

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610119182. X

[51] Int. Cl.

*C07K 16/18 (2006.01)*

*C12N 5/18 (2006.01)*

*A61K 39/395 (2006.01)*

*A61P 7/02 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

[43] 公开日 2008年6月11日

[11] 公开号 CN 101195659A

[22] 申请日 2006.12.5

[21] 申请号 200610119182. X

[71] 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市邯郸路 220 号

[72] 发明人 马端 蔡旭 刘静 彭卓醇  
孔德升 李笑天

[74] 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

代理人 吴桂琴

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 5 页

[54] 发明名称

高抗凝活性抗人组织因子单克隆抗体及其制备方法和应用

[57] 摘要

本发明属生物技术领域，涉及一种高抗凝活性抗人组织因子单克隆抗体及其制备方法和应用。通过对组织因子与 X 因子的结合位点进行生物信息学和抗原免疫原性分析，寻找免疫原性好且包括关系着组织因子与 X 因子结合的关键氨基酸残基的氨基酸序列，制备成组织因子多抗原肽，以此多肽免疫小鼠，制备杂交瘤细胞，获得具有高效抗凝活性的小鼠抗人组织因子单克隆抗体，能在血栓病治疗和与 TF 相关的疾病诊断中发挥重要作用。

- 1、高抗凝活性抗人组织因子单克隆抗体，其特征在于，通过组织因子多抗原肽免疫小鼠，制备杂交瘤细胞，所获单克隆抗体具有高效抗凝活性，所述杂交瘤细胞是TF 4A12。
- 2、如权利要求1所述的高抗凝活性抗人组织因子单克隆抗体，其特征在于所述的组织因子多抗原肽，是利用生物信息学手段对组织因子与凝血因子X的结合位点区域进行抗原表位预测分析，并进行了疏水性、柔韧性及同源性分析，设计特异的组织因子短肽，然后通过化学方法合成。
- 3、如权利要求2所述的高抗凝活性抗人组织因子单克隆抗体，其特征在于，所述的组织因子短肽的氨基酸序列含有21个氨基酸残基，为组织因子181-201序列。
- 4、如权利要求1所述的高抗凝活性抗人组织因子单克隆抗体，其特征在于，所述的组织因子多抗原肽通过下述方法制备：使用9-芴甲氧羰基保护法将权利要求3所述的组织因子短肽氨基酸序列化学合成在球状多聚赖氨酰的表面，使其成为以球状多聚赖氨酰介质为核心的，表面有八个拷贝的多聚赖氨酸组织因子短肽。
- 5、一种单克隆抗体，其特征在于，该单克隆抗体是由权利要求1所述的杂交瘤产生的。
- 6、权利要求1或5的单克隆抗体在制备治疗血栓病药物中的用途。
- 7、权利要求1或5的单克隆抗体在制备诊断与组织因子相关的疾病药物中的用途。

## 高抗凝活性抗人组织因子单克隆抗体及其制备方法和应用

### 技术领域

本发明属生物技术领域,涉及一种高抗凝活性抗人组织因子单克隆抗体及其制备方法和应用。

### 背景技术

正常人体中,血管内的促凝血和抗凝血活性保持着适当的平衡。在动脉粥样硬化、高血压、高血脂、糖尿病等病理因素的影响下,该平衡可能向促凝血方向倾斜,最终导致血栓形成,引起急性心肌梗死、急性脑梗死和急性肺栓塞等危及生命的疾病。因此需要有效、安全的抗凝血剂来治疗特殊的血栓性疾病。

组织因子(tissue factor, TF)是一个跨膜糖蛋白,分为胞外区、跨膜区和胞内区三个部分。在正常生理条件下,TF不和血液接触。只有当血管受损时,暴露于血管内皮下的TF及胶原将导致凝血因子和血小板的活化并随后形成血栓子。TF既是凝血因子VII(FVII)在细胞表面的受体,又是FVII或激活的FVII(FVIIa)的辅因子,能进一步催化激活凝血因子X(FX)和IX,这两种因子分别是内源性凝血途径和凝血酶原复合物的关键成分,可导致凝血酶的快速形成。凝血酶将纤维蛋白原降解为纤维蛋白,后者随之聚合成纤维蛋白凝块。TF广泛存在于动脉粥样硬化斑块的细胞和非细胞成分中,斑块的破裂使其核心中有活性的TF暴露于循环血液,这是造成急性血栓形成的重要原因。

针对动脉血栓性疾病,现有技术已经研制了众多的抗凝血药物,包括肝素类药物、血小板聚集抑制物、凝血酶抑制剂等。上述药物所针对的靶蛋白均位于凝血途径的中下游,理论和实践上都达不到最理想的抗凝效果,且这些靶点蛋白在正常血液循环中,都有一定量的生理浓度,在疾病状态使用这些药物时,由于可能出现过度抑制,因此可能发生出血等不良反应。

虽然人体内存在TF的天然抑制物—组织因子途径抑制物(TFPI),但TFPI不仅能够抑制TF,还有抗炎作用。也就是说,如果使用TFPI治疗血管损伤引起的血栓性疾病,TFPI的抗炎作用有可能成为不良反应。此外,TFPI在血液循环中的半衰期甚短,使用时所需剂量极大。因此,研制TF单克隆抗体即可以克服

