



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102159591 A

(43) 申请公布日 2011.08.17

-
- (21) 申请号 200980133001.0 中村靖
- (22) 申请日 2009.09.03 (74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
- (30) 优先权数据 代理人 程金山
2008-228370 2008.09.05 JP
2008-272642 2008.10.23 JP
2008-286521 2008.11.07 JP
- (85) PCT申请进入国家阶段日 (51) Int. Cl.
2011.02.23 *C07K 16/42* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
- (86) PCT申请的申请数据
PCT/JP2009/004350 2009.09.03
- (87) PCT申请的公布数据
W02010/026758 JA 2010.03.11
- (83) 生物保藏信息
- (71) 申请人 积水医疗株式会社
地址 日本国东京都
- (72) 发明人 高桥由纪 清水知 高桥弘至 权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 3 页
按照条约第19条修改的权利要求书 2 页
-

(54) 发明名称

单克隆抗体和使用所述单克隆抗体的免疫测定法

(57) 摘要

本发明的一个目的是提供一种抗-人 IgM 单克隆抗体和使用所述单克隆抗体的免疫测定法, 所述抗-人 IgM 单克隆抗体能够特异性与人 IgM 反应, 并且诱导基于与处于溶液中的人 IgM 的抗原-抗体反应的免疫凝集。本发明的另一个目的是提供抑制由人 IgM 引起的而不能通过常规方法防止的非特异性反应的试剂, 和提供抑制由人 IgM 引起的非特异性反应的免疫测定法。通过基于在溶液中与人 IgM 的反应性的评估而选择与人 IgM 反应的单克隆抗体, 已经获得了自身能够凝集人 IgM 和进行实际的免疫凝集测定法的新型单克隆抗体, 因此实现了上述目的。

1. 抗-人 IgM 单克隆抗体,其与人 IgM 特异性反应,并且能够诱导基于与处于溶液中的人 IgM 的抗原-抗体反应的免疫凝集。

2. 根据权利要求 1 所述的抗-人 IgM 单克隆抗体,其通过生产抗-人 IgM 单克隆抗体的方法获得,所述方法包括下述步骤:

步骤 1) 通过使用人 IgM 作为抗原建立产生抗-人 IgM 抗体的杂交瘤的步骤;

步骤 2) 使得通过步骤 1 中获得的杂交瘤产生的抗体与处于溶液中的人 IgM 接触,并且选择产生能够诱导基于与处于所述溶液中的人 IgM 的抗原-抗体反应的免疫凝集的抗体的杂交瘤的步骤;和

步骤 3) 获得通过步骤 2 所选择的杂交瘤产生的抗体的步骤。

3. 选自下述 (a) 或 (b) 的抗体:

(a) 由 FERM BP-11134 杂交瘤产生的单克隆抗体;

(b) 根据权利要求 1 所述的抗体,其表现出与根据上述 (a) 的抗体的交叉反应性。

4. 来源于根据权利要求 1-3 任一项所述的抗-人 IgM 单克隆抗体的功能片段。

5. 用于确定样品中人 IgM 的量的免疫凝集测定法,其包括使用根据权利要求 1-3 任一项所述的单克隆抗体和 / 或根据权利要求 4 所述的来源于所述单克隆抗体的功能片段。

6. 用于确定样品中人 IgM 的量的免疫凝集测定试剂和免疫凝集测定试剂盒,其包括根据权利要求 1-3 任一项所述的单克隆抗体和 / 或根据权利要求 4 所述的来源于所述单克隆抗体的功能片段。

7. 生产根据权利要求 1 或 2 所述的单克隆抗体的杂交瘤。

8. FERM BP-11134 杂交瘤。

9. 生产抗-人 IgM 单克隆抗体的方法,其包括下述步骤:

步骤 1) 通过使用人 IgM 作为抗原建立产生抗-人 IgM 抗体的杂交瘤的步骤;

步骤 2) 使得通过步骤 1 中获得的杂交瘤产生的抗体与处于溶液中的人 IgM 接触,并且选择产生能够诱导基于与处于所述溶液中的人 IgM 的抗原-抗体反应的免疫凝集的抗体的杂交瘤的步骤;和

步骤 3) 获得通过步骤 2 所选择的杂交瘤产生的抗体的步骤。

10. 用于抑制由人 IgM 引起的非特异性反应的试剂,其包括根据权利要求 1-3 任一项所述的单克隆抗体和 / 或根据权利要求 4 所述的来源于所述单克隆抗体的功能片段。

11. 用于基于分析物和测试抗体或测试抗原之间的抗原-抗体反应来确定样品中分析物的量的免疫测定法,其中通过添加用于抑制由人 IgM 引起的非特异性反应的试剂而抑制由人 IgM 引起的不包括所述抗原-抗体反应的非特异性反应,所述试剂包括根据权利要求 1-3 任一项所述的单克隆抗体和 / 或根据权利要求 4 所述的来源于所述单克隆抗体的功能片段。

12. 根据权利要求 11 所述的免疫测定法,其中所述测试抗体或测试抗原被支持在不溶载体上。

13. 根据权利要求 12 所述的免疫测定法,其中所述不溶载体包括胶乳、胶体金属或硅石。

14. 免疫测定试剂和免疫测定试剂盒,其包括:

用于抑制由人 IgM 引起的非特异性反应的试剂,其包括根据权利要求 1-3 任一项所述

的单克隆抗体和 / 或根据权利要求 4 所述的来源于所述单克隆抗体的功能片段 ; 和
用于确定样品中分析物的量的测试抗体或测试抗原。

15. 根据权利要求 14 所述的免疫测定试剂和免疫测定试剂盒, 其中所述测试抗体或测试抗原被支持在不溶载体上。

16. 根据权利要求 15 所述的免疫测定试剂和免疫测定试剂盒, 其中所述不溶载体包括胶乳、胶体金属或硅石。

单克隆抗体和使用所述单克隆抗体的免疫测定法

发明领域

[0001] 本发明涉及一种单克隆抗体、和来源于所述单克隆抗体的功能片段,以及使用所述单克隆抗体或功能片段的免疫测定法、测定试剂和测定试剂盒,所述单克隆抗体能够特异性与人免疫球蛋白 M(IgM) 反应并且诱导基于与处于溶液中的人免疫球蛋白 M 的抗原-抗体反应的凝集。本发明还涉及生产所述单克隆抗体的杂交瘤。

[0002] 此外,本发明涉及用于抑制非特异性反应的试剂和使用所述试剂的免疫测定法,并且更具体地,涉及用于抑制由人 IgM 引起的非特异性反应的试剂和使用所述试剂的免疫测定法。

[0003] 发明背景

[0004] 在诊断领域中广泛应用的测定法的实例是通过使用预先针对分析物生成的抗体检测在测试样品中存在的分析物(待检测的物质)的免疫测定法。具体地,免疫凝集测定法是一种基于通过抗体连接分析物所形成的格子样免疫复合物的凝集程度而定性或定量测量样品中的分析物的方法。由于免疫凝集测定法适于光学检测并且可以容易自动化,其广泛应用于检测各种临床测试项目。

[0005] 在最早期免疫反应阶段产生的人 IgM 以约 50-200mg/dL(500-2000 μ g/mL) 存在于血浆中,并且代表一种疾病标记,该疾病标记可能潜在地指示多种疾病,如其水平低于正常水平时指示多发性骨髓瘤(multiple myeloma)和蛋白丢失性肠病(protein-losing enteropathy),或当其水平高于正常水平时指示胶原蛋白疾病和巨球蛋白血症(macroglobulinemia)。

[0006] 基于所述免疫凝集测定法原理并且意欲用于人 IgM 的多种诊断产品还已经投入了实际应用中,但是在这类产品中所用的抗体目前还是多克隆的。

[0007] 多克隆抗体是具有多样反应性的抗体的集合,并且结合分析物分子上的多个表位。因此,多克隆抗体具有强凝集特性,并且最适用于在分子内不具有多个拷贝的同一表位的分析物的免疫凝集测定法。然而,结合多个表位的多克隆抗体具有低的特异性。这在人 IgM 的实例中得到实际的示例。由于在体内存在五种结构相似的免疫球蛋白(包括免疫球蛋白 G),IgM-特异性多克隆抗体的制备需要去除与其它免疫球蛋白交叉反应的抗体级分的步骤,这是极端繁琐和费力的。

[0008] 另一方面,单克隆抗体由单一抗体构成,并且由于其结合特异性的表位而具有高特异性,单克隆抗体容易制备并且一致地进行。此外,由于近年来通过遗传工程方式对单克隆抗体的修饰或改变已变得更容易,单克隆抗体不但对于诊断而且在治疗领域中变得日益重要起来,并且其应用范围进一步扩大。

[0009] 原则上,单克隆抗体可以用在用于具有多拷贝同一表位的分析物的免疫凝集测定法中。然而,据信抗-IgM 单克隆抗体不能有效诱导与免疫球蛋白 M 的凝集,所述免疫球蛋白 M 在其分子内具有 10 个拷贝的同一表位,并且单克隆抗体目前为止尚未用在免疫凝集测定法中。如图 1 所示,血浆 IgM 具有星形构型,其中 5 个 Y 型的结构单位以其尾在中央并且头在外围方式而排列。Y 型是免疫球蛋白的结构单位,并且公知的是其铰链区是柔性的。此

外,如在非专利文献 1 的电子显微镜照片中所示,5 个 Y 型结构单位可以呈现:(b) 扁平的星形构象,其中 Y 型的尾在中央,头在外围,或(c) 以“蟹型”描述的构象,其中 Y 型的头指向锚定尾部的基底的相同方向,这证实锚定 Y 型的尾的区域也是柔性的。

[0010] 由于锚定 IgM 分子内的每个亚基的区域是柔性的,并且该分子的三维结构如上文所解释那样易于变化,抗 -IgM 单克隆抗体将不能通过结合两个 IgM 分子而形成分子间连接,相反主要通过如图 2 所示结合单一 IgM 分子上两个位置的表位而形成所谓的分子内连接。因此,已经相信抗 -IgM 单克隆抗体不能有效诱导与人 IgM 的免疫凝集,并且勉为其难地使用结合多个表位的多克隆抗体。尽管存在一些使用单克隆抗体的实例,其仅代表其中组合使用多种单克隆抗体以产生多克隆抗体效应的案例(例如,专利文献 4,实施例 3)。因此,具有独立凝集人 IgM 特性的单克隆抗体尚是未知的。此外,基于在将人 IgM 或抗 -人 IgM 单克隆抗体固定在固相上的条件下评估的反应性强度,先前已经进行了生产抗 -人 IgM 单克隆抗体的杂交瘤的产生的筛选步骤;即,在溶液中它们之间的反应性未被用作指标(专利文献 1-3)。

