

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 16/28

C07K 16/00 C12N 5/10



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02807746.6

[43] 公开日 2004 年 7 月 7 日

[11] 公开号 CN 1511163A

[22] 申请日 2002.4.3 [21] 申请号 02807746.6

[30] 优先权

[32] 2001. 4. 3 [33] FR [31] 01/04525

[86] 国际申请 PCT/FR2002/001164 2002.4.3

[87] 国际公布 WO2002/081523 法 2002.10.17

[85] 进入国家阶段日期 2003.9.30

[71] 申请人 泰克诺法姆公司

地址 法国巴黎

[72] 发明人 埃尔韦·巴赞 杨尼克·尼泽

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 3 页 说明书 16 页 序列表 1 页

[54] 发明名称 抗体制备与筛选方法

[57] 摘要

本发明的目的是一种抗体制备方法，该方法包括下述步骤：a) 用一种核酸构建体转染细胞系，该核酸构建体含有编码表达于所述细胞系的细胞表面的目的多肽的目的核酸序列，b) 用步骤(a)中制备的细胞或用该细胞的膜制备针对目的多肽的抗体。

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

- 1、抗体制备方法，该方法包括下述步骤：
 - a) 通过一种核酸构建体转染细胞系，该核酸含有编码表达于所述
5 细胞系细胞表面的目的多肽的目的核酸序列，
 - b) 用步骤（a）中制备的细胞或用该细胞的膜制备针对所述目的多肽的抗体。
- 2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于在步骤（a）中经转染的细胞系是免疫系统的细胞系，优选地淋巴细胞系。
- 10 3、根据权利要求 1 或 2 中任一权利要求所述的方法，其特征在于用通过以下步骤得到的 B 细胞制备步骤（b）的抗体：
 - (i) 使用在其表面表达在步骤（a）制备的目的多肽的转染细胞，或使用该细胞的膜使动物免疫，
 - (ii) 让在其表面表达在步骤（a）制备的目的多肽的转染细胞或该
15 细胞的膜，与含有能产生抗体的细胞的细胞群体进行接触。
- 4、根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于步骤（a）中转染的细胞系与在（i）中免疫的动物或在（ii）中使用的细胞是组织相容性的。
- 5、根据上述权利要求中任一权利要求所述的方法，其特征在于在步骤（a），用核酸构建体转染细胞系，该核酸构建体含有编码目的膜蛋白
20 质的目的核酸序列。
- 6、根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于将所述的目的核酸序列置于调节序列控制下，该调节序列能够使所述的目的多肽的表达增加，并能够使其输送到该转染细胞的表面。
- 7、根据权利要求 1-4 中任一权利要求所述的方法，其特征在于在步
25 骤（a），用核酸构建体转染细胞系，该核酸构建体在同一个阅读框内含有编码膜蛋白质的核酸序列和编码目的多肽的目的核酸序列。

8、根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于所述编码膜蛋白质的核酸序列和目的核酸序列被置于调节序列控制下，该调节序列能够使所述的目的多肽的表达增加，并能够使其输送到该转染细胞的表面。

9、根据权利要求 7 或 8 中任一权利要求所述的方法，其特征在于所述目的核酸序列被置于该编码膜蛋白的核酸序列之前、之后或之中。

10、根据权利要求 7-9 中任一权利要求所述的方法，其特征在于所述编码膜蛋白质的核酸序列与编码目的多肽的目的核酸序列由一或多个相同或不同的连接核酸序列而连接。

11、根据权利要求 10 所述的方法，其特征在于其中一个连接核酸序列编码参与免疫应答的多肽。

12、根据权利要求 1-11 中任一权利要求所述的方法，其特征在于转染步骤 (a) 的细胞系时使用的核酸构建体包括选择基因，例如耐抗生素的基因。

13、根据上述权利要求中任一权利要求所述的方法，其特征在于转染步骤 (a) 的细胞系时使用的核酸构建体是适合于步骤 (a) 转染细胞系的细胞的核酸载体。

14、根据权利要求 1-13 中任一权利要求所述的方法，其特征在于所述的转染细胞系与制备抗体时在 (i) 或 (ii) 中使用的细胞是自体的、同基因的或同源的。

15、根据上述权利要求中任一权利要求所述的方法，其特征在于该细胞系转染后，分析表达膜蛋白质或目的多肽的转染子。

16、根据上述权利要求中任一权利要求所述的方法，其特征在于在步骤 (b) 中采用细胞融合技术自一种动物细胞制备单克隆抗体，该动物接受了在步骤 (a) 中制备的、在其表面表达目的多肽的、转染的细胞或该细胞的膜。