TFPI针对性不强和半衰期甚短的缺点，同时也可作为血栓病的治疗提供新的手段。

抗人TF单克隆抗体是否具有抗凝活性，与TF单抗和TF抗原亲和力的强弱关系不大，而是取决于TF单抗是否封闭了TF与相互作用的凝血因子的结合部位。TF与FVII结合形成的复合物除了具有启动凝血途径的作用以外，还具有广泛的信号转导作用，是重要的细胞增殖信号复合物。因此，如果抗人TF单抗阻碍了TF与FVII的结合，可能会导致一系列的生理功能紊乱。如果仅是针对TF和FX结合部位的单克隆抗体则能阻止TF/FVIIa复合物的凝血激活作用，对正常的生理功能影响甚小。

迄今，尚未见有关具有高效抗凝活性的抗TF单克隆抗体的报道。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种新型的具有高效抗凝作用的抗人组织因子单克隆抗体及其制备方法。所述的单克隆抗体是由组织因子多抗原肽（TF-MAP）免疫制备的鼠源单克隆抗体。

本发明的另一目的是提供所述的抗人组织因子单克隆抗体在血栓病治疗和与TF相关的疾病诊断中的应用。

本发明综合应用蛋白质结构生物学、生物信息学、抗体工程等技术，获得了具有高效抗凝活性的抗TF单克隆抗体，能在血栓病治疗和与TF相关的疾病诊断中发挥重要作用。

本发明通过特异的多抗原肽免疫小鼠，制备具有高效抗凝血功能的抗人组织因子单克隆抗体。

本发明首先运用疏水性、柔韧性、同源性和空间结构抗原表位预测分析等方法，寻找并确定了TF与FX相互作用区域的氨基酸序列（TFP）。将此序列采用化学合成的方法在多聚赖氨酸介质进行人工合成，形成TF-MAP。

本发明提供了一种识别人组织因子可预测表位的单克隆抗体。

本发明提供了一种杂交瘤，它产生识别人组织因子可预测表位的单克隆抗体。

本发明的杂交瘤优选TF 4A12。

由本发明的杂交瘤产生的单克隆抗体构成了本发明的一个方面。

### 发明详述：

本发明的单克隆抗体识别人TF抗原。

本发明的单克隆抗体可通过本发明的杂交瘤产生，因此是可以从培养本发明的杂交瘤的培养液或用本发明的杂交瘤免疫小鼠从其腹水中获得。然而，产生本发明的单克隆抗体的方法不受特别的限制，如果基因工程化的抗体能与人TF特异性结合，它也在本发明的范围内。

本发明的杂交瘤产生的识别人TF特异性部位的单克隆抗体，可通过经TF-MAP免疫的动物的脾细胞或淋巴结细胞与骨髓瘤细胞融合获得。

本发明的杂交瘤可以用本领域已知的细胞融合技术产生。因此，用TF-MAP作为免疫原免疫除了人以外的动物，将该动物的脾细胞或淋巴结细胞与骨髓瘤细胞融合，产生杂交瘤，从其中选出识别人TF及TF-MAP的单克隆抗体的杂交瘤，从而获得了本发明的杂交瘤。

所述的TF-MAP中的TFP不受特别限制，可以是来源于FX与TF的结合位点区域—TF<sub>180-240</sub>，经疏水性，柔韧性，同源性以及空间结构的抗原表位预测分析后，满足条件的任何的TFP。

所述的TFP采用化学合成的方法进行人工合成，如Fmoc（9-芴甲氧羰基）保护残基法。

所述的TF-MAP是将TFP化学合成在特殊的介质上，如球型多聚赖氨酰介质。

经免疫产生本发明的杂交瘤的动物不受特别的限制，但包括例如：山羊、绵羊、豚鼠、小鼠、大鼠和家兔。但其中优选的是小鼠。

可用任何本领域已知的方法免疫上述要免疫的动物。在免疫小鼠中，例如，可能提到的方法包括将TF—MAP(约250 μg)与等体积的福氏完全佐剂混合后作为TF抗原，向6—8周龄的Balb / c系雄性小鼠的皮下多点进行免疫，于免疫后第12、25和32日，使用与福氏不完全佐剂混合的TF—MAP，以250 μg / 小鼠的量向小鼠皮下进行追加免疫，作为最终免疫，于第45日以250 μg / 小鼠的量向腹腔内注入用PBS稀释的TF抗原溶液。

本发明的实践中，免疫上述动物后选择抗体滴度高的个体，最终免疫3—5日后切下它们每一只的脾脏或淋巴结，将这些组织中所含的产生抗体的细胞与骨髓瘤细胞，通过本领域已知的细胞融合法，在融合促进剂存在下融合，制备杂交瘤细胞株。

上述融合促进剂不受特别的限制，但包括例如聚乙二醇（PEG），仙台病毒等。然而PEG是优选的。

上述骨髓瘤细胞不受特别限制，但首选SP2/0骨髓瘤细胞。

上述细胞融合方法不受特别限制，但可以包括方法：以1:1—1:10之比混合脾细胞和骨髓瘤细胞，加入分子量为1,000—6,000的PEG至浓度10—80%，在20—37℃，优选30—37℃下孵育该混合物3—10分钟。

在本发明的实施中，产生识别人TF特异性位点的单克隆抗体的杂交瘤的选择，可通过在杂交瘤单独能生长的选择培养基（如HAT培养基）上培养杂交瘤，并采用不同抗原的ELISA法进行筛选，如抗原为TF-MAP、TF<sub>1-219</sub>等。