[0011] 近年来的技术进步已经能够产生针对不同物质的抗体,并且因此基于免疫测定法的诊断试剂应用的数目持续增加。因此,所述试剂中需要的性能水平变得比以前更高,并且最近产生了对严格防止非特异性反应的需求。

[0012] 非特异性反应是指这样的现象,其中测试样品中所包含的因素促进不基于特异性反应的键合,或者抑制特异性免疫反应,其可能引起错误的测定结果。已知引起非特异性反应的因素包括嗜异性抗体和类风湿因子(RF)。

[0013] 嗜异性抗体是关于表现出针对动物来源的抗体的反应性的人抗体的总称,所述人抗体是免疫测定法的主要成分。典型的嗜异性抗体实例是 HAMA(人抗 -鼠 -免疫球蛋白抗体)。嗜异性抗体可以作为不知不觉诱导的针对抗原的致敏性的结果,如通过食用、通过与动物接触、并且通过施用生物药剂的结果而产生。然而,未致敏的抗体也可能表现出嗜异性抗体的特性,并且因此关于嗜异性抗体的来源需要理解更多。另一方面,类风湿因子出现在类风湿性关节炎患者中,并且也已经确定了其结合位点。因此,类风湿因子理解为与嗜异性抗体不同的概念,但是它们共有表现出针对动物来源的抗体的反应性的相同特性,并且均已知它们的身份为人 IgG 或 IgM,如非专利文献 2 中所述。

[0014] 至于关于由嗜异性抗体引起的非特异性反应的测量,非专利文献 3 和 4 中所述的包含抗 -人 IgM 单克隆抗体的嗜异性阻断剂 HBR 早已是可商购获得的,并且已经用在多种利用免疫测定法原理的临床检测中。

[0015] 关于抑制非特异性反应的其它先前考虑的测量包括专利文献 5 的测量,其包括添加针对人 IgM 天然抗体的多克隆抗体,所述多克隆抗体与测定中所用的抗体在相同的动物物种中制备,和包括专利文献 6 的测量,其包括添加针对类风湿因子的结合位点的抗体,所述抗体来源于多种动物的任一种。然而,多克隆抗体的应用在长时间阶段中需要大量的抗原来免疫动物。此外,前者可能仅抑制由天然抗体引起的非特异性反应,并且后者仅具有抑制非特异性反应的有限效应,原因在于其中所识别的类风湿因子的结合位点首先具有可变的性质。事实上,由于利用免疫测定法的检测和检测项目的数目的增加,用于抑制非特异性反应的常规测量不能有效地用于某些样品变得明显起来。

[0016] 已有技术文献

- [0017] 专利文献
- [0018] 专利文献 1 :日本专利申请公布 S60-42400
- [0019] 专利文献 2 :日本专利申请公布 S63-58260
- [0020] 专利文献 3 :日本专利申请公布 H06-504424
- [0021] 专利文献 4 :日本专利申请公布 S60-237363
- [0022] 专利文献 5 :日本专利 4065600
- [0023] 专利文献 6 :日本专利申请公布 H07-012818
- [0024] 非专利文献
- [0025] 非专利文献 1 :Roitt, Essential Immunology (基本免疫学), 初始语言第 3 版, 图 2. 16.
- [0026] 非专利文献 2 :Rinsho Kagaku, 卷 23 附录 175a-1-175a-10 (1994).
- [0027] 非专利文献 3 :Advertisement material for the heterophilic blocking reagent HBR (嗜异性阻断剂 HBR 的广告资料) (Nagase&Co. Ltd., 1993)
- [0028] 非专利文献 4 :CLIN. CHEM. 45/7, 942-956 (1999)
- [0029] 发明的公开内容
- [0030] 本发明要解决的问题
- [0031] 本发明的一个目的是提供一种抗 - 人 IgM 单克隆抗体、所述单克隆抗体的功能片段, 以及使用所述单克隆抗体或片段的免疫测定法、测定试剂和测定试剂盒, 所述抗 - 人 IgM 单克隆抗体与人 IgM 特异性反应, 并且能够诱导基于在溶液中与 人 IgM 的抗原 - 抗体反应的凝集, 并且进一步提供生产所述单克隆抗体的杂交瘤。
- [0032] 本发明的另一个目的是提供用于抑制由 人 IgM 引起的非特异性反应的试剂和使用所述试剂的免疫测定法。
- [0033] 解决问题的方式
- [0034] 本发明人已经进行了广泛的研究来达到上述目的, 并且通过在与人 IgM 反应的单克隆抗体的筛选中利用溶液中反应性作为评估指标, 本发明人已经能够发现这样的新型单克隆抗体, 所述单克隆抗体自身 (即, 通过作为唯一的单克隆抗体) 能够提供 人 IgM 分子之间的连接从而引起凝集, 并且能够进行实际的免疫凝集测定法。这已经导致本发明的完成。这样获得的单克隆抗体不必在将抗原固定在固相上的常规评估方法中表现出高反应性。
- [0035] 本发明人还已经做出了令人吃惊的发现, 即甚至那些不能通过常规措施阻断的非特异性反应可以被自身能够凝集 人 IgM 的所述抗 - 人 IgM 单克隆抗体强烈抑制。因此, 本发明的另一个目的是提供用于抑制非特异性反应的试剂, 其包括自身能够凝集 人 IgM 的抗 - 人 IgM 单克隆抗体。
- [0036] 本发明的另一个目的涉及免疫测定法、测定试剂和测定试剂盒, 其特征在于, 通过添加自身能够凝集 人 IgM 的抗 - 人 IgM 单克隆抗体获得对非特异性反应的抑制和基于抗原 - 抗体反应的免疫测定法的测量精确性。
- [0037] 具体地, 本发明包括下述:
- [0038] (1) 抗 - 人 IgM 单克隆抗体, 其与 人 IgM 特异性反应, 并且能够形成基于与处于溶液中的人 IgM 的抗原 - 抗体反应的免疫聚集物。
- [0039] (2) 根据上述 (1) 所述的抗 - 人 IgM 单克隆抗体, 其通过生产抗 - 人 IgM 单克隆抗

体的方法获得,所述方法包括下述步骤:

[0040] 步骤 1) 通过使用人 IgM 作为抗原获得产生抗 - 人 IgM 抗体的杂交瘤的步骤;

[0041] 步骤 2) 使得通过步骤 1 中获得的杂交瘤产生的抗体与溶液中的人 IgM 接触,并且选择产生能够形成基于与处于所述溶液中的人 IgM 的抗原 - 抗体反应的免疫聚集物的抗体的杂交瘤的步骤;

[0042] 步骤 3) 获得通过步骤 2 所选择的杂交瘤产生的抗体的步骤。

[0043] (3) 选自下述 (a) 或 (b) 的抗体:

[0044] (a) 由 FERM BP-11134 杂交瘤产生的单克隆抗体;

[0045] (b) 根据 (1) 所述的抗体,其表现出与根据上述 (a) 的抗体的交叉反应性。

[0046] (4) 来源于根据上述 (1)-(3) 任一项所述的抗 - 人 IgM 单克隆抗体的功能片段。

[0047] (5) 用于确定样品中人 IgM 的量的免疫凝集测定法,其包括使用根据上述 (1)-(3) 任一项所述的单克隆抗体和 / 或根据上述 (4) 所述的来源于所述单克隆抗体的功能片段。

[0048] (6) 用于确定样品中人 IgM 的量的免疫凝集测定试剂和免疫凝集测定试剂盒,其包括根据上述 (1)-(3) 任一项所述的单克隆抗体和 / 或根据上述 (4) 所述的来源于所述单克隆抗体的功能片段。

[0049] (7) 生产根据上述 (1) 或 (2) 所述的单克隆抗体的杂交瘤。

[0050] (8) FERM BP-11134 杂交瘤。

[0051] (9) 生产抗 - 人 IgM 单克隆抗体的方法,其包括下述步骤:

[0052] 步骤 1) 通过使用人 IgM 作为抗原获得产生抗 - 人 IgM 抗体的杂交瘤的步骤;

[0053] 步骤 2) 使得通过步骤 1 中获得的杂交瘤产生的抗体与溶液中的人 IgM 接触,并且选择产生能够形成基于在所述溶液中与人 IgM 的抗原 - 抗体反应的免疫聚集物的抗体的杂交瘤的步骤;

[0054] 步骤 3) 获得通过步骤 2 所选择的杂交瘤产生的抗体的步骤。

[0055] (10) 用于抑制由人 IgM 引起的非特异性反应的试剂,其包括根据上述 (1)-(3) 任一项所述的单克隆抗体和 / 或根据上述 (4) 所述的来源于所述单克隆抗体的功能片段。

[0056] (11) 用于基于分析物和测试抗体或测试抗原之间的抗原 - 抗体反应来确定样品中分析物的量的免疫测定法,其中通过添加用于抑制由人 IgM 引起的非特异性反应的试剂而抑制由人 IgM 引起的不包括所述抗原 - 抗体反应的非特异性反应,所述试剂包括根据上述 (1)-(3) 任一项所述的单克隆抗体和 / 或根据上述 (4) 所述的来源于所述单克隆抗体的功能片段。

[0057] (12) 根据上述 (11) 所述的免疫测定法,其中所述测试抗体或测试抗原被支持在不溶载体上。

[0058] (13) 根据上述 (12) 所述的免疫测定法,其中所述不溶载体包括胶乳、胶体金属或硅石。

[0059] (14) 免疫测定试剂和免疫测定试剂盒,其包括:

[0060] 用于抑制由人 IgM 引起的非特异性反应的试剂,其包括根据上述 (1)-(3) 任一项所述的单克隆抗体和 / 或根据上述 (4) 所述的来源于所述单克隆抗体的功能片段;和

[0061] 用于确定样品中分析物的量的测试抗体或测试抗原。

[0062] (15) 根据上述 (14) 所述的免疫测定试剂和免疫测定试剂盒,其中所述测试抗体

或测试抗原被支持在不溶载体上。

[0063] (16) 根据上述 (15) 所述的免疫测定试剂和免疫测定试剂盒,其中所述不溶载体包括胶乳、胶体金属或硅石。

[0064] 发明效果

[0065] 本发明的单克隆抗体已经使得提供用于特异性检测人 IgM 的方法、以及提供用于测定人 IgM 的免疫凝集的高质量和廉价的试剂和试剂盒成为可能。

[0066] 此外,由于本发明的筛选单克隆抗体的方法评估溶液中的凝集程度作为选择抗体的指标,所述方法有效并且能够以高精度度选择目的单克隆抗体。

[0067] 此外,由于本发明用于抑制非特异性反应的试剂不与表现出分子内连接的 IgM 形成 1 : 1 的复合物,所述试剂可以有效地中和 IgM 的干扰。因此,使用本发明的试剂的免疫测定法、免疫测定试剂和免疫测定试剂盒不仅可以抑制由人 IgM 引起的普通类型的非特异性反应,而且可以抑制常规措施不能防止的那些。因此,本发明能够比常规测量方法更准确地测量宽范围的测试项目和测试样品,并且可以适用于在日益增多的临床检测中所用的免疫测定法。

