

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 16/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480029688.0

[43] 公开日 2006年11月22日

[11] 公开号 CN 1867584A

[22] 申请日 2004.10.6

[21] 申请号 200480029688.0

[30] 优先权

[32] 2003.10.8 [33] US [31] 60/509,850

[86] 国际申请 PCT/US2004/032949 2004.10.6

[87] 国际公布 WO2005/035721 英 2005.4.21

[85] 进入国家阶段日期 2006.4.10

[71] 申请人 E 生物科学公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 B·锡德 G·李

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 范征

权利要求书 3 页 说明书 42 页 附图 4 页

[54] 发明名称

天然免疫球蛋白结合试剂及其制造和使用方法

[57] 摘要

本发明提供了分离的天然免疫球蛋白结合试剂，包括抗体，也提供了包含天然免疫球蛋白结合试剂的制品、组合物与试剂盒。提供了含有样品或试剂的标记的试剂和底物。也提供了用于制造和使用这些试剂的筛选方法。

- 1.一种分离或重组的抗-NigSAb。
- 2.如权利要求 1 所述的抗-NIgSAb, 其特征在于, 所述抗-NIgSAb 特异性地结合天然免疫球蛋白。
- 3.如权利要求 2 所述的抗-NIgSAb, 其特征在于, 所述抗体选自: 单克隆抗体、多克隆抗体、抗体部分、抗体片段、抗体变体、抗-NIgSAb、抗-NIgSAb 部分、抗-NIgSAb 片段和抗-NIgSAb 变体。
- 4.如权利要求 3 所述的抗体, 其特征在于, 所述抗体在哺乳动物中产生。
- 5.如权利要求 4 所述的抗体, 其特征在于, 所述哺乳动物选自: 人、小鼠、大鼠、山羊、家兔、绵羊、马和仓鼠。
- 6.如权利要求 2 所述的多克隆抗体, 其特征在于, 所述多克隆抗体通过用变性的免疫球蛋白扣除免疫然后用天然免疫球蛋白免疫在哺乳动物中产生。
- 7.如权利要求 2 所述的多克隆抗体, 其特征在于, 所述多克隆抗体通过将所述多克隆抗体与连接于不溶基质的变性免疫球蛋白接触来处理从而去除了抗变性的免疫球蛋白抗体。
- 8.如权利要求 7 所述的多克隆抗体, 其特征在于, 所述不溶基质选自: 珠子、平板、孔、试管、膜或薄片。
- 9.如权利要求 1 所述的抗-NIgSAb, 其特征在于, 所述抗-NIgSAb 通过重组动物或重组宿主细胞产生。
- 10.如权利要求 9 所述的抗-NIgSAb, 其特征在于, 所述重组宿主细胞选自: 哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞和细菌细胞。
- 11.如权利要求 14 所述的抗-NIgSAb, 其特征在于, 所述抗-NIgSAb 由细菌噬菌体产生。
- 12.一种表达抗-NigSAb 的重组细胞系。
- 13.一种含有至少一种抗-NIgSAb 和稀释剂或运载体的组合物。
- 14.一种产生至少一种抗-NIgSAb 的方法, 所述方法包括: 筛选针对抗免疫球蛋白抗原产生的抗体以鉴定特异性地结合天然免疫球蛋白的抗体。
- 15.如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 所述抗-NIgSAb 选自: 多克隆抗

体、单克隆抗体、抗体部分、抗体片段、抗体变体、抗-NIgSAb 片段、抗-NIgSAb 部分和抗-NIgSAb 变体。

16.一种用于研究或诊断的制品，所述制品包括包装材料和含有至少一种分离的抗-NIgSAb 的容器。

17.如权利要求 16 所述的制品，其特征在于，所述抗-NIgSAb 是可检测标记的。

18.如权利要求 17 所述的制品，其特征在于，所述标记选自：化学发光剂、放射性同位素、酶、荧光剂和生色剂。

19.如权利要求 18 所述的制品，其特征在于，所述标记含有 HRP。

20.如权利要求 17 所述的制品，其特征在于，所述抗体在选自以下的哺乳动物中产生：小鼠、大鼠、家兔、山羊、仓鼠和马。

21.一种检测天然免疫球蛋白的方法，所述方法包括：将样品与一种或多种抗-NIgSAb 接触并测定所述抗-NIgSAb 与所述样品的结合。

22.如权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述抗-NIgSAb 是可检测标记的。

23.如权利要求 22 所述的方法，其特征在于，所述抗-NIgSAb 是催化可检测反应产物形成的酶。

24.如权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述样品固定于基质上。

25.如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述基质选自：珠子、平板、薄片、条带、孔、膜和试管。

26.一种分离或重组的 NIgSBR。

27.如权利要求 26 所述的 NIgSBR，其特征在于，所述 NIgSBR 是可检测标记的。

28.如权利要求 27 所述的 NIgSBR，其特征在于，所述标记选自化学发光剂、放射性同位素、酶、荧光剂和生色剂。

29.一种含有至少一种 NIgSBR 和合适的稀释剂或运载体的组合物。

30.一种用于研究或诊断的制品，所述制品包括包装材料和含有至少一种 NIgSBR 的容器。

31.一种用于产生至少一种 NIgSBR 的方法，所述方法包括筛选一种或多种化合物来鉴定特异性地结合天然免疫球蛋白的化合物。

32.如权利要求 31 所述的方法，其特征在于，所述 NIgSBR 从以下文库鉴定：

蛋白质支架文库、肽展示文库、定向进化文库和基于蛋白质阵列的文库。

33.如权利要求 31 所述的方法，其特征在于，所述 NIgSBR 选自：多克隆抗体、单克隆抗体、抗体部分、抗体片段、抗体变体、工程蛋白、聚合物支架、工程化合物、多肽、哺乳动物系统中制备的聚合物、非哺乳动物系统中制备的聚合物和通过噬菌体展示在大肠杆菌中制备的聚合物。

34.一种用于检测天然免疫球蛋白的方法，其特征在于，所述方法包括：将样品与一种或多种 NIgSBR 接触并测定所述 NIgSBR 与所述样品的结合。

35.如权利要求 34 所述的方法，其特征在于，所述 NIgSBR 是可检测标记的。

36.如权利要求 34 所述的方法，其特征在于，所述样品固定于基质上。

37.如权利要求 36 所述的方法，其特征在于，所述基质选自：珠子、平板、薄片、条带、孔和试管。

天然免疫球蛋白结合试剂及其制造和使用方法

相关申请的交叉参考

本申请是由 Seed 和 Li 于 2003 年 10 月 8 日提交, 名为“天然免疫球蛋白结合试剂及其制造和使用方法”的非临时申请 USSN 60/509,850。本申请要求 USSN 60/509,850 的优先权及权益, 该申请出于所有目的全文纳入本文作为参考。

发明领域

本发明总体上涉及择优与天然免疫球蛋白结合胜过与变性免疫球蛋白结合的结合试剂。本发明总体上也涉及产生这些结合试剂并将其用于各种研究、诊断和治疗调整中的方法。这些方法和结合试剂在实质上提高和增强了对各种免疫学相互作用(包括但不限于涉及抗抗体的抗体的作用)的分析, 例如分析免疫印迹的蛋白。本发明也涉及择优结合天然免疫球蛋白的新抗体及其制造和使用方法, 包括但不限于单克隆和多克隆抗体。本发明也涉及产生这种单克隆抗体的杂交瘤以及表达编码这些抗体的核酸分子的重组宿主细胞。本发明也涉及使用这些抗体和结合试剂的研究、治疗和诊断方法与组合物, 以及含有这些抗体的试剂盒。

发明背景

Kohler 和 Milstein[256 NATURE 495-497 (1975)]于 1975 年首次证实单克隆抗体的产生。此后, 人们致力于产生各种杂交细胞(称为“杂交瘤”)和将由这些杂交瘤制造的抗体用于各种科学研究。参见, 例如名为“产生人 T 细胞的互补固定单克隆抗体的杂交细胞系”(Hybrid Cell Line for Producing Complement-Fixing Monoclonal Antibody to Human T Cells)的美国专利号 4,515,893 描述了试图从杂交瘤生产单克隆抗体的一些成功、困难和变化情况。单克隆抗体的产生受所用抗原类型以及用于分离所需杂交瘤的选择方法的影响。

免疫系统易对蛋白质混合物中更丰富的免疫显性表位产生应答; 因此, 这些传统的单克隆抗体生产技术往往产生抗免疫显性表位的单克隆抗体。当试图生产对

稀有或免疫原性差的蛋白质特异的抗体时，困难经常随之而来。此外，分离对与其它蛋白质有显著序列相似性的蛋白特异的抗体也困难。扣除免疫(subtractive immunization)是用于产生抗体的已建立技术，该抗体对不丰富的、免疫原性差和/或在序列或结构上与其它蛋白质相似的抗原特异[Zijlstra 等，“扣除免疫的实施靶向蛋白体/表位”(Targeting the Proteome/Epitome, Implementation of Subtractive Immunization), 303(3) BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN., 733-744 (2003); Lian-June Yang 和 Wen-Liang Wang, “通过扣除免疫制备抗肝癌细胞的凋亡相关抗原的单克隆抗体”(Preparation of Monoclonal Antibody Against Apoptosis-Associated Antigens of Hepatoma Cells by Subtractive Immunization), 8(5) WORLD J.GASTROENTEROL, 808-814 (2002)]。

从粗蛋白质混合物，例如细胞裂解物中纯化和鉴定靶蛋白通常由免疫沉淀，然后进行免疫印迹来实现。免疫沉淀技术利用与不溶性基质(如树脂)结合的特异性抗体来捕获和沉淀感兴趣的蛋白质。通过离心除去未结合的蛋白质，用洗脱缓冲液从固相支持物上回收感兴趣的蛋白质，该蛋白质也变性并释放与树脂结合的抗体。

一般用于细胞生物研究的经典免疫沉淀方法通过 SDS-PAGE 分析将免疫沉淀的蛋白质区带分开。然而，SDS-PAGE 评估的蛋白质也含有从树脂上释放的变性抗体的重链和轻链。这使得难于分析纯化的蛋白质，特别是当 SDS-PAGE 分离后进行免疫印迹(例如，western 印迹)时，其中用于显示印迹抗体的标记二抗也将与免疫沉淀抗体的变性重链和轻链反应。当感兴趣蛋白质的分子量接近抗体的重链或轻链时，由于它们的存在掩盖了蛋白质而进一步妨碍了数据解析。

蛋白质组学研究主要依赖于经典的免疫沉淀/免疫印迹技术来进行许多研究，例如蛋白质表达模式、蛋白质-蛋白质相互作用、翻译后修饰和蛋白质功能。试图消除或尽可能减少存在变性的重链和轻链对免疫印迹影响的当前可用技术不令人满意、用途有限并且未能提供良好解决这些问题的方法。Pierce Chemical of Rockford, IL 的“Seize X”使用交联剂 DSS 在珠子上交联蛋白质 A 或 G 的一抗，恰当地引导抗体以使抗原结合位点远离蛋白质 A 或 G 支持物。该固定化技术使得科研人员能反复使用该一抗并减少重链和轻链在其最终样品中的污染。Seize X 试剂盒的缺点包括以下因素：(i)时间—使用该试剂盒来增加免疫沉淀所需的额外小时，和(ii)复杂性—在过程中需要增加其它步骤。

就此目的而言，在本发明之前，没有择优识别天然免疫球蛋白的试剂可用。完整地阅读下文后可明白本发明提供的这种试剂和其它特征。

发明概述

在一个实施方案中，本发明提供新的结合试剂及其使用方法来择优检测天然免疫球蛋白。这些结合试剂及其制造和使用的方法实质上改善了各种研究、诊断和治疗方法的结果，所述方法包括(但不限于)涉及检测天然抗体分子的任何方法，例如检测免疫印迹蛋白质的方法。本发明结合试剂及其使用方法也用于使用抗抗体的抗体的各种研究技术和诊断方法。

这些结合试剂在本文中称为天然免疫球蛋白特异性结合试剂(NIgSBR)。NIgSBR 可是任何类型的分子或化合物，包括(但不限于)小的有机和无机分子、蛋白质、肽、抗体、核酸、多糖或与天然免疫球蛋白特异性结合的任何其它分子。例如，NIgSBR 可是多克隆抗体、单克隆抗体、抗体部分、抗体片段、抗体变体、工程蛋白、聚合物支架(scaffold)、工程化合物、多肽、哺乳动物系统中制备的聚合物、非哺乳动物系统中制备的聚合物、通过噬菌体展示在大肠杆菌中制备的聚合物等。

这些 NIgSBR 可通过，例如筛选一种或多种化合物来鉴定与天然免疫球蛋白特异性结合的化合物来生产。例如，可从文库中鉴定 NIgSBR，例如抗体文库、蛋白质支架文库、肽展示文库、定向进化文库、基于蛋白质阵列的文库等。含有 NIgSBR 的组合物可视组合物的用途而包含 NIgSBR 和其它材料，例如稀释剂、佐剂、运载体等。可用，例如化学发光剂、放射性同位素、荧光剂、生色剂等标记 NIgSBR。类似地，包含 NIgSBR 的制品(例如，用于研究或诊断用途的试剂盒)可另外包括包装材料和含有固定于基质上的组合物的容器。

本发明包括鉴定和分离 NIgSBR，提供具有可对天然免疫球蛋白进行检测和/或定量的结合特异性的 NIgSBR 的方法。液相或固相检测方法均可使用本发明的 NIgSBR。例如，在各种优选的检测方式中，NIgSBR 或由 NIgSBR 检测的样品可固定于固体基质上，例如珠子、平板、薄片、条带、孔、试管等。或者，可使用液相检测方式，例如继之可使用结合组分的电泳。

如上所述，本发明提供用于择优检测天然免疫球蛋白的方法中的 NIgSBR，包括(在优选的方面)新的抗体及其生产方法。例如，本发明提供生产至少一种特异性

结合天然免疫球蛋白的结合试剂，例如抗天然免疫球蛋白特异性抗体(在这种情况下，相应的 NlgSBR 是“抗-NigSAb”)的方法，该方法通过筛选所产生的抗免疫球蛋白抗原的抗体来鉴定特异性结合天然免疫球蛋白的抗体。该抗体可采取本文所述的任何形式，总体上可用于所述 NlgSBR 的任何检测形式。这些抗体实质上改善了各种研究、诊断和治疗方法的结果，所述方法包括(但不限于)涉及检测天然抗体分子的任何方法，例如检测免疫印迹蛋白质的方法。本发明的方法和抗体也用于各种研究技术和诊断技术，例如当使用抗抗体的抗体时。当本发明方法和抗体用于免疫学方法，包括(但不限于)免疫沉淀和 Western 印迹技术时，其特异性结合天然免疫球蛋白的独特能力实质上改善了结果。

因此，提供了同种的抗体制剂，例如包含能区分天然状态和变性状态的免疫球蛋白间分离的抗-NlgSAb。本发明的抗体可是，例如单克隆抗体、多克隆抗体、抗体部分、抗体片段、抗体变体、抗-NlgSAb、抗-NlgSAb 部分、抗-NlgSAb 片段或抗-NlgSAb 变体。抗体可在哺乳动物，例如人、灵长类、啮齿类、小鼠、大鼠、仓鼠、家兔、马、驴、绵羊或山羊中产生，和/或可以是嵌合型、人源化和或 CDR-嫁接的抗-NigSAb。

例如，可通过扣除免疫在哺乳动物中产生抗体，该方法包括给予变性的免疫球蛋白，然后通过天然免疫球蛋白免疫。得到的多克隆抗体可用，例如连接于不溶性基质(如珠子、平板、孔、试管、膜或薄片)上的变性免疫球蛋白去除。