17、根据权利要求 1-15 中任一权利要求所述的方法，其特征在于步

骤 (b) 包括:

- 自产生针对所述目的多肽的抗体的 B 细胞中分离出编码所述抗体的每个链的核酸序列,

- 在宿主中表达所述核酸序列。

5 18、根据上述权利要求中任一权利要求所述的方法, 其特征在于在步骤 (b) 后, 通过将得到的抗体与下述细胞接触以测试所述抗体识别所述目的多肽的能力:

- 在步骤 (a) 中转染的细胞系的细胞, 和/或

- 用与步骤 (a) 中使用的核酸构建体相同但不含所述目的核酸序列

10 的核酸构建体转染的细胞系的细胞。

抗体制备与筛选方法

- 5 本发明涉及一种用于制备并便利地筛选抗体、特别是单克隆抗体的抗原呈递方法。

由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体具有多方面的意义，许多文献对此作过很透彻描述（Bazin，“大鼠杂交瘤与大鼠单克隆抗体”，CRC出版社，
10 1990年，515页；Goding，“单克隆抗体：原理与实践”，第3版，学术出版社，1996年，492页；Shepherd和Dean，“单克隆抗体”，牛津大学出版社，2000年，479页）。这些抗体在诊断与预防和/或治疗应用中都是有效的。本发明广泛地涉及体内与体外免疫。

免疫应答针对的物质是一种具有一个或多个表位或一个或多个与至少一种载体分子偶联的半抗原的天然分子或人工合成的分子。在抗原制剂种可以添加一种佐剂。这种抗原制剂（在下面也称作“抗原”）相应于
15 免疫学手册中的经典定义。本发明范围内考虑的免疫应答涉及在免疫学手册中描述的那些免疫应答，具体而言是引起抗体合成的那些免疫应答。

自从骨髓瘤细胞与经过免疫的动物的淋巴样细胞之间的细胞融合技术产生以来，大量的实验室生产出了针对抗原决定簇的单克隆抗体。
20 Köhler和Milstein（1975年，《自然》，第256卷，第495页）建立了第一个分泌单克隆抗体的杂交瘤的模型，其是一个鼠科的模型。后来扩展到大鼠（Galfé等人，1979年，277，131），并且现在还广泛应用。

不过，除了融合技术外，获得单克隆抗体首先取决于使用的免疫方法以及对目的杂交克隆进行正确的筛选。可以将对动物体的免疫方法分
25 为体内或者体外两大类，后者为选择动物的某些细胞并将其与抗原一起

进行培养。

还可分成三种免疫技术：i) 用纯化的目的抗原进行免疫，ii) 用呈递目的抗原的细胞进行免疫，iii) DNA 免疫，包括施用一种表达目的抗原的编码基因的 DNA 序列（质粒）。在这三种情况下，已经认识到导致
5 产生针对该抗原的抗体的免疫应答，需要同时活化特异性识别天然抗原的 B 淋巴细胞以及（更多地）特异性识别降解的、并由被称为抗原呈递者的细胞通过主要组织相容性复合体的分子以肽的形式而呈递的抗原的 T 淋巴细胞。

这些不同方式的常规的免疫一直以来被描述了近百年，而体外免疫
10 是近来的。例如可以列举 Mishell 和 Dutton 所描述的小鼠方面的技术或多组人类方面的技术。

使用蛋白质的免疫需要预先对抗原进行纯化或需要制备重组形式的抗原，而这种重组形式的抗原往往不具有天然蛋白质的构象以及转录后特性。

15 使用细胞的免疫的最大缺陷是产生的各种各样抗体，它们不仅识别目的蛋白质，而且还识别大量的由这些细胞呈递的其它抗原，这样使得表征所得到的单克隆抗体就变得很困难。

最后，采用所谓裸露 DNA 方法的免疫已成功地得到应用（Costaglioga 等人，《免疫学杂志》（Journal of Immunology），1998，160，1458-1465），
20 但得到的免疫应答强度水平仍有限。事实上，这些方法需要在被免疫的对象的宿主细胞中表达该抗原蛋白质的编码基因，并且需要这种蛋白质随即被呈递于所述宿主的表面上或被这些宿主分泌。另外，这些方法不能筛选所得到的克隆。

25 这些方法可应用于对例如大鼠、小鼠或任何其它能够产生体液免疫或细胞应答的一种动物进行经典的免疫，所述的免疫或应答可以是正常的或通过转基因手段修饰的。其对于体内免疫以及体外免疫而言都是有

