



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110734897 A

(43)申请公布日 2020.01.31

(21)申请号 201911050228.0 *C12N 15/13*(2006.01)
(22)申请日 2019.10.31 *A61K 39/395*(2006.01)
(83)生物保藏信息 *A61P 35/00*(2006.01)
CCTCC NO:C2019261 2019.10.29 *G01N 33/577*(2006.01)
(71)申请人 浙江蓝盾药业有限公司 *G01N 33/574*(2006.01)
地址 312030 浙江省绍兴市柯桥经济开发 *G01N 33/68*(2006.01)
区西环路586号科技园起航楼2号楼 *C12R 1/91*(2006.01)
505-506室
(72)发明人 郭志刚 黄子祥 赵行琦
(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)

权利要求书1页 说明书9页
序列表4页 附图4页

(54)发明名称

杂交瘤细胞株12G6、抗体及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种杂交瘤细胞株12G6,以及其产生的抗人SIRP α 单克隆抗体,本发明以具有生物活性的SIRP α 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SIRP α 特异性单克隆抗体,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12G6, 其特征在于, 该杂交瘤细胞株的保藏编号为CCTCC NO: C2019261。
2. 权利要求1所述杂交瘤细胞株12G6产生的抗人SIRP α 单克隆抗体。
3. 根据权利要求2所述的抗人SIRP α 单克隆抗体, 其特征在于, 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。
4. 根据权利要求2或3所述的抗人SIRP α 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。
5. 根据权利要求2或3所述的抗人SIRP α 单克隆抗体, 其特征在于, 其轻链可变区为SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。
6. 根据权利要求2或3所述的抗人SIRP α 单克隆抗体, 其特征在于, 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。
7. 一种编码权利要求2或3所述抗人SIRP α 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。
8. 一种药物组合物, 其特征在于, 其包含权利要求2或3所述的单克隆抗体。
9. 一种包含权利要求2或3所述单克隆抗体的检测试剂或者试剂盒。
10. 权利要求2或3所述单克隆抗体在制备治疗与人SIRP α 表达异常或过量、失控相关疾病的药物中的应用。

杂交瘤细胞株12G6、抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明于生物技术领域,特别是涉及一种杂交瘤细胞株12G6、其产生的能特异性且高亲和力结合人SIRP α 的单克隆抗体,其制备方法及其可变区序列,以及应用。

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的作用。

[0004] 信号调节蛋白 α (SIRP α , signal regulatory protein- α),作为免疫球蛋白超家族膜蛋白的成员之一,是SIRP家族中一个典型的抑制性受体。其特异性的表达于髓系细胞如巨噬细胞、树突状细胞,以及神经细胞膜表面。其作为一种跨膜蛋白,胞外区含有3个Ig样结构域,在其氨基的末端结构域能够与CD47的氨基的末端结构域相互结合发挥功能。信号调节蛋白 α 的胞内区是典型的酪氨酸抑制性受体序列,被其与自身相连的Src酪氨酸磷酸酶(SH2)激活,Src酪氨酸磷酸酶(SH2)包括两部分即SHP-1和SHP-2,通过磷酸化过程调节下游的信号通路。CD47是SIRP α 的天然配体,CD47-SIRP α 信号通路在多种生理机制中发挥作用。其中,以在体内巨噬细胞吞噬过程中发挥的作用为最有特征性的。当巨噬细胞表面的SIRP α 在与肿瘤细胞表面的CD47分子结合后,会介导“Don't eat me”的信号,使肿瘤细胞免于巨噬细胞的吞噬,发生免疫逃逸,进而导致肿瘤进展。针对CD47-SIRP α 信号通路,可以设计SIRP α 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。目前国内外报道的针对SIRP α 这一靶点的抗体药只有Boehringer Ingelheim开发的OSE-172,,其尚处于临床前期阶段。

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12G6、其产生的抗人SIRP α 单克隆抗体,其制备方法,其可变区氨基酸序列及核酸序列,以及制药应用。

[0006] 技术方案:本发明所述的杂交瘤细胞株12G6,保藏于中国典型培养物保藏中心,其保藏编号为CCTCC NO:C2019261,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12G6产生的抗人SIRP α 单克隆抗体。