也提供了包含抗-NigSAb 和合适的稀释剂、佐剂或运载体的组合物。本文描述和使用了切割产物与它们其它特定的部分和变体以及抗-NlgSAb 组合物、编码或互补的核酸、载体、宿主细胞、生产抗-NigSAb 的细胞系、组合物、制剂、装置、制品(例如试剂盒)、转基因动物、转基因细胞、转基因植物和它们的制造和使用方法以及与本领域已知的信息相结合。

例如，本发明提供如研究或诊断用途的制品，该制品包括包装材料和含有至少一种 NlgSBR，例如分离的抗-NlgSAb 的容器。NlgSBR，例如抗-NigSAb 通常是可检测的标记以便于使用该制品。可使用任何可用的标记，例如化学发光剂、放射性同位素、酶、荧光剂、生色剂等。在一个实施方案中，标记包括产生可检测产物的酶。例如，该酶可以是 HRP 酶。做成试剂盒的制品可另外包括，例如使用抗-NigSAb 或其它 NlgSBR 的说明书、对照试剂、稀释剂等。

本发明的至少一种抗体结合至少一种特定的表位，该表位对至少一种天然免疫球蛋白的蛋白、亚基、构型、片段、部分或它们的任何组合是特异的，所述表位包括(但不限于)在任何类型或同种型的免疫球蛋白分子的天然重链或轻链上发现的任何表位。至少一种表位可含有至少一个抗体结合区域，该区域至少包括所述蛋白的一部分，所述表位可是线型或构象的并可含有其至少一部分的1-5个或5个或更多个氨基酸，例如(但不限于)在所述免疫球蛋白的天然形式或其任一部分中发现的线型或构象的至少一个结构域。线型表位含有氨基酸的毗连序列，构象表位含有不连续但从抗原的一级、二级、三级或四级结构形成的氨基酸。本发明的至少一种抗体优选与非变性的免疫球蛋白结合。

在本发明的另一个实施方案中，至少一种抗-NIgSAb 任选含有至少一种互补决定区(CDR)(例如，重链或轻链可变区的 CDR1、CDR2 或 CDR3)和/或至少一种恒定或可变框架区或其任何部分的至少一个特定部分。抗-NIgSAb 氨基酸序列还可任选含有至少一种如本文所述或本领域已知的特定的取代、插入或缺失。

本发明提供至少一种本文所述分离的单克隆抗-NIgSAb，其中所述抗体具有至少一种活性，例如(但不限于)择优结合天然免疫球蛋白分子的能力。因此，能按照已知方法筛选无论单克隆还是多克隆抗-NIgSAb 的相应活性。

本发明的另一个实施方案提供了制备以下物质的方法：(i)产生这种抗体的杂交瘤；(ii)多克隆抗体；和(iii)其它择优结合天然免疫球蛋白的结合试剂。

在一个相关的实施方案中，本发明也提供了至少一种在杂交瘤或重组宿主细胞中表达至少一种抗-NIgSAb 的方法，该方法包括在抗-NIgSAb 以可检测和/或可回收的量表达的条件下培养本文所述杂交瘤或重组宿主细胞。表达抗-NIgSAb 的重组宿主细胞含有编码抗-NIgSAb 的核酸分子。

在另一个实施方案中，本发明也提供至少一种含有以下物质的组合物：(a)一种或多种分离的抗-NIgSAb 编码核酸、重组宿主细胞、抗-NIgSAb、NIgSBR 和/或本文所述的杂交瘤；和(b)合适的运载体或稀释剂。根据已知的运载体或稀释剂，运载体或稀释剂可任选是试剂级或药学上可接受的，也可是干燥的或冻干的。组合物还可任选含有至少一种其它化合物、蛋白质或组合物。本发明的一个实施方案也包括含有一种或多种这些组合物的试剂盒。

使用本发明的 NIgSBR 和方法，污染性变性抗体(例如由标准免疫沉淀方法带

入的)不会干扰最终的免疫印迹步骤。本发明的 NIgSBR 和抗-NIgSAb 实质上提高了对免疫印迹的感兴趣蛋白的检测并且实质上改善了数据解析和表达。NIgSBR、抗-NIgSAb 和制造与使用它们的本发明方法适合于各种研究、治疗和诊断方法,包括(但不限于)存在天然和变性的免疫球蛋白分子的方法。

本发明方法不对常规使用的免疫印迹方法附加额外的步骤,无需修改在细胞生物学和蛋白质组学研究实验室中常规使用的方法。例如,尽管由免疫沉淀步骤带入的一抗的变性重链和轻链可存在于免疫印迹上,它们不会被本发明的 NIgSBR 或抗-NIgSAb 检测到,或检测到不多。本发明的 NIgSBR、抗-NIgSAb 和方法通过取消检测变性抗体实质上简化和提高了免疫印迹蛋白的分析。

在一相关的方面,本发明也提供含有编码特定 NIgSBR(例如抗-NIgSAb)的多核苷酸,与之互补或杂交的分离核酸分子,所述核酸分子至少一特定序列、结构域、部分或其变体。本发明还提供含有所述抗-NIgSAb 核酸分子的重组载体、含有这种核酸和/或重组载体的宿主细胞以及制造和/或使用这种抗体核酸、载体和/或宿主细胞的方法。

本文公开的本发明的这些和其它各种实施方案容易为本领域的普通技术人员所理解。

附图简述

图 1: 显示本发明抗体在 Western 印迹方式中择优结合天然免疫球蛋白。

图 2, A 幅和 B 幅: 显示产生和选择在 Western 印迹方式中择优结合天然免疫球蛋白的抗体的本发明方法的结果。

图 3: 显示与本发明的抗-NIgSAb 相比(泳道 2), 使用不择优结合天然免疫球蛋白的常规抗体的 Western 印迹(泳道 1)的结果。泳道 3 显示泳道 2 被泳道 1 中使用的常规抗体再次印迹。

发明详述

本发明提供分离的 NIgSBR, 例如抗-NIgSAb, 以及制造它们的方法、含有它们的组合物和试剂盒与编码抗-NIgSAb 的核酸分子。本发明还包括(但不限于)使用本发明的 NIgSBR 和抗-NIgSAb 的方法, 包括研究、治疗和诊断方法以及装置。本

发明 NIgSBR 和抗-NIgSAb 特异性地结合天然免疫球蛋白。

“特异性结合”表示以高亲合性和/或高亲和力地与结合试剂，例如天然免疫球蛋白的特定多肽(如表位)的抗体结合。抗体与该特定多肽上表位的结合优选强于同一抗体与任何其它表位的结合，特别是存在于和特定的感兴趣多肽相关的分子或同一样品中的表位，例如抗体与天然免疫球蛋白的结合强于和免疫球蛋白的变性形式或片段的结合，从而可通过调节结合条件使抗体更择优与天然免疫球蛋白结合而较少与免疫球蛋白的变性形式或片段结合。特异性结合感兴趣的天然免疫球蛋白多肽的抗体能以微弱、但可检测的水平(例如，与感兴趣的天然免疫球蛋白多肽的结合所显示水平的 50%或更低、40%或更低、30%或更低、20%或更低、15%或更低、10%或更低、5%或更低、1%或更低或者是 0.1%或更低)结合其它多肽，例如变性的免疫球蛋白。这种结合差异或者背景结合可容易地和特异性抗原与感兴趣的天然免疫球蛋白的结合区分开，例如通过使用合适的对照。然而，本领域的普通技术人员易于明白天然免疫球蛋白和变性的免疫球蛋白结合之间任何可检测的差异证实了择优结合感兴趣的天然免疫球蛋白。总体上，以约 10^6 摩尔/升或更高、约 10^7 、或约 10^8 摩尔/升或更高的结合亲和力择优与天然免疫球蛋白结合的本发明抗-NIgSAb 特异性地结合天然免疫球蛋白。

“分离的”生物组分(例如抗-NigSAb)是从与其一起产生或由其产生的生物组分中部分或完全纯化的组分。例如，抗-NigSAb 可从用于生产抗-NigSAb 的细胞材料中部分纯化。该术语“分离的”无需完全纯化至均质；相反，相关组分通常纯化至足以用于相关测定的程度。本发明的抗-NigSAb 也可认为是“重组的”，这说明抗-NigSAb 或其编码物质(例如，重组核酸、基因、多核苷酸等)以人为介入产生或改变。总体上，重组分子的部分重排不是天然构象，或者重组多核苷酸或多肽的一级序列已用一些方法操作。可对处于天然环境或状态中或自其中取出的物质上进行改变以得到重组物质。例如，如果天然存在的核酸被改变，或者如果从通过人为介入被改变的 DNA(在 DNA 来源的细胞中进行)转录而来，则天然存在的核酸变为重组核酸。如果将核苷酸序列从其天然环境中取出并克隆入任何类型的人工核酸载体，则基因序列开放读框是重组的。产生重组分子，特别是重组核酸的方法和试剂是本领域常见和惯常的。术语“重组”也可指含有重组物质的生物体，例如含有重组核酸的细胞、植物或动物可认为是重组细胞、植物或动物。在一些实施方案中，

重组生物体是转基因生物体。

本发明的 NlgSBR 和抗-NlgSAb 可任选进行可检测标记以提供具有可检测标记的 NlgSBR 或可检测标记的抗-NlgSAb。“可检测标记的”、“可检测标记的 NlgSBR”或“可检测标记的抗-NlgSAb”指连接有可检测标记的任何物质(保留与天然免疫球蛋白的结合特异性的抗体或抗体片段或任何其它化合物)。可检测的标记通常以化学偶合连接,但当标记是多肽时,可通过遗传工程技术连接。产生可检测标记的蛋白质的方法是本领域熟知的。可检测的标记可选自本领域各种已知的标记,但一般是放射性同位素、荧光基团、顺磁标记、酶(例如,辣根过氧化物酶)或发出可检测信号(例如,放射性、荧光、颜色)或接触标记后向其底物发出可检测信号的其它组成成分或化合物。各种可检测的标记/底物对(例如,辣根过氧化物酶/二氨基联苯胺、亲和素/链霉抗生物素蛋白荧光素酶/荧光素)、标记化合物,例如抗体的方法和使用标记的抗体的方法是本领域熟知的(参见,例如 Harlow 和 Lane 编,《抗体:实验室手册》(Antibodies: A Laboratory Manual),冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约,1988))。

本发明的 NlgSBR 可是任何类型的物质,包括蛋白质、抗体、肽、核酸、碳水化合物、多糖和它们的部分或片段,或是任何其它特异性结合天然免疫球蛋白的有机或无机分子。

本发明的抗体包括能掺入本发明抗体的任何蛋白质或肽,所述蛋白质或肽含有包含免疫球蛋白分子的至少一部分的分子,例如(但不限于)重链或轻链或其配体结合部分的至少一个互补决定区(CDR)、重链或轻链的可变区、重链或轻链恒定区、框架区或它们的任何部分。本发明的抗体可包括或来源于任何动物,包括哺乳动物,如(但不限于)人、小鼠、家兔、大鼠、啮齿类、山羊、灵长类或它们的组合等。

结合试剂或抗体/抗原结合力

维持抗原和抗体(或任何结合试剂)在一起的作用力在本质上与任何两种非相关性蛋白质(例如,其它大分子,如人血清白蛋白和人转铁蛋白)之间发生的非特异性相互作用没有区别。这些分子间作用力一般分为4种:(1)静电力;(2)氢键结合;(3)疏水作用;和(4)范德华力。静电作用力是由于两条蛋白质侧链上带相反电荷的离子基团之间的相互吸引。该吸引力(F)与电荷之间距离(d)的平方成反比。氢键结

合力是由亲水基团，例如—OH、—NH₂和—COOH之间形成的可逆氢桥提供。这些作用力主要取决于带有这些基团的两个分子的位置靠近。疏水作用力与油滴在水中合并成单一大滴的作用原理一样。因此，非极性的疏水基团，例如缬氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸上的侧链基团易于在水性环境中缔合。最后，范德华力是依赖外部电子云之间的相互作用在分子间形成的作用力。

关于每种不同类型的作用力的其它信息可得自《基础免疫学》(Essential Immunology), I.M.Roitti 编(第6版), Blackwell Scientific Publications, 1988。就本发明而言，NIgSBR或抗-NIgSAb表现出这些作用力的一些或全部。通过大量积累这些作用力获得与天然免疫球蛋白具有高度亲和力或结合强度的NIgSBR或抗-NIgSAb。本领域的普通技术人员使用本文结合本领域公知的方法容易选择特异性结合天然免疫球蛋白的各种化合物或抗体。

测量结合试剂或抗体/抗原的结合强度

NIgSBR或抗-NIgSAb与天然免疫球蛋白之间的结合亲和力可测量并且是上述测量所有作用力的累积。进行这种测量的标准方法为本领域普通技术人员所熟知并且可直接应用于测量本发明的任何化合物或抗体对天然免疫球蛋白的亲和力。

测量抗体/抗原结合亲和力的一种标准方法是通过使用透析管，该管是由抗原可渗透而抗体不可渗透的物质构成的容器。该方法也可用于其它非抗体的结合试剂，例如本发明的非抗体NIgSBR。完全或部分与抗体结合的抗原置于透析管中的溶剂中，例如水。然后将该管置于不含抗体或抗原，但仅含溶剂，例如水的较大容器中。因为仅抗原可通过透析膜扩散出管，透析管内抗原的浓度与外部较大容器中抗原的浓度将趋于平衡。将透析管置于较大容器并等待一段时间以达到平衡后，可检测透析管内和外部容器内的抗原浓度，然后确定浓度的差异。这样就能计算与抗体结合维持于透析管内的抗原量与与抗体解离并扩散入外部容器的抗原量。通过不断更换外部容器中的溶剂(例如，水)来除去扩散进来的任何抗原，就能从透析管内的抗原全部解离抗体。如果不更换外部溶剂，则系统达到平衡从而可计算该反应的平衡常数(K)，即抗体和抗原之间的结合与解离。平衡常数(K)计算为等于透析管内抗原结合的抗体浓度除以游离抗体结合位点的浓度与游离抗原浓度的乘积。平衡常数或“K”值通常以升/摩尔计。K值是游离状态的抗原和抗体间与抗原和抗体形成

的复合形式相比的自由能差异的度量。

结合试剂或抗体亲合性

如上所述，术语“亲和力”描述了结合试剂，例如一种抗体与单一的抗原决定型的结合(情况)。然而，该术语往往与抗体和多价抗原的相互作用相关。术语“亲合性”用于表述这种结合。有助于亲合性的因素复杂并包括多克隆样品中的抗体异质性，这些抗体引导抗抗原上的多种决定型并抗决定簇本身的异质性。大多数抗原的多价性导致抗体与两种抗原分子的结合强于单个抗体相互作用的算术和，并且可任选强许多倍。因此，应该理解的是测量的抗血清和多价抗原之间的亲合性在一定程度上高于抗体和单一抗原决定型之间的亲和力。

本文使用的术语“表位”指能被结合试剂或抗体在一个或多个抗原结合区域识别并与之结合的任何分子的部分。表位可是任何分子或其基团，包括(但不限于)氨基酸或糖的侧链，并可具有特定的三维结构或构象。表位可含有蛋白质分子的任何部分，该蛋白质分子包括本领域通常使用的术语所述的一级、二级、三级或四级结构。

