

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 16/28

G01N 33/577 G01N 33/68

C12N 5/20



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01806574.0

[43] 公开日 2003 年 5 月 14 日

[11] 公开号 CN 1418225A

[22] 申请日 2001.3.8 [21] 申请号 01806574.0

[30] 优先权

[32] 2000. 3. 13 [33] IL [31] 135025

[32] 2000. 10. 23 [33] IL [31] 139217

[86] 国际申请 PCT/IL01/00216 2001.3.8

[87] 国际公布 WO01/68710 英 2001.9.20

[85] 进入国家阶段日期 2002.9.13

[71] 申请人 应用研究系统 ARS 股份公司

地址 荷属安的列斯群岛库拉索市

[72] 发明人 N·约那 D·休萨 I·贝尔泽

M·德雷诺 F·安东尼蒂

M·斯莫拉斯基

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 余颖

权利要求书 2 页 说明书 21 页

[54] 发明名称 人低密度脂蛋白受体的单克隆抗体及其制备和用途

[57] 摘要

本发明提供低密度脂蛋白受体 (LDLR) 的单克隆抗体, 其用于纯化和识别低密度脂蛋白 (LDL) 以及治疗诸如丙型肝炎感染等疾病。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种单克隆抗体、嵌合抗体、全人化抗体、抗独特型抗体或其片段，其特征在于：所述抗体或其片段除单克隆抗体 C7 外，都能特异性地识别和结合人低密度脂蛋白受体(hLDLR)及其片段。
- 5 2. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体，其特征在于：所述单克隆抗体特异性地识别和结合 hsLDLR。
3. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体，其特征在于：所述单克隆抗体是由保藏在 CNCM 编号为 I-2390 的杂交瘤细胞克隆 12.6 表达的单克隆抗体。
- 10 4. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体，其特征在于：所述单克隆抗体是由保藏在 CNCM 编号为 I-2391 的杂交瘤细胞克隆 28 表达的单克隆抗体。
5. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体，其特征在于：所述单克隆抗体是由保藏在 CNCM 编号为 I-2392 的杂交瘤细胞克隆 29.8 表达的单克隆抗体。
6. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体，其特征在于：所述单克隆抗体是由保藏在 CNCM 编号为 I-2393 的杂交瘤细胞克隆 30 表达的单克隆抗体。
- 15 7. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体，其特征在于：所述单克隆抗体是由保藏在 CNCM 编号为 I-2394 的杂交瘤细胞克隆 50.30 表达的单克隆抗体。
8. 如权利要求 3 至 7 中任何一项所述的单克隆抗体，其特征在于：所述单克隆抗体属于免疫球蛋白同种型 IgG₁ 或 IgM。
9. 一种人低密度脂蛋白受体的检测和/或定量方法，其特征在于：所述方法包括使用
20 上述权利要求中任何一项所述的单克隆抗体。
10. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体，其特征在于：所述单克隆抗体能用作在酶连锁免疫吸附试验(ELISA)中的抗体对。
11. 如权利要求 10 所述的单克隆抗体，其特征在于：所述单克隆抗体由杂交瘤细胞克隆 28 或克隆 29.8 产生的。
- 25 12. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体，其特征在于：所述单克隆抗体能在免疫印迹分析法(Western Blot analysis)中识别人 LDLR。
13. 如权利要求 12 所述的单克隆抗体，其特征在于：所述单克隆抗体由杂交瘤细胞克隆 12.6、克隆 28、克隆 29.8 或克隆 30 产生的。
14. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体，其特征在于：所述单克隆抗体能中和重组人可
30 溶性低密度脂蛋白受体(r-hsLDLR)的抗病毒生物活性。
15. 如权利要求 14 所述的单克隆抗体，其特征在于：所述单克隆抗体由杂交瘤细胞克隆 12.6 或克隆 50.30 产生的。

- 16.如权利要求 1 所述的单克隆抗体,其特征在于:所述单克隆抗体能抑制丙型肝炎病毒(HCV)的复制。
- 17.如权利要求 16 所述的单克隆抗体,其特征在于:所述单克隆抗体由杂交瘤细胞克隆 12.6、克隆 28 或克隆 29.8 产生的。
- 5 18.如权利要求 13、15 或 17 所述的单克隆抗体,其特征在于:所述的杂交瘤细胞克隆 12.6 保藏在 CNCM,保藏编号为 I-2390。
- 19.如权利要求 11、13 或 17 所述的单克隆抗体,其特征在于:所述的杂交瘤细胞克隆 28 保藏在 CNCM,保藏编号为 I-2391。
- 20.如权利要求 11、13 或 17 所述的单克隆抗体,其特征在于:所述的杂交瘤细胞克隆 29.8 保藏在 CNCM,保藏编号为 I-2392。
- 10 21.如权利要求 13 所述的单克隆抗体,其特征在于:所述的杂交瘤细胞克隆 30 保藏在 CNCM,保藏编号为 I-2393。
- 22.如权利要求 15 所述的单克隆抗体,其特征在于:所述的杂交瘤细胞克隆 50.30 保藏在 CNCM,保藏编号为 I-2394。
- 15 23.一种如权利要求 1 所述单克隆抗体的制备方法,其特征在于:所述方法包括使一克隆杂交瘤细胞生长,其包括一以 hsLDLR 免疫的哺乳动物的脾细胞、一在液体培养液或哺乳动物腹腔中的均一或不均一淋巴细胞,以使杂交瘤细胞产生和聚集单克隆抗体。
- 24.如权利要求 23 所述的方法,其特征在于:所述低密度脂蛋白受体免疫原是高纯化的人低密度脂蛋白受体。
- 20 25.一种人低密度脂蛋白受体的纯化方法,其特征在于:所述方法包括使含有人低密度脂蛋白受体的物质与如权利要求 1 至 8 中任何一项所述的单克隆抗体接触。

人低密度脂蛋白受体的单克隆抗体及其制备和用途

5 技术领域

本发明涉及特异性地识别人低密度脂蛋白受体(receptor for low-density lipoproteins, 简称 LDLR)的单克隆抗体。这些抗体用于, 例如, 在制备过程以及识别和治疗诸如丙型肝炎感染(HCV)等疾病中识别和纯化人可溶性低密度脂蛋白受体(human soluble LDLR, 简称 hsLDLR)。

10

背景技术

胆固醇是所有真核细胞质膜的一种组分, 是高级生物的细胞生长和生存必不可少的。然而, 胆固醇的血清水平高就会在全身的动脉形成动脉粥样硬化斑块, 从而导致生病和死亡。在哺乳动物中合成胆固醇的主要器官是肝脏。在肠内也会形成大量的胆固醇。这些器官形成胆固醇的速度与每天从食物摄取胆固醇的量密切相关。肝脏和肠以外的细胞从原生质获取胆固醇而非自身合成。胆固醇和脂质通过脂蛋白在体液传送, 其按递增的密度进行分类。脂蛋白是一种颗粒, 由被极性脂质和脱基蛋白质壳体包着的疏水脂质核心构成。这些脂蛋白有两个作用: 它们容易溶解高疏水脂质以及它们包含调控在特定靶细胞和组织内外的个别脂质运动的信号。胆固醇通过低密度脂蛋白在体液内传送, 而这些低密度脂蛋白与非肝细胞质膜上的特定受体相结合。受体/低密度脂蛋白复合物再由传送机构, 也称为受体介导的内吞作用[Goldstein 等人, (1979)], 内化到细胞中。LDLR 是一族结构上相关的细胞表面受体的原始型, 而这些细胞受体介导哺乳动物细胞中多配体的内吞作用。

LDLR 由 822 个氨基酸残基组成, 分子量为 164000。它由几个区域组成, 其中一些区与其它蛋白质共享序列同源性。它的 NH₂ 末端配体结合区由 292 个残基组成, 排列在 7 个富含半胱氨酸的缺陷重复序列中。每个重复序列含有 6 个半胱氨酸残基, 它们是以一与三、二与五及四与六的形式相结合的二硫化物[Bieri 等人, (1995)]。在该区之后是四个附加区: 第一区由 400 个氨基酸残基组成, 与表皮生长因子受体属同系, 第二区由 58 个富集氧连接的糖的氨基酸残基组成, 第三区是 22 个氨基酸残基组成的单跨膜区, 第四区是 50 个氨基酸残基的细胞质功能区[Sudhof 等人, (1985); Brown 等人, (1986)]。

Brown 和 Goldstein 对家族性高胆固醇血症(FH)的研究揭示了 LDLR 在生理上的

重要性。业已发现,这种疾病是由于分子基因缺陷引致低密度脂蛋白功能受体不存在或不足而造成的[Brown 等人, (1976)]。家族性高胆固醇血症(FH)的突变按特性分成几类[Goldstein 等人, (1975)]。