大量制备本发明的单克隆抗体的方法不受特别限制，方法可以是：例如将杂交瘤移植到预先施用降植烷或石蜡油的小鼠腹腔中，回收腹水并从中获得抗体。可通过本领域已知的方法，用蛋白A柱或蛋白G柱等纯化腹水中的单克隆抗体。

本发明所制备的单克隆抗体进行抗原抗体反应的鉴定方法不受限制，如采用免疫印迹法或细胞免疫荧光实验。

本发明所制备的单克隆抗体进行抗凝活性鉴定的方法不受特别限制，如稀释凝血酶原时间、FX发色底物法等。

本发明利用生物信息学手段对TF的特定活性部位进行局部抗原表位分析，得到来源于FX结合TF的区域的特异短肽TFP，化学合成为TF的多抗原肽，用其来免疫小鼠制备抗TF的单克隆抗体，得到具有高效抗凝活性的抗体TF4A12，从而达到了制备表位可预定的单克隆抗体的目的。纯化后的TF4A12显示出良好的抑制FX激活、抗组织因子等作用。

应用本发明设计的特异短肽TFP免疫小鼠并与骨髓瘤SP2/0细胞融合后，只可能获得本发明中获得的、特异针对TF和FX结合位点的单克隆抗体。

以上技术方案中所有基本分子生物学操作均参照《分子克隆实验指南》。

## 附图说明

图1. TF与FX相互作用部分分子模建图：标记（蓝色和红色）部分是TF与FX结合部位，色深（红色）部分是两者结合的关键氨基酸。

图2. TF180-240的抗原表位预测分析图：A和B是Peptool分析得出的疏水性和柔韧性参数，C是抗原表位在线预测的抗原指数参数。

图3. TFP设计图：框里分别为：FX结合位点；预测的抗原表位；小鼠高度同源MHC序列和TFP的序列。

图4. 小鼠免疫血清效价ELISA检测图：×代表MAP对照血清组，▲代表第一次加强免疫一周后血清组，■代表第3次加强免疫一周后血清组。

图 5. TF4A12 的 SDS-PAGE 鉴定图。

图 6. TF4A12 与 TF-MAP 和可溶性 TF 胞外区 (sTF<sub>1-219</sub>) 结合的蛋白印迹鉴定图: A 图是 TF4A12 和 TF-MAP 的 SDS-PAGE 和蛋白印迹结果, B 图是 TF4A12 和 sTF<sub>1-219</sub> 单体和二聚体的 SDS-PAGE 和蛋白印迹结果。

图 7. 稀释凝血酶原时间法筛选具有高效抗凝活性的 TF4A12 分析图, 虚框是对照组, 实框是 TF4A12 组。

图 8. FX 发色底物法鉴定 TF4A12 的高效抗凝活性分析图: 随着 TF4A12 浓度的增加, FX 活性逐步下降。

图 9. 应用免疫荧光标记的 TF4A12 检测肾小球系膜细胞表达 TF 的情况: 浅色 (出现绿色荧光) 的部位即 TF 表达的部位。

图 10. 应用 TF4A12 进行肺组织化学染色: 深色 (出现棕色) 染色的部位表明有 TF 表达。

## 具体实施方式

下面通过实施例更具体的说明本发明。

### 实施例 1. TF 单克隆抗体的制备

#### (1) TFP 的设计

将 TF 与 FX 的结合位点区域的氨基酸序列 TF<sub>180-240</sub>, 运用 Peptool 软件进行疏水性、柔韧性以及同源性分析, 同时运用 Insight II 软件对其进行空间结构抗原表位预测分析, 另外使用在线抗原表位分析网站 <http://www.genscript.com/> 提供的三种运算法则对 TF<sub>180-240</sub> 进行表位预测分析。在候选序列中寻找免疫原性好且包含 TF 与 FX 结合的关键氨基酸残基的氨基酸序列。由于 TF 与 VII 因子结合的区域面积很广, 且 TF/VIIa 复合物介导了细胞增殖的信号转导, 因此针对 TF 与 FVII 结合区域的单克隆抗体很可能破坏细胞增殖信号的转导。本发明设计的短肽是针对 TF/VIIa 复合物与 FX 或是 FXI 的结合区域, 根据 Daniel 等研究报告, TF/VIIa 复合物与 FX 和 FXI 的结合位点位于 TF<sub>180-240</sub> 位氨基酸之间, 两者在计算机工作站上进行模建的结果见图 1。用上述的方法分析其亲水性分析、柔韧性、抗原性以及空间结构分析结果见图 2。设计出一段特异的 21 个氨基酸短肽 TFP, 见图 3。

## (2) TF-MAP 的制备

多聚赖氨酰球的表面有大量的活性酰基基团,可以同时跟八个氨基酸的氨基进行键合,成为短肽化学合成的母体,短肽的合成方法主要采用 Fmoc 保护法进行合成,氨基酸的  $\alpha$ -氨基被 Fmoc 基团保护,再进行肽键缩合反应进行两个氨基酸的键合,之后对该氨基进行脱 Fmoc 化,洗涤,然后进行新一轮的肽键缩合反应,增加短肽的长度。最后在球型多聚赖氨酰表面形成短肽的八聚体,即 TF-MAP。合成产物为微黄色针状晶体, HPLC 纯度检测为 89%。