本文使用的“抗-NIgSAb”、“抗-NigSAb 部分”或“抗-NIgSAb 片段”和/或“抗-NIgSAb 变体”等包括任何蛋白质或肽，所述蛋白质或肽含有包含免疫球蛋白分子的至少一部分的分子，例如(但不限于)重链或轻链或其配体结合部分的至少一个互补决定区(CDR)、重链或轻链可变区、重链或轻链的恒定区、框架区或它们的任何部分。作为非限制性的例子，本发明合适的抗-NIgSAb、特定的部分或变体可结合至少一种天然免疫球蛋白分子，或其特定的部分、变体或结构域。术语“抗-NIgSAb”或“抗体”还包括抗体、抗体消化片段、特定的抗体部分及其变体，包括抗体模拟物或模拟抗体或其特定片段或部分的结构和/或功能的、抗体的部分，包括单链抗体及其片段。功能性片段包括结合非变性免疫球蛋白分子的抗原结合片段。例如，本发明包括能结合天然免疫球蛋白分子或其部分的抗体片段，包括(但不限于)Fab(例如，通过木瓜蛋白酶消化)、Fab'(例如，通过胃蛋白酶消化和部分还原)和 F(ab')₂(例如，通过胃蛋白酶消化)、facb(例如，通过纤溶酶消化)、pFc'(例如，通过胃蛋白酶或纤溶酶消化)、Fd(例如，通过胃蛋白酶消化，部分还原和再聚集)、Fv 或 scFv(例如，通过分子生物学技术)片段。也参见全文纳入本文的 Paul 编，《基

础免疫学》(FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY), 第四版, Lippincott-Raven, NY, NY(1999)。

这种片段可通过本领域已知和/或本文所述的酶切割、合成或重组技术产生。使用其中将一个或多个终止密码子引入天然终止位点上游的抗体基因也可产生各种截短形式的抗体。例如, 编码 F(ab')₂ 重链部分的组合基因可设计为含有编码重链的 CH₁ 结构域和/或绞链区的 DNA 序列。可通过常规技术化学连接抗体的各部分, 或使用遗传工程技术将其制备为连续的蛋白质。

双特异性、异种特异性、异种接合或类似的抗体也可使用, 这种抗体是对至少两种不同的抗原具有结合特异性的单克隆抗体。在该情况中, 结合特异性之一是对至少一种天然免疫球蛋白分子或其部分的, 另一种是对任何其它抗原的特异性。制造双特异性抗体的方法是本领域已知的。双特异性抗体的重组生产通常以两种免疫球蛋白重链-轻链对的共同表达为基础, 其中两条重链具有不同的特异性(Milstein 和 Cuello, 305 NATURE, 537 (1983))。由于免疫球蛋白的重链和轻链的随机分类, 这些杂交瘤(四源杂交瘤)产生 10 种不同的抗体分子的潜在混合物, 其中仅有一种具有正确的双特异性结构。类似的方法公开于, 例如 WO 93/08829; 美国专利号 6,210,668; 6,193,967; 6,132,992; 6,106,833; 6,060,285; 6,037,453; 6,010,902; 5,989,530; 5,959,084; 5,959,083; 5,932,448; 5,833,985; 5,821,333; 5,807,706; 5,643,759; 5,601,819; 5,582,996; 5,496,549; 4,676,980; WO 91/00360; WO 92/00373; EP 03089; Traunecker 等, 10 EMBO J., 3655 (1991); Suresh 等, 121 METHODS IN ENZYMOLOGY, 210 (1986); 每篇文献均全文纳入本文作为参考。

本发明的抗体

本发明的至少一种抗-NigSAb 可任选由本领域熟知的细胞系、混合的细胞系、无限增殖细胞或无限增殖细胞的克隆群产生。参见, 例如 Ausubel 等编, 《新编分子生物学实验指南》(Current Protocols in Molecular Biology), (John Wiley & Sons, Inc., 纽约, 纽约 (1987-2001)); Sambrook 等, 《分子克隆: 实验室手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 第二版, (冷泉港, NY (1989))和 Sambrook 等, 《分子克隆-实验室手册》(Molecular Cloning-A Laboratory Manual)(第三版), 1-3 卷, 冷泉港实验室, 冷泉港, 纽约, 2000(总称为“Sambrook”); Harlow 和 Lane, 《抗

体.实验室手册》(Antibodies. A Laboratory Manual), (冷泉港, 纽约 (1989)); Colligan 等编, 《新编免疫学实验指南》(Current Protocols in Immunology), (John Wiley & Sons, Inc., 纽约(1994-2001)); Colligan 等, 《新编蛋白质科学实验指南》(Current Protocols in Protein Science), (John Wiley & Sons, 纽约, 纽约, (1997-2001)), 每篇文献均全文纳入本文作为参考。

可产生抗-NIgSAb 或其片段、部分或变体以抗合适的免疫原性抗原, 例如分离的免疫球蛋白或其部分(包括合成的分子, 如合成肽)并且它们可是多克隆或单克隆抗体。其它特异性或普通哺乳动物抗体可类似产生。可使用本领域的普通技术人员已知的任何合适的技术来制备免疫原性抗原以及生产多克隆和单克隆抗体。

在制备单克隆抗体的一种方法中, 通过融合合适的无限增殖细胞系(例如, 骨髓瘤细胞系)来产生杂交瘤, 所述无限增殖细胞系例如是(但不限于)Sp2/0、Sp2/0-AG14、P3/NS1/Ag4-1、P3X63Ag8.653、MCP-11、S-194 等、异源骨髓瘤、其融合产物、得自它们的任何细胞或融合细胞、或本领域已知的任何其它合适的细胞系。抗体生产细胞可参见, 例如 www.atcc.org, www.lifetech.com 等, 例如(但不限于)分离或克隆的脾、外周血、淋巴、扁桃体或其它免疫细胞或含有 B 细胞的细胞, 或表达重链或轻链恒定区、可变区、框架或 CDR 序列的任何其它细胞, 或作为内源核酸或异源核酸, 重组或内源性、病毒、细菌、藻类、原核、两栖类、昆虫、爬行类、鱼、哺乳动物、啮齿类、马、羊、山羊、绵羊、灵长类、真核、基因组 DNA、cDNA、rDNA、线粒体 DNA 或 RNA、叶绿体 DNA 或 RNA、hnRNA、mRNA、tRNA、单链、双链或三链、杂交等或它们的任何组合。参见, 例如全文纳入本文作为参考的 Ausubel, 同上; 和 Colligan, Immunology, 同上, 第 2 章。

抗体生产细胞也可得自用感兴趣抗原免疫的任何合适动物的外周血, 或优选脾或淋巴结。也可使用任何其它合适的宿主细胞来表达编码抗体、其特定的片段、部分或变体的异源或内源核酸。融合细胞(杂交瘤)或重组细胞可使用选择性培养条件或其它合适的已知方法来分离, 并通过有限稀释或细胞分选或其它已知的方法克隆。生产具有所需特异性的抗体的细胞可通过本领域普通技术人员已知的合适测定(例如, ELISA)来选择。

可使用其它合适的方法来生产或分离具有所需特异性的抗体, 所述方法包括(但不限于)本领域已知和/或本文所述的从肽或蛋白质文库(例如, 但不限于细菌噬

菌体、核糖体、寡核苷酸、RNA、cDNA 等展示文库；这些文库得自以下公司：Cambridge antibody Technologies，Cambridgeshire，UK；MorphoSys，Martinsreid/Planegg，DE；Biovation，Aberdeen，Scotland，UK；BioInvent，Lund，Sweden；Dyax Corp.，Enzon，Affymax/Biosite；Xoma，Berkeley，CA；Ixsys。参见，例如 EP 368,684；PCT/GB91/01134；PCT/GB92/01755；PCT/GB92/002240；PCT/GB92/00883；PCT/GB93/00605；US08/350,260(5/12/94)；PCT/GB94/01422；PCT/GB94/02662；PCT/GB97/01835；(CAT/MRC)；WO90/14443；WO90/14424；WO90/14430；PCT/US94/1234；WO92/18619；WO96/07754(Scripps)；EP 614989(MorphoSys)；WO95/16027(BioInvent)；WO88/06630；WO90/3809(Dyax)；US4,704,692(Enzon)；PCT/US91/02989(Affymax)；WO89/06283；EP 371998；EP 550400；(Xoma)；EP 229046；PCT/US91/07149(Ixsys))或从随机产生的肽或蛋白质(US5,723,323；5,763,192；5,814,476；5,817,483；5,824,514；5,976,862；WO86/05803；EP 590689(Ixsys，现已知为 Applied Molecular Evolution(AME))，每篇文献均全文纳入作为参考)中选择重组抗体的方法，或者依赖于转基因动物免疫能产生全套人抗体，如本领域已知和/或本文所述的方法(例如，SCID 小鼠，Nguyen 等，41 MICROBIOL.IMMUNOL.，901-907 (1997)；Sandhu 等，16 CRIT.REV.BIOTECHNOL.，95-118 (1996)；Eren 等，93 IMMUNOL.，154-161 (1998)，每篇文献以及相关的专利和申请均全文引为参考)。这种技术包括，但不限于核糖体展示(Hanes 等，94 PROC.NATL.ACAD.SCI. USA，4937-4942 (1997年5月)；Hanes 等，95 PROC.NATL.ACAD.SCI. USA，14130-14135 (1998年11月))；单细胞抗体生产技术(例如，选择性淋巴细胞抗体方法(“SLAM”)(美国专利号 5,627,052；Wen 等，17 J.IMMUNOL.，887-892 (1987)；Babcook 等，93 PROC.NATL.ACAD.SCI. USA，7843-7848 (1996))；凝胶微滴和流式细胞术(Powell 等，8 BIOTECHNOL.，333-337 (1990)；One Cell Systems，Cambridge，MA；Gray 等，182 J.Imm.METH.，155-163 (1995)；Kenny 等，13 BIO/TECHNOL.，787-790 (1995)；B-细胞选择(Steenbakkers 等，19 MOLEC.BIOL.REPORTS，125-134 (1994)；Jonak 等，Progress Biotech，第5卷，《杂交瘤技术的体外免疫》(In Vitro Immunization in Hybridoma Technology)，(Borrebaeck 编，Elsevier Science Publishers B. V.，Amsterdam，Netherlands(1988)))。

如本文所述和/或本领域已知的，抗-NIgSAb 也可任选通过免疫能生产全套人抗体的转基因动物(例如，小鼠、大鼠、仓鼠、非人灵长类等)来产生。可用本文所述的方法从这种动物中分离产生人抗-NIgSAb 的细胞并无限增殖。

可通过已知方法得到能生产与人抗原和其它外来抗原结合的全套人抗体的转基因小鼠(例如，但不限于颁发给 Lonberg 等的美国专利号：5,770,428；5,569,825；5,545,806；5,625,126；5,625,825；5,633,425；5,661,016 和 5,789,650；Jakobovits 等，WO 98/50433；Jakobovits 等，WO 98/24893；Lonberg 等，WO 98/24884；Lonberg 等，WO 97/13852；Lonberg 等，WO 94/25585；Kucherlapate 等，WO 96/34096；Kucherlapate 等，EP 0463151 B1；Kucherlapate 等，EP 0710719 A1；Surani 等，美国专利号 5,545,807；Bruggemann 等，WO 90/04036；Bruggemann 等，EP 0438474 B1；Lonberg 等，EP 0814259 A2；Lonberg 等，GB 2272440 A；Lonberg 等，368 NATURE, 856-859 (1994)；Taylor 等，6 (4) INT.IMMUNOL., 579-591 (1994)；Green 等，7 NATURE GENETICS, 13-21 (1994)；Mendez 等，15 NATURE GENETICS, 146-156 (1997)；Taylor 等，20 (23) NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 6287-6295 (1992)；Tuailon 等，90 (8) PROC.NATL.ACAD.SCI. USA, 3720-3724 (1993)；Lonberg 等，13(1) INT.REV.IMMUNOL., 65-93 (1995)和 Fishwald 等，14(7) NAT BIOTECHNOL 845-851 (1996)，每篇文献均全文纳入本文作为参考)。这些小鼠一般含有至少一种转基因，该转基因含有来自至少一种人免疫球蛋白基因座，被功能性重排或可经功能性重排的 DNA。这种小鼠中的内源性免疫球蛋白基因座可破坏或删除以消除该动物产生由内源性基因编码的抗体的能力。

天然免疫球蛋白的单特异性抗体使用 Kohler 和 Milstein, 256 NATURE 495-497 (1975)的技术从含有反应性抗天然免疫球蛋白的抗体的哺乳动物抗血清纯化，或者制备为与非变性免疫球蛋白具反应性的单克隆抗体。本文使用的单特异性抗体定义为对非变性免疫球蛋白具均质结合特性的单一抗体种类或多抗体种类，并且可是单克隆或多克隆的。本文使用的同源结合指抗体种类结合特异性抗原或表位(例如本文所述与非变性免疫球蛋白相关的抗原或表位)的能力。天然免疫球蛋白特异性抗体通过用合适浓度的天然免疫球蛋白(用或不用免疫佐剂)免疫动物产生，所述动物例如是小鼠、大鼠、豚鼠、家兔、山羊、马和/或等，其中家兔是优选的动物。

多克隆抗体制备

在首次免疫之前收集预免疫血清。每只动物接受，例如约 0.1mg-1000mg 天然免疫球蛋白结合可接受的免疫佐剂。这种可接受的佐剂包括(但不限于)完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、明矾沉淀物、含有小棒杆菌(*Corynebacterium parvum*)和 tRNA 的油包水乳剂。首次免疫包括天然免疫球蛋白(优选完全弗氏佐剂配制)在多个位点通过皮下(SC)、腹膜内(IP)或两者。每只动物以固定间隔放血(优选每周)来测定抗体滴度。首次免疫后，动物可接受或不接受加强注射。接受加强注射的动物通常以相同的途径给予等量的、不完全弗氏佐剂配制的抗原。加强注射约间隔 3 周给予直至获得最大滴度。在每次加强免疫后的约第 7 天或单独免疫后的每周对动物放血，收集血清并于约-20℃保存等份试样。该方法可用于产生本发明的多克隆抗-NIgSAb。

使用环磷酰胺(cyclophosamide)治疗的扣除免疫

相对标准免疫，扣除免疫提供了有力的备选方案并可产生真正唯一的抗体。扣除免疫已广泛并成功地实施来产生标准免疫不能获得的单克隆抗体。扣除免疫采用不同的免疫耐受方法，该方法可从本质上增强针对所需抗原的抗体产生。该方法以使宿主动物对免疫显性或其它不希望的抗原(耐受原)耐受为基础，所述抗原可与感兴趣的抗原结构性或功能性相关。宿主动物的耐受可通过本领域已知的几种方法(高区耐受、新生期耐受或药物诱导耐受)之一来实现。耐受的动物然后接种所需抗原(免疫原)，并筛选随后的免疫应答所产生抗体的所需抗原反应性。

通过选择性消除响应于外来抗原性分子而刺激增殖的 B-细胞，细胞毒性药物环磷酰胺可用于控制正常免疫应答的偏倚。环磷酰胺治疗后，接触那些分子不会产生免疫学应答。作为扣除免疫技术，小鼠接触耐受原，然后注射环磷酰胺。药物清除后，小鼠接触免疫原。理论上，免疫系统应该仅对未在耐受原中发现的免疫原中的那些分子产生免疫学应答。这种扣除免疫技术可用于产生本发明的抗-NIgSAb。

本发明的抗-NIgSAb 可使用本领域已知的技术容易地鉴定，所述技术包括(但不限于)肽展示文库。此外，肽展示文库也可用于鉴定本发明的 NiGSBR。该方法涉及筛选为靶分子识别或结合的各个成员的大肽库，所述靶分子在本发明中可是天然