从由干扰素诱发的细胞[Fischer 等人, (1993)]和体液[Fischer 等人, (1994)]培养上清液中已识别和分离出具有抗病毒活性的可溶性类 LDLR。目前已识别出一些由干扰素诱致的蛋白质,它们有助于干扰素诱导成抗病毒状态。在人羊膜传代细胞培养上清液中可制备和聚集这样一种具有抗病毒活性的蛋白质。该蛋白质可纯化至均一并看作是可溶性 LDLR[见欧洲专利 EP0553667 和 Fischer 等人, (1993)]。业已发现,这种可溶性 LDLR 由哺乳动物细胞分泌到培养液,而这些细胞通过应答干扰素而进入抗病毒状态。与干扰素不同的是,可溶性 LDLR 并不是在细胞中诱发变成抗病毒状态,而是本身变成抗病毒状态。人们发现,可溶性 LDLR 在病毒复制、成熟和发育的整个过程中明显一直存在,这表明它可能参与抑制病毒组合或发育(未公布数据)的复合过程。最近的研究显示培养细胞上的 LDLR 可介导丙型肝炎病毒的内吞作用[Agnello 等人, (1999)]。这些和其它发现认为这族 LDLR 可用作病毒受体。因此,对可溶性 LDLR 所产生的抗体通过与细胞的 LDLR 结合可阻止病毒粒子的进入和发育。

到目前为止,唯一市售的 LDLR 的单克隆抗体是 C7,它是一种对牛 LDLR 的抗体[Beisiegel 等人, (1981), 在美国和英国均有售],其通过以纯化至均一的牛肾上腺皮层 LDLR 使小鼠免疫制备。溶解牛肾上腺皮层的膜,并用二乙氨基乙烷(DEAE)纤维素色谱柱使受体洗脱而使其部分纯化[Beisiegel 等人, (1981)]。牛 LDLR 的抗体和人 LDLR 只起微弱的交叉反应。

事实上,已经发现,当牛 LDLR 的 C7 单克隆抗体用于定量测定重组人 LDLR 时会有明显缺点:

- a) 它对人 LDLR 的亲合力低;
- b) 它与细胞培养液衍生的杂质进行大量的交叉反应。

以前,对人 LDLR 的特定抗体在市面上是买不到的。这看起来使人惊奇,但这是因为经常需要开发新蛋白质的抗体不管其用作纯化、识别以及分析开发的目的。可能因为制备单克隆抗体的一条件需要大量能使小鼠有效免疫的高纯度抗原,所以到目前为止还不能制成这样一些抗体。高纯度抗原在反相高效色谱法(RP-HPLC)中以单一主峰出现。而且在纯化过程中识别和定量抗原的其它方法并不容易研究出来。根据本发明,本文所述的抗病毒活性的测定方法可用于纯化过程中识别 LDLR。

所以,有需要制备 hsLDLR 的特定单克隆抗体以便提供改进有效免疫测定法(ELISA)和在蛋白质印迹法中的蛋白质的识别方法的装置。这些抗体要能够在重组蛋

白质的制备和纯化过程的进展中监控和定量重组 hsLDLR 以及检测天然蛋白质。

发明内容

5 本发明可以产生杂交瘤细胞株,其制备能特异性地识别和结合人 LDLR 及其片段的单克隆抗体。

具体地说,本发明可以产生杂交瘤细胞株,其制备能特异性地识别和结合 hsLDLR 的单克隆抗体。

因此,本发明涉及一种单克隆抗体、嵌合抗体、人化抗体、抗独特型抗体或其片段,除了单克隆抗体 C7 外,它们可特异性地识别和结合人 LDLR 及其片段。

10 本发明提供一些单克隆抗体,其可识别和结合 hsLDLR,并满足下列要求:

1. 单克隆抗体(Mab),在酶联免疫吸附测定法(ELISA)中可成对使用,如夹心 ELISA 法以检测 hsLDLR。
2. 单克隆抗体,在蛋白质印迹法(Western Blot analysis)中可用于识别 LDLR。
3. 单克隆抗体,可用于中和 hsLDLR 的抗病毒生物活性。
- 15 4. 单克隆抗体,可用于抑制病毒感染,如丙型肝炎病毒(HCV)。

本发明还提供一种检测和/或定量人 LDLR 的方法,其包括为该目的以已知方式使用本发明的特异性单克隆抗体。

本发明也提供克隆杂交瘤细胞,其包括一以重组人 LDLR 免疫的哺乳动物的脾细胞以及一均一或不均一的淋巴细胞。

20 用一般方法就可以制备本发明的单克隆抗体,如使一克隆杂交瘤细胞生长,其包括一以 hsLDLR 免疫的哺乳动物的脾细胞以及一在液体培养液或哺乳动物的腹腔中均一或不均一的淋巴细胞,以使杂交瘤细胞生成和聚集单克隆抗体。

另一方面,本发明也提供一种人 LDLR 的纯化方法,其包括使含有原 LDLR 的物质与本发明的一种单克隆抗体接触。在重组蛋白质的纯化过程中,用装上吸收
25 LDLR 特异性单克隆抗体的色谱柱作为亲和纯化步骤。

本发明还提供一种重组人 LDLR 的检测方法,该方法包括如实施例 5 所述 ELISA 法中用本发明的单克隆抗体为抗体。

只要是温血哺乳动物的 LDLR,则任何 LDLR 都可以用作免疫动物的 LDLR 或 LDLR 的片段。也可用 LDLR 的突变蛋白。这样一种哺乳动物的 hsLDLR 的典型例子
30 是可溶性 LDLR 的+291 型,其人 LDLR 的顺序包括氨基酸顺序,开始位点+4 上为氨基酸天冬氨酸(Asp),末端位点+291 上为氨基酸谷氨酸(Glu),当然也可用其它型式,如+292 型等。

附图说明

图 1 所示为对重组人可溶性低密度脂蛋白受体(recombinant human soluble LDLR, 简称 r-hsLDLR)的单克隆抗体产生的流程图。

5 图 2 所示为用各条带下标出对应的单克隆抗体的免疫印迹分析, 条带 1 为 r-hsLDLR 的+291 型, 条带 2 为尿液 hsLDLR, 条带 3 为作为负调控(r-hTBP-1)的重组人 p55 肿瘤坏死因子 (TNF) 受体。图上左边的箭头表示分子量标记物的位置, 而图上右边的箭头指向上述各箭头所示的 hsLDLR 型式的位置。

10 图 3 所示为单克隆抗体 12.6、28 和 29.8 对培养液 FT167 中丙型肝炎病毒(+)和(-)链的生成的影响。在用单克隆抗体抗 LDLR(8 或 2 μ g/mg)感染之前先将细胞处理 30 分钟。然后将细胞用 25 μ l HCV(+)血清[N^o42; 1b]]感染过夜。感染后当天, 洗涤三次, 加入新培养液并且每 48 小时更换一次。感染五天后, 收集肝细胞, 纯化核糖核酸 (RNA), 并用 rTth RT-PCR(Perkin Elmer)分析 1 μ g 细胞核糖核酸。重复上述试验。

+SP: 正链 RNA 的检测; -SP: 负链 RNA 的检测; X: 空白试验。

15

具体实施方式

制备对 hsLDLR 的单克隆抗体。利用这些单克隆抗体研究出识别 hsLDLR 的 ELISA 法和免疫印迹法以及 hsLDLR 的抗病毒活性的中和测定法。

20 用 hsLDLR 的重组+291 型免疫的小鼠在小鼠体内产生单克隆抗体, 这些单克隆抗体由 hsLDLR 的 N 末端配体结合区(从 Asp+4 到 Glu+291)组成。中国仓鼠卵巢(CHO)细胞生成 hsLDLR 的重组+291 型并纯化至均一。

25 免疫小鼠产生大量滴定的特异性抗体。将杂交瘤细胞筛选后, 五种克隆(编号为 12、28、29、30 和 50)当作为最高抗体生产者。这些克隆可选择进行进一步亚克隆。在亚克隆之后, 将抗体生产能力最高的 29 种亚克隆分离出来, 并将装有母克隆和亚克隆的玻璃管冷冻保存。

30 挑选一对对 r-hsLDLR 的单克隆抗体用 ELISA 法检测。单克隆抗体 28 用作覆盖抗体, 以生物素标记的单克隆抗体 29.8 用作第二抗体。结果发现单克隆抗体 12.6 和 29.8 在免疫印迹分析法(Western Blot analysis)中适合识别天然和重组 hsLDLR, 单克隆抗体 28 和 30 在免疫印迹分析法中适合识别重组 hsLDLR, 而单克隆抗体 12.6 和 50 适用于抑制 hsLDLR 的抗病毒活性。

本发明还发现, 单克隆抗体 12.6、28 和 29.8 可抑制人肝细胞主培养液中的丙型肝炎病毒(HCV)基因组的复制。因此这些抗体可用于治疗丙型肝炎感染(图 3)。