## (3) 免疫小鼠

将 TF-MAP(约 250  $\mu$ g)与等量的福氏完全佐剂(Sigma)混合后作为 TF 抗原,以 250  $\mu$ g / 小鼠的量向 6 周龄的 Balb / c 系雄性小鼠(中国科学院上海生化细胞研究所)的皮下分 5 点进行免疫。于免疫后第 12、25 和 32 日,使用与福氏不完全佐剂混合的 TF-MAP,以 250  $\mu$ g / 小鼠的量向小鼠皮下进行追加免疫,作为最终免疫,于第 45 日以 250  $\mu$ g / 小鼠的量向腹腔内注入用 PBS 稀释的 TF 抗原溶液。在第 1 次和第 3 次加强免疫的一周后,取血检测血清抗体效价。对 ELISA 用 96 孔板(Maxisorp, Corning)的各个孔用包被液(0.1M NaHCO<sub>3</sub>, pH9.6)(以下称为 CB)配制成浓度为 5ng/ml 的 TF-MAP 和 TF 胞外区(TF<sub>1-219</sub>)100 $\mu$ l 进行包被,4 $^{\circ}$ C 过夜;每孔 200 $\mu$ l 含有 2% BSA 的 PBS 封闭液,37 $^{\circ}$ C 反应 2h 后;用含有 0.05%的 Tween20 的 PBS (PBTS)洗板 3 次;与不同稀释度的小鼠血清溶液,每孔 100 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h; PBTS 洗板 3 次;加入 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG-HRP, 100 $\mu$ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h; PBTS 洗板 3 次;加入 100 $\mu$ l 邻苯二胺(OPD)显色液显色,50 $\mu$ l/孔 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, WALLC 1420 酶标仪检测 490nm 吸光度,见图 4。

## (4) 细胞融合

最终免疫 3 日后,从 3 只小鼠中制备脾细胞,使用聚乙二醇法与细胞数为脾细胞数 1 / 5 的小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0 融合。将融合细胞悬浮于含有 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基(以下称为 RPMI 培养基)(Gibico),向 96 孔板(每只小鼠 400 个孔)加入细胞(每孔约 400 个细胞)。融合后,第 1、2、3、5 日,通过将一半培养基换成含有 HAT(Sigma)和 condimed H1(Sigma)的 RPMI1640 培养基(以下称为 HAT 培养基)进行杂交瘤的 HAT 选择。

### (5) 杂交瘤细胞筛选

利用下面的筛选法对选择的杂交瘤通过 3 次有限稀释克隆化，两块 96 孔板中每一孔接种 0.9 个细胞。对通过镜检能够确认是单一菌落的孔进行如下给出的 TF-MAP、sTF<sub>1-219</sub> 结合活性的测定，选择克隆。得到的克隆从 HAT 培养基转到 RPMI 培养基中驯化，在确认通过驯化抗体产生能力没有降低的基础上，再次进行有限稀释，进行完全的克隆化。通过以上操作，能够确立能够产生阳性的 TF 抗体 TF4A12 杂交瘤。

### (6) 腹水的制作和抗体的纯化

确立的杂交瘤的腹水的制作按照常规方法进行。即将在体外进行继代的杂交瘤  $5 \times 10^6$  个移植到预先 2 次向腹腔注入石蜡油的 Balb / c 系雄性小鼠的腹腔内。移植后 1—2 周从腹部肥大的小鼠回收腹水。从腹水纯化抗体是使用配备了重组蛋白 A 和琼脂糖凝胶 4 的快速流动层析法 (Pharmacia) 和 Amicon Ultra-15 系统 (Millipore) 进行的。

重组蛋白 A 和琼脂糖 4 的快速流动层析纯化方法按如下操作进行。

将腹水放置冰浴中，边搅拌边逐滴加入等量饱和的硫酸铵至 50% 饱和度，沉淀抗体蛋白；低温离心收集沉淀，0.02M PBS (pH7.4) 溶解后 PBS 透析过夜，依次用 0.4 $\mu$ m 和 0.2 $\mu$ m 滤膜过滤；滤液用 r-Protein A 亲和柱进行亲和层析：以 1ml/min 的流速上样，0.02M PB 洗脱至基线，0.1M glycine/0.5M NaCl (pH 2.5) 洗脱免疫球蛋白，立即用 1M Tris-HCl (pH 8.8/9.0) 中和洗脱液至 pH7.0；用截留分子量为 30KD 的 Amicon Ultra-15 (Millipore, USA) 超滤柱进行 2~3 次超滤，将溶剂置换为 TBS，最终浓缩到大约 1.5ml。用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。

## 实施例 2：TF 单克隆抗体 TF4A12 的鉴定

### (1) SDS-PAGE 的纯度鉴定

应用 Bio-Red 电泳仪系统对 TF4A12 进行 SDS-PAGE 分析鉴定：采用浓度为 12% PAGE 分离胶，进行非还原型电泳；80V 恒压电泳 30min 后，150V 恒压电泳 3h；电泳结束后将凝胶用考马斯亮蓝浸染 2h，脱色液脱色 4h，灰度扫描蛋白条带，得出蛋白初步纯度，结果见图 5。