免疫球蛋白或其一种或多种表位。筛选肽展示文库以发现结合试剂是本领域熟知的。所展示的随机肽序列可是 3-5000 个或更多个氨基酸长，较常见是 5-100 个氨基酸长，更常见是约 8-25 个氨基酸长。除了产生肽文库的直接化学合成方法之外，也描述了几种重组 DNA 方法。一种类型的方法涉及在细菌噬菌体或细胞的表面展示随机肽序列。每个细菌噬菌体或细胞含有编码具体展示的肽序列的核苷酸序列。抗体或其它靶分子固定于基质并与在其表面带有肽文库的细菌噬菌体或细胞一起孵育。几轮如 Lu 等, *BIO/TECHNOLOGY*, 13:366-372 (1995)(该文献引作参考)所述的淘选之后，测序细菌噬菌体集落以测定抗体所识别的共同肽序列。该方法可鉴定抗体或其它靶分子的抗原识别序列。这种方法描述于 PCT 专利公开号 WO91/18980、WO 91/19818 和 WO93/08278。

本领域熟知的用于鉴定结合试剂的另一种方法利用在其表面表达肽或蛋白质分子的病毒、细菌噬菌体或宿主细胞，所述结合试剂对特定靶分子具有特异性，包括本发明的 NIgSBR 和抗-NIgSAb。在该方法中，编码蛋白质、肽、抗体、抗体部分、抗体变体、抗体片段、组合体(combibody)、融合蛋白或杂交蛋白的 DNA 包含于病毒、细菌噬菌体、宿主细胞或其它可复制的系统。这些分子表达在病毒、细菌噬菌体、核糖体、宿主细胞或其它可复制的系统的表面并通过与一种或多种固定化靶分子结合来选择。几轮选择后，分离编码靶结合分子的 DNA。参见，PCT 专利公开号 WO 91/17271。产生随机和特定肽文库的其它系统同时具有体外化学合成和重组方法两个方面。核糖体展示文库也是本领域已知的并且市售可得(Cambridge Antibody Technology, BioInvent, Affitech, Biosite)。参见，PCT 专利公开号 WO 92/05258、WO 92/14843 和 WO 96/19256。也参见美国专利号 5,658,754 和 5,643,768。

进行这些方法所需的肽展示文库、抗体片段展示文库、杂交蛋白质展示文库、融合蛋白质展示文库、载体和筛选试剂盒是本领域已知的和/或自以下来源市售可得，例如 Invitrogen(Carlsbad, California)；Cambridge Antibody Technologies(Cambridgeshire, UK)；Phylos, Inc.(Lexington, MA)；Dyax Corporation(Cambridge, MA)；Morphosys(Martinsried/Munich, Germany) 和 Maxygen(Redwood City, CA)。参见，例如转让给 Enzon 的美国专利号 4,704,692；4,874,702；4,939,666；4,946,778；5,260,203；5,455,030；5,518,889；5,534,621；5,656,730；5,763,733；5,767,260；5,856,456；转让给 Dyax 的 5,223,409；5,403,484；

5,571,698 和 5,837,500; 转让给 Affymax 的 5,427,908 和 5,580,717; 转让给 Cambridge Antibody Technologies 的 5,885,793; 转让给 Genentech 的 5,750,373; 转让给 Xoma 的 5,618,920; 5,595,898; 5,576,195; 5,698,435; 5,693,493 和 5,698,417; Colligan, 同上; Ausubel, 同上; 或 Sambrook, 同上, 以上每篇专利和出版物均全文纳入本文作为参考。

本发明的 NIgSBR 也可从不同的化合物文库中鉴定。这种化合物可是各种类型, 包括(但不限于)肽、蛋白质、抗体、核酸、DNA 适体、碳水化合物、多糖、融合蛋白、杂交分子(例如肽-核酸杂交体)或任何其它有机或无机分子或这些分子的组合。筛选这些化合物文库中与靶分子结合的任何成员。本领域的普通技术人员熟知各种适用于筛选的方法。从不同的文库鉴定本发明 NIgSBR 的靶分子包括(但不限于)天然免疫球蛋白及其任何表位。适用于鉴定本发明 NIgSBR 的不同文库包括(但不限于)基于蛋白质支架的文库, 其中非免疫球蛋白肽用作框架或支架, 而作为靶分子结合区域的可变氨基酸序列的片段建立于其上。本领域的普通技术人员易于理解各种基于蛋白质支架的文库适用于本发明的方法来鉴定 NIgSBR。这些不同的文库以及筛选它们来鉴定结合靶分子的成员的方法是本领域熟知的(参见, 例如 Phyllos, Inc., Lexington, MA 的已知为“Trinectin”基于纤连蛋白的蛋白质支架和已知为“Profusion”的展示技术; Affibody AB 的基于金黄色葡萄球菌的蛋白质 A 的亲体(Affibodies); 和 Pieris Proteolab AG 的基于脂笼蛋白的 Anticalens)。具有高特异性和亲和力地结合蛋白质的非蛋白质俘获分子, 例如 DNA 适体也用于文库和阵列(SomaLogic)。本领域已知的“SELEX”方法是鉴定这些核酸适体的方法。本领域的普通技术人员采用这些可用的技术来鉴定的这些分子以分离本发明的 NIgSBR。

基于定向蛋白质进化的文库和筛选方法也可用于鉴定本发明的 NIgSBR。这些技术通常涉及在遗传水平随机诱导突变, 然后在蛋白质水平选择所需的特性。基于定向蛋白质进化的文库和制造及筛选它们的方法是本领域熟知的。

蛋白质阵列也可用于鉴定本发明的 NIgSBR。蛋白质阵列是在表面, 例如玻璃、塑料、膜、珠子或任何其它表面上使用固定化蛋白质的固相结合测定系统。这些阵列用于从具有选择的结合特性的展示文库分离单个成员。蛋白质阵列可用于本发明的方法来从噬菌体展示或核糖体展示文库中选择 NIgSBR 和抗-NIgSAbs。如同制造

和使用它们的方法一样，蛋白质阵列是本领域普通技术人员熟知的。

许多美国专利和公开的美国专利申请公开了许多文库和制造及筛选它们以发现与靶结合的分子的方法。这些文库和方法的例子公开于以下美国专利和公开的美国专利申请，其中每篇均纳入本文作为参考。参见，例如转让给 Diversa Corporation 的美国专利号 6,605,449；6,537,776 和美国申请系列号 2002/0146762 和 2002/0142394；转让给 Affymax 的美国专利号 5,811,238；转让给 Medical Research Council 的美国专利号 6,489,103；转让给 Dyax Corporation 的美国申请系列号 2003/0186223；转让给 SELEX Techniques 的美国专利号 6,376,190；6,331,398；6,114,120；6,110,900；5,843,653；5,707,796；6,159,690；5,696,249；5,670,637；5,475,096；5,270,163；美国申请系列号 2003/0157487、2003/0044818 和 2002/0102599；转让给 Maxygen 的美国专利号 6,613,514；6,602,986；6,586,182；6,579,678；6,576,467；6,573,098；6,518,065；6,506,603；6,506,602；6,455,253；6,444,468；6,436,675；6,420,175；6,413,774；6,395,547；6,372,497；6,355,484；6,344,356；6,335,160；5,323,030；6,319,713；6,303,344；6,287,861；6,297,053；6,291,242；6,277,638；6,180,406；6,165,793；6,117,679；美国申请系列号 2003/0186356 和 2003/0077613；转让给 Phylos 的美国专利号 6,602,685；6,537,749；6,436,665；6,429,300；6,416,950；6,312,927 和美国申请系列号 2002/0182687；转让给 General Hospital Corporation 的美国专利号 6,579,676；5,411,861 和 5,955,264；转让给 California Institute of Technology 的美国申请系列号 2002/0051998 和 2001/0051855；转让给 Rensselaer Polytechnic Institute 的美国申请系列号 2002/0164635。美国申请系列号 2003/0162218、2003/0152943、2003/0148353、2003/0134351、2003/0113738、2003/0077613、2002/0102734、2002/0045175、2003/0180718 和 2003/0167128。这些专利和申请的每一篇均纳入本文作为参考。

本发明的抗-NigSAb 也可使用至少一种抗-NIgSAb-编码核酸以提供在其奶中产生这种抗体的转基因动物或哺乳动物来制备，所述动物或哺乳动物是例如山羊、牛、马、绵羊等。这种动物可用已知的方法提供。参见，例如(但不限于)美国专利号 5,827,690；5,849,992；4,873,316；5,849,992；5,994,616；5,565,362；5,304,489 等，每篇专利全文纳入本文作为参考。

本发明的抗-NIgSAb 还可使用至少一种抗-NIgSAb-编码核酸以提供转基因植

物和培养的植物细胞(例如,但不限于烟草、土豆和玉米)来制备,所述植物和培养的植物细胞在植物部分或从中培养的植物细胞中产生这种抗体、特定部分或变体。作为非限制性例子,表达重组蛋白质的转基因烟叶成功地用于提供大量重组蛋白质,例如使用诱导型启动子。参见,例如 Cramer 等, 240 CURR.TOP.MICROBOL.IMMUNOL., 95-118 (1999)和本文引用的参考文献。转基因玉米也已用于在商业生产水平表达哺乳动物蛋白,所述蛋白的生物学活性与在其它重组系统中产生或纯化自天然来源的相同。参见,例如 Hood 等, 464 ADV.EXP.MED.BIOL., 127-147 (1999)和本文引用的参考文献。抗体也已在转基因植物种子中大量生产,包括抗体片段(例如单链抗体(scFv's)),所述植物种子包括烟草种子和土豆块茎。参见,例如 Conrad 等, 38 PLANT MOL.Biol., 101-109 (1998)和本文引用的参考文献。因此,根据已知的方法,本发明的抗体也可使用转基因植物生产。也参见,例如, Fischer 等, 30 BIOTECHNOL.APPL.BIOCHEM., 99-108 (1999年10月); Ma 等, 13 TRENDS BIOTECHNOL., 522-527 (1995); Ma 等, 109 PLANT PHYSIOL., 341-346 (1995); Whitelam 等, 22 BIOCHEM.SOC.TRANS., 940-944 (1994); Payne 等, 《液体系统中的植物细胞和组织培养》(PLANT CELL AND TISSUE CULTURE IN LIQUID SYSTEMS), John Wiley & Sons, Inc., 纽约, 纽约州 (1992); Gamborg 和 Phillips 编, “植物细胞、组织和器官培养的基础方法”(PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE ; FUNDAMENTAL METHODS), 《Springer 实验室手册》(Springer Lab Manual), Springer-Verlag(Berlin Heidelberg New York) (1995); 《植物分子生物学》(PLANT MOLECULAR BIOLOGY), Croy 编, BIOS Scientific Publishers, Inc., (1993); Clark 编, 《植物分子生物学: 实验室手册》(PLANT MOLECULAR BIOLOGY : A Laboratory Manual), Springer-Verlag, Berlin (1997)和本文引用的参考文献。以上每篇参考文献均全文纳入本文作为参考。

本发明的抗体可以宽范围的亲和力(K_D)结合天然免疫球蛋白。在一优选的实施方案中,本发明的至少一种抗-NiGSAb 可任选以至少用于 Western 印迹足够高的亲和力结合天然免疫球蛋白。

抗体-抗原的亲和力或亲合性可用任何合适的方法来实验性测定。(参见,例如 Berzofsky 等, 《基础免疫学》(Fundamental Immunology)中的“抗体-抗原相互作用”

(Antibody-Antigen Interactions), 第4版, (W.E.Paul 编, Lippincott-Raven: New York, New York, 1999); Janis Kuby, 《免疫学》(Immunology), (W.H.Freeman and Company: New York, New York, 1992)和本文所述的方法)。如果在不同条件下(例如, 盐浓度、pH)测量, 所测定的特定抗体-抗原相互作用的亲和力可变。因此, 对亲和力和其它抗原结合参数(例如, K_D 、 K_a 、 K_d)的测量优选用抗体和抗原的标准化溶液和标准化的缓冲液进行, 例如本文所述的缓冲液。

核酸分子

使用本文提供的信息, 编码至少一种抗-NIgSAb 的本发明核酸分子可使用本文所述或本领域已知的方法获得。

为获得编码本发明抗-NIgSAb 的核酸分子, 需要抗体的氨基酸序列。为实现此目标, 可纯化抗体蛋白并用自动测序仪测定部分氨基酸序列。无需测定整个氨基酸序列, 但为产生用于部分抗-NIgSAb DNA 片段的 PCR 扩增的引物, 要测定该蛋白质的两个 6-8 个氨基酸区域的线形序列。

一旦鉴定了合适的氨基酸序列, 就可合成能编码它们的氨基酸序列。由于遗传密码是简并的, 多种密码子可用于编码特定的氨基酸, 因此氨基酸序列可由任何一组简并 DNA 寡核苷酸编码。该组寡核苷酸中仅有一种与给定的抗-NIgSAb 序列相同, 但是许多成员通常也能与抗-NIgSAb 的编码核酸杂交, 即使由于遗传密码的简并性造成探针核酸寡核苷酸具有错配。错配的简并 DNA 寡核苷酸通常仍能与抗-NIgSAb 的编码核酸充分杂交以鉴定和分离抗体的编码核酸。通过这些方法分离的 DNA 可用于从各种细胞类型的、无脊椎动物和脊椎动物来源中筛选 DNA 文库并分离同源基因。

杂交形式, 包括(但不限于)液相、固相、混合相, 或原位杂交可用于检测感兴趣的克隆。核酸杂交的广泛指导见 Tijssen (1993) 《生物化学和分子生物学实验室技术——用核酸探针杂交》(Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes), Elsevier, New York 以及 Sambrook、Berger 和 Ausubel(本文)。用于标记核酸的标记方法和相应的检测方法见, 例如 Haugland (1996) 《荧光探针和研究化学品手册》(Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals), 第6版, Molecular Probes, Inc. (Eugene OR); 或

Haugland(2001) 《荧光探针和研究化学品手册》(Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals), 第8版, Molecular Probes, Inc. (Eugene OR)(光盘版)。

本发明的核酸分子可是 RNA 形式, 例如 mRNA、hnRNA、tRNA 或任何其它形式, 或是 DNA 形式, 包括(但不限于)cDNA 和基因组 DNA, 例如得自克隆或合成产生的, 或它们的任何组合。DNA 可是双链或单链, 或它们的任何组合。DNA 或 RNA 的至少一条链的任何部分是编码链, 也称为有义链, 或者它可是非编码链, 也称为反义链。

本发明分离的核酸分子可包括以下核酸分子: 含有开放读框(ORF)的核酸分子, 任选具有一个或多个内含子, 例如(但不限于)至少一个 CDR 的至少一个特定部分, 如至少一条重链或轻链的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3; 含有抗-NIgSAb 编码序列或可变区的核酸; 和含有基本上不同于上述的核苷酸序列的核酸分子, 但由于遗传密码的简并性仍能编码至少一种本文所述和/本领域已知的抗-NIgSAb。当然, 遗传密码是本领域熟知的。因此, 产生这种编码本发明的特异性抗-NIgSAb 的简并核酸变体对本领域的技术人员而言是惯常的。参见, 例如 Ausubel 等, 同上, 并且这种核酸变体包括于本发明中。