确定由克隆产生的亚类同种型单克隆抗体,克隆 12.6、28、29.8 和 30 确定为 IgG₁, 而克隆 50.30 确定为 IgM。

相对于 hsLDLR 的+291 型产生的单克隆抗体也可识别为 hsLDLR 的其它型式, 即在 ELISA 法和蛋白质印迹法分析法中, 在重组 CHO 细胞产生的 r-hsLDLR 的+292 型和+331 型。+292 型包括受体 N-末端部分, 从氨基酸残基 Asp+4 到 Cys+292, 而+331 型包括受体 N-末端部分, 从氨基酸残基 Asp+4 到 Cys+331。

用于免疫小鼠产生单克隆抗体的抗原是在 CHO 细胞内产生的 r-hsLDLR 的+292 型。用稳定期 Fibracel 矩阵系统在生物反应器产生 r-hsLDLR。把该 r-hsLDLR 纯化至均一, 然后用来免疫小鼠。

10 杂交瘤细胞的融合和产生选用反应最好的小鼠的免疫脾细胞。

关于本文所指的抗体, 术语“单克隆抗体”表示包括由任何一种已知技术, 例如, 但不局限于, 酶分解、肽合成或重组技术提供的, 且可以可溶性或结合型式标记的单克隆抗体、嵌合抗体、全人化抗体、对抗独特型抗体的抗体(抗抗独特型抗体)及其片段。

15 单克隆抗体含有基本均一的对抗原特异的抗体群, 这些抗体群含有大致相同的表位结合位。用本领域技术人员已知方法就可以制备单克隆抗体, 例如参见本文的引用文献: Kohler 和 Milstein, "Nature", 256: 495-497 页, (1975); 美国专利 US4, 376, 110; Ausubel 等人, eds., "Harlow and Lane ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL", Cold Spring Harbor Laboratory, (1988); 以及 Colligan 等人, eds., "Current Protocols in Immunology", Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience N.Y., 20 (1992-1996)。这些抗体可以是任何一种免疫球蛋白类, 包括 IgG、IgM、IgE、IgA、GILD 及其任何一种亚类。制备本发明单克隆抗体的杂交瘤细胞可在体内、原位或体外培养。目前, 高滴度单克隆抗体的制备方法优选在体外或原位制备。

25 嵌合抗体是指那些自不同动物种类衍生出的不同部分的分子, 如自一小鼠单克隆抗体以及一人免疫球蛋白稳定区衍生出的具有可变区的一些分子。嵌合抗体主要用于减少应用中的免疫原性以及提高产率, 例如, 当杂交瘤细胞的小鼠单克隆抗体的产率高, 但人的免疫原性不高的时候, 就会用人/小鼠嵌合抗体。嵌合抗体及其制备方法在本领域是已知技术[Cabilly 等人, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 81: 3273-3277 页, (1984); Morrison 等人, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 81: 6851-6855 页, (1984); 30 Boulianne 等人, "Nature", 312: 643-646 页, (1984); Cabilly 等人, 欧洲专利 EP125034(1984 年 11 月 14 日公布); Neuberger 等人, "Nature", 314: 268-270, (1985); Taniguchi 等人, 欧洲专利 EP171496(1985 年 2 月 19 日公布); Morrison 等人, 欧洲专

利 EP173494(1986年3月5日公布); Neuberger 等人, PCT 专利 WO8601533(1986年3月13日公布); Kudo 等人, 欧洲专利 EP184187(1986年6月11日公布); Sahagan 等人, “J. Immunol.”, 137: 1066-1074 页, (1986); Robinson 等人, 国际专利 WO8702671(1987年5月7日公布); Liu 等人, “Proc. Natl. Acad. Sci. USA”, 84: 3439-3443 页, (1987); Sun 等人, “Proc. Natl. Acad. Sci. USA”, 84: 214-218 页, (1987); Better 等人, “Science”, 240: 1041-1043 页, (1988); Riechmann 等人, “Nature”, 332: 323-327 页; 以及 Harlow Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, supra]。本文也引用上述所有文献。

“全人化抗体”是指既含有人免疫球蛋白的可变区又含有稳定区的分子。全人化抗体有可能用于治疗需要重复治疗的慢性和复发病, 如自身免疫病等。一种全人化抗体的制备方法包括小鼠体液免疫系统的“人化”, 即通过把人免疫球蛋白(Ig)基因座引入内生 Ig 基因已经失活的小鼠中, 以制备能产生人 Ig 的鼠系(变种小鼠)。Ig 基因座的物理结构和基因重排非常复杂, 而表达方法要求最终产生范围大的免疫应答。抗体的差异性主要是 Ig 基因座中的不同 V、D 和 J 基因之间组合重排的结果。这些基因座也含有分散布置的调控元素, 它们调控抗体表达、等位基因排斥、类型转换及亲合力成熟性。将未重排的人 Ig 转基因引入小鼠中, 结果显示小鼠的重组系统和人的基因兼容。另外, 用抗原免疫变种小鼠可以得到分泌各种同种型的抗原特异性人单克隆抗体的杂交瘤细胞。

全人化抗体及其制备方法在本技术领域已公知[Mendez 等人, “Nature Genetics”, 15: 146-156 页, (1997); Buggemann 等人, “Eur. J. Immunol.”, 21: 1323-1326 页, (1991); Tomizuka 等人, “Proc. Natl. Acad. Sci. USA”, 97: 722-727 页, (2000); 专利 WO98/24893]。

抗独特型抗体是一种识别通常与抗体的抗原结合部位相关的独特决定簇抗体。使与正在制备的抗独特型抗体的单克隆抗体源同种和同基因型(如鼠系)动物免疫可制备独特型抗体。免疫过的动物通过产生对这些独特型决定簇的抗体(抗独特型抗体)来识别和应答免疫抗体的独特型决定簇。例如参照美国专利 US4,699,880, 其列入参考文献中。

抗独特型抗体也可用作诱导另一种动物免疫应答的“免疫原”, 产生一种称为抗抗独特型抗体。该抗抗独特型抗体在表位上和诱导抗独特型的原单克隆抗体相同。因此, 用对单克隆抗体的独特型决定簇抗体即可识别其它表达同一特异性抗体的克隆。

所以, 本发明的对 LDLR 的单克隆抗体及其异构重整体、异质体、片段和衍生物可用于诱导合适动物的抗独特型抗体, 如 BALB/c 小鼠。用这些免疫小鼠的脾细胞制

备分泌抗独特型单克隆抗体的抗独特型杂交瘤细胞。另外，抗独特型单克隆抗体可与一载体偶联，如钥孔械血蓝素(KLH)，并用以使另外一些 BALB/c 小鼠免疫。这些小鼠的血清含有抗抗独特型抗体，其具有与原单克隆抗体结合的性能，而这些单克隆抗体对上述 LDLR 蛋白质、或异质体、片段和衍生物的表位具有特异性。

5 因此，抗独特型单克隆抗体各有自己的独特型表位，或者在结构上与待评估的表位相似的独特位。术语“单克隆抗体”也包括完整分子及其片段，例如，Fab 和 F(ab')₂，它们都能与抗原结合。Fab 和 F(ab')₂ 片段没有完整抗体的 Fc 片段，很快就在循环中清除，而且它们的非特异性组织结合比完整抗体少[Wahl 等人，“*J. Nucl. Med.*”，24: 316-325 页，(1983)]。

10 值得注意的是，根据本发明揭示的方法，本发明所用的 Fab、F(ab')₂ 及其它片段可检测和定量完整抗体分子的 LDLR 蛋白质。这些片段一般用酶类，如木瓜蛋白酶(产生 Fab 片段)或胃蛋白酶(产生 F(ab')₂ 片段)等，通过蛋白水解分解而成。

一般认为，如果单克隆抗体能够特异性地与分子反应以使分子与抗体结合，它就是一“可结合”分子。术语“表位”是指能以抗体结合，也可被抗体识别的任何分子部分。

15 表位或“抗原决定簇”通常由分子的化学活性表面基团组成，如氨基酸或糖侧链，而且具有特定三维结构特征及特异性电荷特征。

“抗原”是指能以抗体结合的分子或分子一部分，这些抗体的抗原还可诱导一动物产生能与该抗原的表位结合的抗体。一个抗原可有一个或多个表位。上述所指的特异性反应是指抗原以高选择性方式与其相应抗体的表位反应，而不是与大批由其它抗原诱发的其它抗体反应。

20 本发明用的抗体及抗体片段可用于定量或定性检测样本的 LDLR 蛋白质或者检测有否表达本发明的 LDLR 蛋白质的细胞。利用与荧光显微镜、流式细胞仪或荧光探测结合的带荧光标记的抗体，通过免疫荧光技术就可以进行上述定量和定性的检测。

25 当使用免疫荧光显微镜或免疫电子显微镜，本发明用的抗体(或其片段)在组织结构上可用于原位检测本发明的 LDLR 蛋白质。从病人身上抽取一组织样本并将本发明的标记抗体放在该样本中，即可实现原位检测。提供的抗体(或片段)最好把标记抗体(或片段)施加或重叠到生物样本上。利用这样一种处理，不但可确定 LDLR 蛋白质是否存在，而且可确定其在检后组织上的分布。利用本发明，普通技术人员很容易对任何一种组织学方法(例如染色法)进行改进以实现原位检测。

