

[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 200610024886.9

[51] Int. Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 1/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2007年9月26日

[11] 公开号 CN 101041697A

[22] 申请日 2006.3.21

[21] 申请号 200610024886.9

[71] 申请人 上海富纯中南生物技术有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园区哈雷路899号B座207室

[72] 发明人 杨子义 魏国兰 丁妍 陈文卓
司徒维娜

[74] 专利代理机构 上海浦一知识产权代理有限公司

代理人 丁纪铁

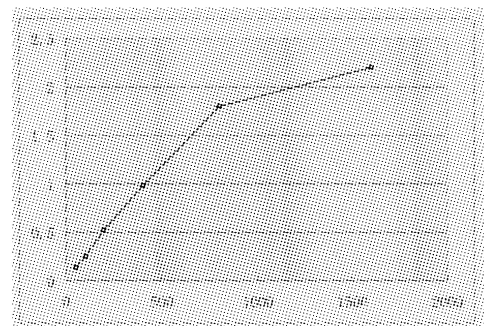
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

[54] 发明名称

抗蛋白表达标签抗体或抗体复合物及其制备方法和应用

[57] 摘要

本发明公开了抗蛋白表达标签抗体或抗体复合物及其制备方法和应用。通过基因工程或化学交联的方式在待检验抗体对应的抗原后部或中部和前部添加蛋白表达标签，使得抗体或抗体复合物可以与该标签结合，增加了抗体或抗体复合物的应用范围，一次制备即可应用于多种抗原的检测。



1. 一种抗蛋白表达标签抗体，其特征在于：由抗蛋白表达标签的特异性抗体可变区和人免疫球蛋白恒定区通过基因工程的方式相嵌合并共表达，所述抗蛋白表达标签的特异性抗体可变区可以识别待检测抗原蛋白上的蛋白表达标签。

2. 一种抗蛋白表达标签抗体复合物，其特征在于：由抗蛋白表达标签抗体与人免疫球蛋白通过化学交联剂进行交联所组成，所述抗蛋白表达标签的特异性抗体可变区可以识别待检测抗原蛋白上的蛋白表达标签。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗蛋白表达标签抗体或抗蛋白表达标签抗体复合物，其特征在于：抗原通过基因工程方式获得，所述的蛋白表达标签位于抗原基因的序列后部。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗蛋白表达标签抗体或抗蛋白表达标签抗体复合物，其特征在于：抗原通过基因工程方式获得，所述的蛋白表达标签位于抗原基因的序列中部或前部。

5. 根据权利要求 2 所述的抗蛋白表达标签抗体复合物，其特征在于：抗原是从生物提取的天然蛋白，所述蛋白表达标签通过化学偶联方式与抗原蛋白偶联。

6. 根据权利要求 2 所述的抗蛋白表达标签抗体复合物，其特征在于：抗原是化学合成的，所述蛋白表达标签通过化学合成方式与抗原蛋白偶联。

7. 根据权利要求 3、4 或 5 所述的抗蛋白表达标签抗体或抗蛋白表达标签抗体复合物，其特征在于：所述蛋白表达标签为(His)₆、GST 或 Myc。

8. 根据权利要求 2 所述的抗蛋白表达标签抗体复合物，其特征在于：所述

的人免疫球蛋白是 IgG、IgM、IgE、IgA 中的任一种。

9. 根据权利要求 2 所述的抗蛋白表达标签抗体复合物，其特征在于：化学交联剂为双功能化学交联剂。

10. 根据权利要求 8 所述的抗蛋白表达标签抗体复合物，其特征在于：双功能化学交联剂为 N-琥珀酰亚氨基-3-2-二硫吡啶丙酯酸、戊二醛或过碘酸钠。

11. 根据权利要求 8 所述的抗蛋白表达标签抗体复合物，其特征在于：双功能化学交联剂为 N-琥珀酰亚氨基-3-2-二硫吡啶丙酯酸。

12. 根据权利要求 2 所述的抗蛋白表达标签抗体复合物，其特征在于：所述抗蛋白表达标签抗体与人免疫球蛋白的摩尔比为 1：1-5：1。

13. 根据权利要求 10 所述的抗蛋白表达标签抗体复合物，其特征在于：所述抗蛋白表达标签抗体与人免疫球蛋白的摩尔比为 2：1。

14. 一种抗蛋白表达标签抗体的制备方法，其特征在于：从分泌抗表达标签抗体的杂交瘤中克隆表达标签抗体的重链和轻链可变区基因，连接到人 IgG CH-Fc 段基因上，构建嵌合抗体。