效的。

曾使用经转染的并在细胞膜上表达目的抗原的非免疫自体或同种异体小鼠细胞系对小鼠进行免疫而得到了单克隆抗体(Palmer d, Kevany M, Mackworth-Young C., Batchelor R., Lombardi G., Lechler R. 使用表达人和小鼠 II 类主要组织相容性二聚体的 L-细胞转染子, 产生与表征 HLA-DR 特异性单克隆抗体。《免疫遗传学》(Immunogenetics)33(1):12-17 (1991)。Thurau SR., Wildner G., Kuon W., Weiss EH, Rithumuller G. 在高转染受体 P815 中 HLA-B27 的表达与免疫原性: 诱导针对 HLA-B27 的单克隆抗体的新方法。《组织抗原》(tissue antigen)33(5): 511-519(1989))。

10

本发明的目的是提供一种新的免疫方法, 该方法能够很容易地获得非常特异性的免疫应答、并且容易对所生成的抗体进行筛选。这个目的可以借助一种抗体制备方法达到, 该方法包括下述步骤:

a) 通过核酸构建体转染细胞系, 该核酸构建体含有编码待表达于所述细胞系细胞表面的目的多肽的目的核酸序列,

b) 用步骤 (a) 制备的细胞或用该细胞的膜制备针对目的多肽的抗体。

在本发明的范围内, 术语“膜”不加区别地系指根据本技术领域技术人员已知的技术得到的完整细胞膜和其碎片。

20 本发明方法中使用的细胞可以是永生细胞系, 但也可以是长寿命的细胞, 例如成纤维细胞。

根据优选的实施方式, 在转染步骤 (a) 中使用的细胞系是免疫系统的细胞系, 例如淋巴细胞系。

25 选择这些免疫系统细胞对本发明的方法而言具有决定性的意义, 因为它们能够自然植入 (colonize) 淋巴器官, 在其中产生免疫反应, 导致抗体产生。此外, 这种免疫使用的转染细胞系还可以作为与 B 淋巴细胞

融合的细胞系，该 B 淋巴细胞在其表面产生并表达针对由该转染细胞系表达的抗原的抗体。因此，根据本发明的方法，可便利地达到两类细胞之间的结合，这样可改进融合产率。

可以采用本技术领域技术人员已知的任何免疫或分子生物学方法制备这些抗体，然后在步骤 (b) 对其进行筛选。便利地，步骤 (b) 如下进行：

(i) 使用在其表面表达在步骤 (a) 中制备的目的多肽的转染细胞、或使用它们的膜使动物免疫，

(ii) 将在其表面表达在步骤 (a) 中制备的目的多肽的转染细胞或它们的膜，与含有能产生抗体的细胞的细胞群体进行接触。

术语“能产生抗体的细胞”，它应该理解为任何能有效产生抗体的细胞以及任何具有抗体组装与产生所必需的条件但却未产生抗体的细胞，例如，可仅仅由于其处于不成熟的发育阶段。

本发明尤其涉及一种抗体制备方法，其中步骤 (a) 中的经转染的细胞系与 (i) 中的经免疫的动物或 (ii) 中使用的细胞是组织相容性的。

使用能够产生抗体的任何动物的细胞，当然，如哺乳动物的细胞，可以实施本发明的方法。优选地，使用一种免疫系统细胞系，例如淋巴细胞系。该转染的细胞系可以是任何动物的细胞系，包括哺乳动物的细胞系，更具体地是人的细胞系。

作为特别实例，可以列举啮齿动物骨髓瘤细胞系，优选地为大鼠骨髓瘤细胞系，最优选地为 LOU 品系大鼠骨髓瘤细胞系，如在 2000 年 11 月 29 日保藏于巴斯德研究院（巴黎）国家微生物培养物保藏中心的、保藏号为 I-2584 的 LOU IR 983 F/TEC 大鼠骨髓瘤细胞系。

根据本发明第一个实施方式，使用含有编码目的膜多肽的目的核酸序列的核酸构建体，进行步骤 (a) 的细胞系转染。当然，该目的核酸序列被置于调节序列的控制下，所述调节序列能够使目的多肽的表达增加，