30 本发明 LDLR 蛋白质的检测方法一般包括以下步骤：培养一生物样本，例如在能够识别 LDLR 蛋白质的标记抗体存在下培养生物流体、组织提取液、新鲜收集的细胞，如淋巴细胞或白细胞，或在组织培养液培养的细胞，以及以本技术领域已知的任何一

种技术来检测该抗体。

生物样本可与固相载体，如硝酸纤维素，或能够固定细胞、细胞粒或可溶性蛋白质的其它固相载体偶联。然后，用适当缓冲液洗涤载体，再如上所述用本发明的标记抗体处理。之后再用缓冲液把固相载体洗涤多一次，以去除游离抗体。用一般方法可以检测在所述固相载体上的结合标记量。

“固相载体”、“固体载体”、“载体”是指任何一种能够与抗原或抗体结合的载体。公知的载体包括玻璃、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、聚丙烯酰胺、辉长岩、磁铁矿。用于本发明目的的载体，其性质可以是部分可溶或不溶。实际上载体材料可为任何可能的结构构造，只要偶联分子能与抗原或抗体结合即可。因此，载体的构造可呈球形，如圆珠形、圆柱形、试管的内表面形、或棒的外表面形。另外，其表面也可以是扁平的，如片状、试纸状等。优选载体包括聚苯乙烯珠粒。本领域技术人员将会知道很多其它适合与抗体或抗原结合的载体，或将能利用普通实验来确定这些适合的载体。

根据公知的方法可以确定如上所述的本发明一定量抗体的结合活性。本领域技术人员利用普通实验就可以确定每次试验的操作和最佳试验条件。

视具体情况可在试验中加上其它常用或必要步骤，如清洗、搅拌、摇动、过滤等。

标记本发明抗体的其中一种方法是把抗体和酶结合，用于酶免疫测定(EIA)。当这种酶受一适当底物作用时，其又将以这样一种方式和底物反应以便产生一能够被，例如分光光度法、荧光法或目测等方法，检测到的化学分子部分。用于可检测标记抗体的酶包括，但不限于，苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 δ -5-类固醇异构酶、酵母乙醇脱氢酶、 α -甘油磷酸盐脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、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-磷酸盐脱氢酶、葡萄糖淀粉酶以及乙酰胆碱酯酶。检测的方法可用比色法，这种方法给酶配一显色底物。也可通过目测法比较底物与用类似方法制备的标准物的酶反应程度，即可进行检测。

还可用任何其它免疫测定法作检测。例如，通过放射性标记抗体或抗体片段，就能用放射免疫测定法(RIA)对 R-PTPase 进行检测。本文的引用文献“Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology”，[by Work, T.S 等人, North Holland Publishing Company, NY(1978)]详细叙述了放射免疫测定的方法，具体参考 Chard, T.的题为“An Introduction to Radioimmue Assay and Related Techniques”部分。用克计数器或闪烁计数器等方式或放射自显影均可检测到放射性同位素。

也可用荧光化合物标记本发明的抗体。当荧光标记的抗体受适当波长的光作用，

由于有荧光,因此可检测到抗体的存在。最常用的荧光标记化合物是荧光异硫氰酸酯、若明丹、藻红蛋白、脓青素、别藻蓝蛋白、邻苯二醛及荧光胺。

另外,用诸如 ^{152}E 或其它镧系元素等发光金属也可使抗体带检测标记。这些金属通过二亚乙基三胺五乙酸(ETPA)等螯合基黏附到抗体上。

5 将抗体和化学发光化合物偶联也可使抗体带检测标记。检测在化学反应过程中产生的光就可以确定化学发光标记的抗体。特别有用的化学发光化合物是鲁米诺、异鲁米诺、染色吡啶翁酯、咪唑、吡啶盐、草酸酯。

同样,本发明的抗体还可用生物发光化合物来标记。生物发光是一种在生物系统中的化学发光,生物系统的催化蛋白质使化学发光反应的效率增加。检测发光就可以
10 确定生物发光蛋白质的存在。用于标记目的的主要生物发光化合物是荧光素、荧光素生产酶、发光蛋白质。

本发明的抗体分子适合用于免疫检测,也称为“双位”或“夹心”法检测。在一般免疫检测法中,一定量的未标记抗体(或抗体片段)与固体载体结合,而一定量带检测标记的可溶性抗体加入以检测和/或定量在固相抗体、抗原和标记抗体之间形成的三元
15 复合物。

典型的和优选的免疫检测法包括“正向”检测法,在这些方法中,与固相结合抗体先与待测样本接触,通过形成二元固相抗体/抗原复合物从样本提取抗原。培养一段合适的时间后,洗涤固体载体以去除剩余样本,也可能包括未反应的抗原,再与含有未知量标记抗体(起“报告分子”的作用)的溶液接触。在培养第二段时间使标记抗体
20 通过未标记抗体与粘附在固体基体或载体的抗原结合之后,第二次洗涤固体载体以去除未反应的标记抗体。

在本发明抗原所使用的另一种“夹心”检测法中,采用称为“同步”和“逆转”检测法。同步检测法只包括一培养步骤,即把结合到固体载体的抗体和标记抗体同时加到待测样本中。经过培养之后,洗涤固体载体以去除残余的流体样本和未结合的标记抗
25 体。然后,如一般“正向”夹心检测法一样,确定与固体载体结合的标记抗体的存在。

在“逆转”检测法中,首先将标记抗体溶液逐步加入流体样本中,在培养一段适合的时间后,加入与固体载体结合的未标记抗体。再培养一段时间,用一般方法洗涤固相,使其不含有待测样本和未反应标记抗体的溶液。如“同步”和“正向”检测法一样,确定与固体载体结合的标记抗体的存在。

30 以下将通过非限制性实施例对本发明进行详细说明。

实施例 1 中国仓鼠卵巢(CHO)r-hsLDLR 的制备

通过以两表达载体共同转变感染二氢叶酸还原酶(DHFR)基因的 CHO-DUKX 细

胞可生成表达 hsLDLR 的稳定重组 CHO 细胞[Urlaub, G.等人, (1980)], 其中一种表达载体: psLDLR01, 其含有 LDLR 的 N 末端配体结合区, 从+4 位上的氨基酸残基 Asp 开始直至+291 位上的 Glu(+291 型), 以及另一种表达载体: pDHFR, 其含有 DHFR 的小鼠基因, 这两种向量均由 SV40 初始区的激活子和转录终止元素调控。根据制造商所订的协议, 用 LipofectAmine(Gibco BRL)通过阳离子脂质体进行转变感染。72 小时后, 将感染细胞转移到不含脱氧和核糖核苷的选择性培养液中, 用 10%透析过的胎牛血清(FCS)补给。表达 DHFR 活性的细胞可形成菌落, 其通过升起具有胰蛋白酶浸泡纸盘的细胞而分离出来。使细胞生长, 并按 r-hsLDLR 活性筛选细胞。然后, 转染细胞经由 MTX 基因扩大, 再使稳定生产者克隆亚克隆并进行选择。

10 在 5 升 CelliGen 生物反应器中, 以无血清培养液[Gibco CHO-A-SFM Cat. no. 95-0091DJ]用编号为#33-10-29-21 的稳定的 CHO 生产者克隆细胞生成重组 hsLDLR (+291 型)。经过滤等级为 0.8-0.2 μ 的筒式过滤器[Gelman Cat. No. CSS92DSCCK]过滤澄清原收集液, 并在截留分子量为 5KD 的滤膜上浓缩 100 倍。以小规模纯化法纯化第一次免疫用的 r-hsLDLR 的+291 型。该方法使用二乙氨基乙烷(DEAE)琼脂糖阳离子交换色谱柱以及在 Butyl-TSK 色谱柱上进行疏水相互作用步骤, 再利用高温聚合物(HTP)色谱柱和 Sephacryl 100 粒度排斥色谱柱。因为粒度排斥色谱法的馏分#27 含有特异性抗病毒活性, 选取该馏分并用下面实施例 9 叙述的抗病毒检测法测定其活性为 780 单位/ μ g。馏分#27 的蛋白质由 N 末端分析法确定为 r-hsLDLR。

20 纯化第二批 CHO +291 r-hsLDLR, 用于小鼠补强注射。纯化时用可改善产率的重整过程, 其包括以下步骤: a)原收集液的澄清和浓缩 100 倍; b)用 HQ POROS 阳离子交换色谱柱洗脱; c)二步疏水相互作用(HIC)步骤: 在 Butyl-TSK 色谱柱收集洗脱液以及流过 Phenyl 5PW 色谱柱。对最后疏水相互作用步骤得到的游离馏分进行透析, 并用 HQ POROS 阳离子交换色谱柱纯化。最后一步采用羟基磷灰石(HTP)色谱柱。所得到的 r-hsLDLR 纯化至大约 90%, 在反相高效液相色谱法中以单主峰洗脱出来。