15. 一种抗蛋白表达标签抗体复合物的制备方法，其特征在于：所述抗蛋白表达标签抗体通过单克隆抗体技术制备，或通过免疫学方法制备多克隆抗体。

16. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗蛋白表达标签抗体或抗蛋白表达标签抗体复合物在作为代替阳性血清的诊断试剂标准品中的应用。

17. 一种试剂盒，其特征在于：以所述抗蛋白表达标签抗体或抗体复合物为用来代替阳性血清的诊断试剂标准品。

抗蛋白表达标签抗体或抗体复合物及其制备方法和应用

技术领域

本发明涉及一种抗体或抗体复合物，尤其涉及一种抗蛋白表达标签抗体或抗体复合物及其制备方法和应用。

背景技术

目前自身免疫性肝病(autoimmune hepatic diseases, AIHD)是指引起肝脏损害的直接原因为自身免疫反应，而非病毒感染的一组肝脏疾病，主要包括自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)、原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)和原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)。临床都表现为瘙痒，黄疸，肝肿大，腹痛等共同症状。我国病毒性肝炎患者众多，但相当一部分原因不明的肝病患者都可能是自身免疫性肝病。我国自身免疫性肝病的发病率有逐年增高的趋势，慢性肝病患者中有相当比例的自身免疫性肝病。同时，一些病毒型肝炎患者，也会合并自身免疫性肝病。这类疾病的治疗方案与病毒性肝炎及其他肝胆疾病完全不同，而且早期诊治的效果尤其好，因此在肝病的诊断中，自身免疫性肝炎的诊断越来越重要。

肝肾微粒体抗原-1(LKM-1)抗体、抗可溶性肝抗原(SLA)抗体、抗非唾液酸糖(ASGPR)蛋白抗体是AIH的主要特征，抗体阳性率可达90%。线粒体抗原抗体(M2)是PBC的特征性抗体，抗体特异性高达97%。它们都可以用酶联免疫方法的诊断试剂盒检测。抗原和抗体之间的高度特异性结合的特性，使得它们成为理想的临床诊断试剂。据统计，现有临床诊断中，50%的检测项目是

通过抗体或抗原的检测实现的。

临床诊断试剂盒一般都包括标准品或阴性和阳性对照品，定量自身抗体诊断试剂盒的标准品往往来自于抗体滴度较高的阳性血清的系列稀释品，或直接使用不同滴度的病人血清。但用病人血清做标准品有很多缺点：1) 很难获得具有高滴度，高特异性的病人血清；2) 个体之间的抗体滴度和特异性差异性较大，难以标准化；3) 由于血清是多抗，具有不同的抗体类型、亲和性和特异性，限制了它的应用；4) 价格昂贵，由于资源的限制，可能不能保证标准品的产量。因此，开发生产标准品的方法，用以检测特异性抗体的水平具有重要意义。

人鼠嵌合特异性抗体可以用于人血清抗体检测的标准品，用于制备标准曲线（美国专利 US6, 015, 662），但该方法具有很大的局限性，每次构建的抗体只包括一种抗体的恒定区，检测其他抗体类型需要重新构建，这样相对比较费时费力。

交联抗体也可以用于人血清抗体检测的标准品，非人的非 IgM 和人的 IgM 交联（美国专利 US 5, 478, 753），用作诊断 IgM 血清试剂盒标准品，交联抗体非人的非 IgM 对检测抗原特异，人的 IgM 可以和标记二抗结合，这些试剂盒很好的解决了传染性疾病在急性感染阶段 IgM 阳性血清来源的困难，使标准品的大规模生产成为可能。其它的交联还包括抗体的一条重链和轻链通过二硫键和 IgG 的重链和轻链或 Fc 交联（美国专利 US 5, 523, 210），构建的双价抗体可用于酶等化学分析；两个对不同抗原特异的抗体通过交联剂交联，（美国专利 US 4, 433, 059），异源交联抗体可用于凝集分析。