[0068] 附图简述

[0069] [图 1] 人 IgM 的结构建模。

[0070] [图 2] 人 IgM 和常规抗 - 人 IgM 单克隆抗体的结合模式。

[0071] [图 3] 使用本发明的抗 - 人 IgM 单克隆抗体的免疫凝集测量检测的结果 (实施例 1)。

[0072] [图 4] 本发明的用于抑制非特异性反应的试剂和用于阻断非特异性反应的对照试剂对使用用于 PSA 检测的胶乳试剂的正常样本测定的影响。

[0073] [图 5] 本发明的试剂和用于阻断非特异性反应的对照试剂对使用用于 PSA 检测的胶乳试剂的非特异性反应样本测定的阻断效应。

[0074] [图 6] 本发明的试剂和用于阻断非特异性反应的对照试剂对使用用于胰岛素检测的试剂的非特异性反应样本的测量的阻断效应。

[0075] 实施本发明的最佳方式

[0076] 抗 - 人 IgM 单克隆抗体

[0077] 本发明的抗 - 人 IgM 单克隆抗体不受任何具体限制的束缚,只要其具有下列特性:与人 IgM 特异性反应,在溶液中在人 IgM 分子之间形成分子间连接,和能够作为单一的单克隆抗体进行免疫凝集测定法。“与人 IgM 特异性反应”用于本文意指所述单克隆抗体与人 IgM 但不与其他人免疫球蛋白进行抗原 - 抗体反应。从针对 IgM 的单克隆抗体是否能够引起免疫凝集的观点来看,先前没有进行关于针对 IgM 的单克隆抗体的探寻,并且因此本发明的自身可以凝集人 IgM 的抗 - 人 IgM 单克隆抗体是新颖的。

[0078] 此外,常规抗 - IgM 单克隆抗体不提供在两个免疫球蛋白分子之间的连接,并且仅能够在单个免疫球蛋白分子内形成分子内连接。然而,本发明的自身可以凝集人 IgM 的单克隆抗体可以在人 IgM 分子之间形成分子间连接,并且因此其能够强烈抑制由人 IgM 引起的非特异性反应,并且如下文所述,其可以适合用作用于抑制非特异性反应的试剂。

[0079] 本发明的所述抗 - 人 IgM 单克隆抗体的具体实例包括由 FERM BP-11134 杂交瘤生产的单克隆抗体。此外,表现出与 FERM BP-11134 杂交瘤产生的单克隆抗体的交叉反应性

的抗体也包括在本发明的抗体范围内。表现出与 FERM BP-11134 杂交瘤产生的单克隆抗体的交叉反应性的抗体包括可以特异性识别与所述单克隆抗体相同的表位（抗原决定簇）的氨基酸序列。

[0080] 功能片段

[0081] 在本发明中，可以使用包含来源于所述单克隆抗体的 Fab 区域的任何功能片段，而不管所述 Fab 区域是通过对所述单克隆抗体进行酶降解、通过遗传加工、或通过其他方式获得的。因此，在本发明的功能片段中，术语“功能”特别意指所述片段具有与人 IgM 结合的能力。

[0082] 检测样品

[0083] 用于使用根据本发明所述的抗 - 人 IgM 单克隆抗体或其功能片段的针对人 IgM 的免疫凝集测定法的检测样品可以是任何生物样品，诸如体液，例如，血液、血清、血浆和尿。

[0084] 测定法

[0085] 根据本发明所述的用于人 IgM 的免疫凝集测定法不受任何具体限制的束缚，只要其通过以某种方式将本发明的抗 - 人 IgM 单克隆抗体和检测样品混合并且因此诱导免疫凝集而检测人 IgM。为了进一步促进免疫凝集，识别与所述单克隆抗体的表位不同的表位的另一种抗 - 人 IgM 单克隆抗体也可以一起使用，并且关于该额外的单克隆抗体的特性没有特别的限制。

[0086] 免疫凝集测定试剂和测定试剂盒

[0087] 用于使用本发明的抗 - 人 IgM 单克隆抗体或其功能片段的关于人 IgM 的免疫凝集测定法的试剂和试剂盒可以包含缓冲样品的离子强度、等渗强度等的成分，或增强免疫凝集的成分。缓冲样品的离子强度、等渗强度等的成分的实例包括乙酸、柠檬酸、磷酸、Tris、甘氨酸、硼酸、碳酸、和 Good' s 缓冲液、以及钠盐、钾盐、和钙盐。增强免疫凝集的成分的实例包括聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、和磷脂聚合物。

[0088] 用于使用本发明的抗 - 人 IgM 单克隆抗体或其功能片段的关于人 IgM 的免疫凝集测定法的试剂和试剂盒与光学测量相容，所述光学测量在分光光度计、在利用分光光度测定原理的日立公司 (Hitachi corporation) 的自动分析仪、在常规自动分析仪如东芝公司 (Toshiba corporation) 的 TBA 系列、JEOL 公司的 BM 系列、奥林巴斯公司 (Olympus corporation) 的 AU 系列、和 Sekisui 医学公司 (Sekisui Medical corporation) 的 CP2000、分析近红外波长范围的装置（例如，Mitsubishi Kagaku Iatron 公司的 LPIA）、测量散射光强度的装置（例如，Dade Behring 公司的 BN 系统）等上进行。

[0089] 对于制备本发明的抗 - 人 IgM 单克隆抗体所用的技术没有特别限制，但是通常其包括产生杂交瘤。在选择本发明的抗 - 人 IgM 单克隆抗体的评估过程中，基于抗体在溶液中诱导的人 IgM 的凝集程度来筛选所述抗体。因此，这样获得的抗 - 人 IgM 单克隆抗体将具有与人 IgM 特异性反应并且自身凝集人 IgM 的特性。

[0090] 可以允许任何结构改变或修饰来制备本发明的抗 - 人 IgM 单克隆抗体，只要所述改变或修饰没有极大消弱单克隆抗体与人 IgM 的反应性的特征。

[0091] 杂交瘤

[0092] 用于生产本发明的抗 - 人 IgM 单克隆抗体的杂交瘤可以是能够产生抗 - 人 IgM 单克隆抗体的任何杂交瘤，所述抗 - 人 IgM 单克隆抗体可以与人 IgM 特异性反应并且基于溶

液中的抗原-抗体反应诱导与人 IgM 的免疫凝集,并且所述杂交瘤可以基于由其产生的单克隆抗体高度能够在溶液中诱导与人 IgM 的免疫凝集进行选择。因此,本发明的抗-人 IgM 单克隆抗体可以通过下述步骤 1)-3) 进行生产:

[0093] 步骤 1) 通过使用人 IgM 作为抗原建立产生抗-人 IgM 抗体的杂交瘤的步骤;

[0094] 步骤 2) 使得通过步骤 1 中获得的杂交瘤产生的抗体与溶液中的人 IgM 接触,并且选择产生能够形成基于与处于所述溶液中的人 IgM 的抗原-抗体反应的免疫聚集物的抗体的杂交瘤的步骤;

[0095] 步骤 3) 获得通过步骤 2 所选择的杂交瘤产生的抗体的步骤。

[0096] 步骤 2 所选择的杂交瘤的实例包括 FERM BP-11134。

[0097] 更具体地,在上述生产过程中的杂交瘤筛选可以通过允许所纯化的抗体与溶液中的人 IgM 反应并且基于相应抗体在溶液中诱导免疫凝集的能力的差异来选择杂交瘤而进行。为了选择更有效地产生本发明的抗体的杂交瘤,可以在上述选择过程之前,例如,通过对固相上的人 IgM 使用杂交瘤培养物上清而不是纯化的抗体,如在 ELISA 等中,进行产生抗-人 IgM 抗体的杂交瘤的预选。

[0098] 通过上述选择过程获得的抗体将具有与人 IgM 特异性反应并且自身能够在溶液中在人 IgM 分子之间形成分子间连接且因此形成免疫聚集物的特性。

[0099] 应用

[0100] 本发明的抗-人 IgM 单克隆抗体可以应用于任何目的,其利用其与人 IgM 特异性反应并且自身凝集人 IgM 的特性。优选的实例包括在上述关于人 IgM 的免疫凝集测定法中的应用以及用作抑制由人 IgM 引起的非特异性反应的试剂。本发明的抗-人 IgM 单克隆抗体可以适合用作抑制由人 IgM 引起的非特异性反应的试剂,因为其不引起与人 IgM 分子的 1:1 分子内连接,并且因此其可以有效地中和人 IgM。尚不清楚本发明的抗体通过什么机制能够抑制由 IgM 引起的甚至不能由常规抑制非特异性反应的试剂所抑制的那些非特异性反应,但是相信其在溶液中凝集人 IgM 的能力与所述机制高度相关。例如,可能的是,可以在溶液中凝集人 IgM 的抗-人 IgM 单克隆抗体识别在人 IgM 分子中普遍存在的表位,而不管其是否是嗜异性抗体类型、类风湿因子 (RF) 类型、或其他。

[0101] 因此,在本发明的情形中,由人 IgM 引起的非特异性反应是指由人 IgM 引起的所有非特异性反应,包括其作用机制已知的那些,如以嗜异性抗体或类风湿因子 (RF) 形式的人 IgM 与动物来源的抗体反应,以及其作用机制尚是未知的那些。因此,本发明抑制非特异性反应的试剂意欲用于其中引起因子为人 IgM 的所有非特异性反应。

[0102] 本发明的抗-人 IgM 单克隆抗体作为抑制非特异性反应的试剂的应用可以在溶液中和在固相上有效的。例如,本发明的试剂在溶液中抑制非特异性反应的应用可以是这样的情形,其中将所述试剂添加到样品溶液中,并且允许所述试剂与溶液中的人 IgM 反应以引起人 IgM 的凝集。例如,所述试剂在固相上的应用可以是这样的情形,其中将包含所述试剂的溶液添加到用于免疫层析的样品垫上,并且干燥和预先固定在其上,且将样品溶液应用到且流过所述样品垫,其中所述样品溶液中包含的人 IgM 将被已经固定的所述试剂捕获。

[0103] 本发明的抑制非特异性反应的试剂可以用于免疫测定法,以基于在分析物与测试抗体或测试抗原之间的抗原-抗体反应确定样品中分析物的量,并且通过这一应用,由人

