

[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 200610101061.2

[51] Int. Cl.
C07K 14/515 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008年1月9日

[11] 公开号 CN 101100485A

[22] 申请日 2006.7.7

[21] 申请号 200610101061.2

[71] 申请人 曾位森

地址 510663 广东省广州市科学城揽月路 80
号广州市科技创新基地 A 区 4 层

共同申请人 王 虹

[72] 发明人 曾位森 王 虹

权利要求书 1 页 说明书 3 页

[54] 发明名称

一种促血管生成素 - 2 单体型抗体的制备及应用技术

[57] 摘要

本发明技术介绍了一种对 ANP - 2 等存在聚合体结构的蛋白质进行酸处理, 使之成为游离单体抗原免疫动物, 制备 ANP - 2 单体型抗体的技术方法。其主要内容是采用甘氨酸酸性缓冲液对 ANP - 2 蛋白质进行酸化处理, 破坏聚合体结构, 使之变成游离单体。用单体型抗原免疫动物, 获得针对 ANP - 2 线性表位的单体型抗体。制备的抗体可用于生产 ANP - 2 免疫学检测试剂盒, 用于 ANP - 2 的检测, 适用于恶性肿瘤的早期诊断、预后判断及疗效评价。

1. 本发明技术涉及一种对ANP-2等存在聚合体结构的蛋白质进行酸处理，使之成为游离单体抗原，用于制备ANP-2单体型抗体的技术方法。其主要特征是采用酸性缓冲液对ANP-2蛋白质进行酸化处理，破坏聚合体结构，使之变成游离单体，用单体型抗原免疫动物，获得针对ANP-2线性表位的单体型抗体，制备的抗体可用于生产ANP-2免疫学检测试剂盒，用于ANP-2的检测，适用于恶性肿瘤的早期诊断、预后判断及疗效评价。
2. 权利要求1所述的发明技术，其特征是酸性缓冲液的化学成分可以是甘氨酸、柠檬酸、乙酸等各种酸性缓冲物质，都可以达到预期的提高血清特异性生长因子免疫学测定灵敏度效果。
3. 权利要求1所述的发明技术，其特征是酸化处理ANP-2蛋白的酸性缓冲液在低盐的条件下ANP-2的聚合体结构，使其变成游离单体，利于制备单体型抗体。
4. 权利要求1所述的发明技术，其特征是酸性缓冲液样品预处理技术方法同样适用于其他存在聚合体结构的蛋白质的单体型抗体制备，应用于临床诊断及科研检测。
5. 权利要求1所述的发明技术，其特征是ANP-2蛋白酸性缓冲液处理技术同样适用于科学研究对ANP-2蛋白及其他有聚合体结构蛋白的抗体制备及免疫学测定。

一种促血管生成素-2 单体型抗体的制备及应用技术

技术领域：免疫检测技术

技术背景：

血管生成素 (angiopoietin, ANP) 是参与肿瘤血管生成的一组主要细胞因子, 对调控新生血管的形成, 维持血管管腔的稳定性具有重要作用。目前发现的 ANP 有四种, 分别为 ANP-1、ANP-2、ANP-3 和 ANP-4, 其中研究得较为清楚的是 ANP-1 和 ANP-2, 而对 ANP-3 和 ANP-4 的了解不多。ANP-1 由 498 个氨基酸组成的糖蛋白, 分子量为 70KD, 广泛分布于全身各器官和组织的血管平滑肌。ANP-2 是由 496 个氨基酸组成的糖蛋白, 分子量约为 75KD, 与 ANP-1 的同源性为 60%。ANP-2 主要在肿瘤组织和瘤旁组织表达, 位于肿瘤侵袭的最前沿, 被认为是肿瘤血管生成的早期分子标志。ANP-1 和 ANP-2 通过与血管内皮细胞上的酪氨酸激酶受体——Tie-2 结合而产生生物学作用。ANP-1 能引起 Tie-2 的活化, 促进血管周围支持细胞 (平滑肌细胞) 与内皮细胞的粘附, 维持血管的成熟和稳定。ANP-2 与 Tie-2 的亲合力更高, 但不激活 Tie-2, 有拮抗 ANP-1 的作用。肿瘤及瘤旁组织高表达 ANP-2, 新生血管完整性降低、通透性增高, 与血管的迁移及肿瘤细胞侵袭、转移有关。检测血清中 ANP-1 和 ANP-2 的水平有助于早期诊断恶性肿瘤, 判断转移与否, 评价治疗效果。