但是以上用于标准品的嵌合抗体和交联抗体，只针对某一种特异性抗原，

检测其他类型抗体时，需重新构建和交联，无通用性，比较费时费力。自身免疫性抗原的制备以基因工程的方法表达和制备为主，为了纯化方便，往往在自身抗原基因的序列后部（也可以根据需要设计在抗原序列中或序列前部）设计有表达标签序列，如(His)6、GST、Myc等。

针对这些特点，我们设计了用抗蛋白表达标签抗体与人抗体交联的复合物或用抗蛋白表达标签的特异性抗体可变区与人抗体恒定区的嵌合抗体代替阳性血清用作诊断试剂的阳性标准品。含有人抗体或含有人抗体恒定区的抗标签抗体，因能够与带表达标签的抗原结合，所以该抗体复合物或嵌合抗体可以与用做检测人体针对某一种抗原产生的特异性抗体的水平时，可以作为阳性标准品替代来源于人体的阳性血清标准品或参照品。

发明内容

本发明要解决的技术问题之一是提供一种可以替代阳性血清作为检测标准品或参照品、并且具有通用性的抗蛋白表达标签抗体或抗体复合物。

本发明要解决的技术问题之二是提供所述抗蛋白表达标签抗体或抗体复合物的制备方法。

本发明要解决的技术问题之三是将本发明蛋白表达标签抗体或抗体复合物应用于定量诊断检测方法中。

为解决上述技术问题，本发明提供一种抗蛋白表达标签抗体，由抗蛋白表达标签的特异性抗体可变区和人免疫球蛋白恒定区通过基因工程的方式相嵌合并共表达。

为解决上述技术问题，本发明还提供一种抗蛋白表达标签抗体复合物，由抗蛋白表达标签抗体与人免疫球蛋白通过化学交联剂进行交联所组成。

为解决上述技术问题，本发明还提供抗蛋白表达标签抗体的制备方法，从分泌抗表达标签抗体的杂交瘤中克隆表达标签抗体的重链和轻链可变区基因，连接到人 IgG CH-Fc 段基因上，构建嵌合抗体。

为解决上述技术问题，本发明还提供抗蛋白表达标签抗体复合物的制备方法，所述抗蛋白表达标签抗体可以通过单克隆抗体技术制备，也可以通过免疫学方法制备多克隆抗体。

为解决上述技术问题，本发明还提供将抗蛋白表达标签抗体或抗体复合物作为代替阳性血清的诊断试剂标准品应用于定量诊断检测中。

本发明由于在抗原后部或中部和前部添加了蛋白表达标签，使得抗体或抗体复合物可以与该标签结合，增加了抗体或抗体复合物的应用范围，一次制备即可应用于多种抗原的检测。

附图说明

图 1 是本发明抗蛋白表达标签抗体或抗体复合物及其制备方法和应用的实施例的标准曲线图。

具体实施方式

下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细的说明。

本发明的一种较佳实施例是制成用于肝肾微粒体 (LKM-1) 抗体自身免疫性肝炎诊断试剂盒。该试剂盒是用于定量测定病人血清中抗 LKM-1 IgG 型抗体的酶联免疫检测试剂盒。抗 LKM-1 IgG 型抗体的检测能够辅助诊断 II 型自身免疫性肝炎。LKM-1 抗原一般通过基因工程方式获得，为了纯化方便，这些抗原在前期克隆时常设计带有表达标签，如组氨酸 (His) 和谷胱甘肽转移酶 (GST) 等。在 96 孔反应板上包被 LKM-1 抗原，将稀释后的待检血清和对照品阳性血

清加入反应板孔中,如果被检血清中存在抗 LKM-1 抗原成分的抗体,经温育后,则血清中的特异性抗体与固相 LKM-1 抗原结合,形成固相抗原抗体复合物。洗去未结合的抗体成分,加入酶标记抗人 IgG 抗体(抗人二抗)温育,固相抗原抗体复合物再与酶标记抗 IgG 抗体结合。洗去未结合的酶标抗体成分,再加入酶的底物。底物被酶催化成为有色产物,可以通过酶标仪检测读取标本和对照品阳性血清的颜色反应的数值。用不同滴度的阳性品对照血清,作出一条酶标仪检测颜色反应数值和对照品阳性血清抗 LKM-1 抗体滴度之间相互关联的标准曲线,根据待检血清酶标仪检测数值在标准曲线上的位置,就可以判断出待检血清中相应的抗 LKM-1 抗体水平。

