[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C12N 5/08 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01805699.7

[45] 授权公告日 2009 年 5 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 100491397C

[22] 申请日 2001.1.26 [21] 申请号 01805699.7

[30] 优先权

[32] 2000. 1.26 [33] US [31] 09/491,894

[86] 国际申请 PCT/US2001/002588 2001.1.26

[87] 国际公布 WO2001/055216 英 2001.8.2

[85] 进入国家阶段日期 2002.8.27

[73] 专利权人 雷文生物技术公司

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 李荣皓

[56] 参考文献

EP－0856520 1998.8.5

EP－0488470A1 1992.6.3

审查员 周 霞

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 3 页 说明书 40 页 附图 4 页

[54] 发明名称

产生人单克隆抗体的方法及组合物

[57] 摘要

本发明提供了产生人单克隆抗体，特别是对特定细胞类型代表性表面抗原特异的人单克隆抗体的方法。 本发明也包括通过本发明方法产生的单克隆抗体群，含有编码能结合目的细胞类型代表性抗原的该免疫球蛋白或其片段的序列的多核苷酸群。

1.一种产生与非胚胎细胞的细胞表面抗原发生免疫反应的人单克隆抗体的方法，包括:

（a） 将非转化的人 B 淋巴细胞和已经被固定化的携带细胞表面抗原的细胞接触，并允许一个或多个非转化的人 B 淋巴细胞特异性地结合携带细胞表面抗原的固定化细胞，其中所述固定化细胞表面无血清;

（b） 除去未结合的 B 淋巴细胞，由此选择与携带细胞表面抗原的细胞特异性地结合的非转化人 B 淋巴细胞; 和

（c） 在有利于 B 细胞增殖的条件下培养（b）中选择的 B 淋巴细胞，以产生大量非转化 B 细胞克隆; 由此产生与细胞表面抗原起免疫反应的人单克隆抗体。

2. 根据权利要求 1 的方法，进一步包括:

（d）从（c）的非转化 B 细胞克隆中分离包含编码人单克隆抗体重链抗原结合片段的序列的多核苷酸;

（e）从（c）的非转化 B 细胞克隆中分离包含编码人单克隆抗体轻链抗原结合片段的序列的多核苷酸; 和

（f）表达（d）和（e）的多核苷酸以产生人单克隆抗体或其抗原结合片段。

3. 根据权利要求 2 的方法，进一步包括产生编码选自双特异性抗体、嵌合抗体、Fab、F（ab'）2、单链 V 区片段（scFV）和融合多肽的多肽的多核苷酸，其中该多肽包含步骤（f）中产生的抗原结合片段，并且其中融合多肽包含与化学功能性部分缀合的抗原结合片段。

4. 根据权利要求 3 的方法，其中所述部分选自信号肽，增强免疫反应性的因子，有利于与固相载体偶联的因子，疫苗载体，生物反应修饰剂，毒素，可检测的标记和药物。

5. 根据权利要求 4 的方法，其中增强免疫反应性的因子是细菌超级抗原。

6. 根据权利要求 4 的方法，其中有利于与固相载体偶联的因子选自生物素和抗生物素蛋白。

7. 根据权利要求 4 的方法，其中生物反应修饰剂是细胞因子。

8. 根据权利要求 7 的方法，其中细胞因子选自肿瘤坏死因子、白细胞介素 2、白细胞介素 4、白细胞介素 12、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子和 γ-干扰素。

9. 根据权利要求 4 的方法，其中可检测的标记选自酶、放射性部分和发光部分。

10. 根据权利要求 1 的方法，其中细胞表面抗原是生物学或化学化合物。

11. 根据权利要求 1 的方法，其中细胞表面抗原是选自受体配体和细胞表面受体的细胞蛋白。

12. 根据权利要求 1 的方法，其中细胞表面抗原被提呈在完整细胞表面上。

13. 根据权利要求 12 的方法，其中细胞是真核细胞。

14. 根据权利要求 2 的方法，其中在宿主细胞中一个或多个基因递送载体表达所述多核苷酸。

15. 根据权利要求 14 的方法，其中基因递送载体选自病毒载体、脂质体和质粒。

16. 根据权利要求 14 的方法，其中宿主细胞是真核细胞。

17. 一种产生与特定非胚胎细胞类型代表性细胞表面抗原特异性结合的人单克隆抗体群的方法，包括:

（a） 将非转化的人 B 淋巴细胞和所希望的特定细胞类型的固定化细胞接触，并允许一个或多个非转化的人 B 淋巴细胞特异性地结合所述固定化细胞，其中其中所述固定化细胞表面无血清;

（b） 除去未结合的 B 淋巴细胞，由此选择与所述特定类型细胞特异性结合的非转化人 B 淋巴细胞; 和

（c） 在有利于 B 细胞增殖的条件下，培养（b）中选择的 B 淋

巴细胞，以产生大量非转化 B 细胞克隆，由此产生对特定细胞类型代表性细胞表面抗原显示结合特异性的人单克隆抗体群。

18. 根据权利要求 17 的方法，进一步包括:

（d)分离包含编码由大量非转化 B 细胞克隆产生的人单克隆抗体群重链或轻链抗原结合片段的序列的多核苷酸群；和

（e）表达该多核苷酸以产生人单克隆抗体或其抗原结合片段的多肽群。

19. 根据权利要求 17 的方法，其中细胞以单层形式生长。

20. 根据权利要求 17 的方法，其中细胞是成年动物来源的。

21. 根据权利要求 17 的方法，其中细胞是外胚层、内胚层或中胚层来源的。

22. 根据权利要求 17 的方法，其中细胞生长在无血清培养基中。

23. 根据权利要求 12 或 17 的方法，其中所述细胞感染了选自细菌、真菌、病毒和支原体（mycroplasma）的微生物。

24. 权利要求 1 的方法，其中细胞表面抗原是人细胞表面抗原。

25. 权利要求 17 的方法，其中特定细胞类型代表性的细胞表面抗原是特定人类细胞类型代表性的人细胞表面抗原。

产生人单克隆抗体的方法及组合物

技术领域

本发明属于免疫学的领域。特别地，本发明涉及人单克隆抗体的产生，特别是对特定细胞类型代表性表面抗原特异的人单克隆抗体的产生。体现在本发明中的组合物和方法对于产生具有重要诊断和／或治疗潜力的人单克隆抗体是特别有用的。

本发明的背景

Kohler和Milsterin发现鼠杂交瘤具有分泌抗预先确定抗原的特异单克隆抗体的能力，这在临床免疫学领域开创了一个新的纪元。这样的杂交瘤细胞系的克隆筛选和永生性确保了它们抗体的单克隆性，单一特异性和永久可用性。然而，因为鼠单克隆抗体常常导致不期望免疫应答的内在免疫原性，所以它在对人的临床应用中有严重的限制。例如，当用鼠单克隆抗体的治疗剂量给药免疫能力的人患者时，患者产生了抗鼠免疫球蛋白分子的抗体；这些人抗鼠的抗体中和了治疗抗体，而且能引起急性毒性。因此人们期望产生没有这样缺陷的抗体。

由于大量的原因，在实践上人单克隆抗体的产生一直是困难的。首先，用目的免疫原免疫人类是不实际的。已产生的人的抗体一直是以外来可用的脾脏存在为基础的。虽然，已研究出了产生具有期望抗原结合特异性的人单克隆抗体的四种可选地方法，但是它们也有显著的缺点。第一种方法涉及产生嵌合抗体的重组DNA技术的应用。通过融合人免疫球蛋白重链和轻链的不变区和确保抗原结合特异性的非人抗体的可变区，产生了这样的抗体。虽然因此产生的嵌合部分异种抗体比用一个全部的异种抗体实质上是更有用的，但是它仍然有大量的缺点。可变区和不变区的鉴定、分离和连接需要相当大的工作。此外，源于一个物种的不变区和源于另一个物种的可变区的连接可能改变可

变区特异性和亲和力，以至于失去了可变区期望的属性。而且，在可变区中，有对物种特异性的框架和超变序列。这些框架和超变序列可引起不期望的抗原反应。这个方法的一个变化是用对应的人序列置换非人的抗体的抗原结合结构域外的残基（WO 94／11509）。再一次，这样的方法需要大量工作量。

人单克隆抗体产生的第二个方法是异种鼠的应用，如在美国专利号：5，814，318 和美国专利号：5，939，598 中所说明的一样。这些遗传工程鼠能表达某些没有重新排列的人重链和轻链免疫球蛋白基因，和被失活的它们内源免疫球蛋白基因。尽管"异种鼠（xenomouse）"代表了一个产生人抗体的可替代系统，但是它未必完全模拟鼠的免疫系统：首先，免疫球蛋白的所有组成部分在鼠中还没有被复制；第二，内源的免疫球蛋白基因的不完全失活可能产生嵌合抗体；第三，期望单克隆抗体的鉴定通常涉及传统的杂交瘤技术，接下来需要广泛的筛选和亚克隆大量杂交瘤，以便于鉴定期望抗体。

产生人单克隆抗体的第三个方法是噬菌体展示文库的构建。用取自于人外周血细胞所有组成部分的 mRNA 提取物进行这个方法，接着是包括优选地所有免疫球蛋白可变区序列的 cDNA 文库的构建。然后，cDNA 被插入进噬菌体，在噬菌体中显示作为 Fab 片段的免疫球蛋白可变区。理论上，如果噬菌体文库足够大，通过淘选抗目的抗原的噬菌体，分离显示期望 Fab 片段的特定噬菌体是可能的。然而，这个方法通常仅仅对于实质上纯化抗原是适用的，而对于抗原的混合物，如在细胞上表达的大量这些表面抗原是不适用的。

最后，已经利用永生化 B 细胞产生单克隆抗体。这个方法涉及如下步骤：(a)分离 B 细胞富集的外周血淋巴细胞；(b)用 EBV-病毒转化 B-细胞，或用永生化人淋巴母细胞瘤细胞融合，接着对显示期望抗原结合特异性的 B-细胞转化体或杂交瘤进行大量筛选。B-细胞转化体本身是一种无效的方法，最多产生 0.1-10％稳定的转化体，因此具有期望特异性的大多数 B-细胞在用做随后筛选过程的库中被丢失了。尽管科研人员（例如，Abe，Tsutomu et al，in EP 0218158）通过用目

的抗原在体外免疫／活化，曾经试图富集表达期望免疫球蛋白的B-细胞群，但是在非特异性B-细胞在这个过程中也增殖的意义上说，活化是无效的。这样，特异性B-细胞的鉴定很大程度上取决于最后的筛选阶段，在这个期间，检测大量转化B-细胞克隆的结合抗原的能力。如前面提及的方法一样，这个方法费时，费力，而且不适于高生产能力抗体的筛选和产生。

因此，非常需要产生人单克隆抗体的可替代途径。

本发明的概述

本发明的主要方面是设计应用于人单克隆抗体产生的有效筛选技术。这个技术允许特异性抗体产生，同时花费小的精力。它对于与特定细胞类型代表性抗原发生免疫反应的大规模人单克隆抗体群的产生是特别有用的。与上述涉及杂交瘤和／或永生化B细胞产生的方法区别的是，本发明的方法利用了非转化B细胞，而且产生了具有抗体产生和／或编码抗体基因的分离所需的抗原结合特异性的扩大的非转化B细胞克隆。

具体地，本发明提供了产生与期望抗原发生免疫反应的人单克隆抗体的一种方法，这个方法包括：（a）提供分离的包含大量非转化的人B淋巴细胞的人淋巴细胞群；（b）筛选特异与期望抗原结合的非转化的人B淋巴细胞；（c）在有利于B细胞增殖以产生大量可产生与期望抗原发生免疫反应的人单克隆抗体的分离的非转化B-细胞克隆的条件下，培养（b）的B淋巴细胞；而且（d）可选地分离非转化B细胞克隆。

在一个方面，筛选非转化的人B淋巴细胞包括：在有利于B淋巴细胞与期望抗原特异性结合的条件下，用期望抗原接触人淋巴细胞群，而且将与期望抗原结合的B淋巴细胞与未结合的B淋巴细胞分离。

在另一个方面，上述概括的方法进一步包括：（e）从（d）的分离的非转化B细胞克隆中分离包括编码人单克隆抗体重链抗原结合片段的序列的多核苷酸；（f）从（d）的分离的非转化B细胞克隆中分

离包括编码人单克隆抗体轻链抗原结合片段的序列的多核苷酸；而且（g）表达（e）和（f）的多核苷酸以产生人单克隆抗体或其抗原结合片段。

编码重链的多核苷酸的分离可以先于或随后于，或同时和编码轻链的多核苷酸的分离进行。

在一个单独的方面，被本发明多核苷酸编码的抗原结合片段可以从双特异性抗体，嵌合抗体，Fab，F(ab')2,单链V区片段（svFv）和融合多肽中选择，其中融合多肽包括与化学功能性部分缀合的抗原结合片段。在这个具体实施中，术语“部分”包括信号肽，增强免疫反应性的因子，有利于与固相载体偶联的因子，疫苗载体，生物反应修饰剂，毒素，可检测的标记和药物。

而在另一个单独方面，用在抗体产生过程中的抗原是生物学或化学化合物。抗原可能是细胞蛋白，如受体配体，分泌蛋白，细胞表面受体，胞质蛋白，和核蛋白。在优选的具体实施方式中，抗原是被完整细胞提呈的表面抗原。完整细胞被用于抗原提呈的，优选地，细胞是表面没有血清的真核细胞。

在另一个方面，在宿主细胞中一个或多个基因递送载体表达编码免疫球蛋白或其片段的多核苷酸。适合的基因递送载体包括病毒载体，脂质体和质粒。优选地，宿主细胞是一个具有进行免疫球蛋白或它们的片段翻译后修饰能力的真核细胞。

本发明也提供了产生与特异细胞类型代表性抗原特异性结合的人单克隆抗体群的方法。这个方法包括：（a）提供分离的包括大量非转化的人B淋巴细胞的人淋巴细胞群；（b）筛选与特定细胞类型特异性结合的非转化的人B淋巴细胞；（c）在有利于B细胞增殖以产生大量的非转化B-细胞克隆的条件下，培养（b）的B淋巴细胞，由此产生了显示与特定细胞类型代表性抗原特异结合的人单克隆抗体群。

在这个具体实施方式的一个方面中，这个方法进一步包括：（d）从大量非转化B细胞克隆中分离包含编码人单克隆抗体群重链或轻链抗原结合片段的序列的多核苷酸群；而且，（e）表达多核苷酸以产生

人单克隆抗体或其抗原结合片段的多肽群。

进一步，提供了分离的多核苷酸群和由此编码的多肽。在优选的具体实施方式中，多肽群中的至少一个多肽与化学功能性部分缀合。优选的部分选自信号肽，增强免疫反应性的因子，有利于与固相载体结合的因子，疫苗载体，生物反应修饰剂，毒素，可检测的标记和药物。

而且，本发明的另一实施方式是通过本发明公开的任何一种本发明方法产生的人单克隆抗体群。

附图的简要说明

图 1. A: 在结合淋巴细胞前，人胎儿卵巢上皮细胞单层的显微照片。B: 与人胎儿卵巢上皮细胞单层结合的淋巴细胞显微照片（箭头所指）。C: 与人胎儿卵巢上皮细胞单层结合的 B 细胞的黑白显微照片，箭头指向是被抗 κ 轻链免疫组织化学染色的 B 细胞。D: 6 天培养后，抗 κ 轻链染色的 B 细胞集落彩色显微照片。E: PCR 产物的琼脂糖凝胶分析显示了从扩大的 B 细胞集落中扩增的轻链 cDNA 片段(箭头所指),1-9 泳道代表 9 个不同的集落.