并能够使其输送到该转染细胞的表面。

根据本发明第二个实施方式，使用一核酸构建体进行步骤（a）的细胞系转染，该核酸构建体在同一个阅读框内含有编码被称为“辅助膜”的膜蛋白质的核酸序列以及编码目的多肽的目的核酸序列。当然，该编码辅助膜蛋白质的核酸序列和该目的核酸序列被置于调节序列控制下，所述调节序列能够使目的多肽的表达增加，并能够使其输送到该转染细胞的表面。该目的核酸序列可以被置于该编码辅助膜蛋白质的核酸序列之前、之后或之中。在这种实施方式中，该编码辅助膜蛋白质的核酸序列和该编码目的多肽的目的核酸序列彼此可以直接连接起来，或可以用一个或多个相同或不同的连接核酸序列连接起来。其可以是编码相对惰性的肽或多肽的连接序列，该惰性的肽或多肽的目的仅仅是避免辅助膜蛋白质与目的多肽之间的相互作用。连接核酸序列也可以编码参与免疫应答的多肽。作为这样一种连接序列的实例，可以列举下述序列：
GGGGSGGGSGGGGS。

15 用于转染本发明方法步骤（a）的细胞系而使用的核酸构建体有利地包括一种选择基因，例如一种抗生素如新霉素的抗性基因。

用于转染本发明方法步骤（a）的细胞系而使用的核酸构建体，优选地是适合于步骤（a）的转染细胞系的细胞的核酸载体。

本发明的载体的一个具体的实例从其 5'到 3'包括：

- 20 - 启动子，如启动子 $Sr\alpha$ ，
- 前导序列，如小鼠 CD80 的细胞，
- 克隆选择的多位点，其中插入了该目的多肽的基因，
- 连接核苷酸序列，
- 编码膜多肽如小鼠的 CD80 的核苷酸序列，该序列前面可以有前导
- 25 序列之如小鼠 CD80 的前导序列。

根据本发明的方法的特别优选的实施方式，步骤（a）的转染的细胞

系与用于制备抗体的 (i) 或 (ii) 中使用的细胞是自体的、同基因的或同源的。

在步骤 (a) 的细胞系转染后, 有利地, 在表达该辅助膜蛋白质或该目的多肽的步骤 (b) 前, 对该转染子进行分析。

5 因此, 在用该载体转染细胞系并在相应于抗性基因的培养基中选择后, 通过流式细胞仪分析转染子的辅助膜蛋白或目的多肽的表达, 例如使用针对这些多肽的单克隆抗体进行分析。所选的克隆在其表面有目的多肽。

根据本发明方法步骤 (b) 使用的技术, 采用本发明方法制备的抗体
10 可以是多克隆的或单克隆的。

于是, 本发明方法步骤 (b) 的第一种实施方式包括制备针对目的多肽的单克隆抗体。这种实施方式包括使用一种动物细胞的细胞融合技术, 该动物细胞接受了在步骤 (a) 中制备的在其表面表达目的多肽的转染细胞或它们的膜。这些细胞或它们的膜有利地单独地或与一种佐剂配合,
15 分一次或多次施用给动物。在进行免疫前对所述细胞进行放射性照射可有效降低或阻断其分裂机制。在采用本技术领域技术人员熟知的在前面描述的技术使细胞免疫和融合后, 例如采用流式细胞仪, 通过比较表达表面蛋白质的、但用不含目的多肽的载体 (“空白” 载体) 转染的细胞上的附着物与表达表面蛋白质的、且用含目的多肽的载体转染的细胞上的
20 附着物, 可以检测出产生针对目的多肽的单克隆抗体的克隆。

本发明的方法与 Köhler 和 Milstein 的制备杂交瘤细胞的技术相结合特别具有价值, 该技术在小鼠、大鼠或在任何其它种属中以不同的适应性合成出单克隆抗体, 但本发明的方法与任何利用体内 (转基因或非转基因动物) 或体外免疫的方法相结合也特别具有价值。利用完全组织相
25 容性的系统是高度优选的, 但不排除在非组织相容性的系统中使用, 在完全组织相容性的系统中:

- 由于在待免疫的系统与用来进行免疫的系统之间的主要抗原是相同的，免疫系统的价值将是部分保留的，

- 在进行除同种异型抗原或异种抗原以外的筛选方面，其价值实际上也是保留的。

5 因此，本发明方法步骤（b）的第二种实施方式包括将在步骤（a）制备的在其表面上表达目的多肽的转染细胞（例如对 HAT 培养基敏感的 IR983F 或 Sp₂/O 细胞）或所述细胞的膜与产生抗体的细胞进行接触。由此，使用根据 Köhler 和 Milstein 的经典细胞融合技术，但也可使用合成例如人的抗体的转基因动物，且事实上可使用来自未成熟的或记忆 B 淋
10 巴细胞的、产生特异性抗体的任何系统，通过在体内（例如采用人细胞转移到免疫缺陷动物中）或体外培养中用抗原刺激，有可能使一种或多种来自这种免疫应答的 B 淋巴细胞永生，并且达到快速而简单地筛选出来自利用各种技术所得到的克隆。在已经产生所寻求特异性抗体的 B 淋
15 巴细胞的情况下（活化的 B 淋巴细胞，前浆细胞、浆细胞等），下面描述的方法在筛选来自永生细胞的抗体的层面上具有其价值。