该诊断试剂盒中作为绘制标准曲线的标准品阳性血清,是试剂盒最关键的成分。目前标准品阳性血清取自抗 LKM-1 抗体水平增高的病人,这样会有很多问题。一是阳性血清是取自用已有诊断试剂盒检测抗 LKM-1 抗体水平增高的病人,现有诊断试剂盒阳性血清取自符合 II 型自身免疫性肝炎诊断标准的病人,而符合 II 型自身免疫性肝炎诊断标准的未必都有抗 LKM-1 抗体增加。二是病人阳性血清抗 LKM-1 抗体水平会随病情变化而变化,因此“标准品”并不标准。三是每个病人血清来源有限,可能每个批号的血清来源均不相同,标准品批间有差异,因此对同一病人的同一份血清,用不同批次的诊断试剂盒检测会有不同的结果。

因 LKM-1 抗原含有表达蛋白标签 His,而利用抗 His 嵌合抗体或抗 His 的特异性抗体与人 IgG 的耦联物就可以代替抗 LKM-1 抗体阳性血清作为试剂盒的标准品,也则不会产生如上所述的缺点。抗 His 嵌合抗体因含有人抗体恒定区的抗标签抗体,因能够与带表达标签的抗原结合,所以抗 His 人鼠嵌合抗体和抗

His 抗体与人免疫球蛋白的耦联物在检测人体针对 LKM-1 产生的特异性抗体的水平时，可以作为阳性标准品替代来源于人体的阳性血清标准品或参照品。

抗 His 人鼠嵌合抗体和抗 His 抗体与人免疫球蛋白的耦联物用作试剂盒的标准品，包括如下步骤：

1. 抗 His 人-鼠嵌合抗体或抗 His 的特异性抗体与人 IgG 的耦联物的制备。

1.1 抗 His 人-鼠嵌合抗体的制备：

从分泌抗 His 抗体的鼠杂交瘤中克隆抗 His 抗体重链和轻链可变区基因，连接到人 IgG CH-Fc 段和 VH 段基因上，构建鼠-人嵌合抗体，嵌合抗体用 CHO 细胞培养的方法制备，用 Protein G 或 Protein A Sepharose 亲和层析纯化后加蛋白保护剂，待用。

1.2 抗 His 的特异性单克隆抗体与人 IgG 的耦联物的制备：

1.2.1 抗 His 的特异性单克隆抗体的制备：

选用 6-8 周龄 Balb/c 小鼠，取 10-100 μ g 带有 (His)₆ 表达标签的融合蛋白与等量完全福氏佐剂充分乳化后皮下注射。以后每隔 2 周以同样剂量抗原加等量不完全福氏佐剂充分乳化后皮下注射加强免疫，共 3-5 次。融合前 3 天腹腔或静脉注射无佐剂抗原 50-100 μ g 再加强免疫一次。也可以用带有 (His)₆ 表达标签的不同的融合蛋白依次免疫和加强免疫动物，以提高获得抗 His 抗体的几率。

取完成免疫的小鼠，摘眼球取血，分离血清备用。拉颈处死小鼠，浸泡于 75% 的酒精中 3-5 分钟。无菌操作取出脾脏，制备脾细胞悬液。取处于对数生长期的 P3-653 细胞与小鼠脾细胞按 1:5-1:10 的比例混合，加入 20ml RPMI-1640 液，1000r/min，5 分钟离心，弃上清。轻轻敲打离心管底部，使