IgM 引起的不包含所述抗原 - 抗体反应的非特异性反应可以被有效抑制, 并且因此可以获得精确的免疫学测量。

[0104] 用于本发明的免疫测定法、测试试剂、和测定试剂盒的检测样品可以是其中可能发生由人 IgM 引起的非特异性反应的各种人生物学样品中的任一种, 所述本发明的免疫测定法、测试试剂、和测定试剂盒的特征在于, 添加自身能够凝集人 IgM 的抗 - 人 IgM 单克隆抗体从而抑制非特异性反应和获得精确的测量。检测样品的实例包括体液, 诸如血液、血清、血浆和尿。此外, 所述分析物可以是任何分子, 只要其能够进行抗原 - 抗体反应, 并且分析物的实例包括 CRP (C- 反应性蛋白), Lp(a), MMP3 (基质金属蛋白酶 3), IV 型胶原蛋白, PSA (前列腺特异性抗原), BNP (脑钠肽 (brain natriuretic peptide)), 胰岛素, 微量白蛋白 (microalbumin), 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C (cystatin C), 抗磷脂抗体, 抗 - 苍白密螺旋体抗体 (anti-Treponema pallidum antibody), FDP (血纤蛋白 / 凝血因子 I 降解产物), D- 二聚体, SF (可溶性血纤蛋白), TAT (凝血酶 - 抗凝血酶 III 复合物), 因子 XIII, 和胃蛋白酶原 I 与 II, 以及半抗原如下述药物: 苯妥英 (phenytoin), 苯巴比妥 (phenobarbital), 卡马西平 (carbamazepine), 丙戊酸盐 (valproate), 和茶碱 (theophylline)。然而, 本发明的原理不允许在这些分析物实例中包含人 IgM。

[0105] 本发明的抗 - 人 IgM 单克隆抗体能够自身凝集人 IgM, 用作抑制由 IgM 引起的非特异性反应的试剂, 其可以添加到溶液中或固相中。对于所添加的所述试剂的浓度没有特别的限制, 只要其有效产生抑制非特异性反应的作用且干扰免疫测定法的主要反应, 但是所述试剂优选以 0.01-10mg/mL 的浓度范围, 更优选以 0.05-1mg/mL 的浓度范围应用。在实际的测定中, 如果在使测试抗体或测试抗原与检测样品接触的步骤之前, 将本发明的抗 - 人 IgM 单克隆抗体与检测样品接触, 可以更有效地抑制非特异性反应。抑制非特异性反应的其他措施或其他抑制剂成分也可以组合使用。

[0106] 在本发明的免疫测定法、测定试剂和测定试剂盒中, 其中将在免疫学测量中是仪器化的成分 (测试抗体或测试抗原) 支持在不溶载体上, 所述不溶载体可以是任何材料, 只要其是可接受作为医学检测试剂成分的不溶材料; 具体的实例包括胶乳颗粒、胶体金属、硅石和碳, 并且尤其优选胶乳颗粒。可以根据分析物的类型和本发明的免疫测定法、测定试剂和测定试剂盒的检测原理适当选择不溶载体的材料和尺寸。在上述胶乳颗粒的情形中, 载体颗粒包括通过具有苯基的单体和具有苯基的单体的聚合制得的共聚物, 并且磺酸盐是优选的, 其通过透射电子显微镜测量的平均粒度为 0.01-1.5 μm , 优选 0.03-0.8 μm , 更优选 0.05-0.5 μm 。

[0107] 在本发明的免疫测定法中, 其特征在于抑制非特异性因子对与分析物分子特异性结合的抗体的作用, 以获得精确的测量, 可以使用任何检测原理, 如酶学检测、荧光检测、化学发光检测、基于浊度的检测等。此外, 操作和评估可以手动进行或机械化进行。因此, 本发明的免疫测定试剂和测定试剂盒可以用在下述任一项中: ELISA, EIA, 化学发光法, 免疫层析法, 免疫凝集法, 胶乳强化的免疫凝集法等。特别地, 免疫凝集法和胶乳强化的免疫凝集法可以在与上述用于人 IgM 的免疫凝集测定试剂和测定试剂盒所用的那些相同的仪器中进行。

[0108] 此外, 除了主要成分之外, 使用抑制由人 IgM 引起的非特异性反应的试剂的本发明的免疫测定试剂和测定试剂盒可以包含缓冲样品的离子强度、等渗强度等的成分, 或增

强免疫凝集的成分,其可以是与上述关于用于人 IgM 的免疫凝集测定试剂和测定试剂盒所述相同的成分。

实施例

[0109] 下文中,将通过提供生产自身能够诱导人 IgM 免疫凝集的抗-人 IgM 单克隆抗体的方法、使用所述单克隆抗体的免疫凝集测定法、和使用所述单克隆抗体作为抑制非特异性反应的试剂的免疫测定法的实例,详细解释本发明的部分。然而,本发明不限于这些实例。

[0110] [检测实施例 1] 生产本发明的抗-人 IgM 单克隆抗体

[0111] (1) 建立产生抗-人 IgM 单克隆抗体的杂交瘤

[0112] 在单次免疫中使用 100 μ g 纯化的人 IgM(由 CHEMICON 公司供应)。在第一次免疫中,将通过混合等体积的人 IgM 和弗氏完全佐剂制备的 200 μ L 乳剂注射到每只 BALB/c 小鼠的腹腔。对于另外的免疫,使用通过用弗氏不完全佐剂类似制备的 200 μ L 乳剂,并且以每两周的时间间隔重复免疫三次。通过 ELISA 测量由小鼠尾静脉收集的血液的抗体滴度,并且选择显示出高滴度的小鼠用于细胞融合。在第四次免疫后两周,将溶解在 200 μ L 盐溶液中的 100 μ g 人 IgM 注射到小鼠腹腔中,并在三天后取出脾。将脾在 RPMI1640 培养基中分散,然后通过以 1,500rpm 离心收集脾细胞。细胞在不含胎牛血清的 RPMI1640 培养基中洗涤至少三次,然后悬浮在 2mL 包含 15% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,以产生脾细胞混悬液。在将脾细胞和 SP2/O-AG14 骨髓瘤细胞以 6 : 1 的比例混合后,在存在 50% 聚乙二醇的条件下诱导细胞融合,且这样获得杂交瘤(融合的细胞)。以 1,500rpm 离心后,收集沉淀,并且悬浮在 GKN 溶液(2g 葡萄糖,0.4g 氯化钾,8g 氯化钠,1.41g 磷酸氢二钠,和 0.78g 磷酸二氢钠二水合物溶解在纯水中制成 1L GKN 溶液)中,通过离心洗涤,并且收集沉淀。沉淀的细胞悬浮在 30mL 包含 15% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,将 100 μ L 该混悬液和 200 μ L 以 2.5×10^6 细胞/mL 含有 BALB/c 小鼠胸腺细胞(代表饲养细胞)的 HAT 培养基分散在三个 96-孔微量平板的每个孔中。将杂交瘤在 5% 二氧化碳的培养箱中在 37°C 培养。

[0113] 抗-人 IgM 抗体在培养物上清中的存在通过使用在固相上的人 IgM 的 ELISA 验证。在细胞融合后 10 天,验证在每个孔中的杂交瘤生长。详细地,将含有 150mM 氯化钠和 10 μ g/mL 人 IgM 的 100 μ L 10mM 磷酸缓冲液(pH 7.2;以下简称为 PBS)分散在 96 孔微量平板的每个孔中,并且在 4°C 过夜。在将这些 96 孔微量平板用含有 0.05% 吐温 20 和 1% 牛血清白蛋白的 300 μ L PBS 洗涤三次后,以 50 μ L/孔加入培养物上清,并且将平板置于室温 1 小时。在将平板用含有 0.05% 吐温 20 的 PBS(以下简称为 PBS-T)洗涤三次后,以 50 μ L/孔加入过氧化物酶标记的山羊抗-小鼠 IgG 抗体(南方生物科技公司(SouthernBiotech corporation)),并且将平板置于室温 1 小时。然后,将平板用 PBS-T 洗涤三次,以 50 μ L/孔向其中加入含有 0.2% 邻-苯二胺和 0.02% 过氧化氢的柠檬酸缓冲液,将平板置于室温 15 分钟,以 50 μ L/孔加入 4.5N 硫酸以终止反应。测量每个孔在 492nm 处的吸光度,并且选择显示出与空白有差异的孔作为阳性孔。

[0114] 通过有限次稀释使得细胞成为单克隆的。即,将来自上述阳性孔的杂交瘤稀释至 10 细胞/mL,并且将 0.1mL 每种这些稀释液置于 96-孔微量平板的孔中,所述孔中已经以 10^6 细胞/孔分散了 BALB/c 小鼠胸腺细胞作为饲养细胞。HAT 培养基用于第一次培养,含

有 15% 胎牛血清的 RPMI1640 用于随后的培养。每次培养在具有 5% 二氧化碳的培养箱中在 37°C 持续 10 天。关于选择阳性孔的 ELISA 和关于建立单克隆性的有限稀释分别重复三次, 并且因此获得 26 个产生抗 - 人 IgM 单克隆抗体的杂交瘤系 (A 至 Z)。

[0115] (2) 生产单克隆抗体

[0116] 将来自每种杂交瘤系的约 10^5 个细胞转移到已经用降植烷 (pristane) 预先处理的小鼠腹腔中, 收集在其中产生的腹水。将收集的腹水液离心, 以去除不溶物质, 并且与等体积的饱和硫酸铵溶液混合。将混合物搅动过夜, 离心后, 收集沉淀物。将收集到的沉淀物溶解在 20mM Tris 缓冲液 (pH8.0) 中并且在相同的缓冲液中透析。将透析的物质分别吸附在已用相同的缓冲液平衡的 DEAE- 琼脂糖柱上, 通过用在相同缓冲液中的 0-300mM 浓度梯度的氯化钠洗脱获得抗 - 人 IgM 单克隆抗体。由杂交瘤 A 至 Z 产生的抗 - 人 IgM 单克隆抗体分别表示为抗体 a 至 z, 并且进行下述检测。

[0117] [评估实施例]

[0118] (1) 评估实施例 1: 评估在固相上的反应性 (常规评估方法)