图 2. A: 从被筛选抗人胎儿卵巢上皮细胞系的 B 细胞扩增的 B 细胞集落显微照片。B 细胞用抗 κ 轻链的抗体染色（绿色箭头所指）。注意 B 细胞仍旧与靶细胞结合（用黑色箭头所指）。B: 用含有从体外扩大的特异 B 细胞集落中扩增的 cDNA 插入物的 pTarge T 质粒转染后，表达 κ 轻链的 COS 细胞抗 κ 轻链免疫细胞化学检测的显微照片。

图 3. 示意产生人单克隆优选发明方法的流程图。

图 4. 人免疫球蛋白的免疫组织化学显微照片。A. HPED 细胞与非转染对照 CHO 细胞温育和被免疫组织化学染色人免疫球蛋白。注意在培养物中没有染色。B. HPED 细胞吸附用含有免疫球蛋白重链 cDNA 插入物的 pDisplay 质粒和含有从 B 细胞克隆扩增的免疫球蛋白轻链 cDNA 插入物的 pTarge T 质粒共转染的 CHO 细胞，而且染色免疫球蛋白。注意与 hPED 单层结合的 CHO 细胞对免疫球蛋白显示了强的染色。被箭头指向

的是实例。C.如B组中被转染,与hPED单层结合的CHO细胞,在人体免疫球蛋白免疫组织化学前被 0.1%的辛基苯氧基聚乙氧乙醇(Triton)溶解,因此,仅仅在CHO细胞表面表达及结合在hPED细胞上的人抗体将保留在hPED细胞上,而且被免疫组织化学染色。箭头所指的是实例。

实施本发明的方式

贯穿于本公开中,各种出版物,专利和公开专利说明书通过区别引用被援引参考。这些出版物,专利和公开专利说明书在本发明中作为参考文献被并入本发明公开中 ,以便更充分地说明本发明涉及领域的状况。

定义:

在本发明实践中,除了特别指出,将利用常规的免疫学、分子生物学、微生物学、细胞生物学和重组DNA技术,这些技术是这个领域熟知技术。参看,例如,Sambrook,et al.MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2nd editon (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F.M.Ausubel, et al. eds(1987))系列从书 METHOD IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M.J. MacPherson,B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1998) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, 和 ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney, ed.(1987))。

用在说明书和权利要求书中,除了上下文可以清楚表明外,单数形式“一个”, “那个”包括复数含义。例如,术语“细胞”包括复数细胞,包括细胞混合物。

术语“抗体”或如本发明中所用的指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的抗原结合部分,免疫球蛋白分子即包含特异地与抗原结合(发生免疫反应)的抗原结合位点的分子。结构上,天然存在最简单的抗体(例如IgG)包括四个多肽链,通过二硫键相互连接的两个重链(H)和两个轻链(L)。天然免疫球蛋白代表一个分子大家族,包括几种类型的分子,如IgD, IgG, IgA, IgM和IgE。该术语也包含杂合抗体,

或改变的抗体，和它们的片段，包括但不限定于Fab片段，和Fv片段。已表明可通过天然存在抗体的片段执行抗体的抗原结合功能。这些片段也被称为“抗原结合片段”。被包含在术语“抗原结合片段”内的结合片段例子包括，但不限定于（i）由VL，VH，CL和CH1结构域组成的Fab片段；（ii）由VH和CH1结构域组成的Fd片段；（iii）由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段，（iv）由VH结构域组成的dAb片段（Ward et al.,(1989 Nature 341:544-546)）；（v）分离的互补决定区（CDR）；和（vi）F（ab'）2片段，一种包括在铰链区通过二硫桥连接两个Fab片段的二价片段。而且，尽管Fv片段的两个结构域通常是被两个分离基因编码，但是通过重组方法可制备合成接头，可使它们作为单一的蛋白质链被产生（称为单链Fv（scFv）；Bird et al.(1998) *Science* 242:423-426；和Huston et al.(1988) *PNAS* 85:5879-5883）。这样的单链抗体也被包含在术语“抗原结合片段”内。优选的抗体片段是具有交联它们靶抗原能力的那些抗体片段，例如，二价片段如$F(ab')_2$片段。可供选择地，本身不能交联它的靶抗原（如，Fab片段）的抗体片段能被用于和第二抗体连接，这个第二抗体起交联抗体片段作用，由此交联靶抗原。

抗体可以用本发明所说明的常规技术被分成片段，筛选片段的用途与筛选整个抗体用途所说明的方法是同样方法。免疫球蛋白分子的Fab片段是由免疫球蛋白分子如下部分组成的多聚体蛋白质并具有特异性地结合抗原的能力，其中所述部分包含共价结合在一起的免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链的免疫活性部分。Fab片段可以用本领域公知的方法，用木瓜蛋白酶进行实质上完整免疫球蛋白的蛋白分解消化制备。然而，通过用本发明公开的方法和这个领域任何公知的方法，通过在适合宿主细胞表达免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链的期望部分可以制备Fab片段。

免疫球蛋白分子的Fv片段是由共价结合在一起的免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区的免疫活性部分组成的多聚体蛋白质并具有特异性地结合抗原的能力。Fv片段典型地可以通过用本发明

说明的方法和/或这个领域技术人员公知的其它方法，通过在适合宿主细胞表达免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区的期望部分，来制备。

本发明的抗体进一步包括有期望结合部分的双特异性分子和嵌合分子。脊椎动物的抗体，杂合抗体或嵌合抗体也包含在术语“抗体”内。

术语“单克隆抗体”用在本发明中指有实质上同质的抗体群的抗体组合物。这并不意味在抗体源或抗体制备方法方面受到限制。单克隆抗体是高度特异性的，被定向抗单一的抗原位点。与通常包括抗不同决定簇（抗原表位）的不同抗体的常规（多克隆的）抗体制备物比较，每个单克隆抗体抗抗原上的单一决定簇。

被应用于单克隆抗体或它的抗原结合片段的术语“人”指从如本发明讨论的人 B 细胞中分离的或通过表达编码该单克隆抗体或其抗原结合片段的多核苷酸而重组制备的抗体组合物。

“单克隆抗体群”指大量异质单克隆抗体，即包含可以识别互相不同的抗原决定簇的群体的各单克隆抗体。

如果抗体与抗原结合的亲和力或亲和性比它与其它参照抗原（包括多肽或其它物质）结合的大，则抗体与该抗原“特异结合”。

用在本发明中的“抗原”指被抗体识别和特异结合的物质。抗原包括但不限于肽、蛋白质、糖蛋白、多糖类和脂类；它们的一部分和它们的联合。

术语“免疫原”通常对这个领域技术人员是公知的。它是当免疫原被注射进入适合宿主或在体外用于 B 细胞免疫时，能刺激 B 淋巴细胞产生抗原特异性抗体的抗原。通过这个领域公知的许多技术，可以使一个化合物变得是免疫原性的，包括交联或连接载体以增加效价，与促分裂原混合以增加免疫应答，及和佐剂联合以增加提呈。

应用在用于体外 B 细胞免疫的细胞上的术语“异种的”指该细胞源于基因型不同于受体 B 细胞的实体。例如，异种细胞可以来自不同的种或受体细胞相同种的不同个体。从一个种的个体中得到的胚胎细

胞与相同种的成体是异种的。同样地，异种多核苷酸或抗原是在受体B细胞不存在的分子或结构上与受体细胞中表达的对应物不同的分子。

如果细胞分别衍生于胚胎的三个胚芽层－外胚层、内胚层、或中胚层之一，那么细胞是“外胚层”，“内胚层”或“中胚层”来源的。外胚层是产生表皮细胞和神经系统细胞的外层。内胚层是产生消化管及它相关器官内层的内层，包括但不限胰腺和肝。中层，中胚层产生了几个器官（包括但不限于心脏、肾脏、生殖腺），结缔组织（例如，骨骼、肌肉、腱）和血细胞。

用在本发明中的“淋巴细胞”是特异性识别及对非自身或自身抗原应答的细胞，而且，它负责特异性免疫产生。包含在“淋巴细胞”内的是各种类型的B淋巴细胞和T淋巴细胞。

术语“介质”、“细胞培养基”和“培养基”可替换应用。这个术语指含水的环境，其中真核或原核细胞培养生长。介质包括物理化学的，营养的和激素的环境。当介质基本没有源于任何哺乳动物源的血清（例如源于胎儿牛，马，人，兔的血清）时，细胞培养基是“无血清”的。用“基本没有”意味着细胞培养基包含大约 0-5％之间的血清，优选地大约0－1％之间的血清，而且最优选地大约0－0.1％之间的血清。

“成分明确培养基”指的是包括对培养中细胞生存和／或生长必须的营养和激素需要的培养基，因此培养基的组分是公知的。习惯上，通过添加对生长和／或生存必需的营养和生长因子形成成分明确培养基。典型地，成分明确培养基提供至少一种源于一个或多个下面类别的组分：a)所有必需氨基酸，和通常添加光氨酸的20种基本氨基酸组；b)能源，通常以碳水化合物形式，如葡萄糖；c)低浓度需要的维生素和／或其它有机化合物；d）游离脂肪酸；和 e)痕量元素，其中痕量元素被定义为典型地需要很低的浓度，通常在微摩尔范围的无机化合物或天然存在的元素。可选地，也可以用源于下面任何一个类别的一种或多种组分补充成分明确培养基：a)一种或多种促有丝分裂剂；b)盐和缓冲液，例如，钙、镁和磷酸盐；c）核苷和碱基，例如腺嘌呤

核苷和胸腺嘧啶核苷，次黄嘌呤；和 d)蛋白质和组织水解产物。

“促有丝分裂剂”或“生长因子”是刺激哺乳动物细胞有丝分裂的分子。通常，促有丝分裂剂或生长因子增强了细胞培养中哺乳动物细胞存活和增殖，并是多肽。促有丝分裂多肽可能是“天然的”或“天然序列的”多肽（即，有天然存在的生长因子的氨基酸序列），而不管产生它的方法（即，它可能是从分子内源被分离或通过包括重组技术的合成技术产生），或是其变异体和突变体。优选地，促有丝分裂多肽有人源生长因子，或它的片段的同样的氨基酸序列，非限制性例子包括 erbB 受体家族一个或多个成员的激活因子；在培养基中提高 cAMP 水平的药剂（例如毛喉素、霍乱毒素，cAMP 或它们的类似物）；吸附分子，如神经细胞吸附分子（N-CAM），层粘连蛋白或纤连蛋白；孕酮；神经营养因子，如骨骼衍生的神经营养因子(BDNF)和睫状神经营养因子（CNTF）；神经营养蛋白-3,-4,-5 或-6（NT-3, NT -4, NT -5 或 NT -6）；或神经生长因子，如 NGF-β；血小板衍生生长因子 (PDGF)；成纤维细胞生长因子，如酸性 FGF(aFGF)和碱性 FGF（bFGG）；血管内皮生长因子（VEGF）转化生长因子（TGF），如 TGF-α 和 TGF-β 包括 TGF-β 1, TGF-β 2, TGF-β 3, TGF-β 4, 或 TGF-β 5；胰岛素样生长因子，包 IGF-I, IGF-II 和 des(1-3)-IGF-I (脑 IGF-I)；胰岛素样生长因子结合蛋白质；和激素，如雌激素、睾酮、甲状腺激素、胰岛素和任何一种列在 Mather, J.P. and Roberts, P.E. (1998) “Introduction to Cell and Tissue Culture”, Plenum Press, New York. 的 138-139 页中表 8.2 中的那些促细胞分裂剂。

