

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 5/18

C07K 16/18

G01N 33/53



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410093480.7

[43] 公开日 2005 年 7 月 27 日

[11] 公开号 CN 1644685A

[22] 申请日 2004.12.23

[21] 申请号 200410093480.7

[71] 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市邯郸路 220 号

[72] 发明人 朱乃硕 李 瑞

[74] 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

代理人 陆 飞 盛志范

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 抗人心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体及其应用

[57] 摘要

本发明涉及一种抗人心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 的单克隆抗体及其杂交瘤细胞系, 特点是特异性敏感性高, 制备方法简单。本发明的单克隆抗体能识别人心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 的 N - 端稳定区段即 28 - 42 氨基酸肽段 S<sub>28-42</sub> 的不同抗原决定簇。本发明的单克隆抗体可以用于诊断伴随 cTnI 特异性升高的疾病如心肌梗塞、心绞痛以及心肌炎等的试剂盒的制备。

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

1. 一种能持续稳定分泌抗人心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体的杂交瘤细胞系：6G3、6A6 和 5H9，它们由下述步骤获得：采用基因工程表达并纯化的人心肌肌钙蛋白 I 免疫小鼠，取其腺细胞与鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 进行融合，筛选出具有稳定抗体滴度的克隆。

2. 一种制备权利要求 1 所述的杂交瘤细胞系的方法，其特征在于采用基因工程表达并纯化的人心肌肌钙蛋白 I 免疫小鼠，取其脾细胞与鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 进行融合，筛选出能稳定分泌抗人心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体的杂交瘤细胞。

3. 一种产生上述抗人心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的方法，其特征在于对权利要求 1 所述的杂交瘤细胞用常规培养液培养，或者用同系小鼠体内诱生法，获得抗人心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体。

4. 如权利要求 3 所述的抗人心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体在制备心肌损伤检测用试剂盒中的应用。

## 抗人心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体及其应用

### 技术领域

本发明涉及一种新的抗人心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 单克隆抗体及其应用。

### 背景技术

急性心肌梗死 (AMI) 是一种发病急、病情危重的疾病, 需要实验室诊断快速、准确, 而检测心肌肌钙蛋白具有方便快捷、敏感性高、特异性强、持续时间长等优点。1987 年, Cummins 等首次报道了使用放射免疫法测定周围血中心肌肌钙蛋白浓度诊断急性心肌梗死。cTnI 仅在心肌中表达, 血液中其浓度增高, 则高度特异性地表明心肌损伤。因此 cTnI 是心肌特异的抗原。cTnI 对 AMI 的诊断其敏感性与特异性均超过广泛使用的 CK-MB 等标志物, 是一种新的心肌损伤特异性标记物。

cTnI 本身生化性质的复杂性和在患者外周血的存在形式, 使得 cTnI 检测试剂的测定值之间存在着差异。如美国临床病理学会 (CAP) 在 1997 年对检测 cTnI 的 Access、OpusPlus 和 Stratus 三个系统进行调查, 结果发现平均 cTnI 浓度由于使用的分析系统差异而有实质性的不同。Access 的测定值最低, 有些甚至比 OpusPlus 结果低 20 倍。造成对同一份样品测量差异的原因之一是试剂盒中提供的抗体识别不同的决定簇。cTnI 仅具有弱的免疫原性, 增加了制备单克隆抗体的难度。在 AMI 病人中 90% 以上 cTnI 以 cTnI - TnC 复合物形式存在, N-端和 C-端对蛋白水解酶作用敏感易受蛋白水解酶作用, 最稳定区域在 28~110 氨基酸残基之间, 能够识别这段稳定区的抗体可以提高 cTnI 检测的敏感性和可重复性, 有助于提高 cTnI 检测的标准化, 制备针对人心肌肌钙蛋白 I 特定区段抗原决定簇的单克隆抗体具有很强的实用价值和广阔的市场前景。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种特异性高的抗人心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体。

本发明的另一目的是提供一种能产生特异性高的抗人心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

本发明的目的是这样实现的:

采用基因工程表达并纯化的人心肌肌钙蛋白 I 免疫小鼠。取其腺细胞与鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 进行融合, 筛选出具有稳定抗体滴度的克隆, 得到能稳定分泌抗人肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体的杂交瘤细胞系 6G3、6A6 和 5H9。其中 6G3、6A6 为 IgG<sub>1</sub>, 5H9 为 IgG<sub>2b</sub>。

对上述杂交瘤细胞用常规培养液培养, 可大量生产抗人心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体; 也可使用同系小鼠体内诱生法, 分泌获得抗人心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体。

本发明的抗人心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体具有稳定性好、特异性高的优点。该单克隆抗体能识别 cTnI 的 N-端稳定区段即 28-42 氨基酸肽段的不同抗原决定簇，利用此特点，可用于制作心肌损伤检测试剂盒。该试剂盒可用诊断伴随 cTnI 特异性升高的疾病，如心肌梗塞、心绞痛、心肌炎等疾病。

下面对本发明作进一步介绍。

1. 免疫小鼠：由于 cTnI 分子量小，没有种属特异性，动物间免疫反应弱，我们采用小剂量、长时程免疫方法，并采用了脾内免疫，以达到较好的免疫效果。用基因工程表达并纯化的人心肌肌钙蛋白 I 免疫 BALB/c 小鼠，免疫方案如下：

免疫次数	间隔时间	免疫剂量	免疫途径
第一次免疫		50 $\mu$ g/400 $\mu$ l/只	腹腔注射
第二次免疫	14 天	30 $\mu$ g/100 $\mu$ l/只	脾内注射
第三次免疫	10 天	60 $\mu$ g/200 $\mu$ l/只	皮下多点注射
第四次免疫	14 天	60 $\mu$ g/200 $\mu$ l/只	皮下多点注射
冲击免疫	30 天	30 $\mu$ g/100 $\mu$ l/只	尾静脉注射

2. 骨髓瘤细胞的准备：在细胞融合 7—10 天前复苏骨髓瘤细胞 SP2/0，保证细胞在融合时正处于对数生长期，活力最好。

3. 细胞融合：冲击免疫后三天进行融合。在融合前一天，取 6—8 周大的 BALB/c 小鼠拉颈处死，按照无菌操作规程取腹腔巨噬细胞和脾细胞作为滋养细胞铺 96 孔培养板。一天后，取免疫小鼠的脾脏获得脾细胞，用 1640 培养液洗涤一次。将上述培养的骨髓瘤细胞 SP2/0 离心后用 1640 培养液洗涤一次后与所取脾细胞混合，细胞数目之比约为 1:8—1:12，再离心洗涤一次，去上清，充分分散沉淀物，向沉淀物中按体积比 1:1.5—1:2.5 加入浓度为 50% 的聚乙二醇 1000，摇 0.5-2 分钟，再静置一分钟后离心去上清液，再加入合适体积的 HAT 培养基，将融合细胞按 100 $\mu$ l/孔加入至 96 孔细胞培养板中。将该板放置在浓度为 5% 的二氧化碳培养箱中，37 $^{\circ}$ C, 100% 湿度下培养，从第五天开始，每隔 2—3 天每孔半量换液一次。

当每孔内细胞增殖到铺满一半底部面积的时候，取培养上清液，用 ELISA 方法检测抗人心肌肌钙蛋白 I 抗体滴度。将抗人心肌肌钙蛋白 I 抗体阳性、滴度高的杂交瘤细胞转移到另一块 96 孔板中进行克隆化。该杂交瘤细胞通过有限稀释使平均每空孔中只含有一个单一杂交瘤细胞，进行克隆化培养。克隆过程中采用 1640 完全培养基，并用 ELISA 检测克隆细胞孔上清培养液中抗体滴度。对抗体滴度高的孔继续进行克隆 2-4 次，直至所有