本发明的方法的步骤（b）的第三种实施方式包括：

- 由产生抗目的多肽的抗体的 B 细胞，分离出编码的所述抗体的每个链的核酸序列，

- 在宿主中表达所述核酸序列。

20 本发明的方法可以包括在步骤（b）后，通过让所述抗体与下述细胞接触而测试得到的抗体识别目的多肽的能力的试验：

- 步骤（a）中转染的细胞，和/或

- 用与步骤（a）中使用的核酸相同但无目的核酸序列的核酸构建体转染的细胞。

25 本发明的方法的卓越之处在于，它能够使来自同一有机体的细胞永生，例如来自同一人类个体的细胞，可采用非常经典的 Epstein-Barr 病毒

技术使所述人类个体的 B 淋巴细胞永生，且使自同一血样中或自其他时间收集并冻存的、或是自其他能够收集到足够量的来自同一个体的细胞的组织中收集的其它细胞永生。除了永生的细胞，可以使用长寿命的细胞，例如成纤维细胞，来实施本发明的方法。

5 通过选择适合的细胞系和表达系统，本发明的方法能够表达细胞中的抗原，而这些细胞不仅具有与待免疫细胞的 I 类组织相容性，而且还选择表达 II 类组织相容性分子的细胞。在后一种情况下，这些转染细胞能够将抗原的 T 细胞表位，如果它存在的话，呈递给免疫系统的 CD4 T 淋巴细胞。

10 本发明的方法的卓越之处还在于，它不需要认识、也不需要预先制备靶向抗体必须能够与之特异性结合的多肽序列甚或整个分子。事实上，当用适当构建体编码的抗原被呈递给免疫系统时（适当的动物或细胞制备物），抗原本身在体内或在体外系统中被认为是外来的，因此绝大部分抗体实际上是针对该抗原的。不同的理论对于在免疫应答过程中生成的
15 全部或部分抗体是否针对引入免疫系统的抗原持有不同观点。在实际中，当大多数抗体是针对所使用的抗原时，免疫应答被认为是特异性的。在本发明的情况下，抗体可以是针对引入的抗原以及由核酸构建体引入的抗原。通过适当转染获得具有除所研究的抗原外的全部转染细胞抗原的适当对照细胞，可以避免与这个问题相关的缺陷。

20 最后，本发明方法的卓越之处还在于，它能够显著地简化目的抗体的筛选步骤。只需将原细胞系、或用不含有编码所述抗原的核酸的同样核酸构建体转染的细胞系的细胞，与用整合了编码所述抗原的核酸的核酸构建体转染的细胞系的细胞进行对照，比较两者与待试验的培养物上清液中的抗体的结合情况即可。可以使用一类称之 FACS（荧光抗体细胞
25 分析器）的仪器进行这类比较。使用荧光素标记的且能与第一抗体结合用第二抗体可以很容易检测出作为靶向的第一抗体的存在。这类技术在

专门实验室是通常采用的。能给出对照细胞与转染细胞之间差别的所有其它方法都可以采用。

本发明的方法在所有需要产生单克隆抗体或甚至多克隆抗体的领域都可找到应用，它们可以在研究中应用于诊断或治疗。从直接治疗观点来看，本发明的方法可以用于病人免疫，其中必须保证能够严格控制接种于病人的转染细胞的命运。因此，例如使用转染经处理的自体细胞系，或使用所述细胞系的细胞的膜片段，本发明的方法可以用于诱导病人的免疫应答。

本发明还涉及如前面定义的能在本发明方法中使用的核酸构建体。本发明还涉及在本发明方法步骤（a）得到的细胞，以及含有它们的组合物，或含有它们膜的组合物以及含有用本发明方法得到抗体的组合物。最后，本发明涉及施用于一对象的治疗与诊断方法，该方法包括使用编码有治疗或诊断意义的蛋白质的多核苷酸序列，在体内实施本发明的方法。