用在本发明中的“细胞因子”，指的是各种细胞间信号分子（最公知的细胞因子参于哺乳动物体细胞的调节）。大量的细胞因子家族（促进生长和抑制生长作用的）被表征，包括，例如白细胞介素（如 IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9（P40）, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14 和 IL-15）；CSF-型细胞因子，如 GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LIF, EPO, TPO（“血小板生成素”）, TNF-α 和 TNF-β)；干扰素（如 IFN-α, IFN-β, IFN-γ）；

TGF-β家族细胞因子（如TGF-β 1，TGF-β 2，TGF-β 3，抑制素A，抑制素B，活化素A，活化素B），生长因子（如EGF，VEGF，SCF（"干细胞生长因子"或"肯灰因子"））TGF-α，aFGF，bFGF，KGF，PDGF-A，PDGF-B，PD-ECGF，INS，IGF-1，IGF-II，NGF-β）；α-型intercrine细胞因子（如，IL-8，GRO/MGSA，PF-4，PBP／CTAP／βTG，IP-10，MIP-2，KC 9E3）；和β-型 intercrine 细胞因子（如MCAF，ACT-2/PAT 744／G26，LD-78／PAT 464，RANTES，G26，I309，JE，TCA3，MIP-1α，B，CRG-2）；和趋化因子（如 NAP-1 ，MCP-1，MIP-1α，MIP-1β，MIP-2，SISβ，SISδ，SISε，PF-4，PBP，γIP-10，MGSA）。大量其它细胞因子对于这个领域熟练的技术人员是公知的；这些细胞因子的来源、特性、靶和效应子活性已被描述，而且对于许多细胞因子，编码分子的DNA序列是公知的；参考，例如：R. Callard & A . Gearing，The Cytokine facts Book（Academic Press 1994），和其中综述和／或引用的具体出版物，它们以参考文献形式整体被并入本发明中。正如目录如The Cytokine facts Book 中被参考的，通常，编码这样细胞因子的许多DNA 和／或蛋白质序列从序列数据库，如 GENBANK（DNA）和／或SWISSPROT（蛋白质）中也是可以得到的。典型地，虽然基于公开的序列信息也可能合成编码细胞因子的多核苷酸，但是编码这样细胞因子的克隆DNA如质粒一样将已经是可得到的。也可以用这个领域所说明的聚合酶链式反应（PCR）方法得到编码细胞因子的多核苷酸。参考，例如，Mullis & Faloona，Met. Enzymology，155:355(1987)。细胞因子的检测，纯化和表征，包括鉴定对已知细胞类型有效的新细胞因子，也已经在大量出版物和本发明的参考文献说明。参考，例如，Lymphokines and Interferons，1987；和 DeMaeyer，E.，et al.，"Interferons and Other Regulatory Cytokines，"（John Wiley & Sons 1998）。

术语"多核苷酸"，和"核酸"可交替地使用。它们指的是任何长度的，或是脱氧核糖核苷酸，或是核糖核苷酸，或它们的类似物等核苷酸的多聚体形式。多核苷酸可以有公知或未知的任何三维结构，

而且可以起公知或未知的任何作用。下面是非限定性的多核苷酸的例子：基因或基因片段的编码或非编码区，从连锁分析中确定的座位，外显子，内含子，信使 RNA（mRNA），转移 RNA，核糖体 RNA，核酶，cDNA，重组多核苷酸，分枝多核苷酸，质粒，载体，任何序列的分离 DNA，任何序列分离的 RNA，核酸探针及引物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸，如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。如果出现修饰，可以在聚合物装配前或后给予核苷酸结构修饰。核苷酸序列可被非核苷酸组分中断。聚合后，可以对多核苷酸作进一步修饰，如通过连接标记组分。

术语“重组”多核苷酸指基因组，cDNA，半合成或合成来源的多核苷酸，它们或不天然存在，或以非自然排列方式与其它多核苷酸连接。

“核苷酸探针”指在杂交反应中被用于检测或鉴定对应靶多核苷酸的多核苷酸。

“可操作地连接”指的是并置，其中所述的成分处于可使它们以它们期望的方式起作用的关联中。例如，如果启动子序列起始编码序列的转录，那么启动子序列可操作地连接到编码序列上。

“基因”指的是包含至少一个可读框的多核苷酸，可读框被转录和翻译后，能够编码特定的蛋白质。

用在本发明中的术语“分离的”指的是与组分、细胞和其它物质分开的，其中，多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或它们的片段天然通常与之相关。本领域熟练的技术人员显而易见的是，非天然存在的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或它们的片段不需要“分离”以使它与它的天然存在的对应物区别。此外，“浓缩的”、“分离的”或“稀释的”多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或它们的片段是可以和它的天然存在的相对应物区别的，因为，浓度或每体积中的分子数比其天然存在的对应物的更多地“浓缩”或更少地“分离”。

可以在一个绝对的基础上测量富集，如每体积溶液的重量，也可以相对于源混合物中存在的另一潜在干扰物质测量。本发明具体实施

方式的渐增富集是越多越是更优选的。因此，例如，优选 2 倍富集，更优选 10 倍富集，更优选 100 倍富集，甚至更优选 1000 倍富集。通过人工组合方法，如化学合成或重组表达，也能提供分离状态物质。

“疾病相关”基因或多核苷酸指的是与非疾病对照的组织或细胞比较，在衍生于患病组织的细胞中以异常水平或以异常形式产生转录或翻译产物的任何基因或多核苷酸。它可以是变得以异常高的水平被表达的基因；它可以是变得以异常低的水平被表达的基因，其中改变的表达与疾病出现和／或发展是相关的。疾病相关基因也指有突变或遗传变异的基因，这个突变或遗传变异与疾病病因学有关基因直接相关或连锁失衡。被转录或翻译产物可以是已知或未知的，而且可以是正常或异常水平。

用在本发明中的“表达”指多核苷酸被转录成 mRNA 的过程，和／或被转录的 mRNA(也称为“转录物”)随后被翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。转录物和被编码的多肽被统称为“基因产物”。如果多核苷酸衍生于基因组 DNA，表达可以包括在真核细胞中 mRNA 剪接。

应用在个体中核苷酸序列或多肽序列的“差异表达”指与对照中检测到的比较，此序列的过量表达或过低表达。过低表达也包含缺少特定序列的表达，这可用当与对照比较，在测试个体中可检测表达的缺少来证实。

“基因递送载体”定义为能携带插入的多核苷酸进入宿主细胞的任何分子。基因递送载体的例子是脂质体、病毒如杆状病毒、腺病毒和反转录病毒、噬菌体、粘粒、质粒、真菌载体和典型地用在这个领域的其它重组载体，已描述了它们用于在各种真核或原核宿主中表达，而且除了简单的蛋白表达，它们也可用于基因治疗。

“载体”是自我复制的核酸分子，它能转移插入的核酸分子至宿主细胞内和/或之间。这个术语包括主要用于核酸分子插入宿主细胞的载体，主要对核酸分子复制起作用的复制载体，及对 DNA 或 RNA 的转录和／或翻译起作用的表达载体。也包括提供上述一个以上功能的载体。

“表达载体”定义多核苷酸，当它被导入适合宿主细胞中能被转录和翻译成多肽。“表达系统”通常意味包括表达载体的适合宿主细胞，这个表达载体能起作用以产生期望的表达产物。

“宿主细胞”包括个体细胞或细胞培养物，这个个体细胞或细胞培养物能或已是载体的受体或核酸分子和／或蛋白质掺入的受体。宿主细胞包括单一宿主细胞的后代，而且由于自然的，偶然的或有意的突变，后代不必与原始母细胞完全相同（在形态上或在总 DNA 成分的基因组上）。宿主细胞包括体内用本发明的多核苷酸转染的细胞。

“转化”或“转染”指外源多核苷酸插入宿主细胞，而不管用于插入的方法，例如，脂质转染、转导、感染或电穿孔。外源多核苷酸可以作为非整合载体被维持，例如，质粒，或可选地，可被整合进宿主细胞基因组。

“病毒载体”定义为重组产生的病毒或病毒颗粒，它包括或在体内、离体或体外被递送进宿主细胞的多核苷酸。病毒载体的例子包括反转录病毒载体、腺病毒载体、腺病毒相关病载体等等。

术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换地用在本发明中，指任何长度氨基酸的聚合物。聚合体可以是线性或分枝的，它可以包括修饰的氨基酸，而且可被非氨基酸序列中断。该术语也包括已被修饰的氨基酸聚合物；例如二硫键形成、糖基化作用、脂化作用、乙酰化作用、磷酸化作用或任何其它处理，如与标记组分连接。用在本发明中的术语“氨基酸”指天然的和／或非天然的，或是合成的氨基酸，包括甘氨酸和 D 或 L 光学异构体，和氨基酸类似物及肽模拟物（peptidomimetics）。

“配体”指能被受体的配体结合域结合的分子。该分子可以被化学合成，或可以是自然界中出现的。配体可是能刺激受体生物活性的“激动剂”或是抑制受体生物活性的“拮抗剂”。

“细胞表面受体”或“表面抗原”是被锚定在原生质膜上的分子。它们组成了蛋白质，糖蛋白和多糖的大家族，它们不仅做为原生质膜的结构组分起作用，而且做为支配各种生物功能的调节元件起作

用。

用在本发明中的“膜蛋白”包括外周的和整体的膜多肽，它们与包括原生质膜和细胞内细胞器膜的任何细胞膜结合。

用于细胞蛋白质的术语“胞质的”，“核的”和“分泌的”指细胞蛋白质大部分被定位的细胞外和/或亚细胞位置。某些蛋白质是“伴侣蛋白”，能够在细胞的细胞溶质和细胞核间来回转运。

术语“发光”通常用于指由于除了温度升高外任何原因，来自于物质上的发射光。一般地，当原子或分子从“激发”状态移到低能量状态（常常是基态状态），它发射电磁能光子（例如，光）；这个过程常常被称为“放射性衰变”。存在许多激发的原因。如果激发原因是光子，发光过程被称为“光致发光”。如果激发原因是电子，发光过程被称为“电致发光”。更具体地，电致发光由电子直接射入和迁移形成了电子－空穴对、而且随后电子－空穴对复合发射光量子引起。由化学反应引起的发光通常被称为“化学发光”。活的有机体产生的发光通常被称为“生物发光”。如果光致发光是旋转容许跃迁（例如，单态－单态转移，三态－三态转移）的结果，光致发光过程通常被称为“荧光”。典型地，由于通过这样旋转容许跃迁，短暂的激发状态快速回落，结果激发原因除去后，荧光发射不是持续的。如果光致发光是不可旋转跃迁（例如，三态－单态转移）的结果，则该光致发光过程通常称为磷光。典型地，由于仅仅通过这样不可旋转跃迁，长期的激发状态才可以回落，结果激发原因除去后，荧光发射持续很久。“发光标记”可以有上述任何一个特性。

用在本发明中术语“抗原提呈细胞”指表达目的抗原的细胞，目的抗原通过本发明的方法产生人单克隆抗体。抗原优选在细胞表面上表达。抗原可以是细胞天然的，或当它的表达由外源导入的多核苷酸控制时，抗原是细胞的异原的。

“双特异性抗体”。单克隆抗体或抗体片段可掺入到双特异性重组肽中，参见例如，Greenman等，(Greenman, J.,等, Mol. Immunol. (England) 28 (11):1243-54(1991))。在这个例子中，构建了包含通

过硫醚键连接的两个F(ab')的双特异性$F(ab')_2$。当两个完整抗体被连在一起，也可得到双特异性抗体。另一个得到双特异性抗体方法是通过混合源于不同抗体或它们片段的链。这样，双特异性抗体的"左侧"分枝有一个功能，而"右侧"分枝有另一个功能。

"微生物体"是肉眼看不见的生物实体。这些实体组成了低等有机体的大门类，包括但不限于细菌，真菌，病毒和microplasma。

"哺乳动物"是脊椎动物，其特征在于生育后代，而且在它们身体上有毛发。用在本发明中的"哺乳动物"包括，但不限于人，宠物（如狗、猫、兔、大鼠和小鼠等等），农富（如山羊、绵羊和马等等），和运动动物（如狐狸，鹿等等）。

用在本发明的术语"哺乳动物的"指来源于哺乳动物。

与期望抗原发生免疫反应的人单克隆抗体的产生

非转化的人B细胞的制备:

可用在本发明中的非转化的人B细胞广泛分部在源于人外周血、淋巴结、脾脏、肝、骨髓、脐带或其它组织的淋巴细胞中。虽然对于人B细胞的来源没有特定的限制，但是优选使用外周血，因为它容易获得（例如，来自于商业上来源或适合供体），而且含有充足B细胞数量。尽管在他的或她的身体中产生B细胞的任何个体都是可候选供体，但是预先曾被暴露于特定目的抗原，而且可能含有免疫B细胞的那些个体是优选的供体。

能根据这个领域公知的任何一种方法，进行包含在人外周血或其它身体组织中的淋巴细胞提取。代表性方法是密度梯度离心和非B淋巴细胞的免疫亲和除去。当进行密度梯度离心时，样品，如外周血典型地用适合的等渗介质稀释，优选无钙和/或镁离子的介质。然后，稀释的血液被加载到适合的分离介质上，当进行离心时，引起外周血淋巴细胞（PBL）与红血细胞和血小板分离。通常使用的分离介质包括但不限于FICOLL®（从Pharmacia可得到，瑞典），LYMPHOPREP™（密度：1.077g/ml，Nycomed Pharma As，Oslo，挪威）和Percoll（Pharmacia，瑞典）。一旦完成离心，PBLs可从血清和分离培养基