ANP-1 和 ANP-2 主要以聚合体的形式存在。ANP-1 多数形成多聚体, 少数形成三聚体。ANP-2 则更易形成二聚体, 少数形成多聚体。以生理性的 ANP-1 和 ANP-2 蛋白免疫动物制备单克隆抗体往往产生空间构象抗体, 即针对多聚体或二聚体空间构象表位的抗体。以这种抗体通过免疫学方法来检测 ANP-1 和 ANP-2 等蛋白含量, 会把多聚体或二聚体作为一个分子, 在定量上出现偏差。而如果采用针对线性抗原的抗体来检测 ANP-1 和 ANP-2 等易形成聚合体的蛋白, 会特异性识别每一个 ANP-1 分子, 定量的准确性会大大提高。在理论上, 检测的灵敏度也会有所提高。因此, 有必要探讨制备 ANP-1 和 ANP-2 等聚合体蛋白单体抗体的方法。

发明内容:

此专利技术描述了一种促血管生成素 2 (ANP-2) 线性单体抗体的技术方法及其临床应用。基本原理是: 蛋白质在酸性环境下会发生温和的变性, 蛋白聚合体会分离成为游离单体。用酸性缓冲液溶解 ANP-2 蛋白, 使之变成线性单体, 然后再先后与福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂混合, 免疫接种小鼠、大鼠、兔子、羊等动物, 制备多克隆抗体或单克隆抗体。生产的多抗或单抗简单纯化后, 用于定量检测血清中 ANP-2 的含量, 作为临床上恶性肿瘤早期诊断、转移判断及治疗效果评价的指标。具体的实验方法和技术路线如下:

- (1) 抗原准备: 从国内外生物医药公司购买 ANP-2 蛋白冻干粉, 或利用原核细胞表达系统或真核细胞表达系统表达重组 ANP-2 蛋白, 常规方法纯化目的蛋白后, -20°C 冻存储备用;
- (2) 用甘氨酸缓冲液 (200mM 甘氨酸、0.2% Tween-20, PH3.2) 溶解 ANP-2 蛋白,

破坏其聚合体结构，使之形成游离线性单体；

- (3) 取一定量(0.01-1mg) ANP-2 蛋白溶液与等体积的福氏完全佐剂充分混合形成粘稠乳液；
- (4) 选取健康小鼠、大鼠、兔子、羊等动物，根据动物的体重，以 1.0ml/Kg 动物的剂量颈背部皮下多点注射 ANP-2 蛋白溶液与福氏完全佐剂混合乳液，免疫动物；
- (5) 3-4 周后，取一定量(0.01-1mg) ANP-2 蛋白溶液与等体积的福氏不完全佐剂充分混合形成粘稠乳液，以 1.0ml/Kg 动物的剂量，在实验动物颈背部皮下多点注射 ANP-2 蛋白溶液与福氏不完全佐剂混合液加强免疫；
- (6) 再过 3-4 周后，实验动物颈背部皮下多点注射相同剂量的 ANP-2 蛋白溶液与福氏不完全佐剂混合液加强免疫；
- (7) 1-2 周后取动物外周血 0.5-1.0ml，用纯化抗原免疫吸附法(EIA)测定免疫动物血清抗体滴度；
- (8) 如果免疫动物血清抗体滴度超过 1:16000，则处死动物。如果是制备多克隆抗体，则采用颈动脉插管方法采取免疫动物血清；如果要制备单克隆抗体，则取出脾脏，分离脾细胞；
- (9) 多克隆抗体采用辛酸-硫酸铵方法纯化抗体。调节抗体滴度为 1:10⁶，4-8℃保存；
- (10) 单克隆抗体的制备：取免疫 BABL/c 小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤 Sp2/0 细胞融合的方法，有限稀释法分离并鉴定分泌抗 ANP-2 抗体的杂交瘤细胞；
- (11) 选用 8-10 个抗体滴度较高的杂交瘤细胞扩大培养，用分型抗体鉴定单克隆抗体的亚型；竞争抑制法鉴定抗体与 ANP-2 的亲合力；根据 ANP-2 的线性表位分析，人工合成典型表位多肽序列，分析各个单克隆抗体主要结合哪种线性表位；
- (12) 与 ANP-1、ANP-3、ANP-4 及血管内皮生长因子(VEGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、血管生成素(angiogenin)等蛋白质交叉结合实验，分析亲和力较高的几个单克隆抗体的特异性；
- (13) 单克隆抗体的规模生产采用杂交瘤细胞小鼠腹腔注射，诱导产生腹水的方法。抗体的纯化采用辛酸-硫酸铵沉淀方法。
- (14) 选用 4-5 个特异性较高的单抗两两组合，其中一个包被在微孔板上，一个作为检测抗体，双抗体夹心 ELISA 法用于 ANP-2 定量检测，综合分析哪两种抗体组合检测 ANP-2 的灵敏度较高，而且特异性较好。用于制备 ANP-2 ELISA 检测试剂盒；
- (15) 选用亲和力及特异性好的几个抗体与粒径为 0.2 μm 的氨基化聚苯乙烯微球交联，交联剂为 1.25% 的戊二醛，100KD 超滤膜分离纯化抗体交联微球，用于制备 ANP-2 免疫比浊定量检测试剂盒；
- (16) 对上述试剂盒进行临床考核：临床选取正常人血清及恶性肿瘤患者血清各 500 份，用上述 ANP-2 ELISA 检测试剂盒或免疫比浊定量检测试剂盒检测正常人血清及恶性肿瘤患者血清中 ANP-2 的含量，用梯度稀释的标准 ANP-2 制作标准曲线进行定量。