如本文所述, 含有编码抗-NIgSAb 的核酸的本发明核酸分子包括(但不限于)本身编码抗体片段、部分或变体的氨基酸序列的核酸; 完整的抗体或其一部分的编码序列; 抗体、片段、部分或变体的编码序列以及其它的序列, 例如有或没有上述其它编码序列的至少一种信号前导或融合肽的编码序列, 所述其它编码序列例如至少一个内含子与其它的非编码序列, 包括(但不限于)非编码 5'和 3'序列, 例如在转录、mRNA 加工, 包括剪接和聚腺苷酸化信号(如 mRNA 的核糖体结合与稳定性)中发挥作用的转录、非翻译序列; 编码其它氨基酸, 例如提供其它官能度的氨基酸的其它编码序列。因此, 编码抗体的序列可与标记序列融合, 例如有助于纯化含有抗体片段、部分或变体的融合抗体的编码肽的序列。

核酸的构建

本发明分离的核酸可使用本领域熟知的以下技术制造(a)重组方法, (b)合成技术, (c)纯化技术, 或它们的组合。

核酸可方便地含有除本发明的抗-NIgSAb 多核苷酸序列以外的序列。例如,

可在核酸中插入含有一个或多个内切酶的限制性位点的多克隆位点以帮助分离多核苷酸。也可插入可翻译的序列来帮助分离本发明翻译的多核苷酸。例如，六组氨酸标记序列提供了纯化本发明蛋白质的简便方法。本发明的核酸(除了编码序列)任选是用于克隆和/或表达本发明的多核苷酸的载体、衔接头或接头。

其它序列可加入这种克隆和/或表达序列以优化其在克隆和/或表达中的功能，帮助分离多核苷酸，或增进多核苷酸引入细胞。克隆载体、表达载体、衔接头和接头的用途是本领域熟知的。(参见，例如 Ausubel，同上或 Sambrook，同上)。

构建核酸的重组方法

本发明分离的核酸组合物，例如 RNA、cDNA、基因组 DNA 或它们的任何组合可用任何数量的本领域技术人员已知的克隆方法从生物来源获得。在一些实施方案中，在严谨条件下与本发明的多核苷酸选择性杂交的寡核苷酸探针用于在 cDNA 或基因组 DNA 文库中鉴定所需序列。RNA 的分离、cDNA 和基因组文库的构建是本领域普通技术人员熟知的。(参见，例如 Ausubel，同上；或 Sambrook，同上)。

构建核酸的合成方法

本发明分离的核酸也可由已知方法(参见，例如 Ausubel 等，同上)通过直接化学合成来制备。化学合成通常产生单链寡核苷酸，该寡核苷酸可通过与互补序列杂交，或以该单链为模板用 DNA 聚合酶通过聚合作用转变为双链 DNA。本领域的技术人员可意识到化学合成 DNA 一般对约 100 个或更少的碱基的序列最有效，较长的序列可通过化学或连接酶介导的方法连接较短的序列来容易地获得。

重组表达盒

本发明还提供含有本发明核酸的重组表达盒。本发明的核酸序列，例如编码本发明抗体的 cDNA 或基因组序列可用于构建可引入至少一种所需宿主细胞的重组表达盒。重组表达盒一般含有操作性连接于引导多核苷酸在所需宿主细胞中转录的转录起始调节序列的本发明多核苷酸。异源和非异源(即，内源性)启动子可用于引导本发明核酸的表达。

在一些实施方案中，用作启动子、增强子或其它元件的分离的核酸可引入非异源形式的本发明多核苷酸的合适位置(上游、下游或在内含子中)以上调或下调本

发明多核苷酸的表达。例如，可通过突变、删除和/或取代在体内或体外改变内源性启动子。

载体和宿主细胞

本发明也涉及含有本发明分离的核酸分子的载体、用重组载体遗传改造的宿主细胞和通过本领域熟知的重组技术产生至少一种抗-NIgSAb。参见，例如 Sambrook 等，同上；Ausubel 等，同上，每篇文献全文纳入本文作为参考。

多核苷酸可任选与含有选择标记的载体相连以在宿主中增殖。质粒载体一般以沉淀物，例如磷酸钙沉淀物的形式，或与荷电脂质形成复合物引入。如果载体是病毒，可在体外用合适的包装细胞系包装再引入宿主细胞。

DNA 插入物应操作性连接于合适的启动子。表达构建物还可含有转录起始、终止位点，并在转录区域含有用于翻译的核糖体结合位点。构建物表达的成熟转录物的编码部分优选在合适地位于待翻译 mRNA 的末端的开始和终止密码子(例如，UAA、UGA 或 UAG)处含有翻译起始位点，哺乳动物或真核细胞表达优选 UAA 和 UAG。

表达载体优选(但任选)含有至少一个选择标记。这种标记包括，例如(但不限于)氨甲喋呤(MTX)；二氢叶酸还原酶(DHFR，美国专利号 4,399,216；4,634,665；4,656,134；4,956,288；5,149,636 和 5,179,017)；用于真核细胞培养的氨苄西林、新霉素(G418)、霉酚酸或谷氨酰胺合成酶(GS，美国专利号 5,122,464；5,770,359 和 5,827,739)耐药性；用于培养大肠杆菌和其它细菌或原核细胞的四环素或氨苄西林耐药基因(以上专利均全文纳入作为参考)。上述宿主细胞的合适培养基和培养条件是本领域已知的。技术人员容易明白合适的载体。可通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染或其它已知方法实现将载体构建物引入宿主细胞。这些方法描述于本领域，例如 Sambrook，同上，1-4 和 16-18 章；Ausubel，同上，1、9、13、15、16 章。

本发明的至少一种抗体可以修饰的形式表达，例如融合蛋白，并且不仅含有分泌信号还可含有其它异源功能区域。例如，可在抗体的 N 末端加上其它氨基酸，特别是荷电氨基酸的区域以提高在纯化期间或以后的处理和保存期间在宿主细胞中的稳定性和持久性。也可给本发明的抗体加上肽组分以有助于纯化。这种区域可

在抗体或其至少一个片段的最终制备之前除去。这些方法描述于许多标准实验室手册中，例如 Sambrook，同上，17.29-17.42 和 18.1-18.74 章；Ausubel，同上，16、17 和 18 章。

本领域的普通技术人员已知许多能表达本发明编码蛋白质的核酸的表达系统。或者，本发明的核酸可通过在含有编码本发明抗体的内源性 DNA 的宿主细胞中启动(操作)表达从而于宿主细胞中表达。这些方法是本领域熟知的，例如描述于美国专利号 5,580,734；5,641,670；5,733,746 和 5,733,761，这些专利全文纳入本文作为参考。

用于生产抗体、其特定部分或变体的细胞培养的例证是哺乳动物细胞。虽然也可使用哺乳动物细胞悬浮液或生物反应器，但哺乳动物细胞系统通常是单层细胞的形式。本领域已开发了许多能表达完整糖基化蛋白的合适的宿主细胞系，包括 COS-1(例如，ATCC CRL 1650)、COS-7(例如，ATCC CRL-1651)、HEK293、BHK21(例如，ATCC CRL-10)、CHO(例如，ATCC CRL 1610)和 BSC-1(例如，ATCC CRL-26)细胞系、Cos-7 细胞、CHO 细胞、hepG2 细胞、P3X63Ag8.653、SP2/0-Ag14、293 细胞、HeLa 细胞等，这些细胞系可容易地得自，例如美国模式培养物保藏所，Manassas, Va(www.atcc.org)。在一个实施方案中，宿主细胞包括淋巴来源的细胞，例如骨髓瘤和淋巴瘤细胞。

这些细胞的表达载体可含有一种或多种以下表达控制序列，例如(但不限于)复制起点；启动子，例如，晚期或早期 SV40 启动子、CMV 启动子(美国专利号 5,168,062 和 5,385,839)、HSV tk 启动子、pgk(磷酸甘油酸激酶)启动子、EF-1 α 启动子(美国专利号 5,266,491)、至少一个人免疫球蛋白启动子；增强子和/或加工信息位点，例如核糖体结合位点、RNA 剪接位点、聚腺苷酸化位点(例如，SV40 大 T Ag polyA 加入位点)和转录终止子序列。参见，例如 Ausubel 等，同上；Sambrook 等，同上。其它已知和/或可用的用于生产本发明核酸或蛋白质的细胞有，例如来自美国模式培养物保藏所的细胞系和杂交瘤(www.atcc.org)或其它已知或商业来源。

当使用真核宿主细胞时，载体中通常掺入聚腺苷酸化或转录终止子序列。终止子序列的例子是牛生长激素基因的聚腺苷酸化序列。也可含有精确剪接转录物的序列。剪接序列的例子是 SV40 的 VP1 内含子(Sprague 等，45 J.VIROL., 773-781

(1983))。此外,本领域已知在宿主细胞中控制复制的基因序列可掺入载体。

抗体的纯化

可通过熟知的方法从血清、或杂交瘤或重组细胞培养物中回收和纯化抗-NIgSAb,所述方法包括(但不限于)蛋白 A 或蛋白 G 纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水相互作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析。高效液相层析(“HPLC”)也可用于纯化。参见,例如 Colligan,《新编免疫学实验指南》(Current Protocols in Immunology)或《新编蛋白质科学实验指南》(Current Protocols in Protein Science), (John Wiley & Sons, 纽约,纽约州,1997-2001),例如 1、4、6、8、9、10,每篇文献全文纳入本文作为参考。除了许多本文引用的其它参考文献以外,各种纯化和相关蛋白质折叠和再折叠的方法是本领域熟知的并可应用于抗体或其它 NiGSBR 分子纯化,包括,例如以下文献中所述的:R.Scopes,《蛋白质纯化》(Protein Purification), Springer-Verlag, N.Y. (1982); Deutscher,《酶学方法》182 卷:“蛋白质纯化指南”(Methods in Enzymology 182 : Guide to Protein Purification), Academic Press, Inc., N.Y. (1990); Sandana 《蛋白质的生物分离》(Bioseparation of Proteins), Academic Press, Inc., (1997); Bollag 等,《蛋白质方法》(Protein Methods), 第二版, Wiley-Liss, NY (1996); Walker 《蛋白质方法手册》(The Protein Protocols Handbook), Humana Press, NJ (1996); Harris 和 Angal 《蛋白质纯化应用:一种实用方法》(Protein Purification Applications : A Practical Approach), IRL Press at Oxford, Oxford, England (1990); Scopes 《蛋白质纯化:原理和实践》(Protein Purification: Principles and Practice), 第 3 版, Springer Verlag, NY (1993); Janson 和 Ryden 《蛋白质纯化:原则、高分辨率方法和应用》(Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications), 第 2 版, Wiley-VCH, NY (1998); Walker 《蛋白质方法光盘版》(Protein Protocols on CD-ROM) Humana Press, NJ (1998)和本文引用的参考文献。

本发明的 NiGSBR 和抗-NiGSAb 可包括以下产物:天然纯化的产物、化学合成方法的产物、通过重组技术由原核或真核宿主生产的产物,所述宿主包括,例如细菌、真菌、酵母、植物、昆虫、非哺乳动物和哺乳动物细胞。取决于重组生产方法中使用的宿主,本发明的抗体可是糖基化或非糖基化的,某些实施方案优选糖基化

的。这些方法描述于许多标准实验室手册，例如 Sambrook，同上，17.37-17.42 章；Ausubel，同上，10、12、13、16、18 和 20 章；Colligan，《蛋白质科学》(Protein Science)，同上，12-14 章，所有文献均全文纳入本文作为参考。

可处理本发明的多克隆抗-NIgSAb 以去除与变性免疫球蛋白结合的任何抗体。将多克隆抗-NIgSAb 与变性免疫球蛋白接触，然后去除与变性免疫球蛋白结合的抗体进行该处理。例如，可使用连接于不溶基质的变性免疫球蛋白来实现该去除处理。可通过收集未结合的抗体或通过去除连接有变性免疫球蛋白的不溶基质连同与变性免疫球蛋白结合的抗体使与连接在基质上的变性免疫球蛋白结合的任何抗体和剩余抗体分开。本领域的普通技术人员易于明白不溶的基质可是珠子、平板、孔、试管、薄片或任何各种形状、大小或材料。

NIgSBR 制备

如本文所述，一般可鉴定、分离和表征非抗体的任何 NiGSBR。本领域的普通技术人员易于明白任何具体的非抗体 NiGSBR 一般适用于标准方法和本领域已知的方法，所述方法适合于 NiGSBR 化合物或分子的特定类型。本领域的普通技术人员无需过多实验就可容易地理解并选择合适的方法对感兴趣的具体 NiGSBR 进行分离、纯化、配制、处理等。如本文所述，就蛋白质或相关 NiGSBR 而言，以下参考文献提供了这些方法的大量细节：R.Scopes，《蛋白质纯化》(Protein Purification)，Springer-Verlag，N.Y. (1982)；Deutscher，《酶学方法》182 卷：“蛋白质纯化指南”(Methods in Enzymology 182 : Guide to Protein Purification)，Academic Press，Inc.，N.Y. (1990)；Sandana 《蛋白质的生物分离》(Bioseparation of Proteins)，Academic Press，Inc.，(1997)；Bollag 等，《蛋白质方法》(Protein Methods)，第二版，Wiley-Liss，NY (1996)；Walker 《蛋白质方法手册》(The Protein Protocols Handbook)，Humana Press，NJ (1996)；Harris 和 Angal 《蛋白质纯化应用：一种实用方法》(Protein Purification Applications : A Practical Approach)，IRL Press at Oxford，Oxford，England (1990)；Scopes 《蛋白质纯化：原理和实践》(Protein Purification: Principles and Practice)，第 3 版，Springer Verlag，NY (1993)；Janson 和 Ryden 《蛋白质纯化：原理、高分辨率方法和应用》(Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications)，第 2 版，Wiley-VCH，NY (1998)；Walker

《蛋白质方法光盘版》(Protein Protocols on CD-ROM) Humana Press, NJ (1998)。就核酸操作而言, Sambrook 和 Ausubel 提供了用于分离、纯化、配制和处理核酸(以及蛋白质和某些小分子)的详细方法。就分离、纯化、配制和处理得到的分子的有机合成技术和方法而言, 可参见, 例如《有机化学》(Organic Chemistry), Fessendon 和 Fessendon, (1982, 第二版, Willard Grant Press, Boston Mass.); 《高等有机化学》(Advanced Organic Chemistry), March, (第三版, 1985, Wiley and Sons, New York)和《高等有机化学》(Advanced Organic Chemistry), Carey 和 Sundberg, (第三版, A 部分和 B 部分, 1990, Plenum Press, New York)。关于许多化合物的分离、纯化、配制和处理的其它细节见 2004 Sigma 目录(USA)或 2004 Aldrich 目录(Milwaukee, WI, USA)。

诊断方法

如本文所述, 本发明也提供可检测标记的, 用于研究、治疗或诊断方法的抗-NIgSAb。

本发明的抗-NIgSAb 可用于各种检测或定量样品中或底物上的其它抗原或抗体的方法(例如免疫测定)。检测抗体的免疫测定通常包括在有可检测标记的本发明抗-NIgSAb 时孵育样品, 检测样品中结合的标记抗体。各种临床测定方法是本领域熟知的, 例如《80年代免疫测定》(Immunoassays for the 80's), (A.Voller 等编, University Park, 1981) 和 Paul 编, 《基础免疫学》(FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY), 第四版, Lippincott-Raven, NY, NY (1999)中所述的。

因此, 用于测定的抗-NIgSAb、NIgSBR 或任何其它抗体分子可加入能固定细胞、细胞成分或蛋白质的硝酸纤维素或其它固体支持物。然后可用合适的缓冲液和其它所需试剂洗涤支持物, 再用可检测标记的抗-NIgSAb 或可检测标记的 NIgSBR 处理。接着用缓冲液第二次洗涤固相支持物以去除未结合的可检测标记的抗-NIgSAb 或未结合的可检测标记的 NIgSBR。然后通过已知的方法步骤检测或定量固体支持物上结合的标记的量。