## (2) 抗体同型的确定

应用小鼠单克隆抗体同型测定试剂盒(Roche)测定 TF4A12, 显示 TF4A12 为 IgG1 型, 轻链为  $\lambda$  型。

## (3) 蛋白印迹鉴定 TF4A12

将 TF-MAP 和 sTF<sub>1-219</sub> 采用浓度为 12% 的 PAGE 分离胶电泳, 50V 恒压电泳 30min 后, 120V 恒压电泳 1.5h; 将 PVDF 膜、滤纸和 SDS-PAGE 凝胶在甲醇中平衡 3min, 在 TBS 中平衡 10min。叠放滤纸—凝胶—PVDF 膜—滤纸, 凝胶靠负极, 膜靠正极, 除尽各层之间气泡。恒压电泳转移 100V×100min。取下 PVDF 膜, 加适量封闭液, 室温轻轻振荡 3h 或 4℃ 过夜。用封闭液按 1:1500 比例将 TF4A12 (一抗) 稀释成工作液, 将 PVDF 膜转入一抗工作液中, 室温轻轻振荡 2h 或 4℃ 过夜。用 TTBS 洗膜 3 次, 每次 10min。将 PVDF 膜转入用封闭液按 1:2500 比例稀释的 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 工作液中, 室温轻轻振荡 1h。用 TTBS 洗膜 3~5 次, 每次 10min。将 PVDF 转入新鲜配制的 HRP 显色液中, 轻轻振荡, 显色至适当深度后立即用大量双蒸水洗膜, 终止显色反应, 结果见图 6。

## (4) TF4A12 效价测定

用 ELISA 法测定提纯的抗 TF McAb 的效价。包被液 (0.05mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 稀释 sTF<sub>1-21</sub> 和 TF-MAP 分别至 5  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ L/孔包被 96 孔酶标板, 4℃ 过夜。用洗涤液 (0.05mol/L PBS-0.05%Tween20 pH 7.4) 洗板 3 次。加 2%BSA-PBS 溶液 200  $\mu$ L/孔, 置 37℃ 1h。用洗涤液洗板 3 次, 加入不同稀释度的 TF McAb, 100  $\mu$ L/孔置 37℃ 1h。洗板 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG, 100  $\mu$ L/孔置 37℃ 1h。洗板 3 次, 加入底物溶液 (邻苯二胺 5mg 溶于 10mL 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液中。临用前 15  $\mu$ L 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 100  $\mu$ L/孔, 置 37℃ 保温 10~30 分钟, 每孔加入 50  $\mu$ L 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 492nm 处测吸光度。

TF4A12 的效价为 1:10<sup>6</sup>。

## (5) TF4A12 亲和力的测定

将纯化的 TF4A12 用 0.15mol/L PBS pH 7.4 稀释至 1.4×10<sup>7</sup>mol/L, 与等体积的 sTF<sub>1-219</sub> (1.4×10<sup>7</sup>mol/L) 混匀, 4℃ 置 18h, 取上述混合液 100  $\mu$ L 至包被有 sTF<sub>1-219</sub> (5  $\mu$ g/mL) 的 96 孔板中, 进行 ELISA 测定。分别测定 sTF<sub>1-219</sub> 存在时的 TF4A12 ELISA A 值和 sTF<sub>1-219</sub> 不存在时的 TF4A12 ELISA A 值 (A<sub>0</sub>), 按下

述公式计算解离常数  $K$ ，亲和常数为  $1/k$ 。 $A_0/(A_0-A)=1+k/a_0$  ( $a_0$ :为抗原的摩尔浓度)。表 1 是 TF4A12 的亲合力测定。

表 1

Mc Ab	$K$ (mol/L)	$1/k$ (mol/L)
TF4A12	$2.0 \times 10^9$	$5.0 \times 10^8$

### 实施例 3: TF4A12 抗凝活性测定

#### (1) 应用凝血酶原时间测定 TF4A12 的抗凝活性

将 TF4A12 杂交瘤细胞用 RPMI 培养基培养至细胞数为  $10^5$ ，更换 CD Hybridoma Medium (Gibco, USA) 培养 7-10 天，收集培养上清。作为待检测抗凝活性样品。

使用市售的正常人血浆(上海市血液中心)，该血浆 25 $\mu$ l 与 5 $\mu$ l 待测样品混合后，于 37 $^{\circ}$ C 下反应 3 分钟，添加 45 $\mu$ l 兔来源的凝血酶原试剂 (Sigma)，用血浆凝固时间测定仪器 (MDC, Germany) 测定直至血浆凝固为止的时间，结果见图 7，显示 TF4A12 具有很好的抗凝活性。

#### (2) 应用 FXa 发色的物活性测定方法测定 TF4A12 抗凝活性

采用 Actichrome<sup>®</sup> TF 试剂盒 (ADI, USA) 检测 TF4A12 杂交瘤细胞分泌单克隆抗体的抗凝活性。在 96 孔板中，每孔依次加 50 $\mu$ l 分析缓冲液 (pH 8.4)，25 $\mu$ l 脂化 TF 标准品 (10pM)，10 $\mu$ l 不同浓度的 TF4A12，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min，加入 25 $\mu$ l 人 FVIIa，25 $\mu$ l 人 FX，37 $^{\circ}$ C 孵育 15min，加入 25 $\mu$ l FXa 发色底物 Spectrozyme, Wallac 1420 酶标仪 (Perkin Elmer, PE) 连续 30min 监测 405nm 吸收值。将 30 分钟内 405nm 吸光度变化作为 TF 的 FXa 产生活性。利用这一方法可以测定抑制 TF / FVIIa 复合物和 FX 结合的抗体的活性，结果见图 8，结果显示 2 $\mu$ g/ml 的 TF4A12 具有抑制 60% 的 FXa 激活。