15 通过阅读下面非限制性地给出实施本发明方法的实施例，将体会到本发明的其它优点与特征。

实施例 I

1) 方法

20 使用质粒 pBJ LL177，采用电穿孔方法转染非分泌的骨髓瘤细胞系 IR983F，该细胞系与 LOU/C 大鼠及其第一代杂种，如 LOU/C X OKAMOTO 和 LOU/C X PVG/C 大鼠是组织相容性的（Azuma M, Cayabyab M, Buck D Phillips JH 和 Lanier LL. CD28 与 B7 相互作用共刺激由小静止性 T 淋巴细胞介导的初级异源增生反应和细胞毒作用。《J. Exp. Med.》，175: 353-360, 1992）。

该质粒（ATCC 号 99595）得自 ATCC，编码人的 CD80，受启动子

SR α 控制 (Takabe Y, Seiki M, Fujisawa JF, Hoy P, Yokota K, Arai KI, Yoshida M 和 Arai N. SR α 启动子: 由猿病毒 40 早期启动子和 1 型人 T-细胞白血病长末端重复的 R-U5 片段组成的高效和多用途的哺乳动物 cDNA 表达系统。《Mol. Cell. Biol. 》, 8: 466-472. 1988)。这种质粒还具有新霉素抗性基因。

电穿孔条件: 在浓度 10 微克/毫升质粒的 500 毫升培养基中 5 百万个细胞接受 300 伏脉冲。

在含有新霉素 (1 毫克/毫升) 的培养基中选择后, 用单克隆抗体抗-CD80 BB1 (Pharmingen)、采用流式细胞仪分析转染子的人 CD80 的表达。得到表面表达人 CD80 最多的克隆。

LOU/C 大鼠接受两次(中间间隔两周)腹膜内注射阳性 IR 983F CD80 (每次注射 2×10^7 个细胞), 该细胞经过铯源辐照, 剂量为 2.5Gy, 并且在第一次注射时细胞经完全弗氏佐剂乳化, 在第二次注射时细胞经不完全弗氏佐剂乳化。第二次免疫后两个周, 免疫动物的血清中出现识别表达人 CD80 的 IR983F、但不识别正常 IR983F 的抗体。

LOU/C 鼠还接受两次(中间间隔两周)足底内注射阳性 IR 983F CD80 (每只爪注射 10^7 个细胞), 该细胞经过铯源辐照, 剂量为 2.5Gy, 并且在第一次注射时细胞经完全弗氏佐剂乳化, 在第二次注射时细胞经不完全弗氏佐剂乳化。第二次免疫后四天, 抽取腓淋巴结 (popliteal ganglia), 这些细胞与 IR983F 融合。

得到了十七株杂交瘤细胞, 这些细胞产生可识别表达人 CD80 的 IR983F、但不识别未转染的 IR983F 的单克隆抗体。三株是同种型(isotype) IgG1, 九株是同种型 IgG2a, 四株是同种型 IgG2b 和一株是同种型 IGM。

这些抗体还能识别同样表达 CD80 的 DAUDI 人 B 细胞系。

2) 结果

上面描述的方法能够得到只是针对膜蛋白质的抗体。为了将这种方

法推广到所有蛋白质中，制备出一种表达载体，它能够使得在 IR983F 表面上表达一种多肽。这种载体从 5'到 3'分别含有：

- 启动子 Sr α ，
- 小鼠 CD80 的引导序列，
- 5 - 克隆位点 Sfi I/Not I，其能够插入编码目的多肽的基因，
- 编码辅助多肽连接链的核酸序列，所述辅助多肽连接链具有基序 GGGGSGGGGSGGGGS，
- 不含有引导序列的小鼠 CD80 的编码部分。该载体还有新霉素抗性基因。

10 在用这种载体转染 IR983F 并在含有新霉素的培养基中选择后，用小鼠单克隆抗-CD80 抗体、采用流式细胞仪分析转染子的小鼠 CD80 的表达。

表达小鼠 CD80 的克隆必然在其表面表达下述多肽序列：

膜-小鼠 CD80-GGGGSGGGGSGGGGS-目的多肽-NH₂。

15 在细胞免疫与融合后，采用流式细胞仪方法，通过比较用“空”载体转染的 IR983F 与用含有与小鼠 CD80 融合克隆的目的序列的载体转染的 IR983F 的抗体附着情况，可以检测产生针对目的多肽的单克隆抗体的克隆，所述的“空”载体中，目的序列没有被克隆，因此不表达小鼠 CD80。

20 实施例 II

经 Sfi I/Not I 限制性消化后，将编码炭疽杆菌保护性抗原的前 250 个氨基酸的核酸序列（编码炭疽杆菌保护抗原的 DNA 序列与分析。Welkos SL, Lowe JR, Eden-McCutchan F, Vodkin M, Lppla SH, Schmitt JJ. 《基因》 69:287, 1988）克隆入上述表达载体中。