间的分界面处被吸出。纯化的 PBLs 在使用前可保存在低温（例如，液氮中）下。

制备富集 B 细胞的淋巴细胞的替代方法涉及通过与溴化 2-氨乙基异硫脲鎓氢溴化物（AET）处理的绵羊红细胞玫瑰花环形成除去 T 淋巴细胞。这个过程通常通过混合 PBLs 与处理过的红细胞进行，随后通过离心方法在离心介质上把 B 细胞与 T 淋巴细胞分离。

B 细胞进一步的富集可以通过或保留 B 细胞或除去 T 细胞的亲和色谱法，在单克隆抗体包被的培养容器上淘选，磁分离技术，或细胞分选器（如 FACS）完成。两种方法都使用了能区分两种类型淋巴细胞的检测剂。这样的检测剂包括但不限于特异性结合细胞表面分子的肽和糖蛋白，其中细胞表面分子在一种而不是两种类型的淋巴细胞中优先地被表达（如果不是专性地表达的话）。各种 T 细胞特异性标记分子在这个领域是公知的。T 细胞特异性标记分子的非限定性的例子包括 TCR／CD3 复合物，CD2、CD4、CD8 和 CD28。B 细胞特异性标记分子的非限定性的例子包括 CD19、CD20、CD21，HLA-DR，和 B 细胞抗原 36kD。在制备包括大量非转化 B 细胞的淋巴细胞组合物中，上述方法的任何一个，或由此修改的程序可以或单独或以任何联合进行。

由此富集和／或分选的 B 细胞群可用于筛选显示与期望抗原特异性结合的 B 细胞，或可选地，在这样筛选过程前，在体外用期望目的抗原进行免疫／活化。在（a）刺激抗原特异性 B 细胞的产生；和（b）产生具有识别淋巴细胞供体从来没有被暴露过的和／或不能激发强免疫应答的自身抗原或抗原方面，在体外 B 细胞的免疫／活化特别有益的。

非转化的人 B 细胞的体外免疫／活化：

B 细胞体外免疫的步骤通常与确定的和常规的 B 细胞活化技术是一致的。这个过程包括在有利于 B 细胞和目的抗原特异性结合的条件下，用目的抗原接触非转化的人 B 细胞群。尽管引起 B 细胞和目的抗原稳定和特异性相关的任何方法都是可用的，但是 B 细胞免疫优选通过 B 细胞与抗原在“免疫培养基”中共培养进行。一般，抗原被固定

在 B 细胞生长的固体基质上。在本发明的某些具体实施方案中，期望抗原被表达这样抗原的单层细胞提呈。任何能培养生长的细胞都是抗原提呈的侯选细胞。如果希望，能指导目的抗原表达的外源多核苷酸可被导入抗原提呈细胞。

适合于本发明的免疫培养基支持 B 淋巴细胞体外存活，维持它的形态、代谢能力和潜在的细胞分化能力。优选地，使用成分明确培养基，这种成分明确培养基包含在培养中对 B 细胞生存和／或生长必需的营养和激素需要，以致于培养基的成分是公知的。支配哺乳动物细胞体外生存常用的参数在这个领域是公知的。可在细胞培养系统中控制的物理化学参数是，例如，pH，CO_2，温度和摩尔渗透压浓度。常常以被改进以提供最优环境的标准培养基组合物方式提供 B 细胞的营养需要。营养物质能被分成几类：氨基酸和它们的衍生物、碳水化合物、糖、脂肪酸、复合脂质体、核酸衍生物和维生素。除了维持细胞新陈代谢的营养物质外，通常 B 细胞也需要来自于下面组至少一组中的一种或多种激素或促细胞分裂剂：类固醇、前列腺素、生长因子、脑垂体激素、凝集素、佐剂肽及在无血清培养基中增殖的肽激素（Sato, G. H. et al., in "Growth of Cells in Hormonally Defined Media", Cold Spring Harbor Press, N. Y., 1982）。除了激素外，B 细胞在体外生存和生长可能需要转运蛋白，如转铁蛋白（原生质离子转运蛋白），血浆铜蓝蛋白（一种铜转运蛋白），和高密度脂蛋白（一种脂质体载体）。

可用在体外活化过程的免疫原是被期望在人 B 细胞中诱导抗体产生的组合物。各种免疫原的变异在这个领域是公知的。各种类型免疫原非限定性例子包括生物学或化学的化合物，如简单或复合的有机或无机分子，肽、蛋白质、糖蛋白、多核苷酸（如反义寡核苷酸）、核酶和它们的衍生物。大量化合物能被合成，例如聚合物，如多肽和多核苷酸，和基于各种核心结构的合成有机化合物，而且这些也包括在术语"化学化合物"中，此外，各种天然来源，如植物或动物提取物，等等可以用于免疫。

为了产生与特异细胞类型的代表性抗原结合的人单克隆抗体，能利用由这样细胞类型组成的组织，组织培养物或由此衍生的细胞及其后代，从这些资源中任何一个制备的切片或涂片和纯化抗原的样品。此外，细胞膜提取物，胞质提取物，或目的抗原丰富的特定细胞类型的整个细胞也能用于体外免疫。特别有利的是差异地（过量表达或过低表达）表达致病基因的细胞，在不同细胞周期点（G_0，G_1，G_2，M，或 S 期）停滞的细胞，不同发育阶段（成年的或胚胎的）或不同发育起源（例如，外皮层的，内皮层的或中皮层的）的细胞，及被包括细菌，真菌和病毒在内的一种或多种微生物感染的细胞。根据传统组织培养技术，可以建立各种细胞系，这对于在这个领域熟练的技术人员是显而易见的。也可以从公共或私人的保藏中得到。最大的保藏代理机构是美国典型培养物保藏中心（http://www.atcc.org），它提供了衍生于大量生物体和组织样品的各种很好地被鉴定特性的细胞系保藏。

目的细胞类型的代表性抗原可是下面类别的一个或多个：受体配体、分泌蛋白质、细胞表面受体、胞质蛋白质，或核蛋白质。特有利的是显示限制性组织、细胞类型或亚细胞分布模式的抗原。在这些亚类内，具有主要诊断和／或治疗潜能的抗原是参与特异性生物过程，包括但不限于细胞循环调节，细胞分化，细胞凋亡，趋化性，细胞运动性和细胞骨架重排。其它类型有治疗潜能的抗原包括与特定疾病或特定疾病阶段相关的抗原。这样的抗原包括但不限于与自身免疫疾病、肥胖症、高血压、糖尿病、神经元和／或肌肉变性疾病、心脏病、内分泌紊乱，它们的任何联合相关的抗原。

为了产生针对特定细胞类型的细胞表面抗原的单克隆抗体，期望用活的和完整的所述类型细胞，优选用表面没有血清的那些细胞免疫非转化的 B 细胞。用在补充血清的培养基中繁殖的细胞免疫可能有显著的缺点。血清是许多小和大生物分子与不明确活性的极其复杂的复合物。已知许多种类这些血清生物分子粘附细胞表面。这些生物分子包括但不限于转移蛋白（如，白蛋白）、结合和伸展因子（例如，胶

原蛋白和纤连蛋白），及各种血清脂质。这些外源分子吸附到细胞表面不仅引起与不代表特定细胞类型的分子起交叉反应的抗体产生，也能掩蔽天然抗原提呈，因此进一步逐渐损毁由此产生的单克隆抗体库的 代表性”。

为了确保细胞表面没有血清，细胞通常生长在成分明确培养基上，这种成分明确培养基缺少血清，但是用激素、生长因子或对于特定细胞类型生存和／或生长必需的任何其它因子补充。在这个领域中配制用于特定细胞类型的成分明确培养基的步骤已是很明确的，因此在本发明中没有详述。（Barnes, D. and Sato, G. (1980) *Anal, Biochem.*, 102:255; Mather, J.P. and Roberts, P.E. (1998) “Introduction to Cell and Tissue Culture”, Plenum Press, New York）。

与目的抗原特异性结合的非转化 B 细胞的筛选:

在筛选显示期望抗原结合特异性的 B 细胞前，用分离剂预处理富集的 B 细胞群或活化的 B 细胞，分离剂破坏细胞聚集，而且把结合抗原从 B 细胞表面上除去。当应用分离剂时，采取预防措施维持 B 细胞膜完整性和保护细胞膜的组分。不同于传统的通过强蛋白分解酶如丝氨酸蛋白酶、胰蛋白酶作用分离锚定细胞或细胞层的方法，通常是通过对细胞表面分子最小化破坏的试剂从培养基质中分离本发明的非转化 B 细胞。这些试剂包括但不限于胶原蛋白酶、dispases、和中性蛋白酶。用这些试剂处理 B 细胞主要是引起聚集的破坏，同时保护细胞表面的免疫球蛋白。分离细胞聚集或从固体基质上脱离锚定细胞所需的处理时间可以随着选择的蛋白酶而变化，但是正常地将是约 3－60 分钟时间，而且优选大约 15－30 分钟。正常地，酶处理在大约 37℃的室温下进行。可以通过用含有生理学范围 pH 和盐浓度的缓冲液，或无血清介质轻轻冲洗除去过量的酶，无血清介质是被这个领域熟练的技术人员常规制备的。

与期望抗原起免疫反应的 B 细胞的随后筛选包括下面步骤: （a）在有利于 B 淋巴细胞和期望抗原特异性结合条件下，用期望抗原接触包含 B 细胞的人淋巴细胞群; 而且（b）将结合期望抗原的 B 淋巴细胞

与没有被结合的 B 淋巴细胞分离。典型地，通过在固体基质上层叠抗原，接着在抗原层上平铺 B 淋巴细胞进行这个过程。接着在生理学条件下，B 淋巴细胞可结合抗原，其中 pH 被维持在 6 和 8 之间，温度在约 20℃－40℃间。通过冲洗、吸取或任何其它适合方法除去没有被结合的 B 淋巴细胞。

这个方法的变化是扣除筛选。例如，在筛选特异性结合结肠癌细胞时，人淋巴细胞所有组成成分与单层正常细胞温育。展示抗正常结肠癌细胞的抗体的那些 B 细胞将结合细胞单层。收集没有被结合的 B 细胞，与结肠癌细胞单层温育。这次，仅仅产生特异性识别结肠癌细胞的单克隆抗体的 B 细胞将结合，而且可以洗去非特异性 B 细胞。

当在筛选方法中利用表达期望抗原的完整细胞时，典型地，在无血清培养基中生长的单层活细胞以大约 5％到 100％的铺满在固相基质上接种。抗原提呈细胞被接种其上的基质可由各种材料制造。基质选择主要由细胞类型决定。大多数细胞能在由例如玻璃、塑料或陶瓷材料制造的基质上增殖。对于某些细胞类型，如神经元，上皮和肌肉细胞，优选用增强细胞粘附和伸展的带电物质预先包被基质。常用的包被材料包括带净正电荷的生物基质。生物基质非限定性的例子包括细胞外基质／粘附蛋白，如层粘连蛋白、纤连蛋白、胶原蛋白或合成多肽，如多聚赖氨酸。各种非生物基质，如由硝化纤维、尼龙、聚四氟乙烯，或任何其它植入材料制成的膜也可被用于支持无血清培养基中细胞的生长。

接种单层抗原提呈细胞后，接着，非转化的人 B 淋巴细胞悬浮液被加入细胞单层中，在大约 37℃温育适合的时间。可使 B 细胞通过它们表面免疫球蛋白的特异性识别结合它们特异性抗原所需的温育期间可随着 B 淋巴细胞和抗原提呈细胞的相对丰度而变化。正常地，它将是大约 10－120 分钟的期间，而且优选大约 30－60 分钟的期间。一旦完成温育，通过无 Ca^{++}/Mg^{++}缓冲液冲洗，从单层抗原提呈细胞中除去没有被结合 B 淋巴细胞。通过离心收集洗下的游离 B 淋巴细胞，然后用 UV 辐射。培养中，UV 处理的 B 淋巴细胞在 3 天内死亡，而且被用

做筛选的 B 淋巴细胞随后克隆生长的饲养细胞。结合在单层抗原提呈细胞上的保留B细胞是在它们细胞表面表达期望免疫球蛋白的B细胞。这些细胞被命名为 筛选的B淋巴细胞”。

筛选的 B 淋巴细胞的克隆扩增:

在克隆扩增前，用实质上保护细胞生活力的适合方法从抗原分离筛选的 B 淋巴细胞。优选的从抗原脱离出 B 细胞的方法是用如上所述温和蛋白酶处理。为了产生筛选的 B 细胞的分离群落，分离的细胞以低密度平铺在培养基中，培养基不仅支持非转化 B 细胞的生存，也支持它的增殖。适合 B 细胞克隆扩增的培养基包括对于维持细胞生长必需的营养和激素的需要，所述细胞生长倍增至少 2 倍，优选 3 倍以上，更优选 5 倍以上。正因为如此，非转化的人 B 细胞分离群落在本发明中指细胞簇，包括从具有期望抗原结合特异性的单一 B 细胞衍生的至少 2 个后代细胞，优选 8 个后代细胞，更优选 32 个后代细胞。能支持非转化 B 细胞所需克隆扩增的非限定性示例的培养基包括 MEM、DMEM、RPMI、F-12，这些培养基包含细胞新陈代谢所需的补加成分，如谷氨酰胺和其它氨基酸、维生素、矿物质和有用的转运蛋白，如转铁蛋白等等。培养基也可以包含防止酵母、细菌和真菌污染的抗生素。细胞培养适合的抗生素包括但不限于青霉素、链霉素、庆大霉素和潮霉素。虽然，可选择地，培养基可含有 1－10％源于牛、马科动物、马、鸡等等的血清，但是优选用本发明所述补加了至少一种生长因子或促细胞分裂剂的成分明确培养基。优选的促细胞分裂剂包括商陆促细胞分裂剂、胰岛素、IL-2、IL-4、IL6、IL10、抗 CD40／CD-40 配体。通常培养基中加入约 1pg/ml 到 0.1mg/ml 间浓度范围的生长因子。通常大约 1ng 到 10ug/ml 间浓度是足够的。可以容易地进行简单滴定试验以测定特定生长因子的最优浓度。

