

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 9/00

C12P 21/08 C07K 16/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99121250.9

[43] 公开日 2001 年 5 月 9 日

[11] 公开号 CN 1294192A

[22] 申请日 1999.10.22 [21] 申请号 99121250.9

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街 159 号

[72] 发明人 赵大庆 陈 馥 廉革伟 林 凤
丁 兰 刘 仔 倪嘉纛

[74] 专利代理机构 中国科学院长春专利事务所

代理人 曹桂珍

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 具有甲状腺素 5' 脱碘酶活力抗体酶的制备

[57] 摘要

本发明属于具有甲状腺素 5' 脱碘酶活力抗体酶的制备方法。该方法以甲状腺素为半抗原,通过共价交联的方法,与牛血清白蛋白连接,制备成全抗原,采用单克隆抗体技术,制备具有甲状腺素结合能力的抗体,通过化学修饰,将甲状腺素脱碘酶的催化中心 - SeH 引入到抗体的抗原结合部位,赋予其甲状腺素脱碘酶的活性。制得的抗体酶稳定性好,活力达 290U/mgPr。

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

知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

1. 一种具有甲状腺素 5'脱碘酶活力抗体酶的制备方法，其特征在于采用以下步骤完成：

A.全抗原的制备

将 T4 与牛血清白蛋白以 30—50:1(摩尔比)的比例溶解于 pH8—11 的 Tris-HCl 缓冲液中，其中，T4 浓度为 1—5mg/ml 搅拌，逐渐滴加戊二醛，反应 10—24 小时，加入甘氨酸终止反应，除盐，冻干；

B.单克隆抗体的制备

a.免疫小鼠

将抗原 1-3mg/ml 与福氏完全佐剂 1:1 混合，摇匀，每只 Bab/c 小鼠注射 100—300 μ l，两周后进行二次免疫，第四到十周每隔两周以福氏不完全佐剂免疫，用 ELISA 检测抗体；

b.融合及抗体制备

拉颈法处死小鼠，取脾脏，无菌条件下在预先放置培养液的平皿中去除脂肪组织，压碎，吸取细胞悬液，离心，弃上清，用完全培养液反复洗涤，得到 $0.5-1.5 \times 10^8$ 个脾细胞，加入 0.1—0.5 倍数量的骨髓瘤细胞，混合，离心，弃去上清的培养液，吸取 1ml 聚乙二醇 (PEG) /二甲亚砜 (DMSO) 加入细胞中，混合 1 分钟；

将含有 PEG 的细胞悬液反复洗涤，加入选择培养基，在培养板上 37 度、5%二氧化碳浓度下培养，一周后镜检，对明显的细胞集落孔进行 ELISA，取阳性孔梯度稀释，扩大培养，进行初次克隆化，

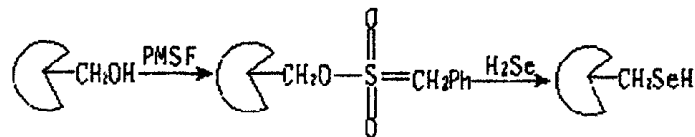
反复克隆化 3—5 次，获得单细胞克隆，将 $0.5-1.5 \times 10^6$ 的杂交瘤细胞注入 Bab/C 小鼠腹腔或采用体外培养法，在培养瓶中，得到腹水或培养上清；

c. 分离提纯抗体

将腹水或体外细胞培养液离心，取上清采用亲和层析或离子交换柱提纯抗体，冻干；

C. 抗体酶的制备

将提纯的抗体冻干粉 5—10mg 溶解在 1ml 除氧的 pH6—8 的磷酸缓冲液中，加入 10—30 μ l 20mg/ml 的苯甲基磺酰氟的乙腈溶液，



室温振荡 0.5—1 小时，加入 50—200 μ l 预先除氧的 1MNaHSe 溶液，30—40 度在氮气保护下反应 20—40 小时，将反应液离心，除盐后冻干，制得抗体酶冻干粉。