25 采用“空”表达载体或者含有炭疽杆菌基因的表达载体转染 IR983F 细胞。

在含有新霉素（1 毫克/毫升）的培养基中选择后，得到了表达小鼠 CD80 的转染子，可使用单克隆抗体 MCA 1586F（Serotec），采用流式细胞仪方法检测这些转染子。

得到表面表达人 CD80 最多的克隆。

5 然后使用这些转染子对动物进行免疫。

例如，LOU/C 大鼠接受两次（中间间隔两周）足底内注射阳性 IR 983F-CD80（每只爪 10^7 个细胞），该细胞是经含有炭疽杆菌基因的表达载体转染的，且在第一次注射时经完全弗氏佐剂乳化，在第二次注射时经不完全弗氏佐剂乳化。第二次免疫后四天，收集腭淋巴结，将这些细
10 胞与 IR983F 融合。

由此得到了杂交瘤细胞，其产生的单克隆抗体可识别被含有炭疽杆菌基因的载体转染的阳性 IR983F-CD80，但不识别只是被“空”载体转染的阳性 IR983F-CD80。

15 实施例 III

1) 方法

使用质粒 pBJ CD94，采用电穿孔方法转染非分泌的骨髓瘤细胞系 IR983 F。通过代替质粒 pBJ LL177 中克隆的 CD28 基因，构建这种质粒。这种质粒还具有新霉素抗性基因。

20 电穿孔条件：在含有浓度为 10 微克/毫升的质粒的 500 微升培养基中的 5 百万个细胞接受 300 伏脉冲。

在含有新霉素（1 毫克/毫升）的培养基中选择后，用 HP-3D9 抗-CD94 单克隆抗体（Pharmingen）、采用流式细胞仪分析转染子的人 CD94 的表达。得到表面表达人 CD94 最多的克隆。

25 LOU/C 大鼠接受两次（中间间隔两个月）腹膜内注射阳性 IR 983F CD80（每次注射 2×10^7 个细胞），该细胞经过铯源辐照，剂量为 2.5Gy，

且在第一次注射时经完全弗氏佐剂乳化，并在第二次注射时经不完全弗氏佐剂乳化。第二次免疫后两周，经过免疫的动物的血清出现识别表达人的 CD94 的 IR983F、但不识别正常 IR983F 的抗体。

LOU/C 大鼠还接受两次（中间间隔两周）足底内注射阳性 IR 983F CD94（每只爪 10^7 个细胞），该细胞经过铯射线辐照，剂量为 2.5Gy，且在第一次注射时经完全弗氏佐剂乳化，并在第二次注射时经不完全弗氏佐剂乳化。第二次免疫后四天，抽取腩淋巴结，将这些细胞与 IR983F 或表达人 CD94 的 IR983F 融合。

通过将 2 千 6 百万淋巴结细胞与 IR983F 进行融合，得到八株产生人抗-CD94 单克隆抗体、但不识别非转染 IR983F 的杂交瘤细胞。通过将 2 千万淋巴结细胞与表达人 CD94 的 IR983F 进行融合，得到十七株产生人抗-CD94 抗体的杂交瘤细胞。

所有这些抗体均同时识别 IR983F CD94 和表达 CD94 的人 NK。

这些克隆的同种型是 3 株 IGM, IgG1, 15 株 IgG2a, 5 株 IgG2b, 1 株 IgG2c。

使用表达人配体 CD134 的 IR983F 作为免疫细胞系。通过将 3 千万淋巴结细胞与 IR983F 进行融合，得到四株产生抗-CD134L 抗体的杂交瘤细胞。使用 3 千万表达人 CD134 的细胞进行融合时，得到十株产生抗-CD134L 抗体的杂交瘤细胞。所有这些抗体均同时识别 IR983F CD134L 和表达 CD134L 的人 B 淋巴细胞。

实施例 IV

例如采用 Dounce 匀浆方法得到 IR983F 膜 (Koizumi K, Shimizu KT, Nishida K, Sato C, Ota K, Yamamada N. 《Biochim-Biophys. Acta》, 649: 393-403, 1981)。

LOU/C 大鼠接受三次皮下注射相当于 4 千万表达人 CD70 的 IR983F

细胞，每次间隔两天。

在第一次注射后十天，采用流式细胞仪，在经过免疫的动物的血清中检测到特异性识别表达人 CD70 的 IR983F 细胞的单克隆抗体。

5 实施例 V

使用 SP₂/O 细胞作为能在本发明方法的步骤 (a) 株被转染的细胞系，可以实施本发明的方法。

这个具体实施方式的实施例描述如下：

材料

10 完全的 RPMI 培养基

- 一瓶 500 毫升 RPMI

- 5 毫升 L-谷氨酰胺

- 500 微升庆大霉素 (50 毫克/毫升)

