



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110724672 B

(45)授权公告日 2020.06.16

(21)申请号 201911051469.7

C12N 15/13(2006.01)

(22)申请日 2019.10.31

A61K 39/395(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61P 35/00(2006.01)

申请公布号 CN 110724672 A

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

(43)申请公布日 2020.01.24

(83)生物保藏信息

CCTCC NO:C2019260 2019.10.29

(73)专利权人 浙江蓝盾药业有限公司

地址 312030 浙江省绍兴市柯桥经济开发区西环路586号科技园起航楼2号楼505-506室

(72)发明人 郭志刚 黄子祥 邬婷 李露露

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所(普通合伙) 32204

代理人 杨晓莉

(51)Int.Cl.

C12N 5/20(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

(56)对比文件

CN 108503708 A,2018.09.07,

CN 110183534 A,2019.08.30,

CN 109438576 A,2019.03.08,

CN 107955071 A,2018.04.24,

D Kim等.Anti-CD47 antibodies promote phagocytosis and inhibits the growth of human myeloma cells.《Leukemia》.2012,第26卷

Pirofski.L.A等.immunoglobulin heavy chain variable,partial [Mus Musclulus].《GenBank DataBase》.2016,

审查员 孔维纳

权利要求书1页 说明书10页

序列表4页 附图6页

(54)发明名称

杂交瘤细胞株105D11、抗体及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种杂交瘤细胞株105D11、其产生的抗人CD47单克隆抗体,本发明以具有生物活性的CD47重组蛋白为抗原,通过杂交瘤技术筛选制备得到能阻断CD47-SIRP α 相互作用的高亲和力抗人CD47特异性单克隆抗体,同时在体外实验中证明可以促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞并且不会引起红细胞凝集,因此该抗体在肿瘤免疫治疗中具有潜在的价值。

1. 杂交瘤细胞株105D11,其特征在于,该杂交瘤细胞株的保藏编号为CCTCC NO: C2019260。
2. 权利要求1所述杂交瘤细胞株105D11产生的抗人CD47单克隆抗体。
3. 一种抗人CD47单克隆抗体,其特征在于,其重链可变区为SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,其轻链可变区为SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。
4. 根据权利要求3所述的抗人CD47单克隆抗体,其特征在于,其重链恒定区选自IgG2、IgG3、IgG4、IgM或IgA亚型,轻链恒定区选自lambda亚型。
5. 一种编码权利要求2或3所述抗人CD47单克隆抗体的核酸,其特征在于,其重链可变区如SEQ ID NO:1所示,其轻链可变区如SEQ ID NO:9所示。
6. 一种药物组合物,其特征在于,其包含权利要求2所述的单克隆抗体。
7. 一种包含权利要求2所述单克隆抗体的检测试剂盒。

杂交瘤细胞株105D11、抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,特别是涉及一种杂交瘤细胞株105D11、其产生的能特异性且高亲和力结合人CD47的单克隆抗体,其制备方法及其可变区序列,以及其制药应用。

背景技术

[0002] 正常情况下,免疫系统可以识别并清除肿瘤微环境中的肿瘤细胞,但为了生存和生长,肿瘤细胞能够采用不同策略,使人体的免疫系统受到抑制,不能正常的杀伤肿瘤细胞,从而在抗肿瘤免疫应答的各阶段得以幸存。肿瘤-免疫循环分为以下七个环节:1、肿瘤抗原释放;2、肿瘤抗原呈递;3、启动和激活效应性T细胞;4、T细胞向肿瘤组织迁移;5、肿瘤组织T细胞浸润;6、T细胞识别肿瘤细胞;7、清除肿瘤细胞。这些环节任何地方出现异常均可以导致抗肿瘤-免疫循环失效,出现免疫逃逸。不同肿瘤可以通过不同环节的异常抑制免疫系统对肿瘤细胞的有效识别和杀伤从而产生免疫耐受,甚至促进肿瘤的发生、发展。肿瘤免疫治疗就是通过重新启动并维持肿瘤-免疫循环,恢复机体正常的抗肿瘤免疫反应,从而控制与清除肿瘤的一种治疗方法。包括单克隆抗体类免疫检查点抑制剂、治疗性抗体、癌症疫苗、细胞治疗和小分子抑制剂等。近几年,肿瘤免疫治疗的好消息不断,目前已在多种肿瘤如黑色素瘤,非小细胞肺癌、肾癌和前列腺癌等实体瘤的治疗中展示出了强大的抗肿瘤活性,多个肿瘤免疫治疗药物已经获得美国FDA批准临床应用。肿瘤免疫治疗由于其卓越的疗效和创新性,在2013年被《科学》杂志评为年度最重要的科学突破。

[0003] 近年来,在免疫检查点抑制剂中最有名的便属PD1-PDL1抗体药等。肿瘤细胞通过上调表面PDL1蛋白表达从而逃离免疫监控,PD1-PDL1属于后天免疫中免疫检查点通路,近年来发现了先天免疫中的免疫检查点通路CD47-SIRP α 在肿瘤免疫逃逸中发挥着至关重要作用。

[0004] CD47也被称为整合素相关蛋白(integrin associated protein,IAP),其广泛的表达于许多正常与肿瘤细胞表面,可与信号调节蛋白 α (Signal regulatory protein α , SIRP α)、血小板反应蛋白(thrombospondin-1,TSP1)以及整合素(integrins)相互作用,介导细胞凋亡、增殖、免疫等一系列反应。CD47为5次跨膜蛋白,分子量在50kDa左右,属于免疫球蛋白超家族,胞外N端为IgV结构域。CD47在19世纪80年代首次被确认为人类卵巢癌的肿瘤抗原,继而CD47被发现在多种人类肿瘤类型中表达,包括急性骨髓白血病(AML)、慢性骨髓白血病(CML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、非霍金性淋巴瘤(NHL)、多发性骨髓瘤(MM)、膀胱癌和其他实体瘤。CD47是“自我”信号,代表“别吃我”,是调节巨噬细胞吞噬作用的一个重要信号。CD47可以与巨噬细胞表面SIRP α 结合,磷酸化其ITIM,随后招募SHP-1蛋白,产生一系列的级联反应抑制巨噬细胞的吞噬作用。针对CD47-SIRP α 信号通路,可以设计CD47抗体来阻断该通路,从而阻止肿瘤细胞免疫逃逸从而起到抗肿瘤作用。虽然国内外开发CD47抗体药的单位数量在逐渐增加,但截至目前尚未有产品上市,走在最前面的要数FORTY SEVEN公司的Hu5F9-G4处于临床二期。

发明内容

[0005] 发明目的:针对上述现有技术,本发明提供了一种杂交瘤细胞株105D11、其产生的抗人CD47单克隆抗体,所述抗人CD47单克隆抗体的制备方法,所述抗人CD47单克隆抗体的可变区氨基酸序列及核酸序列,以及抗人CD47单克隆抗体的制药应用。

[0006] 技术方案:本发明所述的杂交瘤细胞株105D11,保藏于中国典型培养物保藏中心,其保藏编号为CCTCC NO:C2019260,地址:武汉市武汉大学,保藏时间:2019年10月29日。