除了上述细胞培养因子外，可以利用饲养细胞促进非转化的人 B 细胞克隆扩增。用在本发明中 “饲养细胞”是提供 B 细胞繁殖和共刺激功能的辅佐细胞。可以通过这个领域公知技术获得饲养细胞，如外周血单个核细胞，例如，通过白细胞去除术（leukaphoresis），这个

方法是具有最小风险的标准医用方法（参见，例如 Weaveer et al.，(1993) Blood 82: 1981-1984）；而且，在使用前，这些饲养细胞一直可以通过冷冻保藏贮存。其它例证性饲养细胞类型是EBV-转化类淋巴母细胞(Crossland et al. (1991) *J. Immunol.* 146:4414-20)，骨髓基质细胞、肝基质细胞及 3T3 成纤维细胞细胞系。优选饲养细胞类型是不能结合期望抗原的淋巴细胞，它作为未被结合、游离的淋巴细胞在上述提到的筛选步骤期间被收获。优选地，饲养细胞与待扩增非转化 B 淋巴细胞的比率至少约是 100:1，更优选约是 10^4:1，更优选约是 10^6:1。

通常要阻止本发明的饲养细胞进行有丝分裂。在这个领域中，抑制有丝分裂的技术是很明确的。最常用方法是辐射。例如，在约 5cm-25cm 距离，可以用波长约 220-290nm（优选 254nm）范围的短 UV 波辐射淋巴细胞约 30 分钟。可以用约 3，000 到 4，000 rads 范围的 γ 射线辐射外周血单个核细胞(优选,约 3，600rads)。可以用约 6，000 到 12，000 rads 范围的 γ 射线辐射任何类淋巴母细胞(优选,约 10，000rads)。可以用约 6，000 到 12，000 rads 范围的 γ 射线辐射其它类型细胞。

因为在培养系统中扩增细胞前，B 细胞克隆的抗原特异性是被限定的，所以能用自体同源或异源细胞支持 B 细胞生长。在淋巴细胞供体被如，外周血中存在的病毒感染，因此可能污染 B 细胞培养物的情况下，添加异源饲养细胞是重要的。在这种情况下，可在培养方法中利用这样的异源饲养细胞，这些异源饲养细胞衍生于从被筛选和被美国红十字标准视为适合血液供体的个体。培养非转化 B 细胞克隆的条件应与生理条件接近。培养基的 pH 应与生理 pH 接近，优选 pH 6-8 间，更优选 pH 7 到 7.8 间，最优选 pH 7.4。生理温度范围约 25℃-40℃间。优选地，培养细胞在约 32℃到约 38℃间，更优选地，在约 35℃到约 37℃间。

应用上述常规技术，已产生了表达免疫球蛋白的非转化 B 细胞群，所述免疫球蛋白识别人胎儿脑原代细胞系、人胎儿卵巢细胞系、人肺

癌细胞系 A549，及成人神经鞘细胞系，胚胎胰腺管细胞。

编码期望人单克隆抗体或其片段的多核苷酸的分离和表达

在本发明中具体实施的非转化 B 细胞克隆提供了分离和克隆具有期望结合特异性的编码人单克隆抗体多核苷酸的特定试剂。

结构上，天然存在最简单的抗体（例如，IgG）包括四个多肽链，通过二硫键相互连接的两个重链（H）和两个轻链（L）。人抗体由包括几类免疫球蛋白一个大分子家族组成，如 IgD，IgG，IgA，IgM 和 IgE。通常，两种类型链分别编码。过去的几十年中，编码人抗体组的大量基因已被克隆和测序。广泛的序列分析已表明相同类免疫球蛋白链包含带有组成抗原结合位点的可变区的高度保守的“不变区”。基于各种类免疫球蛋白的存在序列，可用各种重组 DNA 技术分离编码期望免疫球蛋白的免疫球蛋白基因。代表性克隆方法包括 PCR、cDNA 文库构建和筛选、在现存核酸数据库中的同源性查询，或任何它们的联合。常用数据库包括但不限于 GenBank，EMBL，DDBJ，PDB，SWISS-PROT ，EST，STS，GSS 和 HTGS。

分离编码本发明人单克隆免疫球蛋白基因的一个例证性方法包括步骤：（a）从本发明非转化 B 细胞克隆中提取核酸；（b）合成编码期望抗体或其片段重链或轻链的 cDNA；（c）扩增 cDNA 产生足够量用于亚克隆和／或基因表达的 DNA。

根据这个领域标准方法或本发明例示方法（实施例 6），可提取在非转化 B 细胞克隆中的核酸。例如，根据 Sambrook et al.，(“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Second Edition, 1989)中阐述方法，能用各种溶解酶或化学溶液分离 DNA 和 RNA，或通过制造商提供说明书所附的核酸结合树脂提取 DNA 和 RNA。可利用反转录和各种扩增技术进 cDNA 合成。对于本发明目的而言，扩增指利用能以合理忠实性复制靶序列、依赖于引物的聚合酶的方法。

成功扩增的限制性因素是提取充分拷贝的靶序列，以便进行有效和可靠地扩增。在本发明方法中，产生了靶免疫球蛋白基因的充分拷贝，因此，能以较大程度的成功和确定性进行扩增。在初期免疫／活

化步骤中，基于对期望抗原的抗体细胞表面表达筛选选定非转化 B 淋巴细胞。这些选定淋巴细胞没有克隆扩增步骤期间产生的它们后代成熟。这些更成熟的后代细胞以产生和分泌大量抗体为特征，部分原因是在这些细胞中有较多量的 mRNA 拷贝。因此，单一被分离，表达细胞表面抗体不太成熟的 B 淋巴细胞可能有大约 10^3 编码其表达免疫球蛋白 mRNA 的拷贝，而较成熟的 B 淋巴细胞将有 10^5 以上或更多 mRNA 拷贝。在本发明中，在有利于 B 细胞增值条件下培养选择的淋巴细胞，这样产生了持续产生抗体的大量 B 细胞克隆。若本发明克隆扩增步骤产生了例如 20 左右这类成熟 B 淋巴细胞的群落，扩增可用的 mRNA 拷贝能是 2×10^6 以上。根据下面进一步说明的方法，这个数量确保成功扩增和随后期望免疫球蛋白的表达。相比较，成功和可预测地扩增被分离、不太成熟、至多仅有几百 mRNA 拷贝的 B 细胞是极其困难的。同样，成功和可预测地从失去持续产生抗体能力的 B 淋巴细胞克隆中，或从其它有非常低 mRNA 表达水平以致该克隆的抗体产生受到损害的 B 淋巴细胞克隆中扩增 mRNA 是相似地极为困难。可以通过天然或重组 DNA 聚合酶，如 T7 DNA 聚合酶，大肠杆菌 DNA 聚合酶的 Klenow 片段，和/或 RNA 聚合酶，如反转录酶进行扩增。优选扩增方法是 PCR。常用 PCR 方法可在 US. Patent Nos. 4,683195(Mullis)和 4,683,202(Mullis et al.)中学到。然而，用于每个扩增反应的 PCR 条件可用计算机软件程序根据经验确定或估计。许多参数影响反应的成功。它们中有退火温度和时间、延伸时间、Mg2+ ATP 浓度、pH、及引物、模板和脱氧核糖核苷酸的浓度。本发明例证的是复制人轻链和重链的特异性引物和条件（参见实施例 6-7）。

扩增后，由此产生的多核苷酸可用琼脂糖凝胶电泳检测，接着用溴乙锭染色和紫外线照射可见。通过证明扩增的免疫球蛋白基因有预测的大小，显示出预测的限制性消化模式，或与正确克隆的 DNA 序列杂交可证实免疫球蛋白基因的特异性扩增。

包括期望序列、分离的多核苷酸可被插入适合载体中，而且随后载体可被导入适合宿主细胞中。本发明宿主细胞尤其可被用作如编码

特异性人单克隆抗体基因的贮藏所，或产生单克隆抗体的载体。通过这个领域任何公知方法，多核苷酸可被导入宿主细胞。例如，通过直接摄取、胞饮作用、转染、f-接合（f-mating）或电穿孔导入外源多核苷酸可转染宿主细胞。一旦导入，外源多核苷酸能作为非整合载体（如质粒）被维持在细胞内，或整合进入宿主细胞基因组。

本发明提供了多核苷酸群，其编码与特异性细胞类型代表性抗原结合的人单克隆抗体群的链。优选地，细胞是真核细胞，更优选哺乳动物细胞、最优选人细胞。特别感兴趣的其它细胞是差异表达（过量表达或过低表达）致病基因的细胞；显示了细胞周期缺陷（例如在各个细胞周期点包括 G_0，G_1，G_2，M，或 S 期停滞）的细胞;不同发育阶段（成年的或胚胎的）细胞;或不同发育起源（例如，外皮层的，内皮层的或中皮层的）的细胞。

用各种基因递送载体可将各多核苷酸导入适合宿主细胞。本发明所用的基因递送载体包括病毒和非病毒载体，如裸质粒 DNA 或 DNA/脂质体复合物。通常载体分类为克隆和表达载体。克隆载体对于获得其含有的多核苷酸复制拷贝是有用的，或做为在保藏所贮藏将来复活的多核苷酸的方法。表达载体（和含有这些表达载体的宿主细胞）可用于获得从它们含有的多核苷酸中产生的多肽。适合克隆和表达载体包括任何在这个领域公知的，例如，用于细菌、哺乳动物、酵母和昆虫表达系统的克隆和表达载体。在各种表达系统中产生的多肽也在本发明范围内。

尽管共导入宿主细胞的另一个多核苷酸序列能携带筛选标记（例如，编码被载体转染的宿主细胞生存或生长必需蛋白的基因），但是克隆和表达载体通常含有这样标记基因。在筛选条件下，仅仅导入了可筛选基因的宿主细胞将生长。通常筛选基因可：（a）提供对抗生素或其它毒素的抗性，例如，氨苄青霉素、新霉素、氨甲喋呤；（b）互补营养缺陷；或（c）供应从复合培养基中不能得到的至关重要营养物质。适合标记基因的选择取决于宿主细胞，而且对于不同宿主适合的基因在这个领域是公知的。通常，载体也含有被宿主识别的复制系统。

可根据标准技术构建适合克隆载体，或从这个领域可用的大量适合克隆载体中筛选。尽管选择的克隆载体可随着计划利用的宿主细胞而变化，但是通常有用的克隆载体将具有自我复制能力，可有对特定限制性内切酶的单一靶，或可携带标记基因。适合的例子包括质粒和细菌病毒，及穿梭载体如pSA3和pAT28。可从商业销售商，如Clontech, BioRad, Stratagene,和 Invitrogen 中得到这些和其它克隆载体。

含有分离的人免疫球蛋白基因或基因片段的表达载体对于获得产生抗体或抗体片段，如抗原结合片段的载体系统是有用的。它意味这些表达载体在宿主有机体中，或做为游离基因或做为染色体 DNA 整合部分必须是可复制的。适合的表达载体包括质粒、病毒载体，包括腺病毒、腺相关病毒、反转录病毒、粘粒等。适合在真核细胞（包括酵母、禽、和哺乳动物细胞）中表达的大量表达载体在这个领域是公知的。表达载体的一个例子是 pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA)，其中转录是被巨细胞病毒（CMV）早期启动子／增强子驱动的。特别有用的表达载体（系统）是杆状病毒／昆虫系统。在杆状病毒系统表达的适合载体包括 pBackPack9(Clontech)，pPbac 和 pMbac(Strategene)。因为在体外和体内腺病毒载体细胞高水平表达和有效转化，所以腺病毒载体对于导入基因进入体内组织特别有用。

也可修饰多核苷酸以包含可检测标记，例如用于淋巴细胞中核酸和／或相应基因表达检测的酶溶标记或放射性同位素。各种广泛适合的可检测标记在这个领域是公知的，包括荧光、放射性、酶溶或其它配体，如抗生物素蛋白／生物素，它们能给出可检测信号。在优选具体实施中，人们可能希望用荧光标记或酶标签，如脲酶、碱性磷酸酶或过氧化物酶代替放射性或其它的环境不期望的试剂。在酶标签情况下，公知的是比色指示剂底物，能用它提供人眼或分光光度计可见的方法，以识别与含有样品互补核酸特异性杂交。

本发明的多核苷酸能包括附加序列，如相同转录单元中附加编码序列，控制元件，如启动子，核糖体结合位点和多聚腺苷酸化位点、在相同或不同启动子控制下的附加转录单元、允许宿主细胞克隆、表

达和转化的序列，及可期望提供本发明实施方式的结构等任何这类结构。此外，多核苷酸可以与其它期望序列融合以扩大由此产生多肽的免疫反应，或有利于多肽纯化。

本发明多肽包括被上述多核苷酸群编码的免疫球蛋白链或它们片段的群体。优选免疫球蛋白片段包含整个免疫球蛋白序列的部分，但保留抗原结合特异性。特定优选抗原结合片段是单链 V 区片段（“scFV”）。单链 V 区片段通过用短连接肽连接 L 和／或 H 链的 V 区产生。Bird et al.,(1998) *Science* 242:423-426。任何有充分可灵活性和长度的肽都可用作 scFV 的接头。通常选择在宿主细胞中有极少到无免疫原性的接头。接头肽的一个例子是$(GGGGS)_3$，它跨一个 V 区羧基末端和另一个 V 区氨基末端间大约 3.5nm。也可用其它的接头序列，而且其也能提供附加功能，如结合药物或固体载体的手段。