“固相支持物”或“运载体”包括能结合肽、蛋白质、抗原或抗体的任何支持物。熟知的支持物或运载体包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和改性纤维素、硝酸纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁石。出于

本发明的目的,运载体的性质在一定程度上是可溶性或不溶性的。只要偶联的分子能结合抗原或抗体,支持物质实质上可具有任何可能的结构构型。因此,支持物构型可是圆的,例如珠子;或圆柱形,例如试管的内表面或棒的外表面。或者,表面可是平的,例如薄片、培养皿、测试带等。优选的支持物包括聚苯乙烯珠子和平板的孔。本领域技术人员易于明白,有许多其它合适的结合抗体、肽或抗原的运载体或可通过惯常的实验确定这些运载体。

熟知的方法步骤可确定给定的一批抗-NIgSAb 或 NIgSBR 的结合活性。本领域的技术人员可使用除本文公开的方法以外的熟知方法通过惯常的实验来确定有效和最优化的测定条件。

可通过连接用于酶免疫测定(EIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)中的酶可检测地标记抗-NIgSAb 或 NIgSBR。连接的酶与暴露的底物反应得到可检测的化学组成成分,例如通过分光光度计、荧光计或经目测。可用于可检测地标记本发明抗-NIgSAb 的酶包括(但不限于)苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酶、 δ -5-甾体异构酶、酵母乙醇脱氢酶、 α -甘油磷酸脱氢酶、丙糖磷酸异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。

通过放射性标记抗-NIgSAb 或 NIgSBR,非变性免疫球蛋白就能通过使用放射免疫测定(RIA)来检测(参见,例如 Work 等,《分子生物学的实验室技术和生物化学》(Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology), North Holland Publishing Company, N.Y. (1978))。放射性同位素可通过使用例如 γ 计数器或闪烁计数器或通过放射自显影术等方法来检测。对本发明目的特别有用的同位素是 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 和 ^{125}I 。

也能用荧光化合物标记抗-NIgSAb 或 NIgSBR。当荧光标记试剂接触合适波长的光时,可因荧光而检测到它的存在。最常用的荧光标记化合物是异硫氰酸荧光素、罗丹明、藻红蛋白、藻青蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二醛和荧光胺。也参见 Haugland,《荧光探针和研究化学品手册》(Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals),第九版, Molecular Probes, Inc., Eugene OR(2003)。

也可使用发射荧光的金属,例如 ^{152}Eu 或镧系的其它金属来可检测地标记抗-NIgSAb 或 NIgSBR。这些金属可使用金属螯合基团,例如二亚乙基三胺五乙酸

(DTPA) 或乙二胺四乙酸(EDTA)来连接于抗-NIgSAb。

也可通过偶联化学发光化合物来可检测地标记抗-NIgSAb 或 NIgSBR。然后通过检测在化学反应期间产生的荧光的存在来确定化学发光标记的抗体的存在。特别有用的化学荧光标记化合物的例子是鲁米诺、异鲁米诺(isoluminol)、热保护的(theromatic)吡啶酯、咪唑、吡啶盐和草酸酯。

类似地,可用生物荧光化合物来标记本发明的抗-NIgSAb 或 NIgSBR。生物荧光是在生物系统中发现的一种类型的化学荧光,在该系统中有一种催化蛋白质增加化学荧光反应的效率。通过检测荧光的存在来确定生物荧光蛋白质的存在。用于标记的重要生物荧光化合物是荧光素、荧光素酶和水母蛋白。

可通过,例如闪烁计数仪(如果可检测标记是放射性 γ 发射体)或荧光计(如果标记是荧光物质)来检测抗-NIgSAb 或 NIgSBR。在酶标记的情况下,可通过使用酶的底物的比色法来检测。也可通过目测比较底物的酶反应程度与类似制备的标准物来检测。

可通过,例如从患者中除去组织样本并使可检测地标记的本发明抗-NIgSAb 或 NIgSBR 与这种样本结合来进行原位检测。优选通过将可检测地标记的抗-NIgSAb 或 NIgSBR 应用于或覆盖生物样品来提供可检测地标记的抗-NIgSAb 或 NIgSBR。使用这种方法不仅能检测天然免疫球蛋白的存在也能检测天然免疫球蛋白在所检查组织中的分布。本领域的普通技术人员易于明白的是,可使用本发明改进各种组织学方法(例如,染色法)以实现这种原位检测。

本发明的抗-NIgSAb 或 NIgSBR 可适用于也称为“双位点”或“夹心”测定的免疫测定。在典型的免疫测定中,一定量的未标记抗体(或抗体的片段)结合于固体支持物,该支持物在经测试的液体中不溶,加入一定量的可检测标记的抗-NIgSAb 或 NIgSBR 来检测和/或定量在固相抗体、抗原和可检测标记的试剂之间形成的三元复合物。

免疫测定通常包括“正向”测定,其中结合于固相的抗体首先与测试样品接触,通过形成二元固相抗体-抗体复合物从样品中提取抗原。合适的孵育期后,洗涤固相支持物以去除残留的液体样品,包括未反应的抗原(如果有的话),然后与含有已知量的标记抗体(其功能是“报道分子”)的溶液接触。第二次孵育以使标记的抗体与结合在固相支持物上的抗原通过未标记的抗体形成复合物,然后第二次洗涤

固相支持物以去除未反应的标记抗体。这种类型的正向夹心测定是一种确定是否存在抗原的简单的“是/否”测定，或者可通过比较标记抗体与含有已知量的非变性免疫球蛋白的标准样品获得的测量值来定量地进行该测定。《广泛放射性免疫测定方法》(Wide Radioimmune Assay Method), (Kirkham 编, Livingstone, Edinburgh (1970) 199-206)描述了这种“双位点”或“夹心”测定。

也可用于天然免疫球蛋白的其它类型的“夹心”测定称为“同步”和“反向”测定。同步测定包括一次孵育步骤，其中结合于固相支持物的抗体、抗原和标记的抗体和其它所需试剂同时加入测试样品。孵育完成后，洗涤固相支持物以去除残留的液体样品和未形成复合物的标记抗体。然后如同常规“正向”夹心测定一样测定与固相支持物相连的标记抗体的存在。

在“反向”测定中，首先向液体样品中分批加入标记抗体的溶液，然后在合适的孵育期后加入结合于固相支持物的未标记抗体。第二次孵育后，以常规方式洗涤固相以去除残留的测试样品和未反应的标记抗体溶液。然后如同“同步”和“正向”测定一样测定与固相支持物相连的标记抗体的存在。在一个实施方案中，可联合使用对相同或不同表位特异的本发明抗-NIgSAb 和/或 NIgSBR 来构建敏感的多位点免疫放射测定。

可制备含有本发明抗-NIgSAb 或 NIgSBR 的试剂盒或制品。这些试剂盒或制品用于研究、治疗或诊断方法。

本文所述方法中，抗-NIgSAb 和 NIgSBR 通常可互换并且可互相取代或可联用，包括在它们是可检测地标记的场合。

然而，以下实施例是对本发明的说明而非限制。技术人员可意识到根据本发明可替换的各种基本上等价的参数和材料。

实施例 1

抗体的生产

免疫和融合方法

用小鼠血清免疫球蛋白免疫 Lou/M 大鼠。用家兔血清免疫球蛋白免疫 Balb/c 小鼠。免疫三次后测试血清滴度。具有高血清滴度的动物脾脏与小鼠骨髓瘤融合配偶体 SP2/O 融合。

融合方法

A.培养基制备

1)IMDM 基础培养基:

2)20%FBS 完全培养基:

500ml IMDM 基础培养基 + 100ml FBS + 6.5ml P/S(原液浓度: 10,000 单位/ml 青霉素; 100,000 单位/ml 链霉素) + 6.5ml 谷氨酰胺(原液浓度: 200 μ M)。

3)补充剂:

100 \times HAT

50 \times HES(杂交瘤增强补充剂)

4)融合培养基:

500ml 完全培养基

5ml 100 \times HAT

10ml 50 \times HES

5)50%PEG(Sigma, MW 1500)

B.制备骨髓瘤细胞

1)融合前,骨髓瘤细胞系培养在至少 10-20%FBS IMDM 培养基中 3-4 天。融合细胞前骨髓瘤(细胞)维持于对数生长期。

2)使用光学显微镜检查骨髓瘤细胞的生长和存活率。

3)轻柔地从烧瓶表面移下骨髓瘤细胞并转移入 50ml 锥形管。

4)骨髓瘤细胞于 1100rpm 离心 5 分钟。

5)弃去上清液,细胞球重悬于普通 IMDM 培养基中。

6)骨髓瘤细胞于 1100rpm 离心 5 分钟。

7)弃去上清液,细胞球重悬于基础 IMDM 培养基中。

8)重复洗涤一次并进行细胞计数。

C.脾细胞的制备如下进行:

1)麻醉动物并经心脏穿刺进行放血以收集尽可能多的血液,然后进行颈脱位。

2)动物浸在 75%乙醇中 2-3 分钟。

3)将动物置于其右侧以暴露左侧腹部区域并钉在用 75%乙醇消毒的聚苯乙烯泡沫塑料架上。

4)用剪刀将左腿皮肤割成 V 形。将皮肤拉离以扩大切口从而暴露腹壁腹膜。正好在左侧腹部的腹膜下可见微红色暗块状的脾脏。

5)用小剪刀割开腹膜以暴露脾脏。

6)切割脾脏并拨开粘着物以取出脾脏。脾脏置于预湿润的尼龙筛选细胞过滤器上，该过滤器置于 50ml 锥形管的顶部。用小的弧形剪刀将脾脏割成小片。

7)用 1cc 注射器柱塞使脾脏片对细胞过滤器过筛并通过研磨作用使之匀浆化。用基础 IMDM 培养基(任选青霉素/链霉素)将脾脏细胞洗入 50ml 锥形管。继续匀浆化和清洗脾脏细胞直至分离了所有脾脏细胞。

8)脾脏细胞于 1100rpm 离心 5 分钟。弃去上清液并重悬细胞球。向细胞中加入 40ml IMDM，重复进行上述离心。这是第一次洗涤。

9)洗涤的脾脏细胞用 IMDM 培养基重悬并进行细胞计数。

D.按照如下进行脾脏细胞与骨髓瘤细胞的融合：

1)以 2-5:1 的脾脏细胞与骨髓瘤细胞比(优选 2:1 或 3:1)合并脾脏细胞和骨髓瘤细胞。

2)细胞混合物于 1500rpm 离心 7 分钟。

3)用玻璃巴斯德移液管吸去上清液，保证在 50ml 锥形管的侧壁上无水分。

4)在聚苯乙烯泡沫塑料架上敲击管的侧面以轻柔地移下细胞球。

5)在 1 分钟内滴加 50%PEG(预热至 37℃)并不时搅拌。

小鼠或仓鼠融合：0.8-1.0ml PEG

大鼠融合：0.9-1.2ml PEG

6)细胞/50%PEG 悬浮液进行反应

小鼠或仓鼠融合：1 分 15 秒

大鼠融合：1 分 30 秒

7)在 5 分钟内逐步加入 15ml 预热的普通 IMDM 培养基：

a)在第一分钟加入 1ml 并不时搅拌。

b)在第二分钟加入 2ml 培养基并不时搅拌。

c)在下一个的 2-3 分钟里加入剩余培养基并不时搅拌。

8)细胞悬浮液于 37℃ 水浴中孵育 2-5 分钟。

9)细胞于 1000rpm 离心 5 分钟。

10)弃去上清液并轻柔地重悬细胞球。然后小心地将细胞移入体积合适的融合培养基(HAT 培养基)。

11)30 分钟-1 小时后,以每孔 200 μ l用广口枪头将杂交瘤培养液铺进 96 孔平底组织培养板。

12)混合物在 37 $^{\circ}$ C、7%CO₂ 和 100%湿度的培养箱中培养 3-4 天。从所有孔中吸去 2/3 上清液并用广口枪头以 140-180 μ l/孔小心地加入 HT 培养基以防止细胞菌落破裂。

13)9-10 天后筛选杂交瘤上清液。

鉴定抗体对天然免疫球蛋白的择优反应性

筛选: 96 孔板上的所有菌落按照如下进行 ELISA 筛选:

1)用 2 μ g/ml PBS 配制为的小鼠血清 IgG 按 100 μ l/孔涂布 ELISA 板。密封该板并于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

2)抽空各孔并用大于 300 μ l/孔的洗涤缓冲液洗涤 3 次。将板翻转并在吸附纸上吸干以去除任何残留的缓冲液。

3)以 200 μ l/孔的测定稀释剂封闭这些孔并于室温孵育 1 小时。

4)重复步骤 2。

5)以 100 μ l/孔向各孔中加入 TCS 样品。密封该板并于室温孵育 2 小时。

6)重复步骤 2, 但总的洗涤次数是 5 次。

7)以浓度 1:2000 向测定稀释剂中加入 100 μ l/孔 HRP-偶联的小鼠抗大鼠抗体。密封该板并于室温孵育 1 小时。

8)重复步骤 2, 但总的洗涤次数是 5 次。

9)在使用前 20 分钟内解冻 ABTS 底物, 每 11ml 底物加入 11 μ l 的 30%H₂O₂。向每孔中以 100 μ l/孔加入 ABTS 底物。该板于室温孵育 10-20 分钟。

10)于 405nm 处对该板读数。

选择所有正克隆并进行以下测试:

1)特异性测试: 用 PBS 配制的 2 μ g/ml 的不同小鼠同种型以 100 μ l/孔涂布 ELISA 板。小鼠 IgG1.2a、2b、G3、IgA 和 IgM 加入行 A、B、C、D、E、F 和 G。样品加入列 1、2、3、4 等。其它测定步骤按以上筛选方法所述进行。

2)同种型测试: 用 PBS 配制的 2 μ g/ml 的不同抗小鼠同种型 mAb 以 100 μ l/孔

涂布 ELISA 板。抗小鼠 IgG1.2a、2b、G3、IgA 和 IgM 加入行 A、B、C、D、E、F 和 G。样品加入列 1、2、3、4 等。其它测定步骤按以上筛选方法所述进行。

3)按以下步骤进行免疫球蛋白的 Western 印迹/免疫印迹：

1)制备欲在 SDS-PAGE 凝胶上电泳的血清 IgG(天然的和变性的)样品。

2)按照转移系统生产商的最佳蛋白质转移结果提供的使用说明将样品从凝胶转移到 Immobilon-P 膜。

3)印迹与 TCS 样品在抗体结合缓冲液中于 4℃ 孵育过夜。

4)膜与样品孵育过夜后，在 TBST 中洗涤印迹 5 次，5 分钟。

5)印迹于室温与 HRP-偶联的抗-Ig 以 1:2000 的稀释度孵育 1 小时。

6)抗-NIgsAb 孵育后，印迹在 TBST 中洗涤印迹 5 次，5 分钟。

7)按照生产商提供的 Pierce 化学荧光 HRP 底物使用说明显影印迹。

8)印迹接触照相软片合适的时间。为获得最佳结果，接触应持续 1-5 分钟以显影对应于特异性抗体-抗原反应的化学荧光信号。与天然免疫球蛋白而非变性免疫球蛋白反应的克隆得到扩增、纯化并偶联于 HRP 抗-NIgsAb，然后进行免疫沉淀/Western 印迹(IP/WB)测试：