沉淀细胞分散，将离心管置 37℃ 水浴中，取 1ml 37℃ 预温的 50%PEG 缓缓滴入离心管内，1 分钟内加完。37℃ 静置 2 分钟，在 5 分钟内滴加 50ml RPMI-1640 液终止 PEG 作用。800r/分钟，8 分钟离心，弃上清。将沉淀细胞轻轻悬浮于所需容积的 HAT 培养基内，接种于 96 孔培养板中。将培养板放入 37℃ 5%CO₂ 培养箱中培养。7-10 天后，换 HT 培养基。换液后三天吸取培养上清，做 ELISA 检测。挑出阳性孔细胞，用有限稀释法将细胞铺单克隆，即做细胞计数，使细胞的浓度为 50 个/ml，于 96 孔板接种三排，用培养液做倍比稀释，铺满 1 块 96 孔板。培养 7-10 天后，选取单个克隆做 ELISA 检测，挑出阳性孔细胞，再一次进行克隆。一般需要反复克隆 3-5 次，直达 100% 阳性孔即可将细胞扩大培养，冻存。将筛选完成的杂交瘤细胞用无血清培养基作悬浮培养，收集培养上清以备进一步纯化。参照 (E. 哈洛, D. 莱恩. 《抗体技术实验指南》)，用 Protein G 或 Protein A Sepharose 做亲和层析，纯化抗体。获得纯品后进行定量，以备。

1.2.2 抗 His 的特异性单克隆抗体与人 IgG 的耦联物的制备：

称取人 IgG 25mg 溶于 0.5ml 含 1.25% 戊二醛的 pH 7.2 0.1mol/L PBS 中，于 2-8℃ 静置过夜。反应后的溶液在 pH 7.2 0.1mol/L PBS 中充分透析，除去多余的戊二醛，加 pH 7.2 0.1mol/L PBS 至 1.5ml。放置 25ml 小烧杯中，缓慢搅拌。将鼠抗 His 抗体 12.5mg 用 pH 7.2 0.1mol/L PBS 稀释至 0.5ml，搅拌下逐滴加入到小烧杯中。加入 1 mol/L PH 9.6 碳酸盐缓冲液中，继续搅拌 3-4 小时。最后加入 0.25ml 0.2 mol/L 的赖氨酸溶液，室温置 2 小时。反应后的溶液经 Sephacryl S-300 HR 层析柱，用 PH7.2 0.1mol/L PBS 洗脱，收集第一出峰，此溶液就为鼠抗 His 抗体与人免疫球蛋白 (IgG) 的交联物。

2. 用酶联吸附免疫法 (ELISA) 鉴定上述嵌合抗体和抗体耦联物与抗原 LKM-1 的结合能力。

用含 1.59g/L Na_2CO_3 、2.93g/L NaHCO_3 的包被缓冲液 (CBS 溶液) 将带有 His 表达标签的 LKM-1 抗原稀释为 $5\mu\text{g/ml}$ 。然后将稀释好的溶液加入酶标板的各孔中, 每孔 $100\mu\text{l}$; $2-8^\circ\text{C}$ 过夜, 之后取出酶标板, 甩去包被液, 洗板三次, 拍干, 加入含 1% 牛血清白蛋白, 8.7g/L NaCl , 1.15 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, PH 7.4 的封闭液, 每孔 $200\mu\text{l}$; 置于 37°C 下 2 小时, 之后取出酶标板, 弃去封闭液, 洗板三次, 拍干。将酶标板板条放置在真空干燥箱内进行真空抽干并于真空箱内保存 1 小时; 最后将酶标板条装入铝箔袋, 真空封口机封口, 贴标签和加盖批号, $2-8^\circ\text{C}$ 保存待用。

将纯化后的抗 His 人-鼠嵌合抗体或抗 His 的特异性单克隆抗体与人 IgG 的耦联物进行对倍稀释, 稀释比例可以为 1: 100, 1: 200, 直至 1: 25600。稀释液是由 1% 牛血清白蛋白, 8.7g/L NaCl , 1.15 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 吐温-20 0.5ml, PH 7.4 组成。将稀释后的单抗加到上述包被板中的各孔中, 每孔 $100\mu\text{l}$, 每个抗体的稀释度作复孔, 室温 ($18-25^\circ\text{C}$) 反应 30 分钟。反应结束后, 包被板用洗液洗 3 遍, 拍干。每个反应孔中加入 HRP 标记的羊抗人 IgG 工作液 $100\mu\text{l}$, 室温 ($18-25^\circ\text{C}$) 反应 30 分钟。反应结束后, 包被板用洗液洗 5 遍, 拍干。每孔加入显色液 A (含柠檬酸 35.8g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9.34g/L, 30% 过氧化氢 $660\mu\text{l}$) 和显色液 B (含 3, 3, 5, 5, - 四甲基联苯氨 0.2g/L, 二甲基亚砷 5ml/L, 6 N HCl 1ml/L) 各 $50\mu\text{l}$, 混匀, 室温避光反应 30 分钟。反应后每孔加入终止液 ($2\text{N H}_2\text{SO}_4$) $50\mu\text{l}$, 酶标仪 OD450 读数。在稀释度为 1: 1600 时, 其 OD450 为 2.0-2.2, 证明抗 His 人-鼠嵌合抗