可通过任何联合形式利用 H 或 L 链所有或任何部分。通常，免疫球蛋白的整个 V 区被包括在 scFV 中。例如，L 链 V 区可与 H 链 V 区连接。可选地，L 链 V 区的一部分可与 H 链 V 区或它的一部分连接。可以考虑在 scFV 中 H 链 V 区和 L 链 V 区源于不同的免疫球蛋白。可能构建双相 scFV，其中一个组分源于本发明选择的 B 细胞产生的免疫球蛋白，另一个组分是不同的多肽，如 T 细胞表位。

可通过重组或合成产生 scFVs。对于 scFV 合成产生，可用自动合成仪。对于 scFV 重组产生，含有编码 scFV 多核苷酸的适合质粒可被导入适合宿主细胞中，该宿主细胞或是真核的，如酵母、植物、昆虫或哺乳动物细胞，或是原核的，如大肠杆菌（*E.coli*），而且可用标准蛋白质纯化技术分离多核苷酸表达的蛋白质。

对于 scFV 产生特别有用的系统是在 E.coli 中的质粒 pET-22b(+)(Novagen, Madison, WI)。pET-22b(+)包含由 6 个顺序组氨酸残基组成的镍离子结合结构域，这个结构域可使表达蛋白质在适合的亲和树脂上被纯化。另一个适合载体的例子是 pcDNA3(Invitrogen, San Diego, CA)，如上所述。

表达条件应确保 scFV 采取功能性的，优选地，最优的三级结构。

取决于所用质粒（特别是启动子的活性）和宿主细胞，可能必需调节产率。例如，用弱启动子，或在较低温度下表达，对优化在原核系统中正确折叠的 scFV 产生可能是必要的，优选地，可在真核细胞中表达 scFV。

本发明也包含与化学功能性部分缀合的人单克隆抗体或它的片段。通常，这个部分是可产生可检测信号的标记。这些缀合的抗体是有用的，例如，在靶抗原检测中。大量适合标记在这个领域是公知的，包括但不限于，放射性同位素、酶和荧光化合物。这个部分可被共价连接到抗体上，重组连接，或通过第二试剂如第二抗体、蛋白质 A、或生物素-抗生物素蛋白复合物缀合到抗体上。

其它功能性部份包括信号肽、增强免疫反应性的因子、有利于偶联固体载体的因子、疫苗载体、生物应答修饰因子和药物。信号肽是短序列，通常存在于 N-末端，而且引导源于细胞的蛋白质的分泌。增强免疫反应性的因子包括，但不限于细菌超抗原。有利于偶联固体载体的因子包括但不限于生物素、抗生素蛋白。免疫原载体包括，但不限于任何生理上可接受的缓冲剂。生物反应修饰剂包括细胞因子、特别是肿瘤坏死因子（TNF）、白细胞介素-2、白细胞介素-4、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子和 γ-干扰素。

适合的药物部分包括抗癌剂。这些包括但不限于放射性同位素、长春花生物碱，如长春布宁、长春新碱和长春地辛硫酸盐、阿酶素、博来酶素硫酸盐、卡铂、顺铂、环磷酰胺、阿糖胞嘧啶、甲氨咪胺、duanorubicin 盐酸盐、盐酸阿霉素、足叶乙甙、氟尿嘧啶、环己亚硝脲、盐酸氮芥、左旋苯丙氨酸氮芥、巯基嘌呤、氨甲蝶呤、丝裂霉素、氯苯二氯乙烷、戊咪二氮、双溴丙酰哌嗪、盐酸甲(基)苄肼、链脲霉素、紫杉醇、硫鸟嘌呤和尿嘧啶氮芥。

免疫毒素，包括可通过重组方法产生的单链分子。各种免疫毒素的产生在这个领域是公知的，而且方法可参见，例如，“Monoclonal Antibody-toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet,” Thorpe et al. (1982) *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, Academic

Press, pp 168-190; Vitatta (1987) *Science* 238:1098-1104; 和 Winter and Milstein (1991) *Nature* 349:293-299. 适合的毒素包括但不限于蓖麻毒蛋白、放射性核素、美洲商陆抗病毒蛋白、假单胞菌外毒素 A、白喉毒素、蓖麻毒蛋白 A 链、真菌毒素如局限曲菌素和磷脂酶。一般地，参看“Chimeric Toxins”,Olsnes and Pihl,Pharmac. Ther. 15:355-381(1981)；和“Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy”,eds. Baldwin and Byers, pp. 159-179, 224-266, Academic Press (1985).

本发明组合物的用途

本发明的多核苷酸和基因递送载体有几种用途。例如它们在产生与特异性抗原起免疫反应的人单克隆抗体和它们的片段的表达系统中是有用的。它们做为杂交探针检测生物样品中编码期望人单克隆抗体的免疫球蛋白基因存在是有用的。而且，多核苷酸做为引物完成期望多核苷酸扩增是有用的。本发明多核苷酸在包括疫苗的药物组合物和基因治疗中也是有用的。本发明具体实施的抗体和多核苷酸提供了用于标准诊断方法中的特异性试剂。特别地，它们的免疫反应片段可用在免疫检测中，检测靶抗原。为了进行本发明的诊断方法，本发明组合物之一被提供做为试剂，检测与它起反应样品中的靶抗原。通过从将要测定诊断参数的个体中获得适合生物样品提供靶抗原。相关生物样品是怀疑含有靶的细胞或组织样品。进行免疫检测的方法在这个领域是很明确的，因此在此不详述。

通过本发明方法产生的人单克隆抗体也可有治疗或预防人疾病的用途。单克隆抗体也可用于调节如下靶抗原的活性，该靶抗原在疾病的发育和/或发展中起重要作用。例如，人源化抗-Her2 抗体，商业上可得到，商标是 HERCEPTIN®，它选择性抑制人乳腺癌细胞生长，现在被用做治疗大量过量表达乳腺癌抗原 Her2 的乳腺癌患者。因此，本发明人单克隆抗体也可被检测它们扩大或抑制靶抗原生物活性的能力。

虽然本发明已经公开了源于人细胞的人单克隆抗体，显而易见，

对于这个领域普通技术人员而言，通过本发明公开的技术，本发明也可用于制备源于除了人以外其它哺乳动物的单克隆抗体。

下面实施例提供了本发明代表性单克隆抗体的制备、表征和用途。这些实施例并不意味着以任何方式限制本发明。

实施例

实施例 1: 外周血淋巴细胞的分离

从国家血液库(National Blood Bank)得到的“血沉棕黄层”中分离人淋巴细胞。“血沉棕黄层”用 1 体积无 Ca^{++} / Mg^{++}的 PBS 稀释。稀释的血沉棕黄层在每 50ml 离心管中 10ml LYMPHOPREP™ 分离介质(密度: 1.077g/ml, Nycomed Pharma As, Oslo, Norway）中被仔细分层，20℃，800g 离心，30 分钟。离心后，当红血细胞沉淀在离心管底部时，淋巴细胞在 LYMPHOPREP™溶液中形成了白色带。收集淋巴细胞到新鲜离心管中，用 PBS 洗两次。每个制备中淋巴细胞的产量在 $3-5 \times 10^8$ 间。分离的淋巴细胞或立即用于特异性 B 细胞筛选，或与抗原 / 目的抗原培养约 24-48 小时后用于特异性 B 细胞筛选。

实施例 2: 体外用目的抗原免疫 / 活化 B 淋巴细胞

通过这个方法，在筛选前用抗原活化特异性 B 细胞。上面分离的淋巴细胞在体外用免疫介质（F12/DMEM，用 10μg/ml 胰岛素，10μg/ml 转铁蛋白，10nM 硒，3nM 孕酮，2.5mg/ml 商陆促细胞分裂剂，10ng / ml IL-2 补充）稀释到浓度为 10^7 细胞 / ml。细胞然后平铺在对其形成单克隆抗体的单层细胞上。我们用人胎儿脑初级细胞系（primary cell line）、人胎儿卵巢细胞系、人肺癌细胞系 A549(ATCC 保藏号 CCL185），及成人神经鞘细胞系。

用前述用于鼠神经上皮细胞的修改方法，从妊娠 8 周的胎儿脑中培养人胎儿脑初级细胞系。参见，例如，Li, R.H. et al. *Endocrine* 15 205-217(1996)。在用胰岛素（5μg/ml，Sigma cat. No. I0259）、转铁蛋白（10μg/ml ，Sigma cat. # T4132）、硒化钠（10nM, Sigma cat. # S5621）、孕酮（3nM, Sigma cat. #P0130）、α-维生素 E、毛猴素（3μM, Calbiochem, cat. #344270）、表皮生长因子（10ng/ml,

Life Technologies, cat. #13247051）、牛血浆纤连蛋白 10μg/ml（Sigma cat. # F1141），及 30%神经鞘细胞的条件培养基补充的无血清培养基 F12/DMEM 中在层粘连蛋白(Life Technologies, cat. #23017015)包被平板上保存细胞。

用在待决美国专利申请 09/545,659 中公开方法得到人胎儿卵巢细胞系，这个申请全部内容作为整体并入了参考文献中。

通过这个领域普通技术人员，利用下面在 Li, et al. *Journal of Neuroscience* 16: 2012-2019 (1996)中概述方法获得成人神经鞘细胞系。

实施例 3: 筛选有期望抗原结合特异性的非转化 B 细胞

在筛选抗特定抗原的 B 淋巴细胞前，在无血清培养基中用 0.25%胶原酶/dispase 与淋巴细胞一起温育 30 分钟，以清洁淋巴细胞表面。为了减少 B 细胞选择性结合期间的细胞聚集，并除去结合在 B 细胞表面的抗原，特别对于在体外免疫期间曾暴露给抗原的细胞，这步是重要的。然后用无血清介质洗细胞两次除去残留的酶。计数洗净的细胞，在无血清介质中稀释密度为 10^7 细胞/ml，准备进行淘选。

在无血清培养基中以大约 5%到 100%的铺满接种单层细胞进行筛选过程。加淋巴细胞悬浮液到单层中，37℃温育 1 小时，使 B 细胞通过它们表面免疫球蛋白的特异性识别与它们的特异抗原结合。每约 15 分钟，轻轻进行搅拌培养物以混合细胞。温育后，用无 Ca^{++}/Mg^{++} 的 PBS 从靶细胞单层中冲洗除去游离淋巴细胞，收集，1500rpm，离心 10 分钟。

通过暴露于 UV 辐射 35 分钟杀死游离淋巴细胞，其中用短波 UV（254nm）30 分钟，在 10cm 距离内用 UVGL-58。培养中，UV 处理的淋巴细胞在 3 天内死亡，而且用做筛选的 B 淋巴细胞克隆生长的饲养细胞。经过冲洗结合在靶细胞单层上的保留 B 细胞是在它们细胞表面有特异性免疫球蛋白的 B 细胞。这些细胞被命名为"筛选的 B 淋巴细胞"。然后，在 37℃，通过在有 0.02%EDTA 的 PBS 中温育 15 分钟，细胞和靶单层细胞一起从培养皿中被释放。收集细胞，用无血清培养基冲洗。

实施例 4: 筛选的 B 细胞的克隆扩增

在用胰岛素(10μg/ml),转铁蛋白(10μg/ml),硒(10nM),孕酮(3nM),商陆促细胞分裂剂(2.5μg/ml), IL-2(10ng/ml)和灭活的胎儿牛血清(5%)补充的F12/DMEM培养基中,在96孔组织培养微量滴定板上接种筛选的 B 细胞。胎儿牛血清的添加是可选的。这个培养基可支持筛选前以前激活的 B 细胞克隆扩增。在一个 96 孔板上接种每 10^8 起始淋巴细胞筛选的 B 细胞。对于从淋巴细胞库中筛选的,没有被抗原预先选择活化的 B 淋巴细胞,添加饲养细胞,饲养细胞或是用 UV 辐射的淋巴细胞(10^6 细胞/孔),或是人肝脏基质细胞。两种饲养细胞都支持 B 细胞增殖。在 37℃, 5% CO_2 中培养细胞。3 天后,培养基被改变一半。在培养末期,通常是 6-10 天,或固定培养物进行免疫组织化学,或用培养物进行总 RNA 提取。

实施例 5: 免疫组织化学

进行免疫组织化学分析确定扩增的非转化 B 细胞保持有产生抗体的能力。2500rpm,离心 96 孔板上的培养物 10 分钟。小心除去培养基,立刻用乙醇(-20℃)固定,空气中干燥。然后,室温下,在 100% 乙醇中,用 3% H_2O_2 处理固定的培养物 30 分钟以灭活内源过氧化物酶活性,接着用 PBS 轻洗 3 次除去残余 H_2O_2。培养物与用 10% 胎儿牛血清和 0.1% 吐温 20 在 PBS 中以 1: 100 比例稀释的缀合人 κ 轻链抗体的辣根过氧化物酶(Sigma, Cat# A7164)温育。室温下温育 2 小时后,用 PBS 洗培养物 3 次,用新制备的 Milli-Q 水洗两次。最后,用在 pH5.05, H_2O_2(0.003%)的乙酸钠缓冲液中制备的辣根过氧化物酶底物二氨基联苯胺(1mg/ml)与培养物温育 5 分钟。在温育末期,用水洗培养物,在显微镜下检查。表达 κ 轻链的 B 细胞被染成红褐色。计数含有 κ 轻链阳性集落孔数和每孔中阳性细胞数。结果表明不同制备中,含有 κ 轻链阳性集落孔比例变化很大,从 0 到 95%。变化取决于淋巴细胞的单个供体,因此是预料中的。集落平均大小是约 20 个细胞。最大集落有 100 个细胞。