克隆孔均成阳性，筛选具有稳定抗体滴度的克隆作为产生抗人心肌肌钙蛋白 I 抗体的杂交瘤细胞系。

4. 单克隆抗体的制备：用常规培养液培养上述的杂交瘤细胞，可大量生产单克隆抗体。或使用同系小鼠体内诱生法，将一定杂交瘤细胞注入小鼠腹腔中，在注射一周前，用石蜡油注射该小鼠。这样杂交瘤细胞就在小鼠腹腔中繁殖，大量分泌抗人心肌肌钙蛋白 I 抗体，2-3 周后一次或多次收集腹水，离心除去固体成分，其上清液即含有抗人心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体。通过正辛酸法或 Protein A 亲和层析法进一步纯化抗人心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体。

### 具体实施方式

以下实施例将有助于本领域的普通技术人员进一步理解本发明，但不以任何形式限制本发明。

1. 免疫小鼠：用实验室基因工程表达并纯化的人心肌肌钙蛋白 I 蛋白免疫 BALB/c 小鼠，第一次腹腔注射，每只 50  $\mu$ g；第二次脾内免疫，每只小鼠 30  $\mu$ g；此后采用皮下多点注射，每只小鼠 60  $\mu$ g。用 ELISA 测血清抗体滴度，达到一定值后，冲击免疫一次，三天后取免疫小鼠的脾细胞以备融合。

2. 骨髓瘤细胞的准备：在细胞融合 7-10 天前复苏 SP2/0 肿瘤细胞，保证细胞在融合时正处于对数生长期，活力最好。

3. 细胞融合：在融合前一天，取 6-8 周大的 BALB/c 小鼠拉颈处死，按照无菌操作规程取腹腔巨噬细胞和脾细胞作为滋养细胞。一天后，取免疫小鼠的脾脏获得脾细胞，用 1640 培养液洗涤一次。将上述培养的骨髓瘤细胞 SP2/0 离心后用 1640 培养液洗涤一次后与所取脾细胞混合，细胞数目之比约为 1:10，再离心洗涤一次，去上清，充分分散沉淀物，向沉淀物中按体积比 1:2 加入浓度为 50% 的聚乙二醇 PEG1000，摇一分钟，再静置一分钟后离心去上清液，再加入合适体积的 HAT 培养基，将融合细胞按 100  $\mu$ l/孔加入至 96 孔细胞培养板中。将该板放置在浓度为 5% 的二氧化碳培养箱中，在温度为 37 $^{\circ}$ C 中培养，从第五天开始，每隔 2-3 天用每孔半量 HAT 液换液一次。

当每空内细胞增殖到铺满一半底部面积的时候，取培养液上清，用 ELISA 测抗人心肌肌钙蛋白 I 抗体滴度。将抗人心肌肌钙蛋白 I 抗体阳性、滴度高的杂交瘤细胞转移到另一块 96 孔板中进行克隆。通过一种经有限稀释该杂交瘤细胞使一孔中只含有一个单一杂交瘤细胞进行克隆化培养。克隆过程中采用 1640 培养液，并用 ELISA 检测克隆细胞孔上清培养液中抗体滴度。对抗体滴度高的孔继续进行克隆 3 次，直至所有克隆孔均成阳性，筛选具有稳定抗体滴度的克隆作为产生抗人心肌肌钙蛋白 I 抗体的杂交瘤细胞系 6G3、6A6、

5H9。

4. 单克隆抗体的制备：用常规培养液培养上述的杂交瘤细胞。大量生产单克隆抗体，使用同系小鼠体内诱生法。将一定杂交瘤细胞注入同系小鼠腹腔中，在注射一周前，用石蜡油注射该小鼠，这样杂交瘤细胞就在小鼠腹腔中繁殖，大量分泌抗人心肌肌钙蛋白 I 抗体，2 至 3 周后收集腹水，离心除去固体成分，其上清液即含有抗人心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体。通过 Protein A 亲和层析法进行纯化。