25 实施例 2 小鼠的免疫

从上述实施例 1 的粒度排斥色谱法洗脱出来的馏分#27 是纯 r-hsLDLR, 取 10 μ g 配成 100 μ g/ml 的浓度, 以完全弗氏佐剂(CFA, 50%(体积))使其均一化, 并分别注射入五只 7 个星期大的 Balb/C 雌性小鼠的脚底。

30 第一次免疫后四星期, 进行补强注射, 即将含有 10 μ g 纯 r-hsLDLR 的同一馏分, 且浓度为 50%(体积)的 CFA 溶液注入小鼠肌肉内。

第二次注射后两星期, 用下述实施例 3 所述的 ELISA 法测试小鼠血清的 r-hsLDLR 抗体。

第二次注射后十星期,小鼠 M-1 和 M-2 的 r-hsLDLR 特异免疫反应性最显著,将 10 μ g 由上述实施例 1 所述的重整纯化过程制成的纯 r-hsLDLR 补强注入该两只小鼠中。

5 十四星期后,从小鼠抽取血液,测试其 r-hsLDLR 抗体。另外再向这两只小鼠补强注射含有 50 μ g r-hsLDLR 的磷酸盐缓冲盐水(PBS)二次:第一次注射腹膜内,二天后,第二次再注射腹膜和静脉内。

第二次注射后两星期,再次从小鼠抽取血液,用以下实施例 3 所述的直接 ELISA 法测试抗血清的抗 r-hsLDLR 活性。每种抗血清依次稀释至 1:100-1:32,000,并以双份施加到 96 孔板中,该孔板覆有上述实施例 1 所述的重整纯化过程纯化的 r-hsLDLR,每孔为 10U。每排第一个孔加入测试缓冲液和含有 PBS+1%牛血清蛋白(BSA)或明胶+0.05%Tween 20+0.05% Thimerosal 的 DMEM+10%同种血清(HS)作空白试验。在 10 最后两排孔中加入同一稀释范围的正常鼠血清作为负调控。用 ELISA 读数器在 492 和 405 纳米处测量酶反应的吸收率。

本测试结果显示小鼠 M-1 的血清具有较高 r-hsLDLR 特异性免疫反应性,故而被 15 舍弃并且收集与骨髓瘤融合的脾细胞[Eshhar Z., (1985)]。

实施例 3 用于抗血清测试和杂种瘤细胞克隆筛选的直接酶联免疫吸附测定法(ELISA)

筛选阳性抗血清的直接 ELISA 法的步骤如下:用含有 100 μ l r-hsLDLR(用上述实施例 1 的重整纯化过程纯化)100 单位/ml(10U/孔)pH5.6 的 PBS+1%明胶(Sigma, Cat. No. G-7765)+0.9mM Ca²⁺和 0.5mM Mg²⁺,下文称为检测缓冲液,覆盖 90 孔板 90 分钟并 20 在 37 $^{\circ}$ C 摇动。用 PBS+0.05% Tween 20 溶液(聚氧乙烯山梨糖醇酐一月桂酸盐- σ P-1379)洗 6 次,下文称为洗涤液。

免疫小鼠的抗血清样本依次稀释至 1:100-1:32,000,或把杂交瘤细胞培养上清液加入孔板中,在 37 $^{\circ}$ C 摇动培养 90 分钟,再用洗涤液洗 6 次。

25 取 100 μ l 与山羊抗体(Sigma-Cat. NO. 4601-1)共轭的辣根过氧化物酶(HRP)-APA 稀释至 1:1,200,并加入孔中,在 37 $^{\circ}$ C 摇动培养 90 分钟,再用洗涤液洗 6 次。

把 100 μ l 底物溶液(通过在 20ml 水中溶解一片 OPD 和一片双氧水而制成)加入孔中,在室温下培养 30 分钟。每孔加入 100 μ l 4N 的盐酸使酶反应中止。

用 ELISA 读数器在 492 和 405nm 处读出 96 孔板的吸收率,并通过连接到 ELISA 读数器的个人计算器中的 Multicalc 软件以 4 参数逻辑算法计算结果。

30 实施例 4 融合、杂交瘤细胞的制备、克隆的选择、腹水抗体的纯化

融合过程和杂交瘤细胞的制备均按 Eshhar Z 在 1985 年的协议进行。简单地说,

在融合前 2-4 天已补加注射的小鼠 M-1 的脾细胞在聚乙二醇(PEG)培养一段短时间与骨髓瘤细胞融合。先用 DMEM 缓慢稀释 PEG, 再以离心完全去除 PEG。细胞重新悬浮于 DMEM-HAT 培养液中, 并分布在浓度为 3.4×10^4 细胞/孔的 96 孔板上, 在 37°C 8% 的二氧化碳培养箱中培养 10-14 天。在 10 天内将所有杂交瘤细胞孔中的培养液换成以 10% 马血清(HS)补给的 DMEM。用实施例 3 所述的直接 ELISA 法筛选含有 r-hsLDLR 的单克隆抗体的杂交瘤细胞培养上清液样本。用检测缓冲液和 DMEM+10% HS 作空白试验, 用单克隆抗体 C7(Amersham 有售)和小鼠 M-1 抗血清作正调控, 而可溶性 p55 肿瘤坏死因子(TNF)受体的单克隆抗体则作负调控。将培养上清液中检测到有抗体的孔中细胞转移到 24 孔板, 再转到 25cm^2 T 瓶中。监视膨胀的培养液分泌 r-hsLDLR 单克隆抗体的情况。将阳性培养液的细胞玻瓶冷冻保存在液氮中。

筛选大约 1000 个培养液用以检测 r-hsLDLR 的抗体。对 54 个免疫活性最高的培养液重复检测多次。其中五个免疫活性最高的培养液(12、28、20、30 和 50)在 96 孔板中通过限制稀释进行克隆。用直接 ELISA 法多次检测生长克隆上清液中的 r-hsLDLR 抗体。

阳性杂交瘤克隆细胞在组织培养瓶含有 15% 马血清的 DMEM 中生长, 冷冻一部分培养液玻管。同时, 向 2-4 只小鼠各注射不同杂交瘤克隆细胞以获得腹水。用硫酸铵沉淀法或蛋白质 G 色谱柱洗脱从腹水纯化抗体。简单地说, 在 20mM pH7 的磷酸盐缓冲液中将 7.5ml 腹水稀释至 1:3, 并装入 5ml 蛋白质 G 色谱柱(C10/10)中。用 20mM pH7 的磷酸盐缓冲液洗涤色谱柱, 用 100mM pH2.7 的甘氨酸洗脱出单克隆抗体。洗脱馏分的 pH 值用 1M pH 9.3 的 Tris 缓冲液调节至 7-7.5。

实施例 5 ELISA 中待用的单克隆抗体对的筛选和 ELISA 参数的优化

从实施例 4 的腹水纯化的单克隆抗体用于进行一组矩阵格式实验以选出最适合于下面实施例 6 所述的夹心 ELISA 法中用作第一和第二 r-hsLDLR 抗体的单克隆抗体对。简单地说, 用以硫酸铵沉淀法或蛋白质 G 色谱柱纯化的五种杂交瘤细胞(编号为 12、28.28、29.08、30 和 50.05)衍生而来的腹水覆盖 96 孔板。以在 CHO 细胞中产生的 r-hsLDLR 的 +291 型、+292 型(从 +4 位上的氨基酸残基 Asp 至 +292 位上的 Cys)以及 +331 型(从 +4 位的氨基酸残基 Asp 至 +331 位上的 Cys)作为抗原筛选抗体。上述部分纯化的单克隆抗体各取 1ml, 用生物素标记, 以其适合性快速筛选为夹心 ELISA 法的第二抗体。简单地说, 用 $30\mu\text{l}$ 0.5M 碳酸氢钠溶液将以硫酸铵沉淀纯化的 1.5mg 单克隆抗体的 pH 值调至 8.5。向抗体溶液加入 0.75mg 生物素-OSu N-羟基丁二亚氨基生物素(生物素-OSu, Sigma, Cat.#H1759, 将 5mg 溶于 $200\mu\text{l}$ DMSO 而制成的溶液), 在室温下轻轻摇动培养 2 小时, 再置于 $2-8^\circ\text{C}$ 培养过夜。把反应溶液装入 Sephadex

G-25M (Pharmacia Cat. #17-0851-01) PD10 色谱柱以分离当中生物素化的单克隆抗体和过量未反应的生物素-OSu。

初步实验显示单克隆抗体 29.08 和 30 用作 ELISA 法的第二抗体时，可在以上背景产生最强信号。

- 5 将作为第二抗体的抗体 12、28、29.08 和 50 用于孔板的覆盖，再测试其反应。实验结果清楚显示抗体 28 最适合用作覆盖。

以信号强度和特异性而言，用单克隆抗体 28 覆盖在微滴定孔板上，用以生物素标记的单克隆抗体 29.08 作为第二抗体所得的结果为最好。利用这些单克隆抗体，r-hsLDLR 的三种型式(+291、+292 和+331)得到的信号强度和特异性非常好。所有型式的吸收率在 492/405nm 处为 1.3 光密度(OD)。