2

说 明 书

具有甲状腺素 5'脱碘酶活力抗体酶的制备

本发明属于具有甲状腺素 5'脱碘酶活力抗体酶的制备方法。

甲状腺素是人体的一种必须激素，甲状腺素与临床上许多疾病相关。人体内的甲状腺素以两种活性形式存在：3,5,3',5'-四碘甲状腺素原氨酸(T₄)和 3,5,3'-三碘甲状腺素原氨酸(T₃)。T₃ 的生物学活性是 T₄ 的 8 倍，是体内活性甲状腺素的主要形式。所有外周组织和血液中的 T₄ 都由甲状腺合成，T₃ 有 85%以上来自于外周组织的甲状腺素 5'脱碘酶的催化产物。可见甲状腺素 5'脱碘酶对于甲状腺素发挥生理功能具有重要意义。目前，人们共发现三种甲状腺素脱碘酶，其中，I 型甲状腺素脱碘酶 (IT45'D) 是一种含硒的膜蛋白，广泛存在于肝、肾、甲状腺、肌肉等部位，大部分 T₃ 都由这种酶催化产生。1990 年，有报道采用凝胶电泳法从相关组织中分离到了 IT45'D。采用放射性同位素 Se75 标记，发现 IT45'D 是一种含硒酶。1991 年 Berry 等 (Nature, 1991, 349: 438-440) 在蟾蜍卵母细胞中运用克隆表达技术从鼠肝中分离到了 IT45'D 的互补 DNA，其中含有一个 TGA 密码子来编码硒代半胱氨酸。IT45'D 中的硒以硒代半胱氨酸形式存在，并且是酶催化的必须氨基酸。抗体酶是 80 年代后期发展起来的新的研究领域。它将免疫球蛋白的可变区赋予了酶的属性，是具有催化活性的抗体蛋白。1986 年，在单克隆抗体技术的基础上，Schultz 和

Lerner 才分别报道了首例具有水解酶活性的单克隆抗体。在短短十几年中，抗体酶催化的反应已达到了 70 多种。疏水腔修饰法是抗体酶设计的最新思想。中国专利 96112628.0 公开了丁兰等人利用这种方法首次成功地制备出比天然酶活力高八倍的具有 GSH-Px 活力的抗体酶，采用谷胱甘肽衍生物为半抗原，以戊二醛共价交联到牛血清白蛋白上，得到抗原结合部位存在疏水腔的与抗原具有强结合力的抗体，将催化中心通过化学诱变的方法，引入抗原结合部位，使抗体具有 GSH-Px 活性。

本发明的目的是提供一种具有甲状腺素 5'脱碘酶活力抗体酶的制备方法。该方法以甲状腺素为半抗原，与牛血清白蛋白连接，免疫小鼠，制备具有与甲状腺素结合能力的抗体，通过化学修饰，将 IT45'D 催化中心引入抗体，获得具有 IT45'D 活力的抗体酶。

天然甲状腺素侧链为两个卤代的苯环，具有在抗体的抗原结合部位诱导出疏水结合环境的能力，本身就是很好半抗原分子。由于天然甲状腺素不具备免疫原性，不能刺激动物产生抗体，所以首先将甲状腺素通过戊二醛连接到牛血清白蛋白上，选择个体较小，免疫机理较为清晰，免疫过程相对简单、易于操作的纯系 Bab/C 小鼠为免疫对象，通过对小鼠免疫，刺激免疫细胞，使其分泌具有甲状腺素结合能力的抗体。为使免疫细胞的快速分裂，以便于大规模制备抗体，将小鼠免疫细胞与骨髓瘤细胞融合制备杂交瘤细胞进行克隆化，得到分泌目的抗体的单细胞克隆。将得到的细胞株扩大培养，注射入小鼠腹腔，从小鼠腹腔中制备含有目的抗体的腹水。通过亲

和层析分离纯化，提纯目的抗体。根据甲状腺素脱碘酶的催化中心的结构，将得到的具有甲状腺素结合力的抗体通过化学修饰，以苯甲基磺酰氟将抗体甲状腺素结合部位的丝氨酸的羟基活化，与硒氢化钠反应，将 $IT_45'D$ 的催化中心 $-SeH$ 引入抗体的甲状腺素结合部位，赋予抗体 $IT_45'D$ 的活力。本发明的制备具体步骤如下：