[0007] 本发明所述杂交瘤细胞株105D11产生的抗人CD47单克隆抗体。

[0008] 所述抗人CD47单克隆抗体,其重链可变区的CDRH1为SEQ ID NO:4所示氨基酸序列,CDRH2为SEQ ID NO:6所示氨基酸序列,CDRH3为SEQ ID NO:8所示氨基酸序列;其轻链可变区的CDRL1为SEQ ID NO:12所示氨基酸序列,CDRL2为SEQ ID NO:14所示氨基酸序列,CDRL3为SEQ ID NO:16所示氨基酸序列。

[0009] 进一步的,所述抗人CD47单克隆抗体重链可变区为SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,其轻链可变区为SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。

[0010] 所述抗人CD47单克隆抗体还包括选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM或IgA亚型的重链恒定区,以及选自Kappa或lambda亚型的轻链恒定区。

[0011] 进一步优选的,所述抗人CD47单克隆抗体还包括选自IgG1亚型的重链恒定区,以及选自Kappa亚型的轻链恒定区。

[0012] 本发明还公开了一种编码上述抗人CD47单克隆抗体的核酸,其重链可变区如SEQ ID NO:1所示,其轻链可变区如SEQ ID NO:9所示。

[0013] 进一步的,包含上述抗人CD47单克隆抗体的药物组合物、检测试剂或者试剂盒也在本发明的保护范围内。

[0014] 上述单克隆抗体在制备治疗与CD47表达异常或过量、失控相关疾病的药物中的应用也在本发明的保护范围内。

[0015] 本发明以商品化的具有生物活性的重组人CD47-mFc融合蛋白作为免疫原,免疫Balb/c小鼠,待其血清效价达到融合要求,取其脾细胞与SP2/0-Ag14骨髓瘤细胞进行细胞融合,通过HAT选择性培养基筛选得到能稳定分泌抗人CD47单克隆抗体的杂交瘤细胞株105D11,经亚克隆化及扩大培养后,在分子水平上进行抗体重、轻链可变区基因的调取测序。单克隆抗体可通过将杂交瘤细胞注射至小鼠腹腔,取腹水收集后经硫酸铵沉淀法和Protein G亲和层析柱纯化获得,并对其抗体特性进行鉴定及体外生物功能活性验证。

[0016] 有益效果:本发明成功制备了杂交瘤细胞株105D11,并通过其产生了抗人CD47单克隆抗体,该抗体特异性好,亲合力高,在细胞水平上可以高亲和力结合人和食蟹猴CD47,同时能阻断CD47与SIRP α 结合。在体外能有效促进巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用,而且不会引起红细胞凝集,该抗人CD47单克隆抗体是肿瘤免疫治疗的潜在药物。

附图说明

[0017] 图1:人CD47与食蟹猴CD47过表达CHO-K1稳定细胞系构建中使用的穿梭载体结构示意图,MCS为多克隆位点,靶基因插入此位置;

[0018] 图2:人和食蟹猴CD47过表达稳定细胞株的流式检测结果,图(1)中A柱形图代表人CD47过表达阴性细胞株,B柱形图代表人CD47过表达阳性细胞株,图(2)中A柱形图代表食蟹

猴CD47过表达阴性细胞株,B柱形图代表食蟹猴CD47过表达阳性细胞株(横坐标为荧光强度,纵坐标为细胞数量);

[0019] 图3:5只免疫小鼠在第3次免疫后第7天抗血清与人CD47重组蛋白间接ELISA反应效价结果(横坐标为抗血清稀释倍数,单位为千,纵坐标为波长450nm下光密度值(OD));

[0020] 图4:5只免疫小鼠在第3次免疫后第7天抗血清与人和食蟹猴CD47过表达细胞株结合流式检测结果,图(1)~(5)分别为#1~#5小鼠抗血清,图(1)~(5)中A柱形图代表CHO-K1母细胞,B柱形图代表食蟹猴CD47过表达CHO-K1细胞株,C柱形图代表人CD47过表达CHO-K1细胞株(横坐标为荧光强度,纵坐标为均一化后的细胞数量);

[0021] 图5:纯化的抗人CD47单克隆抗体变性非还原SDS-PAGE电泳结果;

[0022] 图6:抗人CD47单克隆抗体亚型鉴定ELISA检测结果;

[0023] 图7:纯化的抗人CD47单克隆抗体与人和食蟹猴CD47过表达稳定细胞株结合流式检测结果,A、B、C柱形图分别代表与CHO-K1母细胞株、人CD47过表达细胞株、食蟹猴CD47过表达细胞株结合信号(横坐标为荧光强度,纵坐标为均一化后的细胞数量);

[0024] 图8:纯化的抗人CD47单克隆抗体阻断SIRP α 重组蛋白与人CD47过表达稳定细胞膜上CD47结合流式检测结果,A柱形图代表在有抗人CD47单克隆抗体条件下SIRP α 重组蛋白与人CD47过表达稳定细胞膜上CD47结合信号,B柱形图代表在无抗人CD47单克隆抗体条件下SIRP α 重组蛋白与人CD47过表达稳定细胞膜上CD47结合信号(横坐标为荧光强度,纵坐标为均一化后的细胞数量);

[0025] 图9:抗CD47单克隆抗体红细胞凝血实验结果,抗体浓度从10 μ g/ml开始三倍递减共9个浓度,第一行为阳性对照抗体Hu5F9-IgG4,第二行为本发明中抗体105D11F2;

[0026] 图10:巨噬细胞吞噬反应检测抗CD47单克隆抗体效价结果,左图为阳性对照抗体Hu5F9-IgG4,右图为本发明中抗体105D11F2(横坐标为抗体浓度,单位为 μ g/ml,纵坐标为巨噬细胞吞噬效率)。

具体实施方式

[0027] 下面结合具体实施例对本申请作出详细说明。

[0028] 实施例1:人CD47和食蟹猴CD47过表达CHO-K1稳定细胞系构建

[0029] 1) 穿梭载体构建

[0030] 人源CD47蛋白序列

[0031] NP_001768leukocyte surface antigen CD47 isoform 1precursor[Homo sapiens]

[0032] MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIYTFD
GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDSKDAVSHTGNYTCEVTELTREGETI IELKYRVVSWFSPNENILIV
IFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILL
HYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQ
PPRKAVEEPLNAFKESKGMNDE

[0033] 35,214Da,323aa,1-18为信号肽,19-141,198-207,257-268为胞外域,142-162,177-197,208-228,236-256,269-289为跨膜螺旋,163-176,229-235,290-323为胞内域。

[0034] 食蟹猴CD47蛋白序列

[0035] XP_005548289PREDICTED:leukocyte surface antigen CD47 isoform X1
[Macaca fascicularis]

[0036] MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTksVEFTFCNDTVVIPCfVTNMEaQNTTEVYVkwkFKGRDIYTFD
GALNKSTAPANFSSAKIEVSQLLKGDASLkMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIElKYRVVSWFSPNENILIV
IFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLMITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILL
HYVVFSTAIGLTSFVIAAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQ
PPRKAVEEPLNAFKESKGMNDE

[0037] 35,187Da,323aa。

[0038] 分别合成编码以上两种蛋白的全基因并克隆至pUC57载体(苏州金唯智),通过限制性内切酶进行酶切酶连将其插入慢病毒过表达载体(武汉伯尔,如图1)的MCS区。