总之，本发明介绍了一种对 ANP-2 等存在聚合体结构的蛋白质进行酸处理，使

之成为游离单体抗原，用于制备 ANP-2 单体型抗体的技术方法。采用酸性甘氨酸缓冲液对蛋白质进行酸化处理，可以破坏 ANP-2 的聚合体结构，使之变成游离单体，但不会影响 ANP-2 的免疫学活性和生物学活性。用单体型抗原免疫动物，获得的抗体绝大多数是针对 ANP-2 线性表位的抗体，可以提高 ANP-2 定量检测的准确性，并在一定程度上提高检测的灵敏度。我们已经进行的实验显示，此法制备的多抗和单抗 92% 以上是针对 ANP-2 线性抗原表位的抗体。如果对待测 ANP-2 采用我们的另一项发明技术（已申请），即样品酸性预处理使之形成游离单体技术，则可以进一步提高 ANP-2 免疫检测的灵敏度。

实现方式：

采用本技术方法制备的 ANP-2 单体型多克隆抗体或单克隆抗体可用于生产 ANP-2 免疫检测试剂盒，如 ELISA 检测试剂盒、免疫比浊定量检测试剂盒和发射免疫及荧光免疫检测试剂盒，用于临床或科学研究中定量检测 ANP-2 含量，适用于恶性肿瘤早期诊断，转移判断及疗效评价。

此外，上述技术方法同样适用于具有聚合体结构的其它蛋白单体型抗体的制备，用于临床免疫学检测及科学研究实验。

专利名称(译)	一种促血管生成素-2单体型抗体的制备及应用技术		
公开(公告)号	CN101100485A	公开(公告)日	2008-01-09
申请号	CN200610101061.2	申请日	2006-07-07
[标]申请(专利权)人(译)	曾位森 王宏		
申请(专利权)人(译)	曾位森 王虹		
当前申请(专利权)人(译)	曾位森 王虹		
[标]发明人	曾位森 王虹		
发明人	曾位森 王虹		
IPC分类号	C07K14/515 C07K16/18 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明技术介绍了一种对ANP-2等存在聚合体结构的蛋白质进行酸处理，使之成为游离单体抗原免疫动物，制备ANP-2单体型抗体的技术方法。其主要内容是采用甘氨酸酸性缓冲液对ANP-2蛋白质进行酸化处理，破坏聚合体结构，使之变成游离单体。用单体型抗原免疫动物，获得针对ANP-2线性表位的单体型抗体。制备的抗体可用于生产ANP-2免疫学检测试剂盒，用于ANP-2的检测，适用于恶性肿瘤的早期诊断、预后判断及疗效评价。