实施例 6: 免疫球蛋白基因的分离

用 Qiagen Mini-spin 总 RNA 分离试剂盒从培养物每个孔中提取总 RNA。最后洗脱物体积是 30μl。或用轻链反转录引物（ctc tcc cct gtt ga），或用重链反转录引物（agt ttt gtc aca aga）（1μM），在 4.6μl 总 RNA 样品，20mM Tris，pH8.3，100mM KCl，5mM $MgCl_2$，1mM 每种脱氧核糖核苷酸（dATP，dTTP，dCTP，dGTP），25 单位 RNA 酶抑制剂，和 10 单位 AMV 反转录酶组成的 10μl 反应混合物中，用第一条链 cDNA 合成试剂盒合成第一条链 cDNA。在设定为 37℃、10 分钟，42℃、60 分钟，99℃、10 分钟热循环仪中进行这个反应。

用简并引物（gga gaa ata gtg atg ac(c/t/g) cag(t/a)ct c），1 单位 Taq 聚合酶，和 1 单位 DNA 聚合酶的 Klenow 片段合成第二条轻链 cDNA 链。37℃下进行反应 10 分钟，然后以每分钟 2℃速率升高温度到 50℃，最后 72℃1 分钟。用加入扩增引物（tca ctc tcc cct gtt gaa gct ctt）和 50μl 的 10mM Tris，pH8.3，50mM KCl，1.5mM $MgCl_2$ 反应混合物稀释液，通过聚合酶链式反应完成轻链扩增。95℃、30 秒，63℃、60 秒，72℃、20 秒，进行 45 个循环 PCR。在循环末期，最后延伸可在 72℃下进行 7 分钟。PCR 产物在 Tris-硼酸 EDTA 缓冲液中 0.1％琼脂糖凝胶上，在 75 伏电压下分离 5 小时。预测的轻链产物大小是约 630bp。

重链的合成和扩增与轻链相似。在第二个链合成期间，引物（ct cag tgt cag atc ctc a(c/t)c atg g）被退火到重链起始密码子位点。对于 PCR，用扩增引物（tca agt ttt gtc aca aga ttt ggg ctc aa）。热循环仪设定与轻链是同样的。

实施例 7：PCR 产物的克隆

扩增的 DNA 产物进行凝胶电泳。切下预测大小的 cDNA 条带，用 Qiagen 凝胶纯化试剂盒纯化。立刻用购自 Promega 的 TA 克隆试剂盒，连接重链 cDNA 到 pTarge T 载体上，4℃过夜。对于轻链，通过第 2 轮 PCR 连接信号肽 cDNA（所用引物：atg gaa acc cca gct cag ctt ct c ttc ctc cta cta ctc tgg ctc cca gat acc act gga gaa ata gtg atg ac 和 tca gtt gaa gct ctt tgt gac）到 5'-端（prime），而且

再一次用凝胶纯化试剂盒纯化产物。最终产物被连接到 pTarge T 载体上。转化连接产物到大肠杆菌的 J109 株系中，而且接种在 LB／氨苄青霉素／x-Gal/IPTG 平板中。在 37℃过夜培养平板。正常地，每个平板产生几百个白色克隆。

实施例 8: 免疫球蛋白 cDNA 在哺乳动物细胞中的表达

pTarge T 载体含有允许在哺乳动物细胞中表达 cDNA 插入物的 CMV 启动子，进行原核表达的 T7 启动子，及编码 G418 抗性的 neo 基因。为了证实来源于 B 细胞的免疫球蛋白 mRNA 被成功扩增和克隆进 pTarge T 质粒，从生长在上述每个 LB 平板上约 200 个白色菌落库中提取小量制备质粒 DNA。然后，用 Gibco BRL 的脂质转染胺试剂转染质粒 DNA 进入 COS 细胞。简而言之，在 100μl F12 DMEM 中稀释 1μg 质粒 DNA，而且在 100μl F12／DMEM 中稀释 5μg 脂质转染胺试剂。为了制备转染混合物，两种溶液立刻被混合在一起，室温下放置 15 分钟。然后用 800μl F12／DMEM 稀释混合物，涂层在有 50％铺满的 COS 细胞单层上，用无血清培养基冲洗。在 37℃，COS 细胞与转染混合物温育 4 小时。然后除去转染混合物，用无血清培养基冲洗细胞一次，用具有 10％血清的 F12／DMEM 饲养。24 小时后，用 PBS 洗培养物，用乙醇固定，进行培养物的免疫细胞化学。

一旦鉴定出表达免疫球蛋白的 COS 细胞，接着，质粒库被再次转染进 COS 细胞以分离特异性集落。用 PCR，抗体检测的原核表达，及哺乳动物表达被用于筛选特异性克隆。当从单独 B 细胞克隆中克隆出重链和轻链时，重链和轻链亚克隆进含有 Fc 片段的载体后，在哺乳动物细胞中共表达重链和轻链以产生或直接作为 Fab，或作为整个免疫球蛋白的人单克隆抗体。可建立连续产生人抗体的稳定细胞系。

实施例 9: 制备抗人胎儿胰腺细胞的人抗体

B 细胞的培养

从血沉棕黄层中通过 LYMPHOPREP™层离心（1500rpm，30 分钟）分离人淋巴细胞。用 PBS 通过 1500rpm，10 分钟离心冲洗淋巴细胞。大约 5 x 10^8 淋巴细胞被加入 hPED 细胞铺满的新鲜平板（100mm 皿）

中，hPED 细胞已在无血清培养基中被冲洗。hPED 细胞是人胎儿胰腺祖细胞，可通过公开在共同待决美国专利申请 09／546，577 中的方法获得人胎儿胰腺祖细胞，这个申请内容作为整体并入参考文献。37℃下，温育培养物 1 小时使得 B 细胞与 hPED 细胞结合。温育后，用 PBS 冲洗细胞培养物平板 5 次以除去游离白血细胞。离心收集游离淋巴细胞，在 10ml 无血清 F12／DMEM 中重悬浮，分在两个 100mm 皿中。放置平板在 Stratalinker（购自 Stratagene 的 UV 连接仪），而且以高能量设置与盖子一起被暴露于 UV 光中 15 分钟。UV 辐射的细胞被用作饲养层，用于结合的 B 细胞培养。通过在 37℃，0.02％ EDTA／PBS 中温育结合的 B 细胞和单层 hPED 细胞 15 分钟，结合的 B 细胞和单层 hPED 细胞被从平板中脱离出来。然后，1500rpm，离心 10 分钟收集细胞，而且涂抹在 3 个 96 孔平板上。每个孔含有 150μl 用 5％牛血清，IL-2（10ng/ml），商陆促细胞分裂剂（2.5μg/ml）及从游离白血细胞中制备的 UV 辐射的饲养细胞补充的 F12／DMEM. 在培养的第 3 天，除去一半培养基（即，从 150μl 总体积中除去 75μl），用同样体积如第 1 天一样培养基取代。在第 6 天，用乙醇固定一个平板，用抗人 κ 链免疫组织化学染色。几乎每个培养孔中都含有 Igκ 集落。在第 7 天，用 Qiagen RNeasy 试剂盒（Cat No. 74104）提供的溶解缓冲液溶解其它两个平板中细胞，并冷冻在-80℃。

从 B 细胞集落中克隆免疫球蛋白 cDNA

从 B 细胞集落中克隆免疫球蛋白基因的测略是基于以细胞表面展示系统。用这个方法，如下面更充分详述的，重链和轻链都是从第一条链 cDNA 中被扩增，第一条链 cDNA 是从 B 细胞集落制备的总 RNA 反转录得到的。通过限制性位点 *Bgl II* 和 *Sal I*，克隆重链进入 pDisplay(Invitrogen cat no. V660-20)。重链 Fd 区域作为融合蛋白表达，包含有血细胞凝集素 A-Fd-myc-PDGF 跨膜结构域（Fd 区域指免疫球蛋白重链从 N-末端到铰链范围）。通过这个策略，重链在 B 细胞表面被展示。然而，轻链作为分泌蛋白在 pTarge T 载体中表达。因此，轻链和重链共表达在细胞表面产生了 Fab。通过宿主细胞与靶

细胞结合证实了 Fab 与它的抗原特异性结合。同时，从细胞表面提取 Fab 融合蛋白检测特异性结合。

更详而言之，用 Qiagen RNeasy 试剂盒（Cat No. 74104）从一个平板中提取总 RNA. 在 10／3／2000, 用 Promega cDNA 合成试剂盒(cat No. A3500）进行反转录。如下制备每个样品的反应混合物:

试剂	体积μl／样品
10 x 反转录缓冲液	2
$MgCl_2$	4
Dntp	2
Rnase 抑制剂 RNasin	1
随机引物	0.5
RNA 样品	9.7
反转录酶	0.8

总反应体积是 20μl, 65℃下变 RNA 样品 5 分钟，使用前立刻在冰上冷却。

反应混合物被放在热循环仪中（Genius 型，Techne 制造），而且参数如下：25℃、10 分钟，42℃、30 分钟，99℃、10 分钟，用 Qiagen 热起始 DNA 聚合酶扩增特异性 cDNA。

如下面表格中所说明制备 PCR 反应混合物:

试剂	体积／样品（μl）
10 x PCR 反应缓冲液	5
25mM $MgCl_2$	1
脱氧核糖核苷酸混合物	1
HHR1	0.5
HHF1	0.5
Taq 聚合酶	0.25
蒸馏水	36.75
源于反转录的模板	5
总体积	50

重链引物组:

HHR1:gccagatctcccgtkgtgcagtcyggrscwgaggtg

HHF1:ttcgtcgacctgtttgtcacaagatttgggctcaa

其中，y=c 或 t，w=a 或 t，s=c 或 g，r=a 或 g，k=t 或 g.

用 Gibco BRL 常规制备引物. 在热循环仪上进行 PCR，其中在 95℃起始变性 2 分钟，接着 95℃、30 秒，55℃、30 秒，72℃、30 秒进行 45 个循环，最后在 72℃下延伸 7 分钟.

在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳分离产物，用 Qiagen 的凝胶纯化试剂盒（cat. No. 28706）纯化 DNA 片段. 在 50μl EB 缓冲液中洗脱 DNA. 用限制性酶消化纯化的 cDNA 片段. 加下列试剂到 50μlDNA 样品中: 6.5μl 10 x 缓冲液 H 和 5μl *Sal I* (cat no. 567 663, 10 单位/μl)，5μl *Bal II* (cat no. 567 639, 10 单位/μl). 两种酶均购自 Roche Molecular Biochemicals. 37℃温育反应混合物 1 小时. 在反应末期，用 PCR 纯化试剂盒（cat. No. 28106）纯化反应混合物，并用试剂盒提供的 30μl 洗脱缓冲液洗脱.

质粒 pDisplay 购自 Invitrogen. 为了扩增质粒，溶解 20μg 质粒 DNA 于 200μl pH7.0 的 Tris-EDTA 中. 转化质粒进入 JM109 感受态细胞（Promega pTarge T 载体系统 cat. No, A1410），而且涂抹在 LB/氨苄青霉素（100μg/ml）平板中. 筛选单菌落，而且在 25ml 含有 100μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中生长过夜. 用 Qiagen-midi-prep 试剂盒分离质粒 DNA. 在缓冲液 H 中，用 200 单位的 *Sal I* 和 *Bal II* 消化约 100μg 分离质粒 DNA 4 小时. 消化的 DNA 在 1% 琼脂糖凝胶上被分离 2 次，用凝胶试剂盒纯化（Qiagen cat. #2806）. 纯化的 pDisplay *Sal I/Bal II* 片段在分散等份中被分散，用之前贮藏在-80℃.

用 T4 DNA 连接酶（Promega, cat. No. M1794）在供应商提供的连接缓冲液中 10 x（300mM tris-HCl (PH 7.80), 100mM $MgCl_2$, 100mM DTT, 10 mM ATP）连接重链 cDNA 片段到 pDisplay *Sal I* 和 *Bal II*，过夜. 连接的 DNA 转染进入 JM109 感受态细胞，并涂抹在氨苄青霉素

/LB 平板上。背景氨苄青霉素抗性克隆数约 2-3 个克隆,如在同样条件下通过质粒 DNA 单独连接所测定的一样。从每个培养皿中,收集 10 个克隆,生长在 5ml LB/氨苄青霉素中,过夜。用 Qiagen-mini-prep 试剂盒(cat. No. 27106)分离质粒 DNA。

通过两个 PCR 反应扩增轻链 cDNA。第一个循环用轻链引物组进行:ggagaaatagtgatgacbcagwctc,和 tcactctcccctgttgaagctctt,其中:w=a 或 t, b=t 或 c 或 g。凝胶纯化 PCR 产物,在 5'末端结合信号序列进行第二个循环 PCR。所用引物是: atg gaa acc cca gcg cag ctt ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca gtt tca gat acc act gga gaa ata gtg atg ac,和 tca gtt gaa gct ctt tgt gac。热循环仪设定是:起始在 95℃、2 分钟,50℃、3 分钟,72℃、30 秒,接着 95℃、30 秒,55℃、30 秒,72℃、30 秒进行 40 个循环。产物再一次被凝胶纯化,连接到 pTarge T 哺乳动物表达载体上(PromegapTarge T 载体系统 cat. No, A1410)。转化连接到 DNA 进入 JM109 细胞中。在 LB/氨苄青霉素平板上过夜培养后,收集 10 个克隆进行质粒 DNA 小量制备。