[0039] 2) 病毒包装质粒制备

[0040] 测序正确的重组质粒,转入克隆菌DH5 α (武汉伯尔)中进行扩增,质粒抽提使用无内毒素质粒大抽试剂盒(武汉伯尔)。提取后,核酸电泳确定分子量大小,同时使用微量分光光度计评估质粒的质量。A260/A280比例在1.7~1.9,OD260/230比例在>20,浓度高于0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 为高质量质粒。

[0041] 同时,用相同方法制备相应的病毒包装辅助质粒。

[0042] 3) 病毒包装

[0043] 严格参照转染试剂(南京诺唯赞)操作说明,主要流程为当HEK293T细胞(北京北纳)密度达到80%汇合度时加入上述所有质粒和转染试剂进行转染。转染6h后换新鲜培养基,转染后48-72h收集含病毒颗粒的培养液。

[0044] 4) CHO-K1细胞病毒侵染及加压筛选

[0045] 将病毒溶液加入到CHO-K1细胞(北京北纳)中,培养3天后,加入嘌呤霉素(武汉伯尔,工作浓度为2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$),继续培养3天(此后细胞培养全部使用含抗生素培养基),传代。

[0046] 5) 单克隆培养

[0047] 将细胞稀释至1个细胞每孔,挑取单克隆细胞,用含工作浓度嘌呤霉素的培养基培养2-3周。传代,并逐级扩大培养至T25细胞培养瓶,保种。

[0048] 6) 流式检测

[0049] 应用商品化小鼠抗人CD47单抗进行间接免疫荧光染色,检测所构建细胞株相对于未转染对照细胞CD47蛋白表达量。间接免疫荧光标记的样品制备方法如下:

[0050] a) 培养细胞用0.25%的胰酶(GIBCO)充分消化(切记消化过度否则易形成絮状)并用PBS轻轻吹打制备单细胞悬液。

[0051] b) 10ml PBS洗涤细胞1次,1000rpm,5min离心,再用1ml PBS悬浮细胞,细胞计数。

[0052] c) 取 2.5×10^5 个细胞于1.5ml离心管中,1ml PBS洗涤细胞1次,2000rpm,5min离心,吸弃上清液。

[0053] d) 加入50 μl 商品化小鼠抗人CD47单抗(Novusbio NBP2-31106,10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)混匀,置室温下避光反应30min。

[0054] e) 用1ml PBS洗涤细胞1次,2000rpm,5min离心,吸弃上清液。

[0055] f) 加入50 μl 20倍稀释的FITC标记山羊抗小鼠IGG荧光二抗(Jackson ImmunoResearch 115-096-062,2.5 $\mu\text{l}/2.5 \times 10^5$)混匀,室温下避光反应20min。

[0056] g) 用1ml PBS洗涤细胞1次,2000rpm,5min离心,吸弃上清液。

[0057] h) 加入200 μ l PBS重悬成单细胞悬液,用流式细胞仪上机检测。

[0058] 检测结果表明,最终各筛选到一株高表达人CD47和食蟹猴CD47的稳定细胞株,分别如图2中的(1)和(2)所示。

[0059] 实施例2:动物免疫及抗血清ELISA效价与流式细胞术测定

[0060] 选取5只6~8周龄Balb/c小鼠(北京斯贝福)同笼饲养,分别编号#1、#2、#3、#4、#5。首次免疫前4天,每只小鼠通过尾静脉采血约0.05ml,4℃放置半小时,然后10000rpm,4℃离心10min,分离血清作为以后实验阴性对照血清。首次免疫时以重组人CD47-mFc融合蛋白(Acro Biosystems CD7-H52A5)免疫原与等体积弗氏完全佐剂(SIGMA)充分混合,超声乳化完全,采取皮下两点和腹腔两点注射,免疫剂量为每只小鼠50 μ g免疫原,注射体积为0.2ml。分别间隔14天和35天进行第二、第三次免疫,此两次免疫与首次免疫区别在于将弗氏完全佐剂改成弗氏不完全佐剂(SIGMA),同时将免疫剂量调整为25 μ g。第三次免疫后第7天,每只小鼠通过尾静脉采血约0.05ml,4℃放置半小时,然后10000rpm,4℃离心10min,分离血清检测抗血清ELISA效价和流式细胞术测定。

[0061] 检测抗血清效价时采用间接ELISA方法,其中间接ELISA方法如下:用重组人CD47-mFc融合蛋白包被酶标板,0.5 μ g/ml,50 μ l/孔,4℃过夜。次日倾去包被液,用0.05%PBST人工洗板3次后,加入0.5%BSA(SIGMA)封闭,200 μ l/孔,37℃,1h。弃去封闭液,0.05%PBST人工洗板3次后,加入自1:1000开始倍比稀释的上述抗血清共10个稀释度,空白对照为PBS,上述免疫前血清为阴性对照,50 μ l/孔,37℃,1h。0.05%PBST人工洗板3次后,加入1:20000稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG(Fab)二抗(Jackson ImmunoResearch115-035-072),50 μ l/孔,37℃,1h。0.05%PBST人工洗板5次后,加入显色底物TMB(湖州英创),50 μ l/孔,室温,10min,最后加入1M硫酸终止反应。在酶标仪上读取OD450nm,结果显示5只小鼠的抗血清效价分别达到1:64000、1:64000、1:256000、1:256000、1:512000(如图3),说明使用所述免疫原免疫小鼠产生了能在重组蛋白水平结合人CD47的高亲和力抗体。

[0062] 采用流式细胞术检测抗血清与人和食蟹猴细胞膜上CD47结合活性,具体方法参见实施例1中所述间接免疫荧光标记的样品制备方法,此处所使用细胞系为实施例1中选取的人和食蟹猴CD47过表达的CHO-K1细胞株。检测结果显示,5只小鼠的抗血清均能不同程度结合细胞膜上人和食蟹猴CD47,而#1小鼠与这两者综合结合活性较高(如图4),说明使用所述免疫原免疫小鼠产生了能在细胞水平结合人CD47的高亲和力抗体。

[0063] 第三次免疫后间隔28天选取与人和食蟹猴细胞膜上CD47综合结合活性较高的#1小鼠进行第四次免疫,此次免疫不使用佐剂,采取尾静脉注射,免疫剂量为25 μ g免疫原,注射体积为0.2ml。此次免疫间隔4天后进行细胞融合。

[0064] 实施例3杂交瘤单克隆细胞株的制备

[0065] 1. 细胞融合

[0066] 细胞融合采用聚乙二醇法。具体操作如下:

[0067] 1) 融合前一周,复苏SP2/0-Ag14骨髓瘤细胞(北京北纳)。在细胞融合前两天,扩大培养SP2/0-Ag14,使其在融合当天处于对数生长期。

[0068] 2) 进行细胞融合前半小时,预先处理SP2/0-Ag14细胞,重悬SP2/0-Ag14细胞后计数,取2-3 $\times 10^7$ 个细胞置于37℃水浴锅待用。

[0069] 3) 将待融合的小鼠进行心脏取血,同上操作收集血清,保存在 -20°C ,可做融合后筛选的阳性对照。断颈处死小鼠,浸泡于75%酒精中,转移到细胞房。取脾脏进行研磨,经 $70\mu\text{m}$ 筛网过滤制成单细胞悬液。