- 10 将 r-hsLDLR 抗原的三种型式依次稀释至浓度为 0.9-1000 ng/ml，并加以分析。以单克隆抗体 28 用于覆盖和以用生物素标记的单克隆抗体 29.08 作为第二抗体得到一剂量应答曲线。这种组合得到的是一条浓度范围在 1-10 ng/ml 的 r-hsLDLR 的线性应答曲线。

- 15 影响 ELISA 检测法的参数包括试剂浓度、培养时间、缓冲液和孔板的选择等，通过测试得出各种最佳参数：

- 用 5-10 μ g/ml 单克隆抗体 28 的 PBS 溶液覆盖在微滴定培养板的孔上
- 缓冲液的组成

- 20 a) PBS+Tween 20
b) Tris+Ca+2+NaCl+Tween 20

- 封闭溶液：

- 25 a) 含 1%明胶的 PBS, 0.05% Tween, 0.005% Thimerosal
b) 含 1%BSA 的 PBS, 0.05% Tween, 0.005% Thimerosal
c) 含 1%FBS 的 PBS, 0.05% Tween, 0.005% Thimerosal
d) 含 1%牛奶的 PBS, 0.05% Tween, 0.005% Thimerosal
e) I Block, Hy Pep 和 Hy 酵母

- 以生物素标记的第二单克隆抗体 29.08 的浓度：1: 500、1: 1000、1: 2000、1: 4000、1: 8000、1: 10,000，相当于浓度 10.74-0.537 μ g/ml。
 - 外亲合素的浓度：1: 500、1: 1000、1: 2000、1: 4000、1: 8000、1: 10,000，相当于浓度 4-0.2 μ g/ml。
- 30

根据这些实验，建立了下面实施例 6 所述的夹心 ELISA 法的最后步骤。

实施例 6 r-hsLDLR 夹心 ELISA 法的建立

用单克隆抗体 28 和 29.08 建立 r-hsLDLR 的夹心 ELISA 法。简单地说, 在 2-8℃ 用 100μl 蛋白质 G 纯化的单克隆抗体 28(5μg/ml)把 96 孔板覆盖过夜或在 37℃3 小时。孔板用 PBS+0.05%Tween 洗 5 次, 然后在 37℃用 200μl 封闭溶液(PBS+1%BSA 或明胶+0.05%Tween 20+Thimerosal0.05%)培养 1 小时或在 4℃培养过夜, 然后用 5 PBS+0.05%Tween 洗 5 次, 把 100μl 样本或校准曲线抗原(CHO 的+291 r-hsLDLR, 在封闭溶液中稀释至 0.5-32ng/ml)加入孔中, 在 37℃摇动培养 90 分钟。孔板再用 PBS+0.05% Tween 20 洗 5 次。

加入含有 100μl/孔生物素化的单克隆抗体 29.08(0.69μg/ml)的封闭溶液, 在 37℃摇动培养 1 小时。孔板用 PBS+0.05%Tween 20 洗 5 次。取 100μl 市售的外亲合素/过氧化物酶共轭物(Extravidin TM-Peroxidase Biomakor Cat.#0645-1)稀释至 1: 10,000, 并加入孔中, 在 37℃摇动培养 1 小时。孔板用 PBS+0.05%Tween 20 洗 5 次。向每个孔加入 125μl 上述底物溶液, 培养约 10 分钟, 直至颜色变成所需的深浅度。加入 125μl 4N 盐酸使反应中止。用 ELISA 读数器在 492 和 405nm 波长时读出 96 孔板的吸收率, 并用连接到 ELISA 读数器的个人计算器中的 MultiCalc 软件计算所得结果。

15 实施例 7 同种型单克隆抗体

根据制造商的检测程序用市售同种型试剂盒(PharMingen International)确定同种型单克隆抗体免疫球蛋白(Ig)。克隆 12.6、28、29.8 和 30 确定为 IgG1, 而克隆 50.30 是 IgM 类。

实施例 8 SDS-PAGE 免疫印迹分析法

20 用成为 r-hsLDLR 的单克隆抗体通过免疫印迹分析法分析纯化的 r-hsLDLR 的 +291 型以及从人尿液纯化的天然 LDLR。简单地说, 在还原条件下(0.04M 白喉破伤风类毒素(DTT))把 12% SDS Poly Acrylamide 凝胶和浓度为 100ng/条的 r-hsLDLR 的 CHO+291 型, 或天然尿液的 hsLDLR 或 TBP-1 原收集液一起装入色谱柱(作为负调控)。每条带也装上低分子量标记物(LMW)。将这组样本洗脱 5 次。通过电洗脱使在凝胶上 25 分离出来的蛋白质转移到硝酸纤维滤膜。该滤膜在含有 10%低脂奶、0.1 %Tween 20 的 PBS 中培养 16 小时。将滤膜剪成条状, 每条条带用 5 种选出来的单克隆抗体: 12.6、30、50.30、28 或 29.08(腹水稀释至 1: 4000) 中的其中一种在室温下培养 2 小时。

30 用含有 0.1%Tween 20(3x15 分钟)的 PBS 洗涤膜带, 并用第二抗体一与辣根过氧化物酶/鹼性磷酸酶共轭的山羊抗鼠(稀释至 1: 10,000, Biomakor) 在室温下培养 2 小时。

用含有 0.1 %Tween 20(3x15 分钟)的 PBS 洗涤这些膜带。用增强式化学发光法

(ECL, Amersham)检测正谱带。

在免疫印迹分析法(图 2)中单克隆抗体 12.6 和 29.8 用于识别尿液和纯化的 r-hsLDLR 的+291 型。单克隆抗体 28 和 30 用于识别纯化的 r-hsLDLR 的+291 型。

实施例 9 用单克隆抗体抑制 r-hsLDLR 的抗病毒活性

5 通过 VSV/WISH 系统的细胞病效应(CPE)抑制分析法, 在体外测试能特异地与 r-hsLDLR 反应的单克隆抗体抑制 r-hsLDLR(+291 型)抗病毒活性的能力。

把 WISH 细胞(来源于人羊膜)放在以 10%FBS 和 0.04M 谷氨酰胺补给的甲氧基乙基汞(MEM)中, 并置于 37°C 5%的二氧化碳培养箱中培养。在检测开始前 24 小时把指数型增长的细胞接种在 96 孔组织培养板中, 分布密度为 40,000 细胞/孔。稀释待测
10 样本和标准样本, 并施于孔板的细胞中。立即将 VSV 加入孔中, 感染倍数(MOI)为 0.5 pfu/孔。孔板在 37°C 培养 16-18 小时, 用乙醇洗涤。用 Gram Crystal Violet stain 法观察单层存活细胞。将彩色密度和标准样本浓度的关系作成曲线, 定量地作出相对标准样本的细胞病变效应。

为了分析抗体的中和效应, 将 r-hsLDLR 在 37°C 预培养 30 分钟, 其间逐渐增加
15 待测单克隆抗体的腹水浓度。将这些溶液加入 96 微滴定孔板的 WISH 细胞培养液中, 再加入水疱性口炎病毒(VSV)。培养 18 小时后, 用结晶紫染在剩余细胞上确定由 VSV 介导的细胞溶解性。将彩色密度(由 ELISA 读数器确定)和标准样本浓度的关系作成曲线, 半定量地作出相对标准样本的细胞病变效应。

提高 r-hsLDLR 浓度测试单克隆抗体效应。结果发现两种单克隆抗体(12.6 和 50.30)
20 具有中和活性, 如表 1 所示。

在表 1 所示的实验中, 在腹水的稀释浓度为 1: 40 时测试该两种单克隆抗体的抑制效应。在这种稀释浓度下, 单克隆抗体 12.6 的活性比单克隆抗体 50.30 稍高。这可能是由于单克隆抗体本身的性质以及它们在腹水的浓度差异所引起的。

相对单克隆抗体的浓度增加 r-hsLDLR 可克服单克隆抗体的抑制效应。事实上,
25 当 r-hsLDLR 的浓度等于 62.5 U/ml 时, 在待分析的抗体浓度中没有一种单克隆抗体对 r-hsLDLR 的活性有任何影响。

表 1 克隆 12.6 和 50.30 对 r-hsLDLR 抗病毒活性的抑制作用^①

VSV/Mab	LDLR 浓度(U/ml)			
	0	2.5	12.5	62.5
-VSV	1.5	1.2	1.6	1.5
+VSV	(0.25)	1	7(1.7)	1.7
+VSV+克隆 50.30	6(0.4)	0.88	(1.25)	1.62

+VSV+克隆 12.6	5(0.5)	0.77	7(0.7)	1.67
--------------	--------	------	--------	------

① r-hsLDLR 的抗病毒活性抑制 WISH 细胞中由 VSV 介导的细胞溶解性

单克隆抗体的抑制效应是在腹水的浓度为 1: 40 时测定的。存活细胞的数目在表中以光密度(OD)值表示。括号内的数字表示 LDLR 的浓度为 0 和 12.5 U/ml 时所进行的复制。