[0119] 将以 $1 \mu\text{g/mL}$ 含有人 IgM 的 $50 \mu\text{L}$ PBS 分散在 96- 孔微量平板中, 并且置于室温下 1 小时, 因此将人 IgM 固定在微量平板上。然后, 将微量平板用 $200 \mu\text{L}$ 含有 3% BSA (牛血清白蛋白) 的 PBS 封闭, 在向孔中加入 $50 \mu\text{L}$ 含有 $1 \mu\text{g/mL}$ 的抗 - 人 IgM 单克隆抗体的 PBS 后, 将其置于室温下 1 小时。然后, 将微量平板用 PBS-T 洗涤三次, 以 $50 \mu\text{L}$ / 孔加入过氧化物酶标记的抗 - 鼠抗体, 将该微量平板置于室温下 1 小时。在用 PBS-T 洗涤三次后, 向每个孔中加入 2,2' - 连氮 - 双 (3- 乙基苯并噻唑啉 -6- 磺酸 (2,2' -azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) (由 KPL 公司供应) 底物溶液, 将微量平板置于室温下 20 分钟。通过向每个孔中加入 $50 \mu\text{L}$ 1% SDS 溶液终止反应。测量在 405nm 波长处的吸光度, 并且根据吸光度, 排列所述抗 - 人 IgM 单克隆抗体的反应性强度 (表 1),

[0120] (2) 评估实施例 2: 评估在溶液中的反应性 (本发明所述的评估法)

[0121] 将 $750 \mu\text{L}$ 每种抗 - 人 IgM 单克隆抗体溶液 (即 100mM Tris- 盐酸缓冲液, pH 8.0, 含有 $400 \mu\text{g/mL}$ 纯化的抗 - 人 IgM 单克隆抗体, 3% 聚乙二醇 6000, 5mM 柠檬酸三钠和 2.5mM 氯化钙 (脱水物)) 添加到 $150 \mu\text{L}$ 含有 $200 \mu\text{g/mL}$ 人 IgM 的 PBS 中, 并且搅拌该混合物。10 分钟后, 通过在日立 U-3310 分光光度计 (Hitachi U-3310spectrophotometer) 中使用两种波长 (主波长 340nm 和次波长 800nm) 测量吸光度 (吸光度 2)。在对照中, 将 $750 \mu\text{L}$ 每种抗 - 人 IgM 单克隆抗体溶液添加到 $150 \mu\text{L}$ 不含人 IgM 的 PBS 中, 搅拌该混合物, 并且在相同条件下测量吸光度 (吸光度 1)。通过由吸光度 2 减去吸光度 1 计算伴有人 - IgM- 特异性免疫凝集的吸光度的变化 (表 1)。

[0122] [表 1]

[0123]

抗体	亚型	常规评估		本发明所述的评估		
		吸光度 (Abs)	反应性 排列	吸光度 1 (mAbs)	吸光度 2 (mAbs)	吸光度 变化
a	G	0.070	23	4.1	5.3	1.2
b	G	0.069	24	3.6	4.8	1.2
c	G	0.103	18	4.3	4.7	0.4
d	G	0.064	25	4.0	4.8	0.8
e	G	0.416	15	5.3	7.5	2.2
f	G	0.315	17	6.0	12.1	6.1
g	G	0.619	8	4.6	8.3	3.7
h	G	0.509	13	3.5	11.5	8.0
i	G	0.545	12	5.0	10	5.0
j	G	0.710	4	4.4	8.7	4.3
k	G	1.464	1	5.6	10.3	4.7
l	G	0.619	8	3.9	7.6	3.7
m	G	0.084	20	3.9	4.5	0.6
n	G	0.087	19	3.9	5.3	1.4
o	G	0.318	16	18.3	20.6	2.3
p	G	0.080	21	4.7	5.6	0.9
q	G	0.070	23	4.0	4.3	0.3
r	G	0.781	3	4.6	10.9	6.3
s	G	0.603	10	4.9	8.3	3.4
t	G	0.685	6	5.1	161.8	<u>156.7</u>
u	G	0.627	7	2.9	6.5	3.6
v	G	0.078	22	5.4	5.7	0.3
w	G	0.694	5	5.2	8.7	3.5
x	G	0.448	14	6.7	11.4	4.7
y	G	0.567	11	5.0	13.8	8.8
z	G	1.161	2	14.1	16.7	2.6

[0124] (3) 评估结果

[0125] 从吸光度变化来看,发现抗体 t 是与人 IgM 特异性反应且能够诱导基于与处于溶液中的人 IgM 的抗原-抗体反应的免疫凝集的抗-人 IgM 单克隆抗体。应该注意,在常规评估法(即,在固相条件下评估)中,抗体 k 和 z 的反应性强度是显著的,尽管抗体 t 的反应性排在第 6 位,其小于抗体 k 的反应性的一半,并且因此不可能选出本发明的抗体 t。同时,可以看出,形成基于与处于溶液中的人 IgM 的抗原-抗体反应的免疫聚集物的能力不必与强反应性一致,并且因此,仅基于对固相条件中的反应性的常规评估,非常难以鉴定具有本发明的特性的单克隆抗体。产生抗体 t 的杂交瘤 T 已经保藏,保藏号为 FERM BP-11134。

[0126] [实施例 1]

[0127] 验证抗-人 IgM 单克隆抗体的免疫凝集及其作为抑制非特异性反应的试剂的潜在应用

[0128] (1) 制备人 IgM 溶液

[0129] 将含有 200 μ g/mL 人 IgM(由 CHEMICON 公司供应)的溶液在 PBS 中连续稀释,以制备 100, 50, 和 25 μ g/mL 的人 IgM 溶液。

[0130] (2) 制备抗-人 IgM 单克隆抗体 t 的溶液

[0131] 使用 100mM 含有 3% 聚乙二醇 6000, 5mM 柠檬酸三钠和 2.5mM 氯化钙(脱水物)的 Tris-盐酸缓冲液(pH 8.0)(以下称为抗体稀释液)将本发明的抗-人免疫球蛋白 M 单克隆抗体 t 稀释至终浓度为 400 μ g/mL, 以制备抗-人 IgM 单克隆抗体 t 溶液。作为对照, 嗜异性阻断剂 HBR 的溶液通过将嗜异性阻断剂 HBR(由 SCANTIBODIES 实验室公司(SCANTIBODIES LABORATORY, INC.)供应, 并由 Nagase & Co.Ltd. 进口)在抗体稀释液中稀释至终浓度 400 μ g/mL 而制备, 所述嗜异性阻断剂 HBR 包括用作非特异性反应阻断剂的抗-人 IgM 单克隆抗体, 而不是抗-人免疫球蛋白 M 单克隆抗体 t。

[0132] (3) 测定法

[0133] 免疫凝集测定法通过使用日立 7170 型自动分析仪(Hitachi type 7170 automatic analyzer)进行。具体地, 将 150 μ L 在(2)中制备的抗-人免疫球蛋白 M 单克隆抗体 t 溶液或 150 μ L 嗜异性阻断剂 HBR 溶液添加到在(1)中制备的每种浓度的 30 μ L 人 IgM 溶液, 搅拌该混合物并且在 37 $^{\circ}$ C 温热, 测量在 340nm 主波长和 800nm 次波长的吸光度在 10 分钟的变化作为反应强度(mAbs)的量度。结果显示在图 3 中。

[0134] (4) 结果

[0135] 本发明的抗-人 IgM 单克隆抗体 t(内部参考号 73224)表现出在 25 μ g/mL 及以上的人 IgM 浓度的反应强度的浓度-依赖性增加, 因此证实其自身进行关于人 IgM 的实际免疫凝集测定法的能力。另一方面, 用作对照的嗜异性阻断剂 HBR 没有表现出反应强度的任何增加, 证实其不能凝集人 IgM。这表明本发明的抗-人 IgM 单克隆抗体能够通过具有与在常规阻断非特异性反应的试剂中所用的其它抗-人 IgM 单克隆抗体明显不同的特性而抑制由人 IgM 引起的不能被常规阻断非特异性反应的试剂所抑制的那些非特异性反应。

[0136] 下文, 将在涉及免疫反应的数种检测中验证本发明的抑制非特异性反应的效应(实施例 2-4)。

[0137] [实施例 2]

[0138] 验证抑制非特异性反应的效应 [1](使用用于 PSA 检测的胶乳试剂)

[0139] 本发明对于非特异性反应的效应使用用于 PSA 检测的胶乳试剂所见, PSA 检测使用抗-PSA 单克隆抗体, 该效应通过在通用自动化分析仪装置中测量反应强度而验证。PSA 是一种糖蛋白, 其具有约 34,000 的分子量, 并且特异性在前列腺的上皮细胞中生产, 并且其用在前列腺癌的筛查(医学检查)中, 前列腺癌是老年男性中的一种典型的恶性肿瘤。

[0140] (1) 试剂

[0141] (1-1) 第一试剂

[0142] (i) 基本试剂

[0143] 30mM HEPES 缓冲液(pH 7.0), 其含有 0.5M KCl 和 0.1% BSA(牛血清白蛋白)

[0144] (ii) 本发明的试剂

[0145] 将自身能够诱导基于同人免疫球蛋白 M 的抗原 - 抗体反应的免疫凝集的抗 - 人 IgM 单克隆抗体 t 溶液添加到上述基本试剂中, 以制得抗体终浓度为 25, 50 或 100 μ g/mL。

[0146] (iii) 对照试剂

[0147] 将可商购的嗜异性阻断剂 HBR 或山羊抗 - 人 IgM 多克隆抗体 (由 MBC 公司供应) 添加到上述基本试剂中, 以制得终浓度为 25, 50 或 100 μ g/mL。

[0148] (1-2) 第二试剂

[0149] Nanopia(商标)PSA, PSA 胶乳试剂溶液 2 (Sekisui 医药公司)

[0150] (2) 测量装置

[0151] 日立 7170 型自动化分析仪 (Hitachi type 7170 automatic analyzer) :

[0152] 参数条件

[0153] (i) 样品、第一试剂、和第二试剂的体积 : 4 μ L, 100 μ L, 和 100 μ L。

[0154] (ii) 分析方法 : 两点终点法 (2 point end method) (检测点为 19-34 个)

[0155] (iii) 测量波长 : 主波长 570nm/ 次波长 800nm

[0156] (3) 检测样品

[0157] (i) 正常样本

[0158] 使用来自女性的血清。女性血液包含很少的 PSA, 如果有的话, 且因此通常用作阴性对照。

[0159] (ii) 非特异性反应样本

[0160] 使用来自女性的显示出异常高水平的反应强度的血清。PSA 是男性特异性抗原, 并且不应该在女性血清中发现。因此, 相信表现出异常高水平的反应强度的女性血清应该诱导非特异性反应, 其中所诱导的胶乳凝集与 PSA 含量无关。具体地, 通过组合使用上述基本试剂和第二试剂, 通过筛查商购血清 (来自田纳西血液服务公司 (TENNESSEE BLOOD SERVICES, INC.) 的正常女性的不含抗凝血剂的全血的血清), 而鉴定表现出高水平吸光度的女性血清, 并且将该鉴定的血清用于后续工作。

[0161] (4) 测定法

[0162] 所述正常样本和非特异性反应样本在日立 7170 型自动化分析仪中测定, 使用第一试剂作为基本试剂, 本发明的试剂或对照试剂、和第二试剂作为 Nanopia(商标)PSA PSA 胶乳试剂溶液 2, 并且检验反应强度。