[0070] 4) 将预先处理好的SP2/0-Ag14细胞和脾细胞混合均匀,离心 $1000\text{rpm}\times 5\text{min}$,弃上清。用无血清的RPMI1640基础培养基(GIBCO)洗涤混合细胞两次,最后一次将上清倾倒入净。取 1ml 37°C 预温的PEG1450(SIGMA),缓慢滴加到细胞沉淀上,作用90s,立即加入 37°C 预温的无血清RPMI1640基础培养基,5分钟内加完,混匀后离心 $800\times 5\text{min}$,细胞沉淀重悬在含HAT(SIGMA)的10%FBS(Royacel)+杂交瘤补充物(ROCHE)-RPMI1640培养基中,均匀铺至96孔板中, $80\mu\text{l}$ /每孔,于 37°C 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。

[0071] 5) 融合后定期观察细胞状态。在融合第5~7天,进行换液,即用新鲜含HAT的10%FBS+杂交瘤补充物-RPMI1640培养基换出培养孔板中全部培养基, $120\mu\text{l}$ /每孔,继续培养5~7天。

[0072] 2. 阳性融合细胞的筛选及亚克隆化

[0073] 通过间接ELISA检测各孔中细胞分泌抗体的情况。以重组人CD47-mFc融合蛋白作为ELISA筛选包被抗原,HRP标记的山羊抗小鼠IgG(Fab)二抗作为检测抗体,选择与重组人CD47-mFc融合蛋白反应呈阳性的孔。然后采用流式细胞术检测这些孔中克隆上清分别与人CD47和食蟹猴CD47过表达CHO-K1细胞株结合活性。选择与两个细胞株均有较高结合能力的克隆上清,再采用流式细胞术检测这些克隆上清阻断SIRP α 蛋白与细胞表面CD47结合情况,最终选择了一个能够较好阻断SIRP α 蛋白与细胞表面CD47结合的克隆,显微镜下观察若有成活的杂交瘤细胞或细胞团,进行标记,采用有限稀释法将孔中的细胞进行克隆化,经过两次亚克隆后建立稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并进行扩大培养。杂交瘤细胞株命名为105D11,保藏于中国典型培养物保藏中心,其保藏编号为CCTCC NO:C2019260,地址:武汉市武汉大学,保藏时间:2019年10月29日。

[0074] 实施例4抗人CD47单克隆抗体的制备及纯化

[0075] 1. 腹水制备

[0076] 分别取3只10~16周龄balb/c雌鼠(北京斯贝福),每只小鼠提前12~18天腹腔左右各注射 0.25ml 腹水制备佐剂(北京博奥龙)。取生长对数期杂交瘤细胞计数,取 6×10^6 个细胞用 10ml 无菌PBS洗两次,离心时用 1000rpm , 5min ,最终用无菌PBS调整细胞浓度至 2×10^6 个/ ml ,然后给上述小鼠腹腔左右各注射 0.5ml 细胞悬液并按摩腹部使细胞分布均匀。约10~14天后小鼠腹部明显隆起并开始收集腹水,一般隔天收集一次,共收集三次。每次收集好腹水, 2000rpm 离心 5min 后收集上清(用移液枪尽量吸走最上层油脂),短时间保存在 4°C ,长时间保存在 -20°C 。

[0077] 2. 抗体纯化

[0078] 1) 取上述保存腹水 14000rpm 离心 10min ,除去细胞碎片和颗粒杂质。

[0079] 2) 转移上清液并用滤纸过滤,收集滤出液并测量体积。

[0080] 3) 边搅拌边慢慢加入等体积的饱和硫酸铵到滤出液中,终浓度为1:1。

[0081] 4) 将溶液放在磁力搅拌器上室温温和搅拌2小时再分装至高速离心管 4°C 静置过夜,使蛋白质充分沉淀。

[0082] 5) 第二天取出直接 10000rpm 离心 30min ,弃上清保留沉淀晾干。

- [0083] 6) 加入0.5倍滤出液体积的PBS溶解沉淀,然后超滤离心脱盐浓缩。
- [0084] 7) 加入滤出液两倍体积的结合缓冲液稀释浓缩液,并用0.45 μ m滤膜过滤。
- [0085] 8) 收集滤出液用protein G预装柱(常州天地人和)按照厂家说明书进行亲和纯化。
- [0086] 9) 收集洗脱液用截留分子量为50KD的超滤离心管(Millipore)进行脱盐浓缩。
- [0087] 3. 抗体浓度及纯度测定
- [0088] 脱盐浓缩后的抗体采用Bradford法测定抗体浓度,并用SDS-PAGE电泳初步鉴定抗体纯度(如图5)。
- [0089] 实施例5抗人CD47单克隆抗体的特性鉴定
- [0090] 1. 抗体亚型的鉴定
- [0091] 采用Mouse单克隆抗体亚型鉴定试剂盒(Proteintech)鉴定得到的抗人CD47单克隆抗体的亚型,酶标板上预包被了针对小鼠IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3、IgM、kappa light chain、lambda light chain的特异性抗体,具体实验操作见试剂盒说明书。结果如图6,我们得到的抗人CD47单克隆抗体的重链亚型为IgG1,轻链亚型为Kappa。
- [0092] 本发明的抗体可以作为其他同型重组表达,例如IgG2, IgG3, IgG4, IgM和IgA。
- [0093] 2. 流式细胞术检测抗体与细胞膜上CD47的反应性
- [0094] 参照实施例1中所述间接免疫荧光标记的样品制备方法,采用流式细胞术检测纯化的抗人CD47单克隆抗体与人和食蟹猴CD47过表达细胞膜上CD47结合情况。如图7结果表明,我们得到的抗人CD47单克隆抗体能以较高亲和力结合细胞膜上人和食蟹猴CD47。
- [0095] 3. 流式细胞术检测抗体阻断SIRP α 蛋白与细胞表面CD47结合
- [0096] SIRP α 是CD47的配体,CD47蛋白能够与细胞表面的SIRP α 结合,流式检测如图8所示。以此为依据,使用流式细胞术的方法检测抗人CD47单克隆抗体阻断SIRP α 与细胞表面的CD47结合。人CD47过表达细胞株按照实施例1中所述间接免疫荧光标记的样品制备方法处理,每组加入1 μ g SIRP α -hFc蛋白(Acro Biosystems SIA-H5251),同时将抗人CD47单克隆抗体加入共孵育,流式细胞术检测SIRP α -hFc蛋白与人CD47过表达细胞株的结合情况。从流式结果来看(图8),抗人CD47单克隆抗体可以较好的阻断SIRP α 蛋白与细胞表面CD47结合。
- [0097] 4. 抗人CD47单克隆抗体红细胞凝血实验
- [0098] 红细胞凝集的本质是抗原-抗体反应。起抗原作用的是镶嵌在红细胞膜上的一些特异性蛋白或糖脂,称为凝集原。抗CD47抗体与血红细胞上所表达的CD47膜蛋白结合,并在红细胞之间形成桥梁,使发生凝集现象。本实施例中使用LymphoprepTM(Axis-Shield PoC AS, Cat#AS1114547)通过密度梯度离心法从混合健康人血液中分离血红细胞,然后使用PBS重悬血红细胞,按比例稀释至适宜密度。将血红细胞悬液加入到96孔细胞培养板中,将完成稀释的抗人CD47单克隆抗体(对照阳性抗体为FORTY SEVEN公司的Hu5F9-G4,本发明中抗体编号为105D11F2)加入到该培养板的相应孔中。室温孵育约1小时。观察不同测试浓度下红细胞的凝集情况,并使用凝胶成像系统进行拍照保存。结果如图9,阳性对照抗体可介导人血红细胞产生凝集作用,而本发明抗体在测试浓度下无明显介导人血红细胞产生凝集的作用。
- [0099] 5. 巨噬细胞吞噬反应检测抗人CD47单克隆抗体效价
- [0100] 肿瘤细胞表面高表达的CD47通过与巨噬细胞表面表达的SIRP α 相互作用,提供“不