- 5 提高单克隆抗体 12.6 和 50.30 的浓度测定对 r-hsLDLR 抗病毒活性的抑制作用。在稀释浓度为 1: 40(腹水)时, 单克隆抗体 12.6 抑制 r-hsLDLR 的抗病毒活性大约有 60%, 在稀释浓度为 1: 20,500 时, 大约只有 35%。而单克隆抗体 50.30 抑制 r-hsLDLR 的抗病毒活性大约有 45%, 在稀释浓度为 1: 20,500 时, 大约只有 15%。

10 用两种单克隆抗体得到的剂量应答曲线以及过量 r-hsLDLR 会减弱其抑制作用的观察结果均认为单克隆抗体与 r-hsLDLR 结合才会发挥其作用。

实施例 10 用单克隆抗体抑制丙型肝炎病毒(HCV)的复制

测试 r-hsLDLR 的特异性单克隆抗体在主培养液的人肝细胞中抑制丙型肝炎病毒复制的能力。FT167 细胞培养液取自一个 57 岁男病人, 他出于医治要求作肺叶切除手术(结肠肿瘤的转移, 肺右叶)。

- 15 人肝细胞的主培养液由两步胶原酶融合法制备[Maurel P. “Adv. Drug Del. Rev.” 22: 105-132 页, (1996); Pichard L.等人, “Mol. Pharmacol.”, 41: 1047-1055 页, (1992); Ferrini JB. 等人, “ChemBiol Interactions”, 107: 31-45 页, (1997)]。用锥虫蓝排斥试验法确定平皿接种前细胞的存活率。将含有 400 万个细胞的 3ml 培养液放在 60mm 用胶原预覆盖的塑料盘中。长期无血清培养液由 Williams'E 组成, 按公布的方法进行补
- 20 给[Lanford R.等人, “In Vitro Cell Dev. Biol.”, 25: 174-182 页, (1989)]。随后每 48 小时更新一次培养液。在湿空气和 5%二氧化碳的环境中 37°C 下保持培养液。在这些培养条件下, 人肝细胞不同的表型至少可保持 35 天[Ferrini JB.等人, “Chem-Biol Interactions”, 107: 31-45 页, (1997)], 它们对丙型肝炎病毒感染敏感, 同时又可使病毒基因组进行复制[Fournier C.等人, “J. Gen Virol”, 79: 2367-2374 页, (1998)]。

- 25 丙型肝炎病毒(HCV)阳性血清样本: 建立一个人血清库, 这些人血清均来自由 EIA HCV3.0 和 Chiron RIBA HCV 3.0 SIA 测试其抗 HCV 抗体呈阳性的病人。所有病人没有一个感染了乙型肝炎病毒(HBV)或人免疫缺损病毒(HIV)。在每个血清样本中, 由 Roche 监测器定量 HCV RNA 以及由直线探针检测法(Line Probe assay)确定基因型 [Inno-Lipa HCV II, Innogenetics]。为了避免反复进行冷冻和解冻, 将血清样本分装
- 30 于-80°C 保存。这些实验均采用样本 S42(基因型 1b; 病毒数量: 410,000 个/ml)。

为了进行感染和下一步处理, 在无菌条件下把肝细胞培养液转移到 P3 实验室(严

格限制人感染微生物)。平皿接种三天后,当细胞从分离的损伤中复原时,以 25 μ l 丙型肝炎病毒阳性血清样本(S42)在 3ml 培养液中培养过夜在体外使肝细胞感染。感染后,细胞用 3ml 新鲜培养液洗涤,在正常条件下使长期培养液继续培养。

用三种不同 r-hsLDLR 的单克隆抗体 12.6、28 和 29.8 处理细胞。感染前 30 分钟, 5 将细胞与 2 或 8 μ g/ml 的不同单克隆抗体接触。然后如上所述使细胞感染。

在相似条件下感染调控细胞,但不进行抗病毒处理。在平行实验中,实验条件相似的情况下,用 5000 U/ml 干扰素 α (IFN α)对同一培养液进行处理以作比较(IFN α 显著抑制细胞中丙型肝炎病毒的复制)。所有处理均重复一次。

感染后 5 天,取出培养液,用冻磷酸盐缓冲盐水洗涤 3 次。然后用异硫氰酸胍盐 10 /酸性苯酚提取法从 4 \times 10⁶ 个肝细胞纯化核糖核酸(RNA)[Chomczynske PN.和 Sacci N., "Analyt. Biochem.", 162: 156-159 页, (1987)]。将沉淀的 RNA 溶解在 50 μ l 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理水中,再进行定量。取 1 μ g 细胞的核糖核酸用 strand-specific rTth RT-PCR 检测法分析。

为了防止可能出现的感染, strand-specific rTth RT-PCR 检测法依次在三种不同环 15 境下进行:分别是预 PCR 环境、PCR 环境以及后 PCR 环境。溶解在 10 μ l 焦碳酸二乙酯处理水中的 RNA 以矿物油覆盖,并在 95 $^{\circ}$ C 加热 1 分钟。将温度降至 70 $^{\circ}$ C,加入 10 μ l 预热的 cDNA 反应混合物。然后将温度降至 60 $^{\circ}$ C,退火 2 分钟,在 70 $^{\circ}$ C cDNA 与 rTth DNA 聚合酶(Perkin-Elmer)反应 20 分钟。使温度保持在 70 $^{\circ}$ C,加入 40 μ l 含有 EGTA 的预温缓冲液作为 Mn²⁺螯合剂以抑制 rTth RT 活性。反应试管保持在 70 $^{\circ}$ C, 20 加入 40 μ l 预温的 PCR 混合物。在 Gene Amp[®] PCR 系统 9600(Perkin-Elmer)进行的 PCR 条件包括在 94 $^{\circ}$ C 初次循环 1 分钟,在 94 $^{\circ}$ C 和 15 秒内循环 50 次,在 58 $^{\circ}$ C 循环 30 秒,在 72 $^{\circ}$ C 循环 30 秒,最后还要在 72 $^{\circ}$ C 循环 7 分钟。在正链 HCV RAN 检测法中,反引物 P3 的核苷酸序列是:5'-TGG/ATGCACGGTCTACGAGACCTC-3', (nt: 38-56), [Laskus T.等人, "J. Gen. Virol.", 78: 2747-2750 页, (1997)]。将同一引物的次序倒转, 25 检测负链。用琼脂糖(2%)凝胶电泳法分析十分之一扩增的产物,再用 BET 法染色和在紫外光下摄影。在所有实验中,稀释合成的丙型肝炎病毒(HCV) RNA 正和负链,加入总量为 1 μ g 的肝 RNA 以仿真培养肝细胞分析的条件。这些混合物用作 RT-PCR 检测和分析的正调控。

图 3 显示在 LDLR 单克隆抗体存在下 FT167 培养液中 HCV 负链的制备被完全抑 30 制。由此可见,病毒基因组的复制也被显著抑制。这些结果与 LDLR 可能是 HCV 受体的观点吻合。

实施例 11 LDLR 嵌合抗体的制备

从产生 LDLR 的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞系纯化 mRNA。

利用纯化的 mRNA 作为模板,以寡核苷酸与重链可变区(oligo 1)的外显子 CH1 5'端和轻链可变区(oligo 2)的 Ckh 外显子 CH1 5'端互补合成特异性 cDNA。

这样可得到两种 cDNA,其中一种编码重链可变区(LDLR 特异性),而另一种编码轻链可变区(LDLR 特异性)。将 cDNA 进行克隆和排序。

为构成嵌合重链,只要将克隆人 Ig 重链的可变区换成(用遗传操作)编码小鼠重链可变区(LDLR 特异性)的克隆 DNA 即可。遗传操作包括利用特异性限制酶和小鼠可变区结合从而激活人 Ig 的可变区。以同样方法,可构成嵌合轻链。

构成成两种哺乳动物表达质体,其中一种包括嵌合重链基因,而另一种包括嵌合轻链基因。同时用这两种媒介物感染杂交瘤细胞系(SP6)。

以转染细胞的培养汤作为第二抗体,由 ELISA 法或免疫印迹法测试 LDLR 特异性 Ig 的形成。用 Biacore 测定嵌合抗体对其配体的亲合力。

实施例 12 具有人免疫球蛋白基因座的转基因小鼠(变种小鼠)的制备及 hLDLR 的单克隆抗体的制备

WO98/24893 和 Mendez M.J.等人[“Nature Genetics”, 15: 146-56 页, (1997)]对变种小鼠的制备进行了叙述。

在人酵母人造染色体(YAC)库中筛选选出含有人重链可变区(约 1000 kb)的酵母人造染色体(YAC 的克隆方法是需要插入尺寸大于 100 kb 时所选择的方法)。