A. 全抗原的制备

将 T4 与牛血清白蛋白以 30—50:1(摩尔比)的比例溶解于 pH8—11 的 Tris-HCl 缓冲液中，其中，T4 浓度为 1—5mg/ml 搅拌，逐渐滴加戊二醛，反应 10—24 小时，加入甘氨酸终止反应，除盐，冻干。

B. 单克隆抗体的制备

a. 免疫小鼠

将抗原 1-3mg/ml 与福氏完全佐剂 1:1 混合，摇匀，每只 Bab/c 小鼠注射 100—300 μ l，两周后进行二次免疫，第四到十周每隔两周以福氏不完全佐剂免疫，用 ELISA 检测抗体。

b. 融合及抗体制备

拉颈法处死小鼠，取脾脏，无菌条件下在预先放置培养液的平皿中去除脂肪组织，压碎，吸取细胞悬液，离心，弃上清。用完全培养液反复洗涤，得到 $0.5-1.5 \times 10^8$ 个脾细胞。加入 0.1—0.5 倍数量的骨髓瘤细胞，混合，离心。弃去上清的培养液，吸取 1ml 聚乙二醇 (PEG) /二甲亚砷 (DMSO) 加入细胞中，混合 1 分钟。

将含有 PEG 的细胞悬液反复洗涤，加入选择培养基，在培养板上 37 度、5%二氧化碳浓度下培养。一周后镜检，对明显的细胞集

落孔进行 ELISA，取阳性孔梯度稀释，扩大培养，进行初次克隆化。反复克隆化 3—5 次，即可获得单细胞克隆。

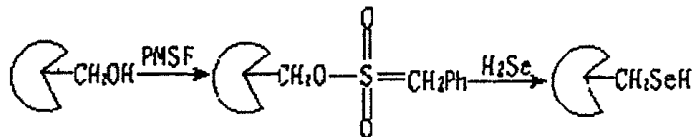
将 $0.5-1.5 \times 10^6$ 的杂交瘤细胞注入 Bab/C 小鼠腹腔或采用体外培养法，在培养瓶中，得到腹水或培养上清。

c. 分离提纯抗体

将腹水或体外细胞培养液离心，取上清采用亲和层析或离子交换柱提纯抗体，冻干。

C. 抗体酶的制备

将提纯的抗体冻干粉 5—10mg 溶解在 1ml 除氧的 pH6—8 的磷酸缓冲液中，加入 10—30 μ l 20mg/ml 的苯甲基磺酰氟的乙腈溶液，



室温振荡 0.5—1 小时，以氮气为载体通入 H_2Se 气体 10 分钟或加入 50—200 μ l 预先除氧的 1MNaHSe 溶液，30—40 度在氮气保护下反应 20—40 小时。将反应液离心，除盐后冻干。即制得抗体酶冻干粉。

人们过去一直认为硒蛋白在体内只是起到清除自由基和过氧化物的功能，IT45'D 的发现又为硒蛋白和硒在人体内的功能研究提供了新的研究领域。天然 IT45'D 由于具有亲脂性、含量低等特点，使其分离提纯困难，大大限制了其研究和应用，直到目前，人们对其机理的认识还只是一个假说。IT45'D 的人工模拟酶的出现，对硒在该酶中所起到的作用及机理的假说提供了重要的证据。临床上的

亚急性克汀病的症状之一就是体内 T4 含量高，而 T3 含量低，从而对整个机体的代谢产生影响。少数地方性甲状腺肿的患者在补充了碘之后，症状仍得不到缓解，这些都被认为与甲状腺素 5'脱碘酶相关。天然酶不仅很难得到，而且稳定性差，使其临床应用和研究受到了限制。抗体酶具有稳定性好，易大规模制备等特点，为相关疾病治疗提供了一种可行的途径。

本发明提供的实施例如下：

实施例 1:

(1) 全抗原的合成

将 T41mg 与牛血清白蛋白以 50:1 (摩尔比)的比例溶解于 pH9.0 20mmol/L 的 Tris-HCl 的缓冲液中，搅拌，逐渐滴加等摩尔比的 1ml 戊二醛溶液，反应 12 小时，加入 1ml10mmol/L 甘氨酸终止反应，用 20mmol/L pH 7.4 磷酸缓冲液透析过夜，用紫外光谱测定半抗原连接量，每个牛血清白蛋白连接 30 个半抗原分子，冻干保存。