[0163] (5) 测定结果

[0164] 在图 4 所示的正常样本的测定中, 不管使用本发明的试剂还是使用对照试剂, 增加浓度的添加的抗 - 人 IgM 抗体或嗜异性阻断剂 HBR 不导致反应强度的改变, 这表明在所述样本中不存在 PSA, 并且加入抗 - 人 IgM 抗体或 HBR 对测定反应绝对没有影响。另一方面, 在图 5 所示的非特异性反应样本的测定中, 使用不具有其它试剂的基本试剂观察到不小于 150mAbs 的异常吸光度。山羊抗 - 人 IgM 多克隆抗体、对照试剂以多至 100 μ g/mL 的添加浓度不能表现出显著的抑制效应, 并且加入商购的嗜异性阻断剂 HBR (其包括抗 - 人 IgM 单克隆抗体) 甚至提高反应强度, 虽然是略微提高, 而不是抑制其。

[0165] 当加入本发明的包含抗 - 人 IgM 单克隆抗体 t 的试剂时, 在 25 μ g/mL, 观察到异常吸光度的显著减少, 并且在 50 μ g/mL, 非特异性反应几乎被完全抑制。因此, 证实本发明

所述的测定法表现出对由人 IgM 引起的而不能被已经用于阻断非特异性反应目的的常规抗 - 人 IgM 单克隆抗体或抗 - 人 IgM 多克隆抗体所阻断的非特异性反应的强抑制效应。

[0166] [实施例 3]

[0167] 验证抑制非特异性反应的效应 [2] (使用用于 CRP 检测的胶乳试剂)

[0168] 本发明对于非特异性反应的效应使用用于 CRP 检测的胶乳试剂所见, CRP 检测使用抗 -CRP 单克隆抗体, 该效应通过在通用自动化分析仪装置中进行测量而验证。CRP 是公知的一种非特异性炎症标记。

[0169] (1) 试剂

[0170] (1-1) 第一试剂

[0171] (i) 基本试剂

[0172] 20mM Tris- 盐酸缓冲液 (pH 8.5), 其含有 500mM 氯化钠。

[0173] (ii) 本发明的试剂

[0174] 将自身能够诱导基于同人 IgM 的抗原 - 抗体反应的免疫凝集的抗 - 人 IgM 单克隆抗体 t 溶液添加到上述基本试剂中, 以制得抗体终浓度为 50 μ g/mL。

[0175] (iii) 对照试剂

[0176] 将对被动非特异性反应具有抑制效应的正常小鼠 IgG 或商购的嗜异性阻断剂 HBR 添加到基本试剂中, 以制得终浓度为 50 μ g/mL。

[0177] (1-2) 第二试剂

[0178] SS 型 Pureauto (商标) S, CRP 胶乳, 胶乳试剂溶液 2 (Sekisui 医药公司)

[0179] (1-3) 校正器

[0180] SS 型 Pureauto (商标) S, CRP 胶乳, 校正器 (Sekisui 医药公司)

[0181] (2) 测量装置

[0182] 日立 7170 型自动化分析仪 :

[0183] 参数条件

[0184] (i) 样品、第一试剂、和第二试剂的体积 : 分别为 3 μ L, 150 μ L, 和 50 μ L。

[0185] (ii) 分析方法 : 两点终点法 (检测点为 19-34 个)

[0186] (iii) 测量波长 : 主波长 570nm / 次波长 800nm

[0187] (iv) 校准 : spline

[0188] (3) 检测样品

[0189] 非特异性反应样本 1 : 在正常血清中发现的异常高吸光度的样本

[0190] 非特异性反应样本 2 : 在正常血清中发现的异常高吸光度的样本

[0191] (4) 测定法

[0192] 所述非特异性反应样本在日立 7170 型自动化分析仪装置中测定, 使用第一试剂作为基本试剂, 本发明的试剂或对照试剂和第二试剂作为 SS 型 Pureauto (商标) S, CRP 胶乳, 胶乳试剂溶液 2, 并且记录测量值。

[0193] (5) 测定结果

[0194] 如在表 2 中所示, 使用基本试剂获得的关于非特异性反应样本 1 和 2 的测量值是正常测量值 (即, 通过使用来自其它供应商的包含兔多克隆抗体的胶乳试剂验证的参照值。产品名称 : CRP- 胶乳 (II) “Seiken” X2, DenkaSeiken 公司) 的 5-10 倍高。使用包含

50 μ g/mL 的正常小鼠 IgG 的对照试剂,对于非特异性反应样本 1,而不是对于非特异性反应样本 2 观察到测定值的改进。因此,应该理解,非特异性反应样品 1 是所谓的包含嗜异性抗体的 HAMA 样本。使用包括 50 μ g/mL 嗜异性阻断剂 HBR 的对照试剂,对于非特异性反应样本 1 和 2 二者均观察到改进,测量值减少至如正常测量值一样低。本发明的包含抗-人 IgM 单克隆抗体 t 的试剂也提高了关于非特异性反应样本 1 和 2 二者的测量值,并且这一效应高于由嗜异性阻断剂 HBR 所显示的效应。因此,已经证实本发明的测定法可以抑制可以由嗜异性阻断剂 HBR 强烈抑制的普通非特异性反应,具有与所述嗜异性阻断剂 HBR 相同或更高的效力。

[0195] [表 2]

[0196]

	正常测量值 (参照值)	基本试剂	对照试剂		本发明的试剂
			正常小鼠 IgG	HBR	
非特异性反应样本 1	1.4	15.0	1.5	1.8	1.3
非特异性反应样本 2	1.3	6.6	6.0	1.3	1.3

[0197] 单位 (mg/dL)

[0198] [实施例 4]

[0199] 验证抑制非特异性反应的效应 [3] (使用用于胰岛素检测的胶乳试剂)

[0200] 本发明的抑制非特异性反应的效应还使用用于胰岛素检测的胶乳试剂进行验证。

[0201] (1) 生产小鼠抗-胰岛素单克隆抗体

[0202] 使用人胰岛素 (30-AI51, 由 Fitzgerald 公司供应) 作为免疫原,通过常规制备单克隆抗体的方法生产具有不同抗原识别位点的两种小鼠抗-胰岛素单克隆抗体。对这些抗体指定内部参考号 66221 和 66412 (以下分别称为抗体 66221 和抗体 66412)。

[0203] (2) 生产胶乳颗粒

[0204] 将 1, 100g 蒸馏水, 200g 苯乙烯, 0. 2g 苯乙烯磺酸钠, 和其中将 1. 5g 过硫酸钾溶解在 50g 蒸馏水中的溶液置于玻璃反应瓶 (体积 :2L) 中, 该玻璃反应瓶装备了搅拌装置、回流冷却器、温度检测器、氮进气管和封套。瓶内部的空气用氮气置换, 并且在 70°C 连续搅拌进行聚合 48 小时。在完成聚合后, 将上述溶液用滤纸过滤, 并且取出胶乳颗粒。通过使用透射电子显微镜装置 (“JEM-1010 型”, 由 JEOL 公司供应) 以 10, 000- 倍放大拍摄获得的胶乳颗粒的照片, 并且在至少 100 个颗粒上进行图像分析, 以确定平均粒度。获得的平均粒度为 0. 3 μ m。

[0205] (3) 制备吸附抗-胰岛素单克隆抗体的胶乳颗粒的溶液

[0206] 1) 制备吸附抗体 66221 的胶乳颗粒的溶液

[0207] 向 1. 0% 具有 0. 3 μ m 平均粒度的胶乳颗粒溶液 (5mM Tris 缓冲液, pH8. 5) 中加入等体积的含有 0. 60mg/mL 的抗体 66221 的溶液 (5mM Tris 缓冲液, pH 8. 5), 将混合物在 4°C 搅拌 2 小时。随后, 加入等体积的含有 0. 5% BSA 的 5mM Tris 缓冲液 (pH 8. 5), 将混合物在 4°C 搅拌 1 小时。然后, 将混合物离心, 以去除上清, 将沉淀物重悬在 5mM Tris 缓冲液

(pH 8.5) 中,以获得吸附抗体 66221 的胶乳颗粒的溶液。

[0208] 2) 制备吸附抗体 66412 的胶乳颗粒的溶液

[0209] 使用抗体 66412,通过使用上述 1) 所述相同的方法生产吸附抗体 66412 的胶乳颗粒的溶液。

[0210] (4) 试剂

[0211] 1) 制备第一试剂

[0212] (i) 基本试剂

[0213] 5mM Tris 缓冲液 (pH 8.5),其含有 500mM 氯化钠和 0.2% BSA。

[0214] (ii) 本发明的试剂

[0215] 该试剂通过将单克隆抗体 t 溶液添加到所述基本溶液中制得抗体终浓度为 50 μ g/mL 而产生。

[0216] (iii) 对照试剂

[0217] 该试剂通过添加商购的嗜异性阻断剂 HBR 而不是本发明的单克隆抗体 t 至最终抗体浓度为 50 μ g/mL 而产生。

[0218] 2) 第二试剂的制备

[0219] 混合等体积的吸附抗体 66221 的胶乳颗粒溶液和吸附抗体 66412 的胶乳颗粒溶液,并且将混合物用 5mM Tris 缓冲液 (pH 8.5) 稀释,以致波长 600nm 处的吸光度为 5.0Abs。所得到的混合物表示为第二试剂。

[0220] (5) 样品

[0221] 将关于葡萄糖耐受性检测所收集的血清样本用作样品。

[0222] (6) 测定法

[0223] (i) 使用本发明的试剂和对照试剂的测量

[0224] 通过使用日立 7170 型自动化分析仪装置和第一与第二试剂的组合,测量样品中胰岛素的浓度。具体地,将 150 μ L 第一试剂添加到 10 μ L 样品中,将混合物在 37°C 温热 5 分钟,并在随后加入 50 μ L 第二试剂后,搅拌混合物。在主波长 570nm 和次波长 800nm 处测量 5 分钟期间内伴有凝集发生的吸光度的变化,并且与使用已知浓度的标准物质获得的标准曲线进行比较,以计算胰岛素浓度。

[0225] (ii) 使用标准试剂测量

[0226] 通过使用 LUMIPULSE (商标) 胰岛素 -N (由 Fujirebio 公司供应),按照所附的手册和供应商建议,测量样品中胰岛素的浓度。图 6 显示在该组胰岛素测量值和上述使用本发明的试剂或对照试剂获得的那些测量值之间的相关性。