体和抗 His 的特异性单克隆抗体与人 IgG 的耦联物与 LKM-1 有良好的结合力。

3. 将上述的嵌合抗体和抗体耦联物作为标准品应用于定量诊断检测方法中。

将上述抗 His 人-鼠嵌合抗体和抗 His 的特异性单克隆抗体与人 IgG 的耦联物的 ELISA 鉴定结果, 根据不同稀释度绘制曲线。因无抗 LKM-1 抗体的国际参考质控, 按抗体的 OD450 值自定义其抗体的相对单位, OD450=2.0-2.2 时, 其对应的稀释度为 1: 1600, 设定单位为 1600RU。其他稀释度以此类推, 如 1: 3200 为 800RU, 1: 6400 为 400RU 等。计算抗 His 人-鼠嵌合抗体和抗 His 的特异性单克隆抗体与人 IgG 的耦联物的不同稀释度平行测定的 OD450 平均值, 以每个稀释度的 OD450 值为纵坐标, 各自对应的浓度为横坐标, 绘制出标准曲线。

本发明较佳实施例的标准曲线如图 1 所示。从曲线整个趋势看, 线性段为 50-800RU, 800RU 以上, 曲线已趋向于饱和。在线性段内取 5 个点(800RU、400RU、200RU、100RU、50RU), 以此作为试剂盒的标准曲线。

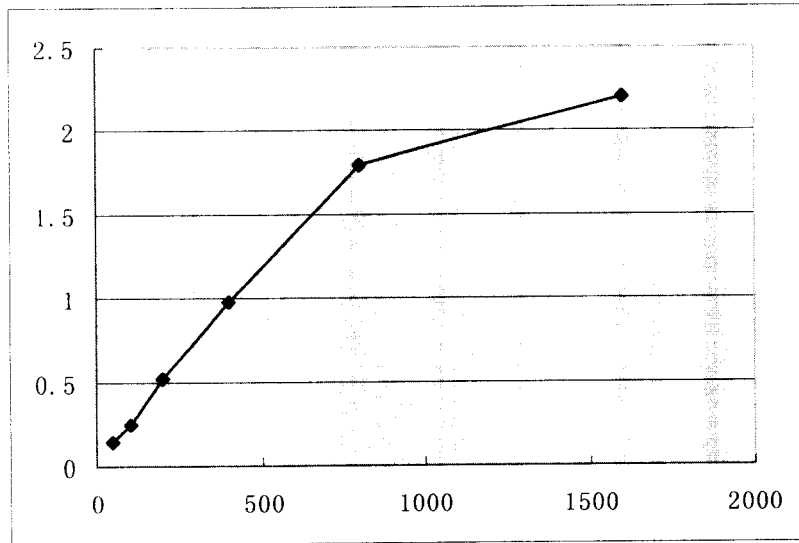


图1

专利名称(译)	抗蛋白表达标签抗体或抗体复合物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN101041697A	公开(公告)日	2007-09-26
申请号	CN200610024886.9	申请日	2006-03-21
[标]申请(专利权)人(译)	上海富纯中南生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海富纯中南生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海富纯中南生物技术有限公司		
[标]发明人	杨子义 魏国兰 丁妍 陈文卓 司徒维娜		
发明人	杨子义 魏国兰 丁妍 陈文卓 司徒维娜		
IPC分类号	C07K16/46 C07K16/00 C07K1/10 C12N15/09 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了抗蛋白表达标签抗体或抗体复合物及其制备方法和应用。通过基因工程或化学交联的方式在待检验抗体对应的抗原后部或中部和前部添加蛋白表达标签，使得抗体或抗体复合物可以与该标签结合，增加了抗体或抗体复合物的应用范围，一次制备即可应用于多种抗原的检测。