4)按照如下步骤进行 IP/WB：

步骤 I：按照如下步骤制备细胞裂解物：

1.收集约 10^7 个 Jurkat 细胞。

2.用约 10ml PBS 在锥形管中洗涤细胞并以 $400 \times g$ 离心 10 分钟。

3.弃去上清液并重复步骤 2。

4.第二次洗涤后，完全弃去上清液并在含有 $1 \times$ 蛋白酶抑制剂混合物(终浓度为 10^7 细胞/ml)的 1ml 冷裂解缓冲液中重悬细胞球。温和地搅动管子。

5.该管置于冰上 30 分钟并不时搅拌。

6.细胞裂解物于 4℃ 以 $10,000 \times g$ 离心 15 分钟。

7.小心地收集上清液而不打散细胞球并将上清液转移至干净的试管。此时，可冷冻细胞裂解物用于 -80℃ 长期保存。弃去细胞球。

步骤 II：按照如下步骤预清洁细胞裂解物：

1.50μl 抗免疫球蛋白珠子悬浮液转移至试管并加入 450μl 冷的裂解缓冲液。混合物以 $10000 \times g$ 离心 60 秒并除去裂解缓冲液。用 500μl 冷的裂解缓冲液重复洗涤

并将珠子重悬于 50 μ l 冷的裂解缓冲液。

2.50 μ l 抗免疫球蛋白珠子悬浮液和 500 μ l 细胞裂解物加入试管并在冰上孵育 60 分钟。

3.混合物于 4 $^{\circ}$ C 以 10000 \times g 离心 10 分钟并将上清液转移至新鲜的试管中。如果有珠子移入，必须重新离心上清液并将其转移至另一新鲜的试管。

步骤 III：按照如下步骤进行免疫沉淀；

1.5 μ g 抗人胱冬酶-7 抗体加入含有冷的预清洁裂解物的试管。

2.混合物于 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。

3.以预冷的裂解缓冲液配制的 50 μ l 抗-免疫球蛋白珠子悬浮液加入该混合物 (按照以上预清洁步骤 1 的指示制备)。

4.混合物于 4 $^{\circ}$ C 在摇摆平台或旋转器上孵育 1 小时。

5.试管于 4 $^{\circ}$ C 以 10000 \times g 离心 60 秒。

6.小心地完全除去上清液并用 500 μ l 裂解缓冲液洗涤珠子 3 次。为尽可能降低背景，在这几次洗涤中要小心地完全除去上清液。

7.最后一次洗涤后，抽去上清液并向珠子团状物中加入 50 μ l 样品缓冲液，得到的混合物搅拌并于 100 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟。

8.混合物以 10,000 \times g 离心 5 分钟，然后收集上清液并加样于 SDS-PAGE 凝胶上。收集上清液样品并且如果要迟一些才进行凝胶电泳可在此时冷冻样品。

9.按照生产商的使用说明进行 SDS-PAGE。

10.按照转移系统生产商提供的使用说明将样品从 SDS-PAGE 凝胶转移至 Immobilon-P 膜。

11.印迹于 4 $^{\circ}$ C 与用抗体结合缓冲液配制的 2 μ g/ml 的抗-人胱冬酶-7mAb(一抗)孵育过夜。

12.膜与一抗孵育过夜后，在 TBST 中洗涤印迹 5 次，5 分钟。

13.印迹于室温与 HRP-偶联的第二步骤 mAb(抗-NIgSAb)以 1:250 的稀释度孵育 1 小时。

14.二抗孵育后，印迹在 TBST 中洗涤印迹 5 次，5 分钟。

15.按照生产商提供的 Pierce 化学荧光 HRP 底物使用说明书显影印迹。

16.印迹接触照相软片合适的时间。为获得最佳结果，接触应持续 1-5 分钟以

显影对应于特异性抗体-抗原反应的化学荧光信号。

本发明的方法选择性富集高度优先结合最佳信号的天然免疫球蛋白的抗体，同时降低由于和自免疫沉淀步骤带入的变性轻链和重链分子结合导致的背景噪声。

如在 IP/Western 印迹中特异性结合天然免疫球蛋白的克隆 eB144 产生的单克隆抗体所例证的，本发明的抗-NIgSAb 和 NIgSBR 示于图 1、2 和 3，这些附图证实相比于和变性免疫球蛋白分子的重链和轻链反应的常规多克隆抗体，本发明的抗-NIgSAb 和 NIgSBR 仅选择性与天然免疫球蛋白反应的实质性优点。如图所示，假定与天然免疫球蛋白结合的值 100%，则检测到抗-NIgSAb 与变性免疫球蛋白分子结合的值为 0%。

使用本发明检测标记的抗-NIgSAb 的免疫印迹结果示于图 1。用家兔抗-人 IL-2 多克隆抗体免疫沉淀 100ng 重组人 IL-2。每孔加样 20ng 进行 SDS-PAGE 并转移至用于 Western 印迹的膜。泳道 1 与常规标记的多克隆抗体(Amersham 驴抗-家兔 Ig, 1:5000)一起孵育—泳道上额外的区带显示变性的免疫球蛋白重链和轻链污染物。泳道 2 与按照本发明方法制备的可检测标记的单克隆大鼠抗-家兔 Ig 上清液一起孵育。

显示了本发明方法产生的抗体不与变性的家兔免疫球蛋白反应的选择过程。每条泳道使用不同的抗体探查。每幅图对应的泳道用相同的抗体探查。显示了择优结合天然抗体的抗体的产生。通过 Western 印迹，泳道 5、6、10、12、15 每条均表明抗-NIgSAb 显示与变性的家兔免疫球蛋白几乎没有抗体反应性。泳道 4、7、8、11、13、14、16 和 17 每条均与天然和变性的免疫球蛋白反应。

图 3 显示本发明抗-NIgSAb 与非变性免疫球蛋白的特异性。用小鼠抗-人胱冬酶 7(5 μ g)免疫沉淀 JURKAT 细胞裂解物(0.5ml 的 1×10^7 细胞/ml)。每孔加样 10 μ l(1×10^6 个细胞)进行 SDS-PAGE 并转移至用于 Western 印迹的膜。泳道 1 与标记的常规多克隆抗体(Jackson 多克隆抗-小鼠 Ig, 1:5000)一起孵育—泳道上额外的区带显示轻链和重链污染物。泳道 2 与本发明可检测标记的抗-NIgSAb(抗-小鼠 Ig)(1:300)一起孵育。泳道 3 是使用泳道 1 所用的标记的常规抗体(Jackson 多克隆抗-小鼠 Ig, 1:5000)的泳道 2 的重复印迹。泳道 3 上出现的额外区带显示轻链和重链污染物，证实了本发明可检测标记的抗-NIgSAb(抗-小鼠 Ig)(1:300)选择性和择优结合天然 Ig 超过污染的变性 Ig。

实施例 2

制备多克隆抗-NIgSAB 的扣除免疫

方法:

第 1 天: 使用完全佐剂配制的最终抗体生产不需要的耐受原(变性的免疫球蛋白)(25-50mg)注射 6 只小鼠(i.p.)。10 分钟后, 以 100mg/kg 体重注射用无菌磷酸盐缓冲盐水配制的环磷酰胺(SJGMA)。为此目的配制 2mg/ml 环磷酰胺溶液。

第 2 天: 再次注射环磷酰胺(100mg/kg 体重)。

第 3 天: 重复注射环磷酰胺。

第 7 天: 对小鼠放血并经 ELISA 测试抗体滴度。

第 14 天: 使用不完全佐剂配制的最终抗体生产不需要的耐受原(25-50mg)注射 6 只小鼠(i.p.)。10 分钟后, 以 100mg/kg 体重注射用无菌磷酸盐缓冲盐水配制的环磷酰胺。

第 15 天: 再次注射环磷酰胺(100mg/kg 体重)。

第 16 天: 重复注射环磷酰胺。

第 21 天: 对小鼠放血并测试抗体滴度。如果未获得抗体滴度则进行下一步骤。如果还存在抗体滴度, 用耐受原和环磷酰胺再次注射。

第 28 天: 用完全佐剂配制的所需免疫原(天然免疫球蛋白)免疫。

第 38 天: 对小鼠放血并测试抗体滴度。

第 42 天: 用不完全佐剂配制的免疫原再次免疫。

第 46 天: 对小鼠放血以测试抗体滴度。该抗体代表多克隆抗-NIgSAb, 如果获得所需的抗体滴度(约 $1/10^3$ 或更高), 则第二天进行细胞融合(如果要生产用于动物的单克隆抗体的话)。如果未获得所需滴度, 则每两周重复注射以佐剂配制的免疫原直至获得所需滴度。

实施例 3

抗-NIGSAB 在哺乳动物细胞中的克隆与表达

典型的哺乳动物表达载体含有至少一个介导 mRNA 转录起始的启动子元件、抗体编码序列和转录终止和转录物的聚腺苷酸化所需的信号。其它元件包括增强

子、Kozak 序列和侧翼是用于 RNA 剪接的供体和受体位点的间插序列。用 SV40 的早期和晚期启动子、逆转录病毒(例如, RSV、HTLVI、HIVI)的长末端重复(LTRS)和巨细胞病毒(CMV)的早期启动子可实现高效的转录。然而, 也可使用细胞元件(例如, 人肌动蛋白启动子)。用于实践本发明的合适的表达载体包括, 例如载体, 如 pIRES1neo、pRetro-Off、pRetro-On、PLXSN 或 pLNCX (Clontech Labs, Palo Alto, California)、pcDNA3.1(+/-)、pcDNA/Zeo(+/-)或 pcDNA3.1/Hygro(+/-)(Invitrogen)、PSVL 和 PMSG(Pharmacia, Uppsala, Sweden)、pRSVcat(ATCC 37152)、pSV2dhfr(ATCC 37146)和 pBC12MI(ATCC 67109)。可用的哺乳动物宿主细胞包括人 Hela 293、H9 和 Jurkat 细胞、小鼠 NIH3T3 和 C127 细胞、Cos 1、Cos 7 和 CV 1、quail QC1-3 细胞、小鼠 L 细胞和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

或者, 基因可在含有整合入染色体的基因的稳定细胞系中表达。与选择标记共转染, 例如 dhfr、gpt、新霉素或潮霉素可鉴定和分离转染的细胞。

也可扩增转染的基因来表达大量编码的抗体。DHFR(二氢叶酸还原酶)标记用于开发携带几百或者甚至几千份感兴趣基因拷贝的细胞系。另一种有用的选择标记是酶谷氨酰胺合成酶(GS)(Murphy 等, 227 BIOCHEM.J., 277-279 (1991)和 Bebbington 等, 10 BIO/TECHNOLOGY, 169-175 (1992))。使用这些标记, 哺乳动物细胞可生长在选择培养基中并可选择具有最高抗性的细胞。这些细胞系含有整合入染色体的扩增的基因。中国仓鼠卵巢(CHO)和 NSO 细胞经常用于生产抗体。

表达载体 pC1 和 pC4 含有 Rous 肉瘤病毒的强启动子(LTR)(Cullen 等, 5 MOLEC.CELL.BIOL., 438-447 (1985))和 CMV-增强子的片段(Boshart 等, 41 CELL, 521-530 (1985))。多克隆位点, 例如限制性内切酶切割位点 BamHI、XbaI 和 Asp718 有助于克隆感兴趣的基因。此外, 载体含有 3'内含子、大鼠前胰导素原基因的聚腺苷酸化和终止信号。

实施例 4

产生与非变性免疫球蛋白具有反应性的单克隆抗体

可使用小鼠来产生可用于本发明方法的单克隆抗体。

免疫

一种或多种免疫方案可用于产生抗-NIgSAb 杂交瘤。首先, 在以下示范性免

疫方案后可进行几次融合，但也可用其它类似的已知方案。几只 14-20 周龄的雌性和/或手术阉割的雄性小鼠经 IP 和/或 ID 用 1-1000 μ g 的所需免疫球蛋白免疫，所述免疫球蛋白用等体积的 TITERMAX 或完全弗氏佐剂乳化，终体积是 100-400 μ l(例如，200)。每只小鼠也可任选在两个 SQ 位点的每一处接受以 100 μ l 生理盐水配制的 1-10 μ g(免疫球蛋白)。然后小鼠在 1-7、5-12、10-18、17-25 和/或 21-34 天免疫后，经 IP(1-400 μ g)和 SQ (1-400 μ g \times 2)用等体积的 TITERMAX 或不完全弗氏佐剂乳化的免疫球蛋白免疫。12-25 和 25-40 天后，可通过眼眶后穿刺(不用抗凝剂)对小鼠放血。然后使血液于室温凝固 1 小时，收集血清并根据已知的方法用抗-免疫球蛋白 EIA 测定来滴定。当反复注射未导致滴度增加时进行融合。那时，可给予小鼠稀释于 100 μ l 生理盐水的 1-400 μ g 免疫球蛋白的最终 IV 加强注射。三天后，通过颈脱位无痛处死小鼠，无菌取出脾脏并浸在 10ml 含有 100U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素和 0.25 μ g/mL 两性霉素 B(PSA)的冷磷酸缓冲盐水(PBS)中。通过用 PSA-PBS 无菌灌注脾脏收集脾细胞。细胞在冷的 PSA-PBS 中洗涤一次、用台盼蓝染料排除法计数并重悬于含有 25mM Hepes 的 RPMI 1640 培养基中。

细胞融合

根据已知方法，例如本领域已知的，鼠骨髓瘤细胞和可存活脾细胞可以 1:1-1:10 的比例进行融合。作为非限制性例子，脾细胞和骨髓瘤可团在一起。然后可于 37 $^{\circ}$ C 在 30 秒内将细胞球缓慢重悬在 1ml 的 50%(w/v)PEG/PBS 溶液(PEG 分子量 1,450, Sigma)中。然后可通过在 1 分钟内缓慢加入含有 25mM Hepes(37 $^{\circ}$ C)的 10.5ml RPMI 1640 培养基来终止融合。融合的细胞以 500-1500rpm 离心 5 分钟。然后细胞重悬在 HAT 培养基(含有 25mM Hepes 的 RPMI 1640 培养基、10%胎儿克隆 I 血清(Hyclone)、1mM 丙酮酸钠、4mM L-谷氨酰胺、10 μ g/mL 庆大霉素、2.5%Origen 培养补充剂(Fisher)、10% 653-调节的 RPMI 1640/Hepes 培养基、50 μ M 2-巯基乙醇、100 μ M 次黄嘌呤、0.4 μ M 氨基蝶呤和 16 μ M 胸苷)中并以 200 μ l/孔接种于 15 个 96 孔平底组织培养板中。然后将这些板置于含有 5%CO₂ 和 95%空气的潮湿的 37 $^{\circ}$ C 培养箱中 7-10 天。

在小鼠血清中检测抗-NIgSAb

固相 EIA 可用于筛选小鼠血清的对天然免疫球蛋白特异的人 IgG 抗体。简言

之，可用 PBS 配制的 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 的免疫球蛋白涂布这些板过夜。在含有 0.02%(v/v)吐温 20 的 0.15M 盐水中洗涤后，于室温用 PBS 配制的 1%(w/v)BSA 以 $200\mu\text{l}/\text{孔}$ 封闭 1 小时。板可立即使用或于 -20°C 冷冻待用。小鼠血清稀释液可于室温以 $50\mu\text{l}/\text{孔}$ 在免疫球蛋白涂布的板上孵育 1 小时。洗涤这些板，然后于室温按 $50\mu\text{l}/\text{孔}$ 用在 1%BSA-PBS 中以 1:30,000 稀释的特异性 HRP-标记的山羊抗-人 IgG Fc 探查 1 小时。再次洗涤这些板，于室温在 15 分钟期间以 $100\mu\text{l}/\text{孔}$ 加入柠檬酸-磷酸底物溶液(0.1M 柠檬酸和 0.2M 磷酸钠，0.01% H_2O_2 和 1mg/mL OPD)。然后以 $25\mu\text{l}/\text{孔}$ 加入终止溶液(4N 硫酸)并用自动板分光光度计在 490nm 处读 OD 值。