### 实施例 4: TF4A12 的应用

#### (1) 肾小球系膜细胞表达的 TF 与抗 TF McAb 的免疫荧光反应

将  $10^5$  肾小球系膜细胞接种于直径 3.5cm 的培养皿中，生长至 60% 培养皿面积后，以冰浴丙酮 4 $^{\circ}$ C 固定 8min，PBS 洗 3 次，5min/次，加入 1:100 稀释的 TF4A12，

37℃孵育1h, PBS 洗5min×3次, 加入1:50稀释的山羊抗小鼠FITC-IgG, 37℃孵育 45min, PBS洗5min×3次, 用缓冲甘油密封盖玻片, 在荧光显微镜下观察, 结果见图9, 结果显示TF4A12能识别肾小球系膜细胞上的TF。

#### (2) TF4A12 对小鼠肺组织中 TF 的免疫组化染色

石蜡包埋小鼠肺组织切片经脱蜡透明处理后, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 除去组织中内源性过氧化物酶, 继以 0.1%胰酶消化修复抗原, PBS 洗 2min, 共 3 次, 用 1: 20 的正常马血清封闭, 加入 TF4A12, 置 37℃1h 后 4℃ 过夜再加入生物素化的马抗小鼠 IgG 作为二抗, 以 DAB 作底物显色, 甲基绿复染细胞核。56℃(30min-1h) 烘干后, 二甲苯浸润, 中性树胶封片。结果见图 10, 结果显示 TF4A12 可与小鼠肺组织中 TF 反应。