5. ELISA 分别用天然 cTnI 蛋白和表达的人心肌肌钙蛋白 I 以及合成的 N 端一段稳定区 28-42 氨基酸肽段 S<sub>28-42</sub> 作为抗原，用间接 ELISA 方法检测杂交瘤培养上清，筛选阳性克隆。

6. 结果：

采用小剂量、长时程免疫方法，以及脾内免疫方法用基因工程表达的人心肌肌钙蛋白 I 免疫 BALB/c 小鼠，融合鼠脾细胞和骨髓瘤细胞；采用 ELISA 鉴定筛选阳性克隆并连续克隆化直至 100% 孔阳性，得到 3 株能稳定分泌抗人心肌肌钙蛋白 I N-端稳定区的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株，分别为 6G3、6A6 和 5H9。

7. 通过以下方法进行抗人 cTnI 单克隆抗体的特异性鉴定：

(1) ELISA 结果 杂交瘤细胞株 6G3、6A6 和 5H9 的培养上清均与基因工程表达的 cTnI 蛋白和天然 cTnI 蛋白反应，用合成的 cTnI 的 N-端肽 S<sub>28-42</sub> 检测，三种杂交瘤细胞株也都与 S<sub>28-42</sub> 反应。说明该三株杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体针对 cTnI 蛋白稳定区段。

其中，肽段 S<sub>28-42</sub> 的序列如下：CAYATEPHAKKKSKIS-NH<sub>2</sub>。

(2) Western blot 结果 用基因工程表达 cTnI 蛋白和天然 cTnI 蛋白作为抗原，三株抗体分别做为一抗，经 Western blot 鉴定在分子量为 28 KU 处有特异性抗原-抗体结合的条带。进一步证明杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体是特异性结合 cTnI 蛋白的单克隆抗体。

(3) 竞争 ELISA 结果 用天然 cTnI 蛋白作为抗原用竞争 ELISA 测定三株单抗之间的增值反应。三种单抗相互之间都有明显的增值反应。说明三种单克隆抗体针对 cTnI 上不同的抗原决定簇。

8. 具体应用：

(1) 利用三株单克隆抗体能够分别识别 cTnI 蛋白不同抗原决定簇的特点，可以用于心肌损伤检测试剂盒的开发。具体实施如下：可以用与鼠异源（如兔）的多克隆抗体包被，把三种单克隆抗体用生物素标记后选择其中之一用于检测从而制备成心肌损伤检测试剂盒。或者选用一种单克隆抗体作为捕捉抗体，另一种生物素标记的单克隆抗体作为检测抗体制备成为检测试剂盒。

(2) 病人血清检测：采用双抗夹心 ELISA 法检测病人血清。用纯化的大鼠多抗包被酶标板，加入待检测心肌损伤病人血清样本及正常人对照血清样本，然后依次加入生物素标记 6G3 抗体，HRP 标记的链霉亲和素，显色。对于检测样品，结果和实际结果符合率为 96%。

组别	样本数量	阳性	阴性	备注
正常人血清	10	—	10	检测 OD<0.08 为阴性
AMI 病人血清	12	11	1	检测 OD>0.15 为阳性

专利名称(译)	抗人心肌肌钙蛋白I单克隆抗体及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN1644685A</a>	公开(公告)日	2005-07-27
申请号	CN200410093480.7	申请日	2004-12-23
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学		
申请(专利权)人(译)	复旦大学		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学		
[标]发明人	朱乃硕 李瑞		
发明人	朱乃硕 李瑞		
IPC分类号	C07K16/18 C12N5/18 G01N33/53		
代理人(译)	陆飞		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种抗人心肌肌钙蛋白I(cTnI)的单克隆抗体及其杂交瘤细胞系，特点是特异性敏感性高，制备方法简单。本发明的单克隆抗体能识别人心肌肌钙蛋白I(cTnI)的N-端稳定区段即28-42氨基酸肽段S28-42的不同抗原决定簇。本发明的单克隆抗体可以用于诊断伴随cTnI特异性升高的疾病如心肌梗塞、心绞痛以及心肌炎等的试剂盒的制备。

组别	样本数量	阳性	阴性	备注
正常人血清	10	-	10	检测 OD<0.08 为阴性
AMI 病人血清	12	11	1	检测 OD>0.15 为阳性