在杂交瘤上清液中检测免疫球蛋白

可使用合适的 EIA 检测分泌免疫球蛋白的阳性生长杂交瘤。简言之，96 气孔 (pop-out)板(VWR, 610744)用碳酸钠缓冲液配制的 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 山羊抗-小鼠 IgG Fc 涂布过夜。洗涤板，用 1%BSA-PBS 于 37°C 封闭 1 小时，立即使用或于 -20°C 冷冻。未稀释的杂交瘤上清液于 37°C 在板上孵育 1 小时。洗涤板并于室温用在 1%BSA-PBS 中以 1:10,000 稀释的 HRP-标记山羊抗-小鼠抗体探查 1 小时。然后板与上述底物溶液一起孵育。

测定抗-NIgSAb 反应性

如上所述，可使用合适的 RIA Western 印迹或其它试验来同时测定杂交瘤对天然免疫球蛋白的反应性。分泌抗-NIgSAb 的杂交瘤可分散在细胞培养液中并通过有限稀释进行连续亚克隆。可扩充得到的克隆群并深低温保藏在冷冻的培养基(95%FBS, 5%DMSO)中并保藏在液氮中。与非变性免疫球蛋白相比，本发明的单克隆抗体证实了对天然免疫球蛋白的特异性。

类别分型和同种型

可用与筛选特定滴度的小鼠免疫血清所用的类似方式的 EIA 来进行抗体的同种型测定。抗原可涂布在上述 96-孔板上， $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 纯化的抗体可于室温在板上孵育 1 小时。洗涤板并于室温用在 1%BSA-PBS 中以 1:4000 稀释的 HRP 标记的山羊抗-小鼠 IgG₁ 或 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG₃ 或其它类别特异性或同种型特异性抗体探查 1 小时。再次洗涤板并与上述底物溶液一起孵育。

结果和讨论

产生抗-NIgSAb 单克隆抗体

进行几次融合并将每份融合物接种于产生几十种对天然免疫球蛋白特异的抗体的 15 块板(1440 孔/融合物)上。使用以免疫球蛋白免疫的小鼠脾细胞进行几次融合。产生了一组若干天然免疫球蛋白反应性单克隆抗体。与非变性的免疫球蛋白相比,还表征了抗-NIgSAb 以证实对天然免疫球蛋白的特异性结合。

引用的文献

以下参考文献全文纳入本文作为参考: Ausubel 等编,《新编分子生物学实验指南》(Current Protocols in Molecular Biology), (John Wiley & Sons, Inc., 纽约, 纽约州 (1987-1991)); Sambrook 等,《分子克隆: 实验室手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 第二版, (冷泉港, NY (1989))和 Sambrook 等,《分子克隆-实验室手册》(Molecular Cloning-A Laboratory Manual)(第三版), 1-3 卷, 冷泉港实验室, 冷泉港, 纽约, 2000; Harlow 和 Lane,《抗体.实验室手册》(Antibodies. A Laboratory Manual), (冷泉港, 纽约 (1989)); Colligan 等编,《新编免疫学实验指南》(Current Protocols in Immunology), (John Wiley & Sons, Inc., 纽约(1994-2001)); Colligan 等,《新编蛋白质科学实验指南》(Current Protocols in Protein Science), (John Wiley & Sons, 纽约, 纽约州, (1997-2001))。

以下参考文献提供了与本发明所用方法有关的有用细节并且也全文纳入本文作为参考。

(1.)Kohler, G.和 C.Milstein, “分泌具有预定特异性抗体的融合细胞的连续培养”(Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity), NATURE, (1975), 256 (5517):495-7。

(2.)Harlow, E.和 D.Lane,《抗体: 实验室手册》(Antibodies: A Laboratory Manual), 冷泉港出版社, 1988。

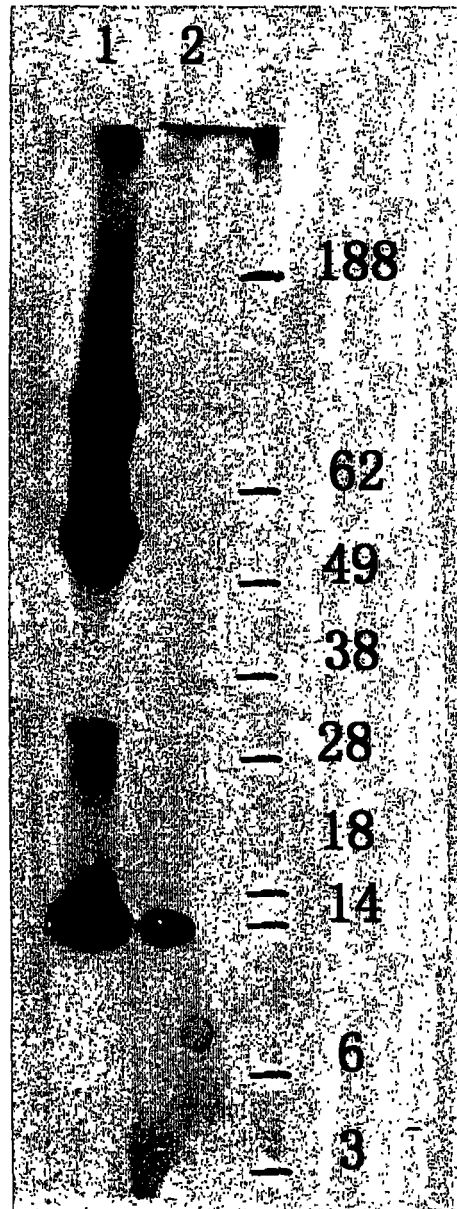
(3.)“淋巴细胞杂交瘤”(Lymphocyte Hybridomas),《微生物学和免疫学的最新课题》(Current Topics in Microbiology and Immunology), 第 81 卷 (F.Melchers, M.Potter 和 N.Warner 编, Springer-Verlag, 1978)。

(4.)Brooks 等, “扣除免疫产生特异性抑制转移的单克隆抗体”(Subtractive Immunization Yields Monoclonal Antibodies that Specifically Inhibit Metastasis), J.OF CELL BIOL., (1993) 122(6):1351-1359。

(5.)Williams, C.V., C.L.Stechmann 和 S.C.McLoon, “产生针对罕见抗原的单克隆抗体的扣除免疫技术” (Subtractive Immunization Techniques for the Production of Monoclonal Antibodies to Rare Antigens), BIOTECHNIQUES, (1992) 12(6):842-847。

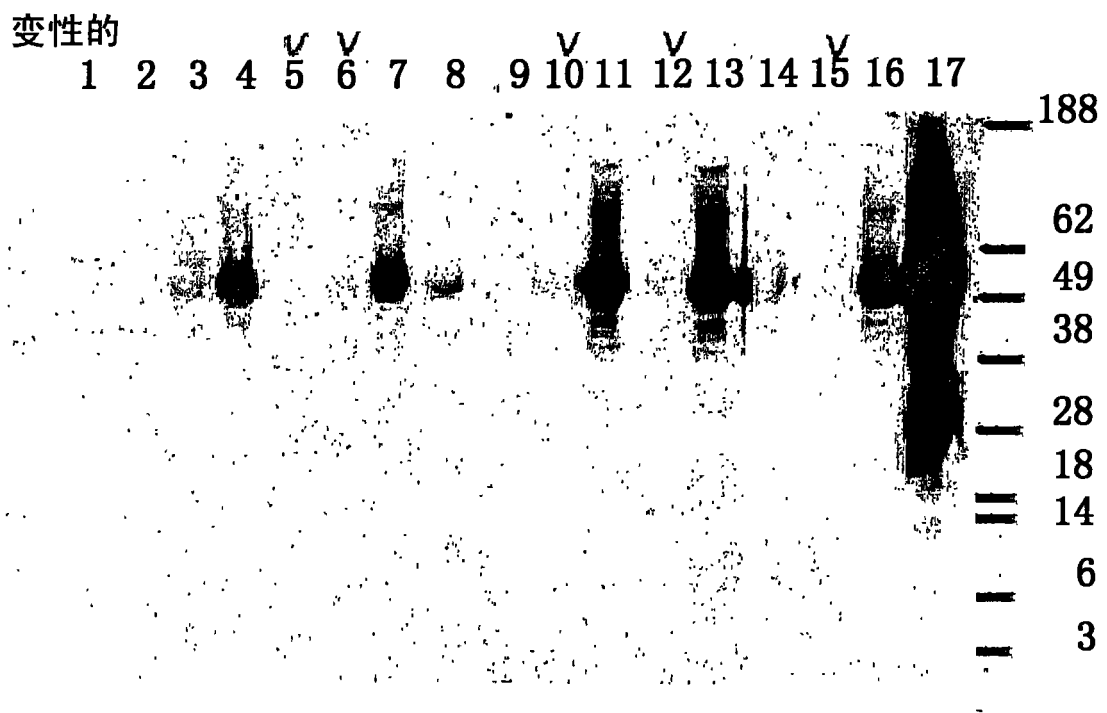
(6.)Sleister, H.M.和 A.G.Rao, “扣除免疫：产生对相似序列蛋白质的差别性抗体的工具” (Subtractive Immunization : A Tool for the Generation of Discriminatory Antibodies to Proteins of Similar Sequence), J.IMMUNOL.METHODS., (2002) 261(1-2):213-220。

如同特别指出每份出版物、专利或其它文件全文纳入本文作为参考一样，本文引用的所有出版物、专利或其它文件也全文纳入作为参考。这些文件显示了本发明同时期的现有技术和/或描述和实施本发明。出版物包括任何科学或专利出版物，或以任何媒体形式可得到的任何其它信息，包括所有录音的、电子的或打印的形式。



泳道 1 泳道 2 kD

图 1



A 幅

图 2

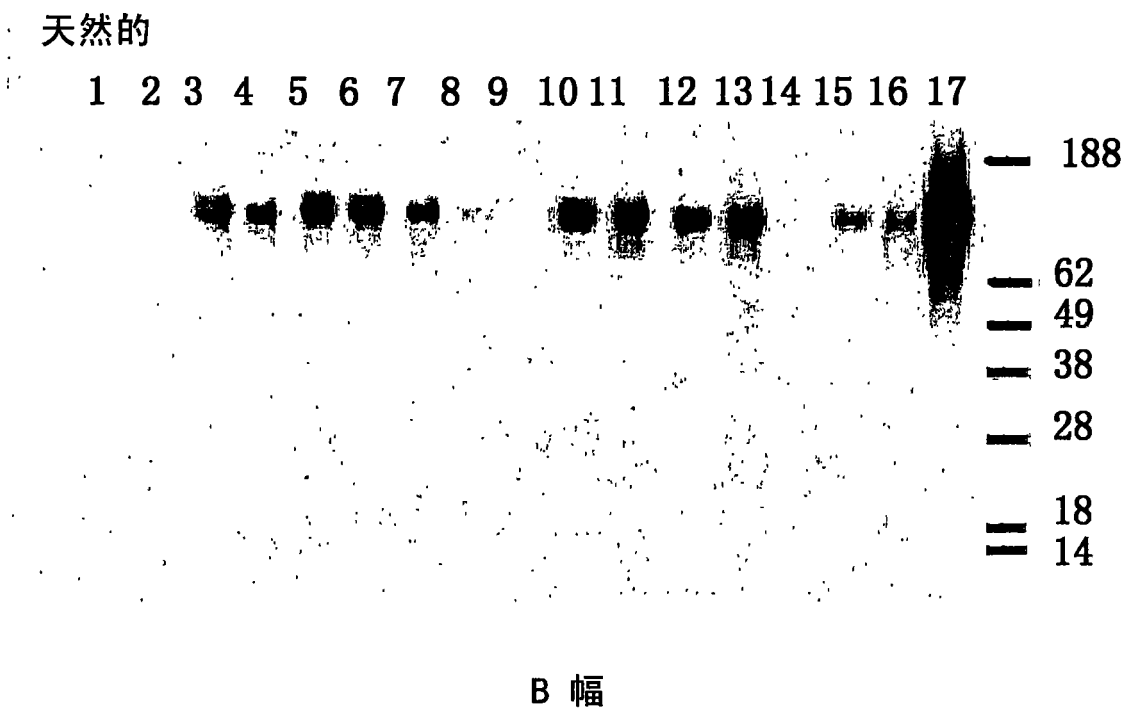


图 2

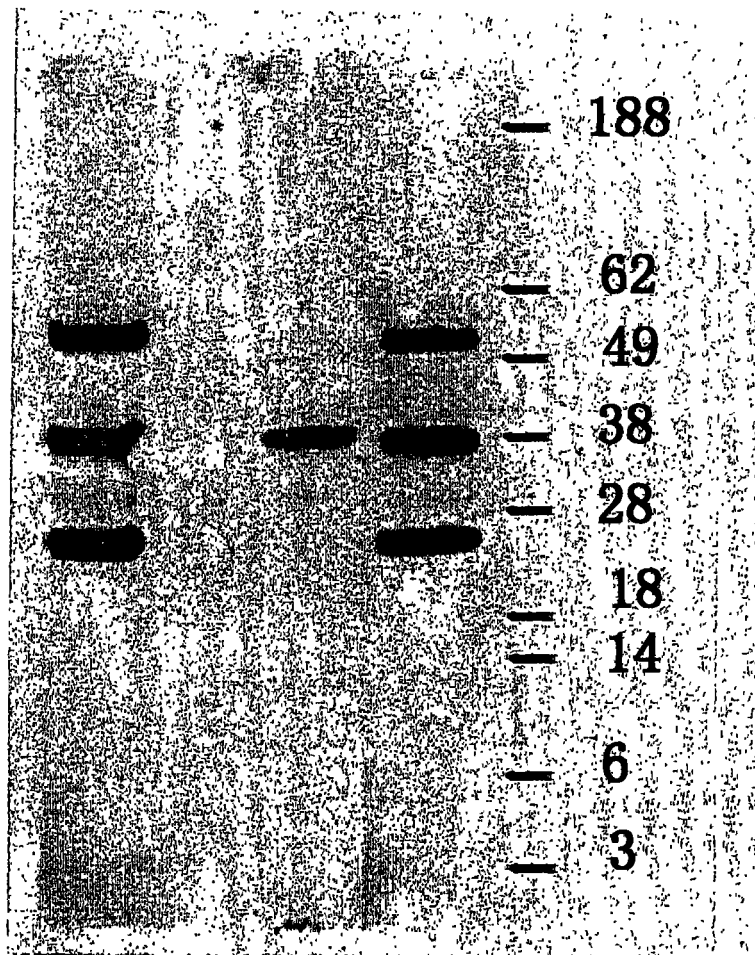


图 3

专利名称(译)	天然免疫球蛋白结合试剂及其制造和使用方法		
公开(公告)号	CN1867584A	公开(公告)日	2006-11-22
申请号	CN200480029688.0	申请日	2004-10-06
[标]发明人	B·锡德 G·李		
发明人	B·锡德 G·李		
IPC分类号	C07K16/00 C07K16/42 C12N C12N5/06 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/00 A61K2039/505		
代理人(译)	范征		
优先权	60/509850 2003-10-08 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了分离的天然免疫球蛋白结合试剂，包括抗体，也提供了包含天然免疫球蛋白结合试剂的制品、组合物与试剂盒。提供了含有样品或试剂的标记的试剂和底物。也提供了用于制造和使用这些试剂的筛选方法。