电穿孔培养基 (适量至 300 毫升，无菌蒸馏水)

15 - 0.3M 肌醇 (16.2 克)

+ 1 毫摩尔磷酸二氢钾 (40.82 毫克)

+ 0.1 毫摩尔醋酸钙 (4.74 毫克)

+ 0.5 毫摩尔醋酸镁 (32.17 毫克)。

后-电穿孔培养基 (适量至 300 毫升，无菌蒸馏水)

20 132 毫摩尔氯化钠 (2.13 克)

+ 8 毫摩尔氯化钾 (178.9 克)

+ 10 毫摩尔磷酸二氢钾 (408 毫克)

+ 0.1 毫摩尔醋酸钙 (4.74 毫克)

+ 0.5 毫摩尔醋酸镁 (32.17 毫克)。

25 方法

- 自培养瓶取样进行 SP₂/O 细胞计数。

- 收集 1×10^7 个细胞。
- 将收集的细胞在 1300rpm 下离心 5 分钟。
- 在 37°C 下将沉淀物重悬在 1 毫升电穿孔缓冲液中。
- 根据这种情况添加 10 微克 CD40L 或添加质粒 CD94。用最初克隆
- 5 在 BCMGSneo-TRAP 中的 CD40L 基因取代质粒 PBJ LL177 中的克隆的 CD28 基因，由此构建质粒 PBJ-CD40L (TRAP 克隆，人 T 细胞 CD40 的配体。《Eur. J. Immunol. 》，22: 3191-3194. 1992)。
- 得到的悬浮液用加压抽吸进行匀浆。
- 收集 400 微升悬浮液。
- 10 - 在 400 微升锥形管中，在 350V、5ms、一次脉冲条件下，在存在所述质粒的情况下，对细胞悬浮液进行电穿孔。
- 往管中添加 1 毫升 37°C 的后-电穿孔培养基。
- 该悬浮液在室温下培养 10 分钟。
- 收集管中内容物，将这些细胞悬浮液重悬在无酚红的 RPMI 培养基
- 15 (Invitrogen) 中。

然后，这些细胞再按照每孔 200 微升的量分配在 96 孔培养板中。

将它们在含 5%CO₂ 的空气中于 37°C 培养 24 小时。

通过每孔添加 150 微升含有 0.5 毫克/毫升遗传霉素 (Geneticin) (Invitrogen) 的完全 RPMI 培养基 (Invitrogen)，对培养基进行更换。

- 20 这些细胞再在 5%CO₂ 气氛下于 37°C 培养。

由此得到经质粒转染的细胞 (具有遗传霉素抗性)。

根据这种情况，采用 FACS 分析经该质粒转染的细胞，以便测定 CD40L 或 CD94 在膜上的表达。

结果

- 25 由按照上述方法进行的实验可得到：

- 一个表达 CD40L 的转染的 SP₂/O 克隆 (SP₂/O-CD40L)

- 三个表达 CD94 的 SP₂/O 克隆 (SP₂/O-CD94-F4, SP₂/O-CD94-F1 和 SP₂/O-CD94-D2)。

<110> 泰克诺法姆公司
 <120> 抗体制备与筛选方法
 <130> 11379PCT
 <140> PCT/FR01/xxxxxxx
 <141> 2002-04-03
 <150> FR01/04525
 <151> 2001-04-03

 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220> ,
 <221> 其他_特征
 <222> (1)..(15)
 <223> 避免辅助膜蛋白与目的多肽之间发生相互作用的连接链的实例

 <400> 1

 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

专利名称(译)	抗体制备与筛选方法		
公开(公告)号	CN1511163A	公开(公告)日	2004-07-07
申请号	CN02807746.6	申请日	2002-04-03
[标]发明人	埃尔韦巴赞 杨尼克尼泽		
发明人	埃尔韦·巴赞 杨尼克·尼泽		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 C07K16/00		
CPC分类号	C07K2319/02 C07K16/2827 A61K2039/505		
代理人(译)	林晓红		
优先权	2001004525 2001-04-03 FR		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的是一种抗体制备方法，该方法包括下述步骤：a)用一种核酸构建体转染细胞系，该核酸构建体含有编码表达于所述细胞系的细胞表面的目的多肽的目的核酸序列，b)用步骤(a)中制备的细胞或用该细胞的膜制备针对目的多肽的抗体。