要吃我”信号,抑制巨噬细胞吞噬效应。本实施例以人早幼粒急性白血病细胞HL-60(北京北纳)为靶细胞,以诱导自人单核细胞的巨噬细胞作为效应细胞,以Hu5F9-G4(南京金斯瑞)作为阳性参照进行实验。在实验过程中,使用PKH26染料(SIGMA MINI26-1KT)和APC-Anti CD11b抗体,分别对HL-60细胞膜及巨噬细胞上的特异性标记物CD11b进行标记。PKH26染料带有长脂质尾的红色荧光染料能稳定结合到细胞膜的脂质区域,使HL-60细胞带有荧光标记。APC-Anti CD11b抗体可与巨噬细胞上的CD11b特异性结合,使细胞带有特异性荧光信号。通过检测细胞所带有的荧光信号,统计同时具有PKH26阳性和CD11b-APC阳性信号的细胞个数,以及仅带有PKH26阳性信号的细胞个数,计算对应实验条件下的巨噬细胞吞噬率,从而反应阳性参照或供试品介导巨噬细胞所产生的细胞吞噬效应。具体实验步骤如下:

[0101] 1) 离心收集靶细胞,弃上清,使用DPBS(GIBCO)稀释并重悬细胞(密度小于 $1E7$ Cells/mL),加入适量PKH26染料工作液进行孵育染色。

[0102] 2) 将完成染色的靶细胞按 $2E5$ Cells/mL密度重悬于完全培养基中,于细胞培养箱($37^{\circ}\text{C}/5\%\text{CO}_2$)继续培养过夜。

[0103] 3) 离心收集已完成PKH26染色的靶细胞,使用1640完全培养基重悬细胞并调节细胞悬液密度至 $2E5$ Cells/mL。

[0104] 4) 将靶细胞悬液加入到96孔细胞培养板中,每孔 $50\mu\text{L}$ ($10000\text{Cells}/\text{Well}$)。

[0105] 5) 将完成稀释的待测样品和阳性参照工作液加入到该培养板的相应孔中,每孔 $50\mu\text{L}$,转移培养板至细胞培养箱中孵育约0.5小时。

[0106] 6) 消化并离心收集效应细胞,使用1640完全培养基重悬并调整细胞悬液密度至 $5E5$ Cells/mL。

[0107] 7) 将效应细胞悬液加入到完成孵育的细胞培养板中,每孔 $100\mu\text{L}$ ($50000\text{Cells}/\text{Well}$)。转移培养板至细胞培养箱中继续孵育约1小时。

[0108] 8) 配制检测抗体工作液。

[0109] 巨噬细胞吞噬实验组使用CD11b检测抗体进行标记;

[0110] 巨噬细胞QC检测使用CD11b(Miltenyi Biotec 130-091-241)、CD14(Miltenyi Biotec 130-098-070)、CD45(Miltenyi Biotec 130-110-771)、CD64(Miltenyi Biotec 130-097-071)、CD163(Miltenyi Biotec 130-097-630)、CD206(Miltenyi Biotec 130-095-217)检测抗体分别进行标记。

[0111] 9) 待细胞培养板孵育完成后,离心培养板,弃孵育上清后,将检测抗体工作液加入到培养孔中, 4°C 孵育15min。

[0112] 10) 离心培养板,弃孵育上清后,使用DPBS重悬细胞。

[0113] 11) 使用流式细胞仪收集细胞并读取荧光信号。

[0114] 实验数据采用FlowJo进行分析,细胞吞噬率采用以下公式进行计算: $\% \text{ Phagocytosis by MDMs} = \text{PKH26+and CD11b+Cells} / \text{All PKH26+Cells} \times 100\%$ 。使用GraphPad Prism 6来拟合四参数曲线,得到抗体的 EC_{50} 。结果如图10,阳性参照(Hu5F9-G4)和本发明抗体均可有效阻断CD47与SIPR α 的相互作用,诱导巨噬细胞吞噬靶细胞,吞噬效应呈量效依赖关系,其 EC_{50} 分别约 $0.002749\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $0.005394\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0115] 实施例6杂交瘤细胞株重轻链可变区基因的克隆

[0116] 1. 抗人CD47单克隆抗体重轻链可变区基因提取、扩增及初步鉴定

[0117] 实施例3中阳性杂交瘤细胞株扩大培养后,收集对数生长期的细胞,使用Novagen鼠源抗体可变区基因克隆的整套试剂并按照其说明书对本发明中所述抗体的重轻链可变区基因进行克隆测序。具体方法路线为:使用Straight A's™mRNA Isolation Kits从收集杂交瘤细胞株中分离总RNA,然后使用First Strand cDNA Synthesis Kit和Ig-3' constant region primer合成第一条cDNA链,接着使用Ig-5'primers和NovaTaq DNA Polymerase以第一条cDNA链为模板进行PCR扩增,得到的PCR扩增产物使用Vector Cloning Kit克隆到克隆载体中,并进行筛选,分离DNA进行基因测序。

[0118] 2. 抗人CD47单克隆抗体重轻链可变结构域的基因测序及分析

[0119] 在GenBank中,比对测序结果与小鼠抗体核酸序列,结果显示该抗体的轻链和重链的可变区序列与提交的小鼠IgG可变区序列的同源性超过93%,确定测序得到的基因序列为小鼠抗体序列。利用IMGT/V-QUEST与ABYSSIS软件分析得到抗体轻链和重链可变区的氨基酸序列及CDR区、FR区的划分。分析结果表明:杂交瘤细胞株抗体重链可变结构域VH的核苷酸序列和氨基酸序列如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示;杂交瘤细胞株轻链可变结构域VL的核苷酸序列和氨基酸序列如SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10所示;重链可变结构域VH依次包含高变区CDRH1、CDRH2和CDRH3,所述的核苷酸序列依次为SEQ ID NO:3、5、7,氨基酸序列依次为SEQ ID NO:4、6、8;轻链可变结构域VL依次包含高变区CDRL1、CDRL2和CDRL3,所述的核苷酸序列依次为SEQ ID NO:11、13、15,氨基酸序列依次为SEQ ID NO:12、14、16。

[0120] 抗体可变区核酸及氨基酸序列

[0121] SEQ ID N01:

[0122] CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTCCAGTGAAGCTGTCCTGCAAG
GCTTCTGGCTACACCTTACCAGTTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACGAGGCCTCGAGTGGATTGG
AAGGATTGATTCTTCCGATAGTGAACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACACTGACTGTAGACAAAT
CCTCCAGCACAGCCTACATCCAACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGGG
GAAGGATTACGACGGTCCTGGTTTCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCATTGTCTCTGCA

[0123] SEQ ID N02:

[0124] QVQLQQPGAELVKPGAPVKLSCKASGYTFTSYWMNWKQRPGRGLEWIGRIDSSDSETHYNQKFKDKAT
LTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCARQGEGLRRSWFPYWGQGLVIVSA

[0125] SEQ ID N03:

[0126] AGTTACTGGATGAAC

[0127] SEQ ID N04:

[0128] SYWMN

[0129] SEQ ID N05:

[0130] AGGATTGATTCTTCCGATAGTGAACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGGAC

[0131] SEQ ID N06:

[0132] RIDSSDSETHYNQKFKD

[0133] SEQ ID N07:

[0134] CAGGGGAAGGATTACGACGGTCCTGGTTTCCTTAC

[0135] SEQ ID N08:

[0136] QGEGLRRSWFPY

[0137] SEQ ID N09:

[0138] GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGC
AAGGCCAGTCAGAATGTGGATACTAATGTAGTCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAAATACTGATTTA
TTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCTCAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCATCA
TCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGTGAGGATATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTCCGGAGGG
GGGACCCAGCTGGAAATAAAA

[0139] SEQ ID N010:

[0140] DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVDTNVVWYQQKPGQSPKILIYSASYRYSVDPDRFSGSGSGT
DFTLIISNVQSEDLGSGYFCQQYNSYPYTFGGGTQLEIK

[0141] SEQ ID N011:

[0142] AAGGCCAGTCAGAATGTGGATACTAATGTAGTC

[0143] SEQ ID N012:

[0144] KASQNVDTNVV

[0145] SEQ ID N013:

[0146] TCGGCATCCTACCGGTACAGT

[0147] SEQ ID N014:

[0148] SASYRYS

[0149] SEQ ID N015:

[0150] CAGCAATATAACAGCTATCCGTACACG

[0151] SEQ ID N016:

[0152] QQYNSYPYT

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 浙江蓝盾药业有限公司
- [0003] <120> 杂交瘤细胞株105D11、抗体及其应用
- [0004] <160> 16
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 363
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggctcc agtgaagctg 60
- [0012] tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agttactgga tgaactgggt gaagcagagg 120
- [0013] cctggacgag gcctcgagtg gattggaagg attgattctt ccgatagtga aactcactac 180
- [0014] aatcaaaagt tcaaggacaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
- [0015] atccaactca gcagcctgac atctgaggat tctgcggtct attactgtgc aagacagggg 300
- [0016] gaaggattac gacggtcctg gtttccttac tggggccaag ggactctggt cattgtctct 360
- [0017] gca 363
- [0018] <210> 2
- [0019] <211> 121
- [0020] <212> PRT
- [0021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0022] <400> 2
- [0023] Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
- [0024] 1 5 10 15
- [0025] Pro Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
- [0026] 20 25 30
- [0027] Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
- [0028] 35 40 45
- [0029] Gly Arg Ile Asp Ser Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
- [0030] 50 55 60
- [0031] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
- [0032] 65 70 75 80
- [0033] Ile Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
- [0034] 85 90 95
- [0035] Ala Arg Gln Gly Glu Gly Leu Arg Arg Ser Trp Phe Pro Tyr Trp Gly
- [0036] 100 105 110
- [0037] Gln Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ala
- [0038] 115 120

- [0039] <210> 3
- [0040] <211> 15
- [0041] <212> DNA
- [0042] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0043] <400> 3
- [0044] agttactgga tgaac 15
- [0045] <210> 4
- [0046] <211> 5
- [0047] <212> PRT
- [0048] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0049] <400> 4
- [0050] Ser Tyr Trp Met Asn
- [0051] 1 5
- [0052] <210> 5
- [0053] <211> 51
- [0054] <212> DNA
- [0055] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0056] <400> 5
- [0057] aggattgatt cttccgatag tgaactcac tacaatcaaa agttcaagga c 51
- [0058] <210> 6
- [0059] <211> 17
- [0060] <212> PRT
- [0061] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0062] <400> 6
- [0063] Arg Ile Asp Ser Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
- [0064] 1 5 10 15
- [0065] Asp
- [0066] <210> 7
- [0067] <211> 36
- [0068] <212> DNA
- [0069] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0070] <400> 7
- [0071] cagggggaag gattacgacg gtctgtggtt ccttac 36
- [0072] <210> 8
- [0073] <211> 12
- [0074] <212> PRT
- [0075] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0076] <400> 8
- [0077] Gln Gly Glu Gly Leu Arg Arg Ser Trp Phe Pro Tyr

[0078]	1	5	10
[0079]	<210>	9	
[0080]	<211>	321	
[0081]	<212>	DNA	
[0082]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0083]	<400>	9	
[0084]	gacattgtga	tgaccagtc	tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
[0085]	gtcacctgca	aggccagtca	gaatgtggat actaatgtag tctggtatca acagaaacca 120
[0086]	gggcagtctc	ctaaaatact	gatttattcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat 180
[0087]	cgcttctcag	gcagtggatc	tgggacagat ttcactctca tcatcagcaa tgtgcagtct 240
[0088]	gaagacttgt	caggatattt	ctgtcagcaa tataacagct atccgtacac gttcggaggg 300
[0089]	gggaccagc	tgaaataaaa	a 321
[0090]	<210>	10	
[0091]	<211>	107	
[0092]	<212>	PRT	
[0093]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0094]	<400>	10	
[0095]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly		
[0096]	1	5	10 15
[0097]	Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn		
[0098]		20	25 30
[0099]	Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ile Leu Ile		
[0100]		35	40 45
[0101]	Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly		
[0102]		50	55 60
[0103]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ile Ile Ser Asn Val Gln Ser		
[0104]		65	70 75 80
[0105]	Glu Asp Leu Ser Gly Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr		
[0106]		85	90 95
[0107]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Glu Ile Lys		
[0108]		100	105
[0109]	<210>	11	
[0110]	<211>	33	
[0111]	<212>	DNA	
[0112]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0113]	<400>	11	
[0114]	aaggccagtc	agaatgtgga	tactaatgta gtc 33
[0115]	<210>	12	
[0116]	<211>	11	