(2) 单克隆抗体的制备

a. 免疫

将全抗原 2mg/ml 与福氏完全佐剂以 1:1 的比例混合，摇匀，每只 Bab/c 小鼠注射 200 μ l，两周后进行二次免疫，每隔两周以福氏不完全佐剂免疫一次，融合前三天加强免疫。

b. 抗体的检测

将酶标板每孔加入 100 μ l5%戊二醛溶液，37 度保温 15min，洗涤，拍干。加入 100 μ l 1mg/ml 的 T4 溶液，保温 1 小时。每孔加入 200 μ l

的 0.1mg/ml 的牛血清白蛋白溶液，保温 1 小时。加入待测血清或腹水，保温 1 小时。每孔加入一个活力单位的酶标二抗，保温 1 小时。加入底物反应液 100 μ l, 37 度反应半小时，每孔加入 50 μ l 2mmol/L 硫酸溶液终止反应，用酶标仪检测。

c. 融合及抗体的制备

将血清检测为阳性的小鼠用拉颈法处死，取脾脏，无菌条件下在预先放置培养液的平皿中去除脂肪组织，压碎，吸取细胞悬液，离心，弃上清。用完全培养液反复洗涤，得到 1.2×10^8 个脾细胞。加入 0.1 倍数量的骨髓瘤细胞，混合，离心。弃去上清的培养液，吸取 1ml PEG/DMSO 加入细胞中，混合 1 分钟。

将含有 PEG 的细胞悬液反复洗涤，加入选择培养基，在培养板上 37 度、5%二氧化碳浓度下培养。一周后镜检，对明显的细胞集落孔进行 ELISA，取阳性孔梯度稀释，扩大培养，进行初次克隆化。反复克隆化 3 次，获得单细胞克隆。

将 1×10^6 的杂交瘤细胞注入 Bab/C 小鼠腹腔，得到腹水。

d. 抗体的分离提纯

将小鼠腹腔内的腹水 6000rpm/min 离心 15 分钟，取上清，用 60% 硫酸胺沉淀，6000rpm/min 离心 20 分钟，弃上清，将沉淀用 pH 7.0 的 PBS 溶解，过 G-25 柱除盐。将洗脱液经 γ -Protein A 亲和层析柱分离提纯，冻干得到精制抗体。

(3) 抗体酶的制备及活力测定

a. 抗体酶的制备

将提纯的抗体冻干粉 5mg 溶解在 1ml 除氧的 pH7.0 的 PBS 中，加入 20 μ l 20mg/ml 的苯甲基磺酰氟的乙腈溶液，室温振荡 0.5 小时，加入 100 μ l 预先除氧的 1MNaHSe 溶液，30 度在氮气保护下反应 40 小时。将反应液 8000rpm/min 离心，经 G-25 除盐后冻干。制得抗体酶冻干粉。

b. 抗体酶活力测定

采用放射免疫分析(RIA)法测活

将抗体酶溶解在 pH 7.4 的 700 μ l PBS 中，加入 100 μ l 10mM 的 DTT，加入 10 μ M T4 100 μ l，加入 1g/100ml 的 BSA 溶液 100 μ l，37 度反应半小时，加入二倍体积的预冷乙醇，6000g 离心 10min，取上清，将反应液稀释至 1-30/100ml T4，将反应稀释液加入预先包被有 T4 或 T3 的试管中，温浴 0.5 小时，再加入带有放射性 I¹²⁵ 标记的 T4 或 T3 溶液，温浴 0.5-1 小时，测定每管的放射剂量。相同条件下以不同浓度的 T4 和 T3 制作标准曲线，在标准曲线中找出相应的 T4、T3 浓度。

采用放射免疫法测得抗体酶活力为 275U/mgPr (U—每分钟转化底物的 pmol 数)

实施例 2:

(1) 全抗原的合成

将 T4 与牛血清白蛋白以 30: 1 (摩尔比) 的比例混合于 pH10 的 Tris-HCl 20mmol/L 缓冲液中，搅拌，逐渐滴加戊二醛，反应 15 小时，其它反应条件同实施例 1 中 (1)。