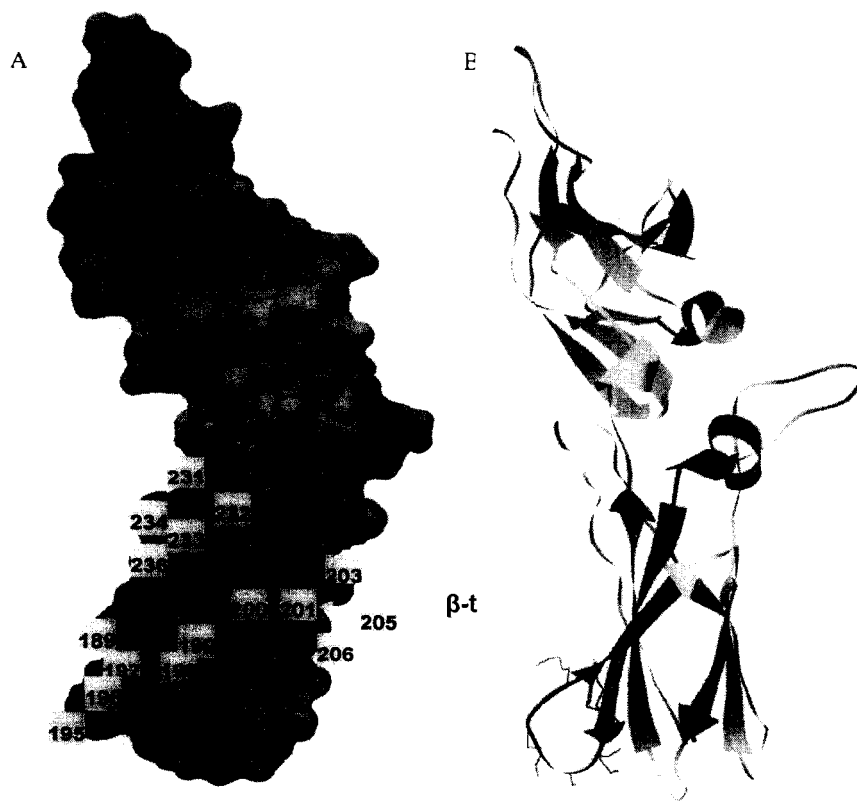


图 1

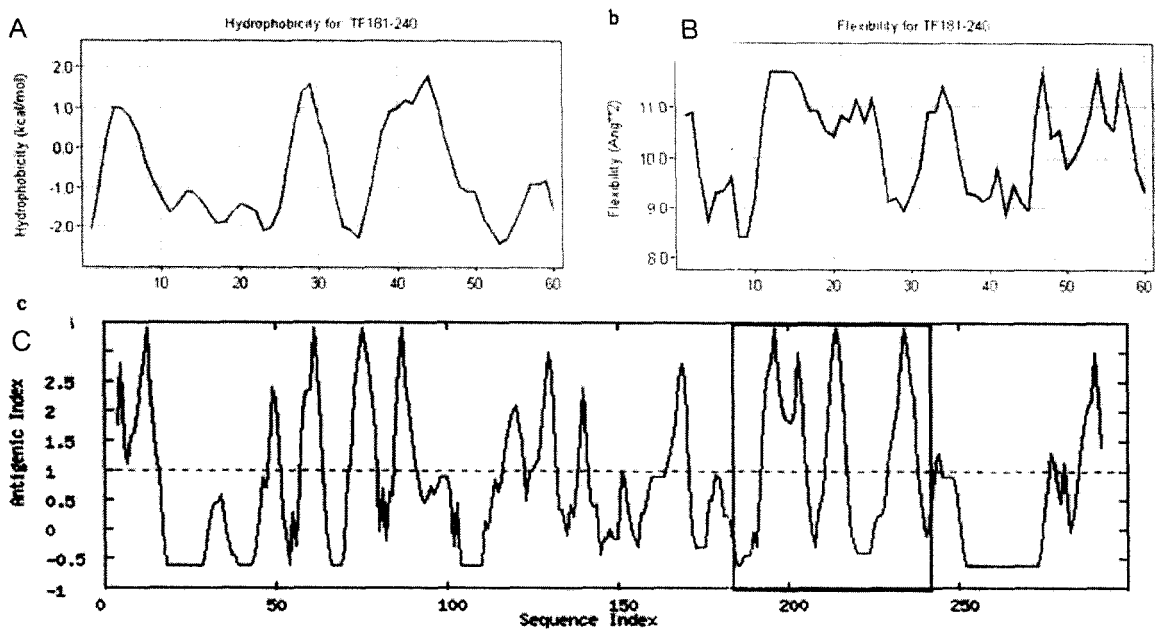


图 2

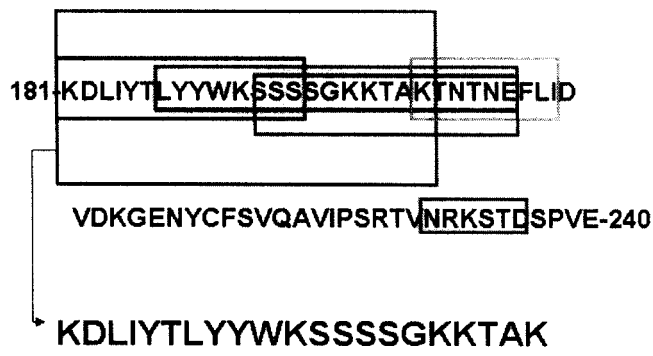


图 3

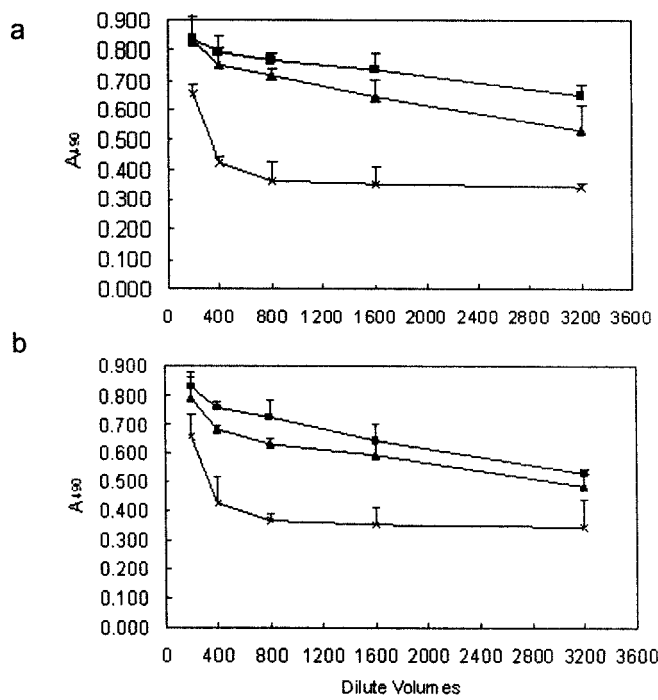


图 4

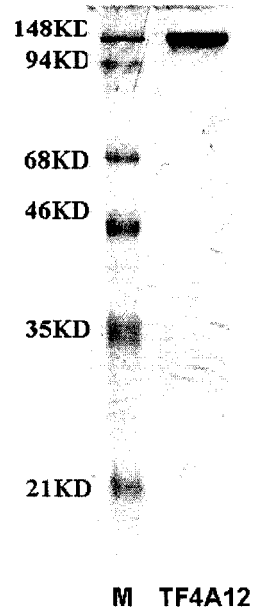


图 5

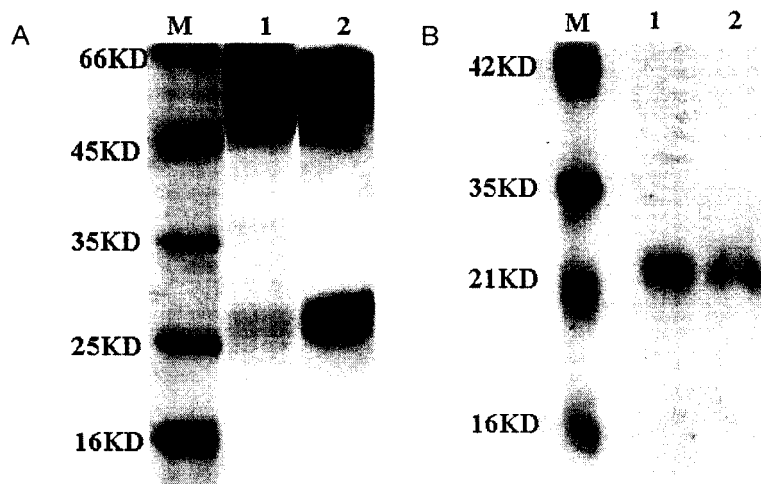


图 6

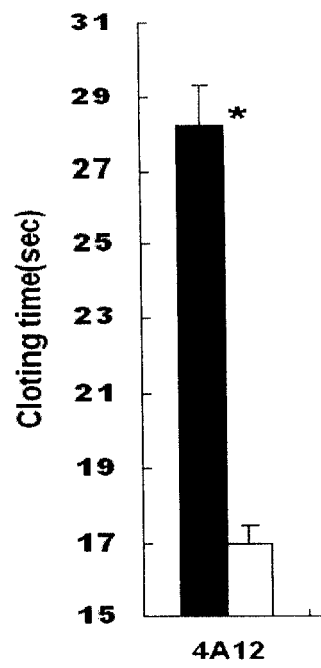


图 7

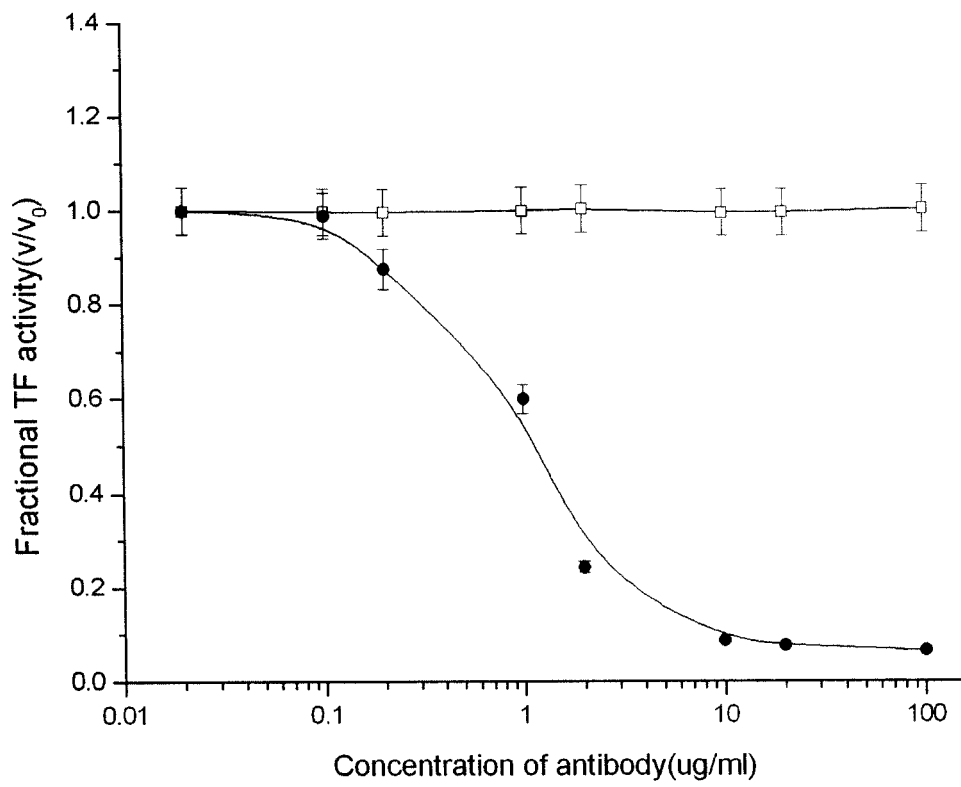


图 8

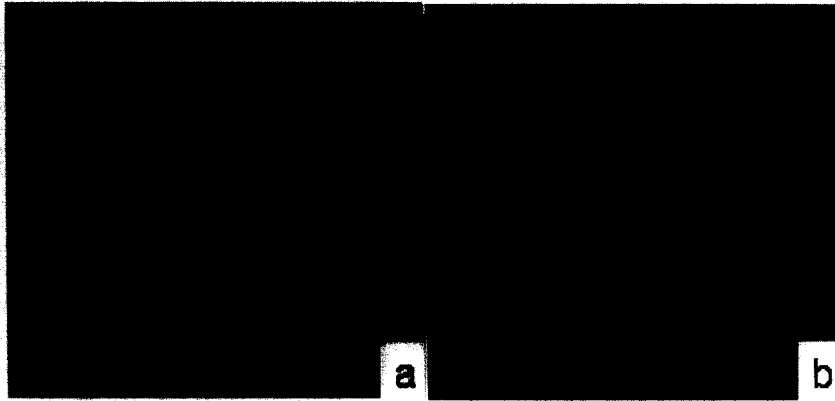


图 9



图 10

专利名称(译)	高抗凝活性抗人组织因子单克隆抗体及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101195659A</a>	公开(公告)日	2008-06-11
申请号	CN200610119182.X	申请日	2006-12-05
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学		
申请(专利权)人(译)	复旦大学		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学		
[标]发明人	马端 蔡旭 刘静 彭卓醇 孔德升 李笑天		
发明人	马端 蔡旭 刘静 彭卓醇 孔德升 李笑天		
IPC分类号	C07K16/18 C12N5/18 A61K39/395 A61P7/02 G01N33/53		
代理人(译)	吴桂琴		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明属生物技术领域，涉及一种高抗凝活性抗人组织因子单克隆抗体及其制备方法和应用。通过对组织因子与X因子的结合位点进行生物信息学和抗原免疫原性分析，寻找免疫原性好且包括关系着组织因子与X因子结合的关键氨基酸残基的氨基酸序列，制备成组织因子多抗原肽，以此多肽免疫小鼠，制备杂交瘤细胞，获得具有高效抗凝活性的小鼠抗人组织因子单克隆抗体，能在血栓病治疗和与TF相关的疾病诊断中发挥重要作用。