[0227] (7) 测定结果和讨论

[0228] 在显示相关性的图 6 中,在使用对照试剂 (HBR) 的检测中发现一些没有显示相关性的样品。另一方面,在已经使用本发明的试剂的本实施例中,抑制了相关性的缺乏,而与 LUMIPULSE (商标) 胰岛素 -N 的极好的相关性是明显的。因此,已经证实,也在胰岛素检测中,本发明的试剂抑制不能被商购嗜异性阻断剂 HBR 抑制的非特异性反应。

[0229] 工业适用性

[0230] 由于本发明的单克隆抗体是基于在溶液中诱导凝集反应的药效选择的,其有效地与人 IgM 反应,能够进行更准确和一致的关于人 IgM 的免疫凝集测定。

[0231] 本发明的单克隆抗体还提供用于关于人 IgM 的免疫凝集测定法的高质量和廉价的测定试剂和测定试剂盒。

[0232] 本发明的抑制非特异性反应的试剂,以及使用所述试剂的免疫测定法、免疫测定试剂和免疫测定试剂盒可以抑制由 HAMA 等引起的普通非特异性反应。另外,它们还可以抑制甚至不能通过已知的措施防止的那些非特异性反应,而与检测项目的类型无关,条件是这些非特异性反应可能由人 IgM 引起,因此能够进行比常规测定法更准确的测量。

[0233] [保藏的微生物的介绍]

[0234] A. 生物材料所保藏的保藏机构的名称和地址 :

[0235] 独立行政法人产业技术综合研究所特许生物保藏中心 (International Patent Organism Depository, The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

[0236] Chuo 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba-City, Ibaraki, 305-8566 日本

[0237] B. 生物材料保藏于上述保藏机构的日期 :

[0238] 2008 年 9 月 19 日 (原始保藏日期)

[0239] 2009 年 6 月 9 日 (原始保藏物变换至依据布达佩斯条约的保藏物的日期)

[0240] C. 由上述保藏机构指定的保藏物的保藏号 :