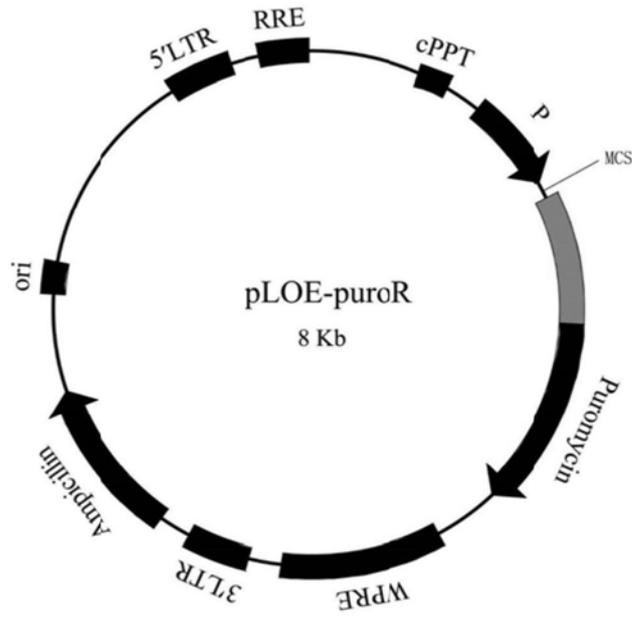


图1

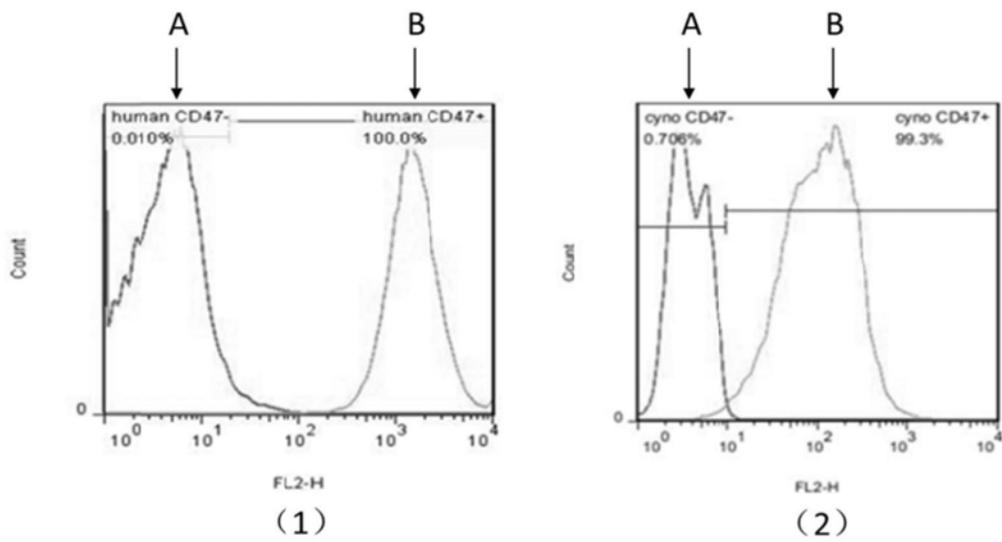


图2

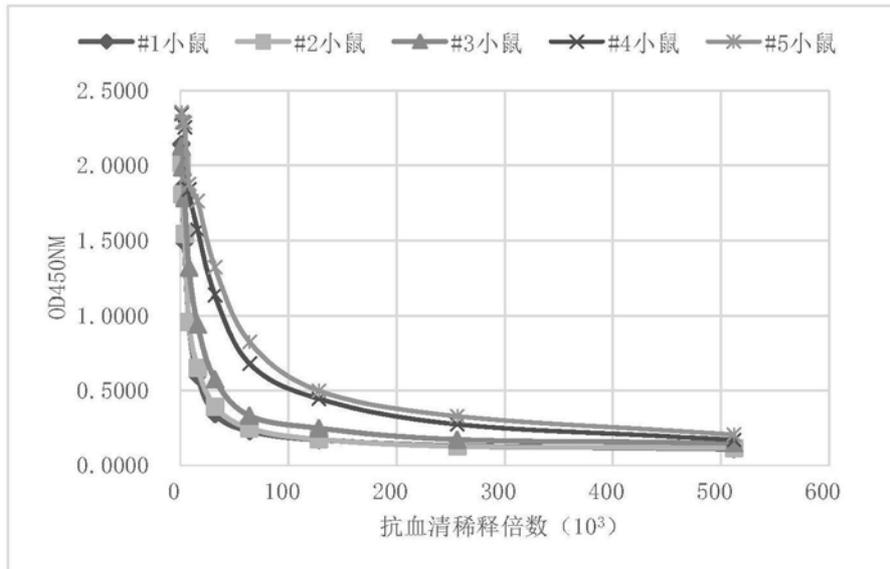


图3

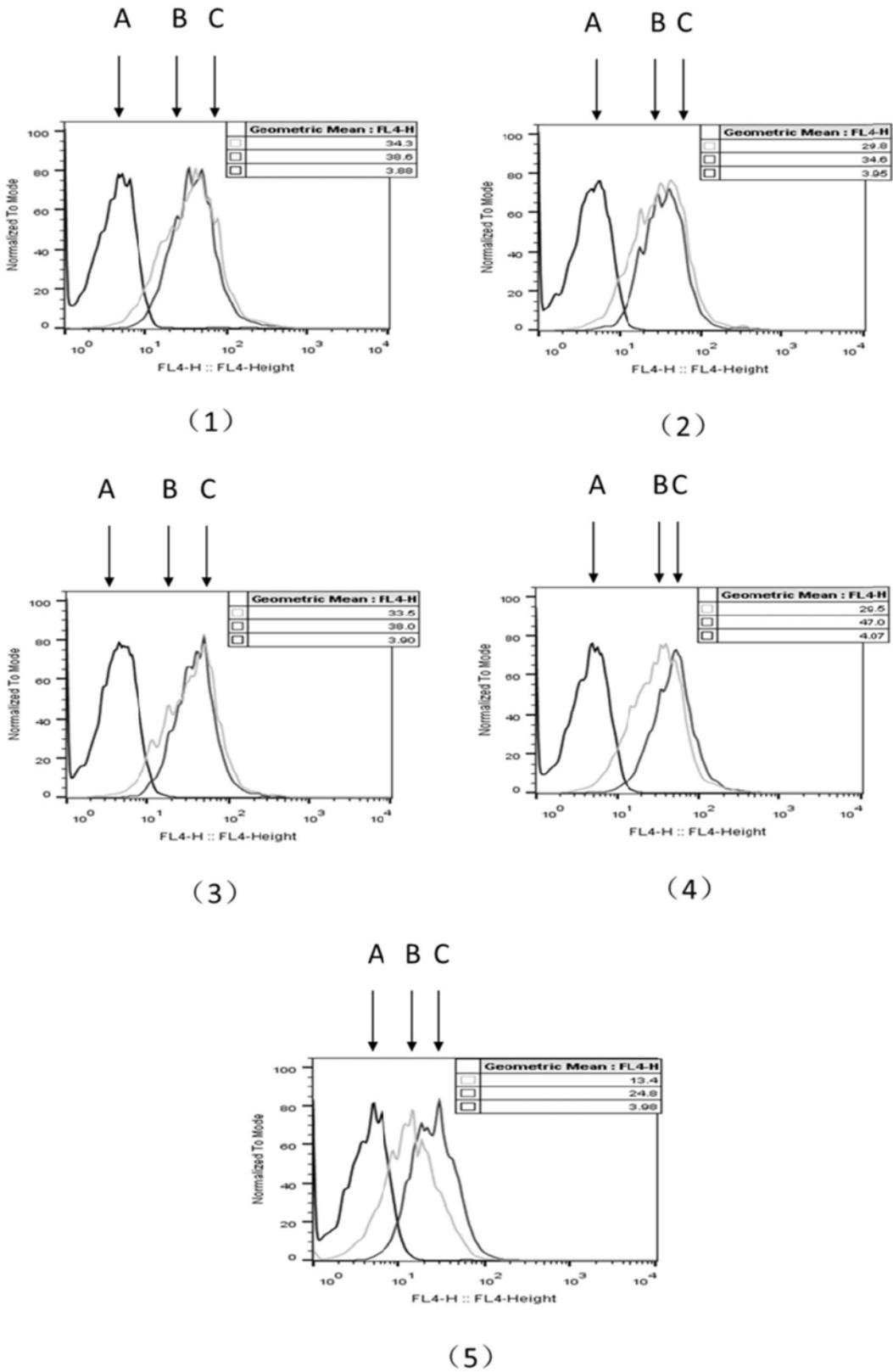


图4

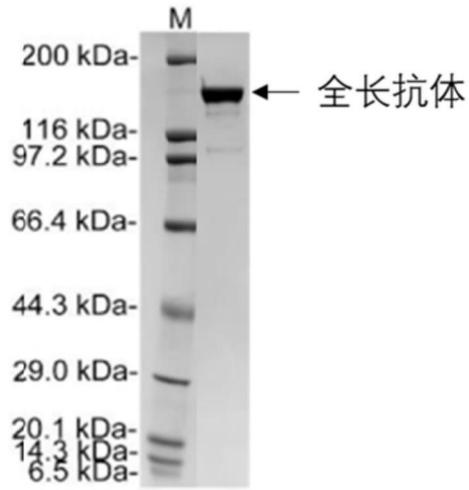


图5

抗体亚型	OD450nm
IgG1	1.8377
IgG2a	0.0696