(2) 单克隆抗体的制备

a. 将全抗原 3mg/ml 与福氏完全佐剂以 1:1 的比例混合，摇匀，每只 Bab/c 小鼠注射 200 μ l，两周后进行二次免疫，每隔两周以福氏不完全佐剂免疫一次，融合前三天加强免疫。

b. 抗体的检测

同实施例 1 中(2)b。

c. 融合及抗体的制备

将血清检测为阳性的小鼠用拉颈法处死，取脾脏，无菌条件下在预先放置培养液的平皿中去除脂肪组织，压碎，吸取细胞悬液，离心，弃上清。用完全培养液反复洗涤，得到 1.5×10^8 个脾细胞。加入 0.3 倍数量的骨髓瘤细胞，混合，离心。弃去上清的培养液，吸取 1ml PEG/DMSO 加入细胞中，混合 1 分钟。

将含有 PEG 的细胞悬液反复洗涤，加入选择培养基，在培养板上 37 度、5%二氧化碳浓度下培养。一周后镜检，对明显的细胞集落孔进行 ELISA，取阳性孔梯度稀释，扩大培养，进行初次克隆化。反复克隆化 4 次，获得单细胞克隆。

将 1.5×10^6 的杂交瘤细胞注入 Bab/C 小鼠腹腔，得到腹水。

d. 抗体的分离提纯

同实施例 1 中 (2) d。

(3) 抗体酶的制备及活力测定

a. 抗体酶的制备

将 10mg 提纯的抗体冻干粉溶解在 1ml 除氧的 pH 8 的 PBS 中，

加入 30 μ l 20mg/ml 的苯甲基磺酰氟的乙腈溶液，室温振荡 50 分钟。
加入 200 μ l 预先除氧的 1mol/L NaSeH，40 度在氮气保护下反应 30 小时，将反应液 8000 转每分钟离心后，经 G-25 柱除盐，冻干，制得抗体酶冻干粉。

b. 抗体酶活力测定

采用放射免疫法测得抗体酶活力为 290U/mgPr

实施例 3

(1) 全抗原的制备

将 T4 与牛血清白蛋白以 40:1（摩尔比）的比例混合于 pH11 的 Tris-HCl 20mmol/L 缓冲液中，逐渐滴加戊二醛，搅拌 24 小时，其它反应条件同实施例 1 中（1）。

(2) 单克隆抗体的制备

a. 将全抗原(1mg/ml)与福氏完全佐剂以 1:1 的比例混合，摇匀，每只 Bab/c 小鼠注射 300 μ l，两周后进行二次免疫，每隔两周以福氏不完全佐剂免疫一次，融合前三天加强免疫。共免疫六周。

b. 抗体的检测

同实施例 1 中(2)b。

c. 融合及抗体的制备

将血清检测为阳性的小鼠用拉颈法处死，取脾脏，无菌条件下在预先放置培养液的平皿中去除脂肪组织，压碎，吸取细胞悬液，离心，弃上清。用完全培养液反复洗涤，得到 0.5×10^8 个脾细胞。加入 0.5 倍数量的骨髓瘤细胞，混合，离心。弃去上清的培养液，

吸取 1ml PEG/DMSO 加入细胞中，混合 1 分钟。

将含有 PEG 的细胞悬液反复洗涤，加入选择培养基，在培养板上 37 度、5%二氧化碳浓度下培养。一周后镜检，对明显的细胞集落孔进行 ELISA，取阳性孔梯度稀释，扩大培养，进行初次克隆化。反复克隆化 3 次，获得单细胞克隆。

将 0.5×10^6 的杂交瘤细胞注入 Bab/C 小鼠腹腔，得到腹水。

d. 抗体的分离提纯

同实施例 1 中 (2) d。

(3) 抗体酶的制备及活力测定

a. 抗体酶的制备

将 5mg 提纯的抗体冻干粉溶解在 1ml 除氧的 pH6 的 PBS 中，加入 10 μ l 20mg/ml 的苯甲基磺酰氟的乙腈溶液，室温振荡 1 小时。加入 50 μ l 预先除氧的 1mol/L NaSeH，40 度在氮气保护下反应 20 小时，将反应液 8000 转每分钟离心后，经 G-25 柱除盐，冻干，制得抗体酶冻干粉。

b. 抗体酶活力测定

采用放射免疫法测得抗体酶活力为 230U/mgPr