[0241] FERM BP-11134

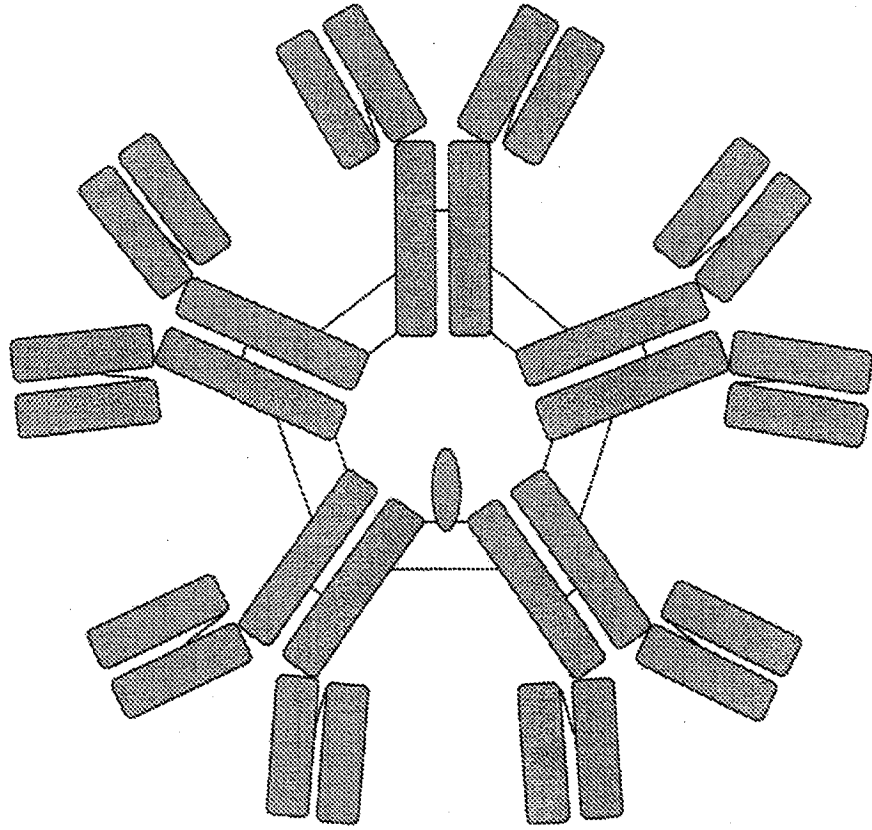


图 1

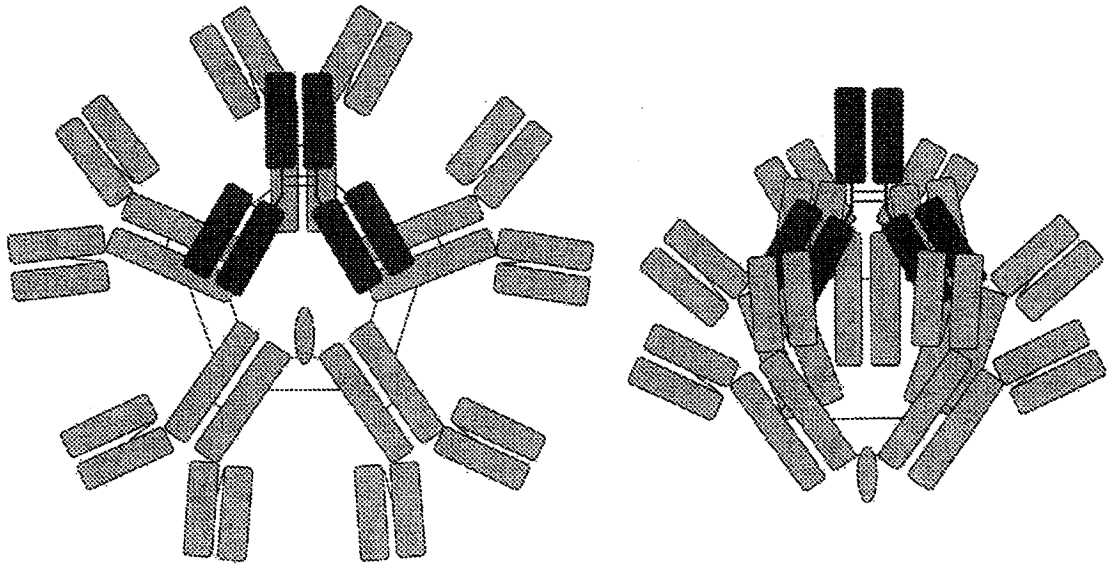


图 2

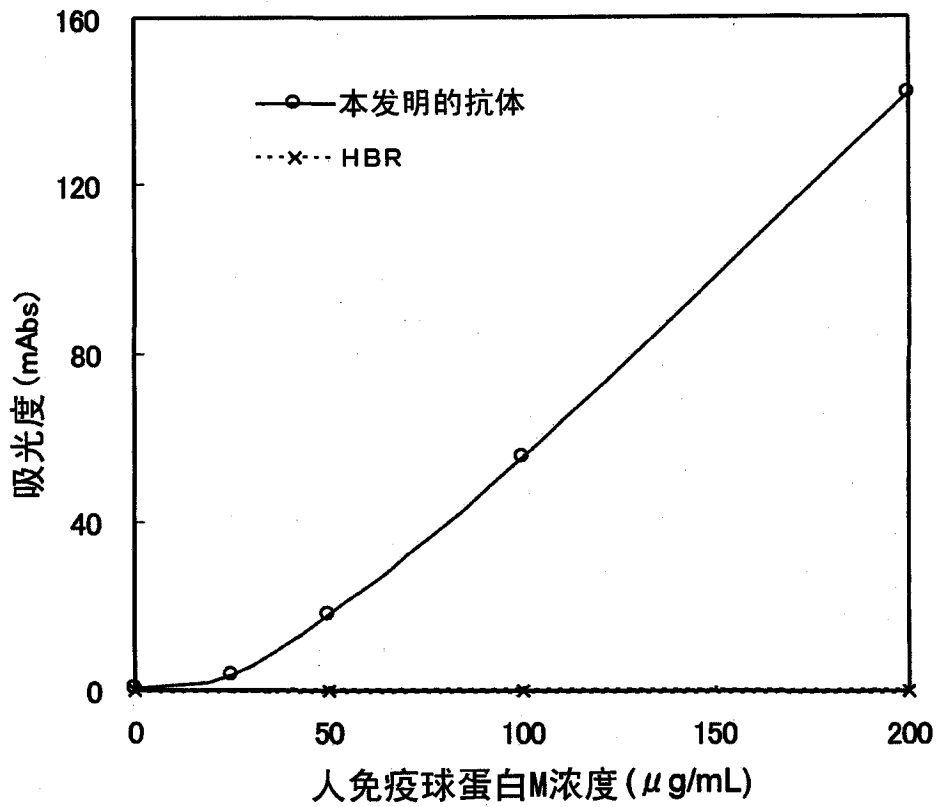


图 3

正常样本的测定

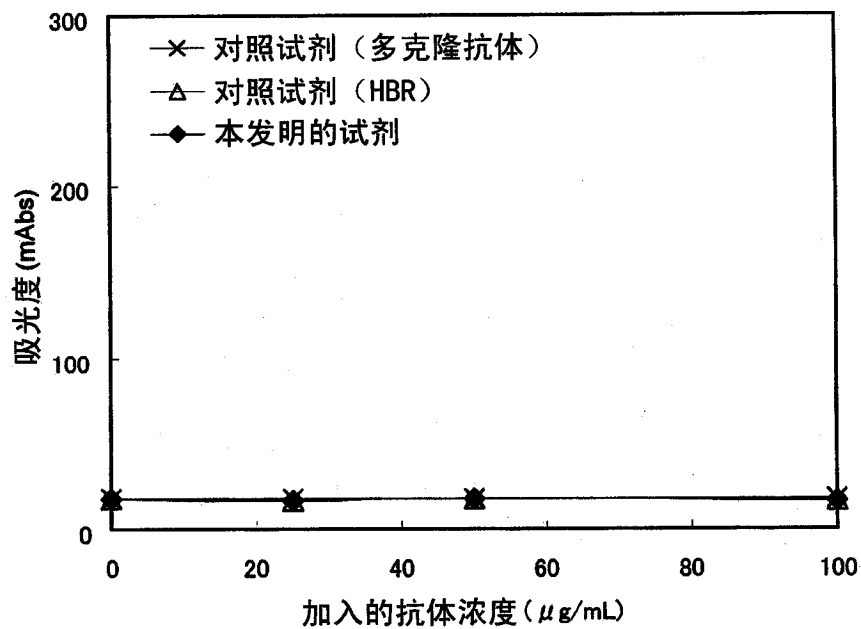


图 4

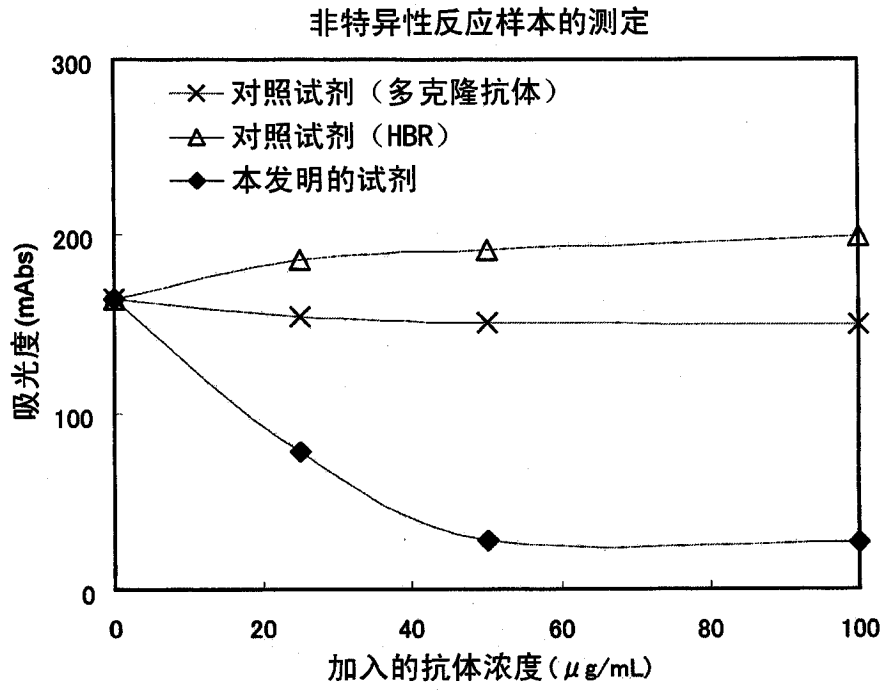


图 5

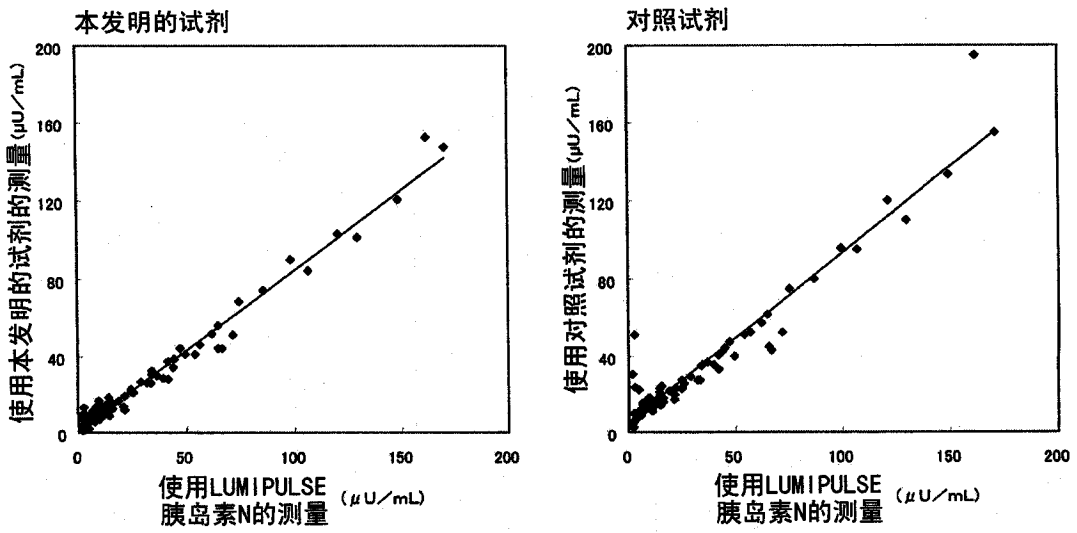


图 6

1. 抗-人 IgM 单克隆抗体,其与人 IgM 特异性反应,并且能够自身诱导基于与处于溶液中的人 IgM 的抗原-抗体反应的免疫凝集。

2. 根据权利要求 1 所述的抗-人 IgM 单克隆抗体,其通过生产抗-人 IgM 单克隆抗体的方法获得,所述方法包括下述步骤:

步骤 1) 通过使用人 IgM 作为抗原建立产生抗-人 IgM 抗体的杂交瘤的步骤;

步骤 2) 使得通过步骤 1 中获得的杂交瘤产生的抗体与处于溶液中的人 IgM 接触,并且选择产生能够诱导基于与处于所述溶液中的人 IgM 的抗原-抗体反应的免疫凝集的抗体的杂交瘤的步骤;和

步骤 3) 获得通过步骤 2 所选择的杂交瘤产生的抗体的步骤。

3. 选自下述 (a) 或 (b) 的抗体:

(a) 由 FERM BP-11134 杂交瘤产生的单克隆抗体;

(b) 根据权利要求 1 所述的抗体,其识别与根据上述 (a) 的抗体相同的表位。

4. 来源于根据权利要求 1-3 任一项所述的抗-人 IgM 单克隆抗体的功能片段。

5. 用于确定样品中人 IgM 的量的免疫凝集测定法,其包括使用根据权利要求 1-3 任一项所述的单克隆抗体和 / 或根据权利要求 4 所述的来源于所述单克隆抗体的功能片段。

6. 用于确定样品中人 IgM 的量的免疫凝集测定试剂和免疫凝集测定试剂盒,其包括根据权利要求 1-3 任一项所述的单克隆抗体和 / 或根据权利要求 4 所述的来源于所述单克隆抗体的功能片段。

7. 生产根据权利要求 1 或 2 所述的单克隆抗体的杂交瘤。

8. FERM BP-11134 杂交瘤。

9. 生产抗-人 IgM 单克隆抗体的方法,其包括下述步骤:

步骤 1) 通过使用人 IgM 作为抗原建立产生抗-人 IgM 抗体的杂交瘤的步骤;

步骤 2) 使得通过步骤 1 中获得的杂交瘤产生的抗体与处于溶液中的人 IgM 接触,并且选择产生能够诱导基于与处于所述溶液中的人 IgM 的抗原-抗体反应的免疫凝集的抗体的杂交瘤的步骤;和

步骤 3) 获得通过步骤 2 所选择的杂交瘤产生的抗体的步骤。

10. 用于抑制由人 IgM 引起的非特异性反应的试剂,其包括根据权利要求 1-3 任一项所述的单克隆抗体和 / 或根据权利要求 4 所述的来源于所述单克隆抗体的功能片段。

11. 用于基于分析物和测试抗体或测试抗原之间的抗原-抗体反应来确定样品中分析物的量的免疫测定法,其中通过添加用于抑制由人 IgM 引起的非特异性反应的试剂而抑制由人 IgM 引起的不包括所述抗原-抗体反应的非特异性反应,所述试剂包括根据权利要求 1-3 任一项所述的单克隆抗体和 / 或根据权利要求 4 所述的来源于所述单克隆抗体的功能片段。

12. 根据权利要求 11 所述的免疫测定法,其中所述测试抗体或测试抗原被支持在不溶载体上。

13. 根据权利要求 12 所述的免疫测定法,其中所述不溶载体包括胶乳、胶体金属或硅石。

14. 免疫测定试剂和免疫测定试剂盒,其包括:

用于抑制由人 IgM 引起的非特异性反应的试剂,其包括根据权利要求 1-3 任一项所述

的单克隆抗体和 / 或根据权利要求 4 所述的来源于所述单克隆抗体的功能片段 ; 和
用于确定样品中分析物的量的测试抗体或测试抗原。

15. 根据权利要求 14 所述的免疫测定试剂和免疫测定试剂盒, 其中所述测试抗体或测试抗原被支持在不溶载体上。

16. 根据权利要求 15 所述的免疫测定试剂和免疫测定试剂盒, 其中所述不溶载体包括胶乳、胶体金属或硅石。

专利名称(译)	单克隆抗体和使用所述单克隆抗体的免疫测定法		
公开(公告)号	CN102159591A	公开(公告)日	2011-08-17
申请号	CN200980133001.0	申请日	2009-09-03
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
[标]发明人	高桥由纪 清水知 高桥弘至 中村靖		
发明人	高桥由纪 清水知 高桥弘至 中村靖		
IPC分类号	C07K16/42 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/541 G01N33/6854 C07K16/4283 A61P29/00 A61P37/02 G01N33/5302 G01N33/686 G01N33/54393 G01N33/545		
代理人(译)	程金山		
优先权	2008228370 2008-09-05 JP 2008272642 2008-10-23 JP 2008286521 2008-11-07 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供一种抗-人IgM单克隆抗体和使用所述单克隆抗体的免疫测定法，所述抗-人IgM单克隆抗体能够特异性与人IgM反应，并且诱导基于与处于溶液中的人IgM的抗原-抗体反应的免疫凝集。本发明的另一个目的是提供抑制由人IgM引起的而不能通过常规方法防止的非特异性反应的试剂，和提供抑制由人IgM引起的非特异性反应的免疫测定法。通过基于在溶液中与人IgM的反应性的评估而选择与人IgM反应的单克隆抗体，已经获得了自身能够凝集人IgM和进行实际的免疫凝集测定法的新颖单克隆抗体，因此实现了上述目的。

抗体	亚型	常规评估		本发明所述的评估		
		吸光度 (Abs)	反应性 / 排列	吸光度 1 (mAbs)	吸光度 2 (mAbs)	吸光度 变化
a	G	0.070	23	4.1	5.3	1.2
b	G	0.069	24	3.6	4.8	1.2
c	G	0.103	18	4.3	4.7	0.4
d	G	0.064	25	4.0	4.8	0.8
e	G	0.416	15	5.3	7.5	2.2
f	G	0.315	17	6.0	12.1	6.1
g	G	0.619	8	4.6	8.3	3.7
h	G	0.609	13	3.5	11.5	8.0
i	G	0.545	12	5.0	10	5.0
j	G	0.710	4	4.4	8.7	4.3
k	G	1.464	1	5.6	10.3	4.7
l	G	0.619	8	3.9	7.6	3.7
m	G	0.084	20	3.9	4.5	0.6
n	G	0.087	19	3.9	5.3	1.4
o	G	0.318	16	18.3	20.6	2.3
p	G	0.080	21	4.7	5.6	0.9
q	G	0.070	23	4.0	4.3	0.3
r	G	0.781	3	4.6	10.9	6.3
s	G	0.603	10	4.9	8.3	3.4
t	G	0.685	6	5.1	161.8	156.7
u	G	0.627	7	2.9	6.5	3.6
v	G	0.078	22	5.4	5.7	0.3
w	G	0.694	5	5.2	8.7	3.5
x	G	0.448	14	6.7	11.4	4.7
y	G	0.567	11	5.0	13.8	8.8
z	G	1.161	2	14.1	16.7	2.6