DNA 印迹分析法(Southern blot)和脉冲场电泳法(Pulse Field Electrophoresis)的特征在于 YACs。这些 YACs 应该包括在生殖细胞系构作中的 C μ 、C δ 、Dh 和 Vh 区。

利用 YACs 中的重叠序列,以一步一步重组的方法在酵母重组 YACs。在重组之前,3'端 YAC(具有 V 区)与 HPRT 选择标记物结合。用 PFGE 法和 DNA 印迹分析法(在人重链基因座存在下,其生殖细胞系构作从 C 区到 Vh 区)确定重组 YAC 的结构。

用含有完整 γ 2 稳定区、小鼠增强子、新霉素抗性基因的介质对准 YAC 的偏心臂以产生最终含有完整可变区的重链,即 82 个 Vh 基因、6 个 Jh 基因以及三种具有相应调整序列的不同稳定区 C μ 、C δ 、C γ 。这种 YAC 称为 yH2。该结构用于制备异种小鼠。

用与以上所用的相似策略,重建 kappa 基因座,不同之处在于:新霉素选择标记物与含有完整 kappa 基因座的重组 YAC 结合。这种 YAC 称为 yK2。

将含有酵母原生质球的 YAC 与 HPRT 缺失的 E14.TG3B 小鼠胚胎干细胞融合,使 YAC 引入胚胎干细胞。选择 HPRT 阳性细胞。增殖阳性克隆,并用 Southern blots 和 CHEF blot 分析法对阳性克隆进行分析。选择含有完整 yH2 的 YAC。

如 yH2 酵母人造染色体一样，在胚胎干细胞中加入和选择 yK2 的 YAC。

将含有胚胎干细胞的 yH2 显微注射入小鼠 C57BL/6J 的胚细胞。评估所制成的嵌合雄性小鼠的生殖细胞系遗传给下一代的情况。

5 用 DI 小鼠培育 yH2 和 yK2 转基因小鼠(使基因目标/失活的小鼠重链和 kappa 链基因座纯合)。每条 yH2；DI 转基因链均与 yK2；DI 转基因链一起培育以产生异种小鼠链。

用流式细胞仪和 ELISA 法评估异种小鼠 B 细胞发育的重建和抗体的制备。

按实施例 2 的方法使异种小鼠免疫。

按实施例 3 和 4 的方法制备杂交瘤细胞和筛选阳性克隆。

10 杂交瘤细胞克隆 12.6、28、29.8、30 和 50.30 在布达佩斯条约(the Budapest Treaty)下保藏在巴黎的 Collection Nationale de Culture de Microorganismes(CNCM), Institut Pasteur, 保藏编号分别为 I-2390、I-2391、I-2392、I-2393 和 I-2394。

参考文献

1. Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., and Zhang, Q X. (1999). "Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor [In Process Citation]." *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(22), 12766-71.
- 5 2. Beisiegel, U., Schneider, W. J., Goldstein, J. L., Anderson, R. G., and Brown, M. S. (1981). "Monoclonal antibodies to the low density lipoprotein receptor as probes for study of receptor-mediated endocytosis and the genetics of familial hypercholesterolemia." *J Biol Chem*, 256(22), 11923-32.
- 10 3. Bieri, S., Djordjevic, J. T., Daly, N. L., Smith, R., and Kroon, P. A. (1995). "Disulfide bridges of a cysteine-rich repeat of the LDL receptor ligand-binding domain." *Biochemistry*, 34(40), 13059-65.
4. Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1976). "Familial hypercholesterolemia: A genetic defect in the low-density lipoprotein receptor." *N Engl J Med*, 294(25), 1386-90.
- 15 5. Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1986). "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis." *Science*, 232(4746), 34-47.
6. Chomczynski, P. N., And Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Analyt. Biochem.* 162:156-9.
7. Eshhar Z, 1985 "Monoclonal Antibody Strategy and Techniques" in "Hybridoma technology in the bioscience and medicine", Edited by Timothy A. Springer (Plenum Publishing Corporation, 20 1985; Chapter 1).
8. Fischer, D. G., Tal, N., Novick, D., Barak, S., and Rubinstein, M. (1993). "An antiviral soluble form of the LDL receptor induced by interferon". *Science*, 262(5131), 250-3.
9. Fischer, D. G., Novick, D., Cohen, B, Rubinstein, M. (1994). "Isolation and characterization of a soluble form of the LDL receptor, an interferon-induced antiviral protein". *Proc Soc Exp Biol 25 Med* 206(3), 228-32.
10. Ferrini, J. B., Pichard, L., Domergue, J., and Maurel, P. (1997). "Long-term primary cultures of adult human hepatocytes". *Chem-Biol Interactions* 107:31-45.
11. Fournier, C., Sureau, C., Coste, J., Ducos, J., Pageaux, G., Larrey, D., Domergue, J., and Maurel, P. (1998). "In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus". *J. Gen Virol.* 79:2367-74.
- 30 12. Goldstein, J. L., Anderson, R. G., and Brown, M. S. (1979), "Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis." *Nature*, 279(5715), 679-85.
13. Goldstein, J. L., Dana, S. E., Brunschede, G. Y., and Brown, M. S. (1975). "Genetic heterogeneity in familial hypercholesterolemia: evidence for two different mutations affecting 35 functions of low-density lipoprotein receptor." *Proc Natl Acad Sci USA*, 72(3), 1092-6.
14. Lanford R. E., Carey, K. D., Estlack, L. E., Smith, G. C., and Hay, R. V. (1989). "Analysis of plasma protein and lipoprotein synthesis in long-term primary cultures of baboon hepatocytes maintained in serum-free medium" *In Vitro Cell Dev. Biol.* 25:174-82.
15. Laskus T., Radkowski, M. Wang, L. F., Cianciara, J., Vargas, H., and Rakela, J. (1997). 40 "Hepatitis C virus negative strand RNA is not detected in peripheral blood mononuclear cells and viral sequences are identical to those in serum: a case against extrahepatic replication". *J. Gen. Virol.* 78:2747-50.
16. Maurel P. (1996) "The use of adult human hepatocytes in primary culture and other in vitro systems to investigate drug metabolism in man". *Adv. Drug Del. Rev.*, 22:105-132.

-
17. Mendez, M. M., Green, L. L., Corvalan, J. R. F., Jia X-C., Maynard-Currie, E. E., Yang, X-D., Gallo, M. L., Louie, D. M., Lee, D. V., Erickson, K. L., Luna, J., Roy, C. M-N., Abderrahim, H., Kirshenbaum, F., Noguchi, M., Smith, D. M., Fukushima, A., Hales, J. F., Finer, M. H., Davis, C. G., Zsebo, K. M., and Jakobovits, A. (1997). "Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice". *Nature Genetics*, 5 15, 146-56.
18. Pichard, L., Fabre, I., Daujat, M., Domergue, J., Joyeux, H., and Maurel, P. (1992). "Effect of corticosteroids on the expression of cytochromes P450 and on cyclosporin a oxidase activity in primary cultures of human hepatocytes" *Mol. Pharmacol.* 41:1047-55.
- 10 19. Riachmann, L., Clark, M., Waldmann, H., and Winter, G. (1988). "Reshaping human antibodies for therapy." *Nature*, 332, 323-37.
20. Sudhof, T. C., Goldstein, J. L., Brown, M. S., and Russell, D. W. (1985). "The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins." *Science*, 228(4701), 815-22.
- 15 21. Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Isolation of Chinese Hamster Cell Mutants Deficient in Dihydrofolate Reductase Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220.

专利名称(译)	人低密度脂蛋白受体的单克隆抗体及其制备和用途		
公开(公告)号	CN1418225A	公开(公告)日	2003-05-14
申请号	CN01806574.0	申请日	2001-03-08
[标]申请(专利权)人(译)	应用研究系统ARS股份公司		
申请(专利权)人(译)	应用研究系统ARS股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	应用研究系统ARS股份公司		
[标]发明人	N约那 D休萨 I贝尔泽 M德雷诺 F安东尼蒂 M斯莫拉斯基		
发明人	N·约那 D·休萨 I·贝尔泽 M·德雷诺 F·安东尼蒂 M·斯莫拉斯基		
IPC分类号	G01N33/53 C07K C07K16/28 C12N C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 G01N G01N33/577 G01N33/68 C12N5/20		
CPC分类号	Y10S436/82 C07K16/28 A61K2039/505		
代理人(译)	余颖		
优先权	135025 2000-03-13 IL 139217 2000-10-23 IL		
其他公开文献	CN1418225B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供低密度脂蛋白受体(LDLR)的单克隆抗体，其用于纯化和识别低密度脂蛋白(LDL)以及治疗诸如丙型肝炎感染等疾病。

表1 克隆 12.6 和 50.30 对 r-hsLDLR 抗病毒活性的抑制作用^①

VSV/Mab	LDLR 浓度(U/ml)			
	0	2.5	12.5	62.5
-VSV	1.5	1.2	1.6	1.5
+VSV	(0.25)	1	7(1.7)	1.7
+VSV+克隆 50.30	6(0.4)	0.88	(1.25)	1.62