筛选特异性抗体

轻链 cDNA 库和它们各自重链 cDNA 共转染 CHO-k1 细胞以表达细胞表面展示的抗体。CHO-k1 细胞系购自 Bio-Whitaker's,并生长在有 5%胎儿牛血清的 F12/DMEM 中。为了转染 35mm 皿 CHO 细胞,从 B 细胞克隆中制备轻链 cDNA 和它们各自重链 cDNA,每轻链 cDNA 和它们各自重链 cDNA 1μg(在 100μl F12/DMEM 培养基中)与 100μl 含有 7μl 脂质转染胺试剂(Gibco BRL cat no. 1081302)的 F12/DMEM 混合。可在室温下放置混合物 30 分钟以形成脂质。然后用 0.8ml F12/DMEM 稀释混合物,加入到已用无血清培养基冲洗过的 CHO 细胞单层中。在除去转染混合物前,转染培养物 4 小时,用 5%胎儿牛血清补充的 F12/DMEM 饲养细胞。

培养 24 小时后,用 PBS 冲洗转染的 CHO 细胞,并在 37℃,用无 $Ca2^{++}$和 $Mg2^{++}$、有 0.02%EDTA 的 PBS 温育 15 分钟。用吸量管轻轻吹打,细胞与培养皿分离。由此产生的细胞悬浮液 1000rpm,离心 10 分钟进

行沉淀。除去上清液后，在无 $Ca2^{++}$，$Mg2^{++}$ ，有 0.02％EDTA 和 0.5％BSA 的 PBS 中重悬浮细胞沉淀。

室温下，生长在 35mm 皿中的单层 hPED 细胞，在 3％蔗糖溶液中 0.125％戊二醛中固定 1 小时。用 PBS 洗固定的细胞 3 次，在 37℃，在 0.1M NH_4HCO_3 溶液的 1％BSA 中封闭 1 小时。再一次在 PBS 中洗固定的细胞。为了检测在 CHO 细胞表面表达的抗体是否与 hPED 细胞结合，加入上面制备的转染 CHO 细胞悬浮液到固定的 hPED 细胞，并在 4℃温育，过夜。非结合的细胞用流动的 PBS 洗去。结合的细胞或立刻被固定在原位置，或在用乙醇固定前，用 PBS 中 0.2％Triton X-100（Sigama cat no. T9284）溶解。固定的培养物再一次在正常羊血清（PBS 中 5％）中被封闭，并在 4℃温育在抗人 IgG(H+L)-过氧化物酶(Southern Biotechnology Associates, Inc., Cat. No. 6005-05, 以 1: 100 稀释）中，过夜。温育后，用 PBS 洗细胞 3 次，用 Milli-Q 水洗 2 次，每次 5 分钟。冲洗后，在室温下，在 0.1M pH5.05 乙酸钠缓冲液和 0.003% H_2O_2 的二氨基联苯胺（1mg/ml, Sigama cat. No. D5637）中温育细胞 20 分钟。检测了从 20 孔 B 细胞扩增的 20 组轻链和重链 cDNA 后，发现 3 组显示了对 hPED 细胞的特异性结合。图 4 是 3# 克隆的一个例子。没有人免疫球蛋白 cDNA 转染的 CHO 细胞系，作为对照，在这个检测中显示了阴性染色（A 图）。用来自于克隆 3# 的轻链和重链免疫球蛋白 cDNA 共转染的 CHO 细胞结合到 hPED 细胞上，对人免疫球蛋白显示了特异性染色（B 图）。为了排除共转染的 CHO 细胞是由于除了在细胞表面人抗体的特异性结合外的机理结合的可能性，在固定前，在 Triton X-100 溶液中溶解结合的 CHO 细胞。因此，仅仅特异性与 hPED 细胞结合的人抗体保留在原位置，而且染成褐色染色（C 图）。在 CHO 细胞表面表达的抗体特异性与 hPED 细胞结合。

图 1

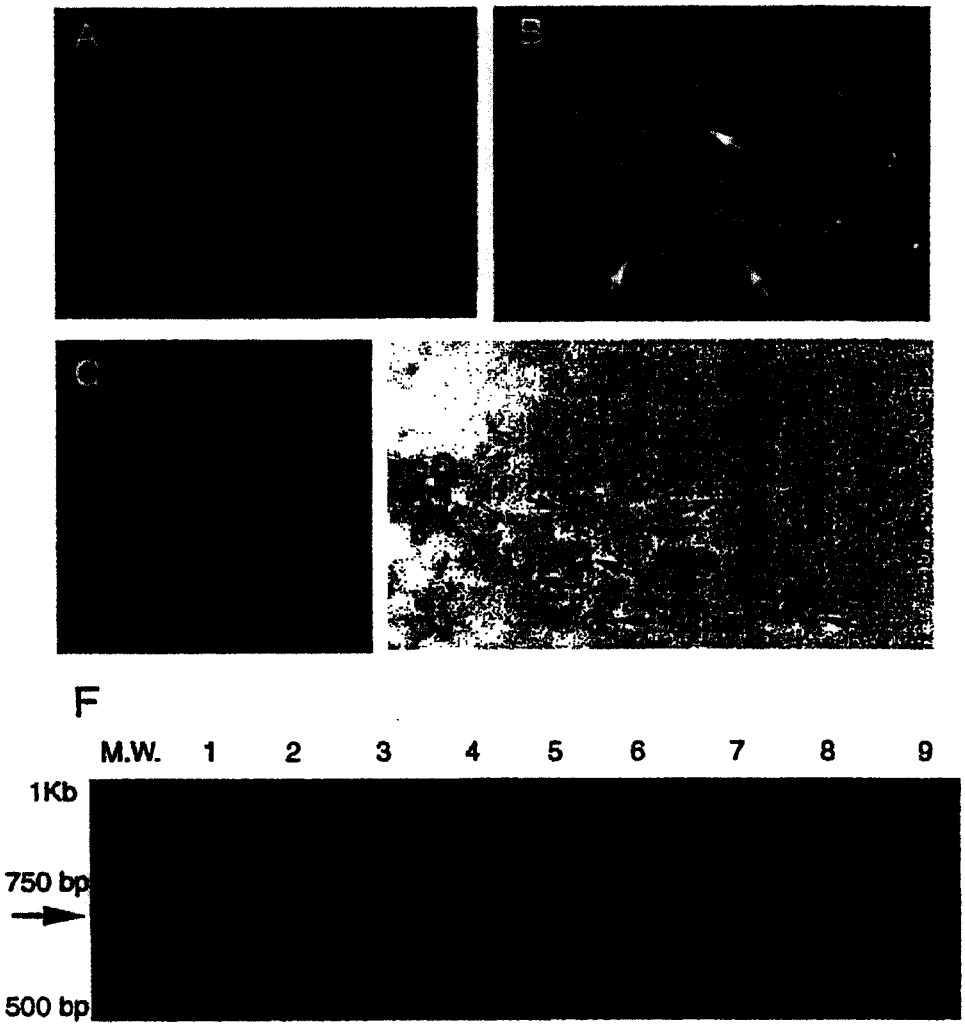


图 2

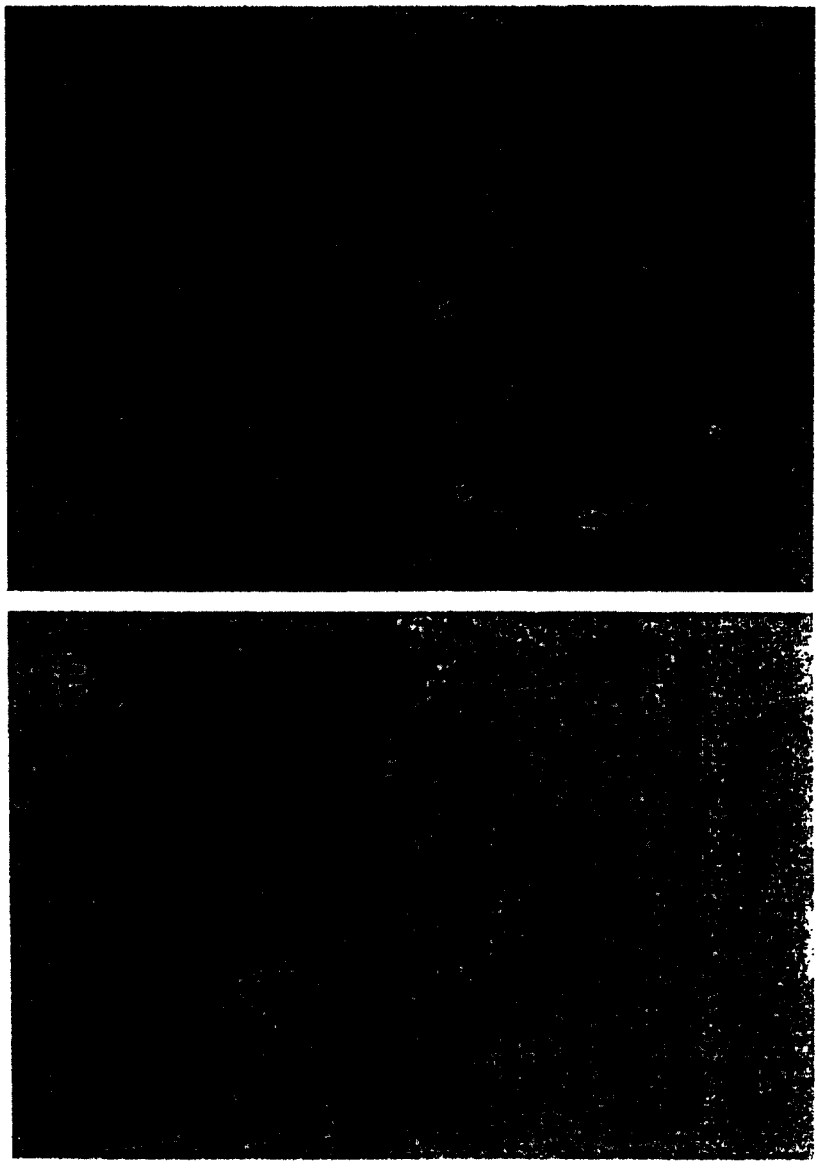


图 3

产生抗细胞表面抗原的人单克隆抗体的流程图

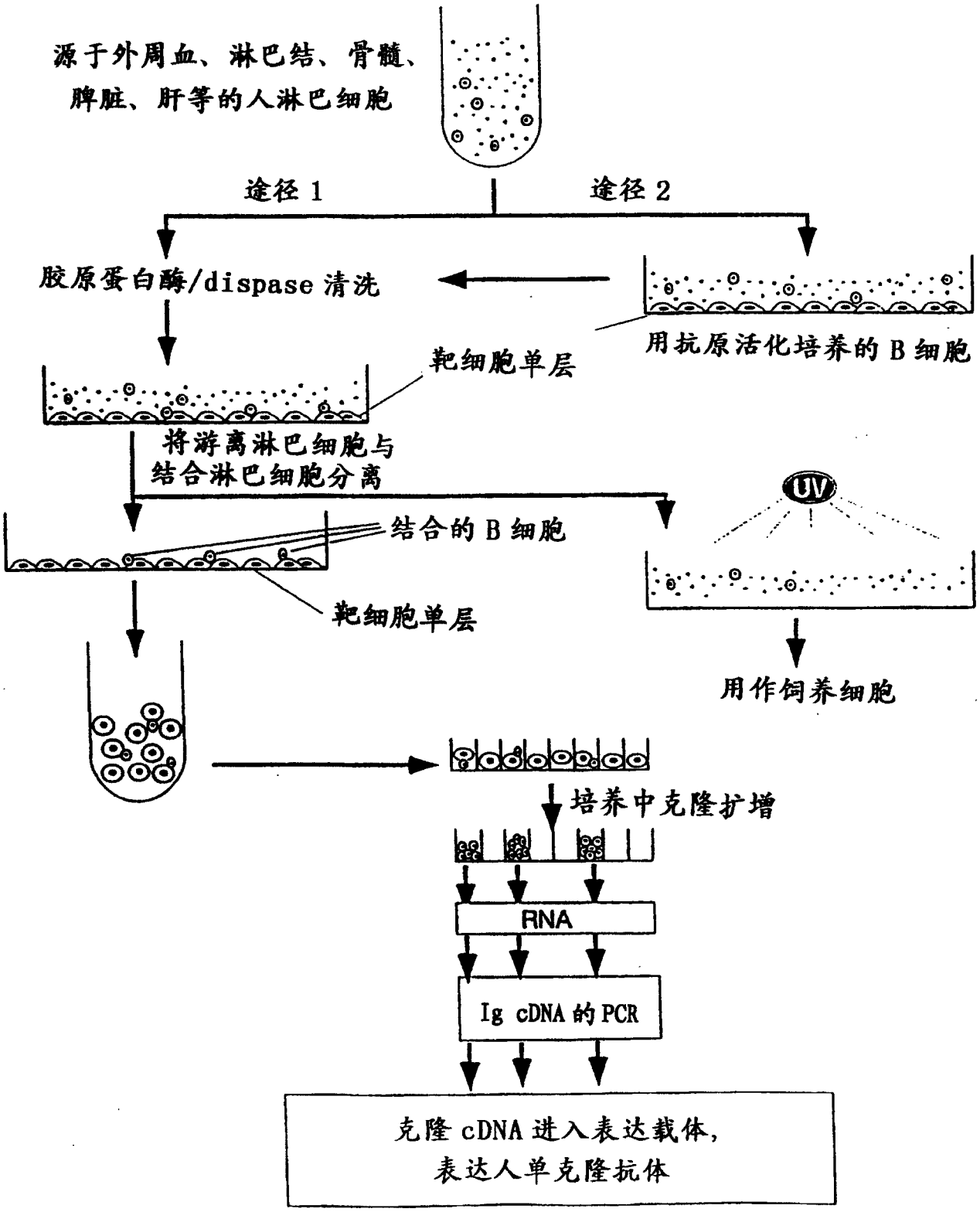


图 4