IgG2b	0.0493
IgG2c	0.0467
IgG3	0.0472
IgM	0.0453
Kappa	0.7779
Lambda	0.0488

图6

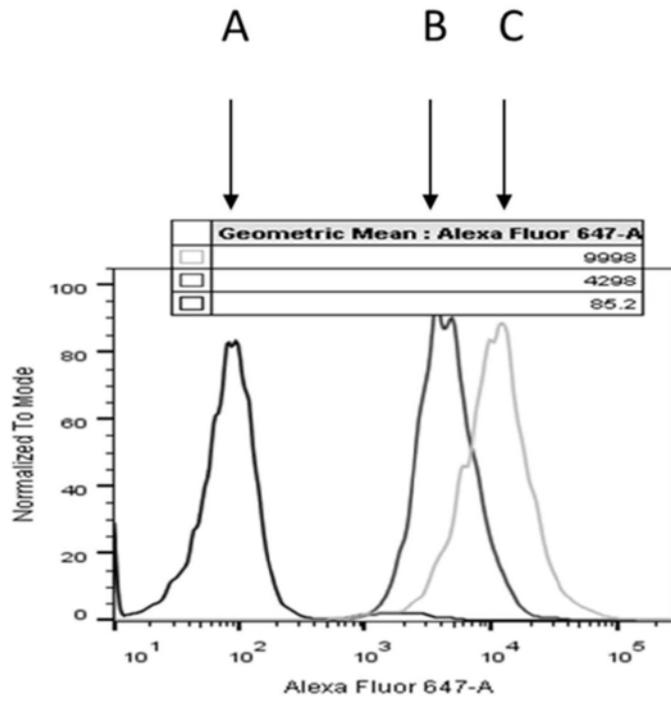


图7

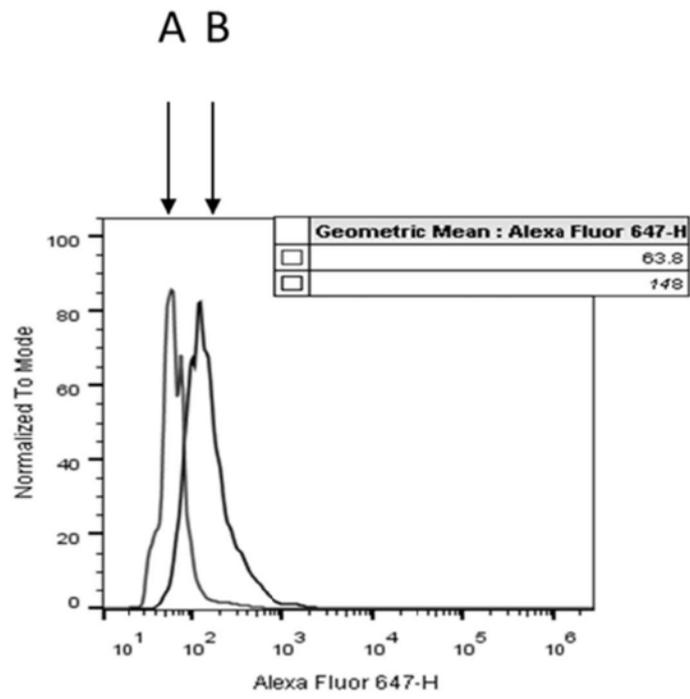


图8

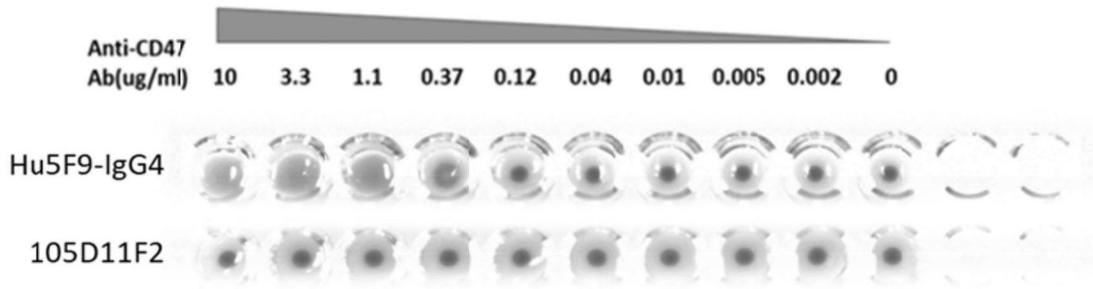


图9

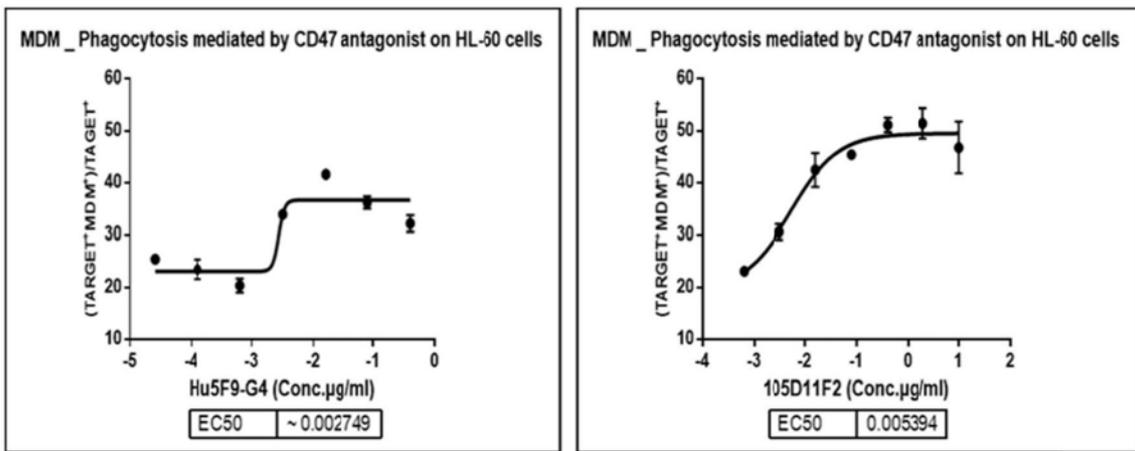


图10