[0008] 所述抗人SIRP α 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SIRP α 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] 所述的抗人SIRP α 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SIRP α 单克隆抗体还包括选自IgG2b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SIRP α 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SIRP α 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人SIRP α 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] 本发明以商品化的重组人SIRP α -hFc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SIRP α 抗体的杂交瘤细胞株12G6,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活性验证。

[0016] 有益效果:本发明成功制备了杂交瘤细胞株12G6,并通过其产生了抗人SIRP α 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SIRP α ,同时能阻断CD47与SIRP α 结合,该抗人SIRP α 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SIRP α 与食蟹猴SIRP α 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SIRP α 过表达稳定细胞株的流式检测结果,图(1)中A柱形图代表CHO-K1母细胞,B柱形图代表最终选择用于后续实验的人SIRP α 过表达细胞株,图(2)中A柱形图代表CHO-K1母细胞,B柱形图代表最终选择用于后续实验的食蟹猴SIRP α 过表达细胞株(横坐标为荧光强度,纵坐标为细胞数量);

[0019] 图3:2只免疫小鼠在第3次免疫后第7天抗血清与人SIRP α 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4:2只免疫小鼠在第3次免疫后第7天抗血清与人SIRP α 过表达细胞株结合流式检测结果,A柱形图代表PBS空白对照组,B柱形图代表#2小鼠抗血清,C柱形图代表#1小鼠抗血清(横坐标为荧光强度,纵坐标为细胞数量);

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

[0022] 图6:抗人SIRP α 单克隆抗体亚型鉴定ELISA检测结果;

[0023] 图7:纯化的抗人SIRP α 单克隆抗体与人和食蟹猴SIRP α 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、食蟹猴SIRP α 过表达细胞株、人SIRP α 过表达细胞株结合信号(横坐标为荧光强度,纵坐标为细胞数量);

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

具体实施方式

[0025] 下面结合具体实施例对本申请作出详细说明。

[0026] 实施例1:人SIRP α 和食蟹猴SIRP α 过表达CHO-K1稳定细胞系构建

[0027] 1) 穿梭载体构建

[0028] 人源SIRP α 蛋白序列

[0029] NP_542970 tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate lisoform 1 precursor [Homo sapiens]

[0030] MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWF
RGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTQRNMDFSIRIGNITPADAGTYCYVKFRKGGSPDDVEFKSGAGTELSVRA
KPSAPVVS GPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYIHSSTAKVVLTRD
VH SQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVPPTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGVSR
TETAS TVTENKDGTYNWSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQGSNTAAENTGS
NERNIYIVVG VVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSSTRLHEPEKNAREITQDNDITYADLNLPKGK
KPPAQAAEPNNHTEYA SIQTSPQPASEDTLYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQVPRK

[0031] 54,967Da,504aa,1-30为信号肽,31-373为胞外域,374-394为跨膜螺旋,395-504为胞内域。

[0032] 食蟹猴SIRP α 蛋白序列

[0033] XP_015313155 PREDICTED: tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate lisoform X2 [Macaca fascicularis]

[0034] MEPAGPAPGRLGPLLCLLLTASCAWSGVLGEEELQVIQPEKSVSVAAGDSATLNCTVSSLIPVGPIQWF
RGAGPGRELIYNLKEGHFPRVTPVSDPTQRNMDFSIRISNITPADAGTYCYVKFRKGGSPDVELKSGAGTELSVRAK
PSAPVVS GPAVRATAEHTVSFTCESHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPAGKSVSYISIRSTARVVLTRRDVHS
QVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSEAIRVPPFLEVTQQSMRADNQVNVTCQVTKFYPQRLQLTWLENGVSRTEMASA

LPENKDGTYNWTSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVNKSFSVKVSAHPKEQGSNTAAENTGTNERNIYIVVGV
VCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLEHEPEKNAREITQDTNDITYADLNLPKGKKPAPRAAEPNNHTEYAS
IQTSPQASEDTLTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQVPRK

[0035] 54,841Da,503aa。

[0036] 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。

[0037] 2) 病毒包装质粒制备

[0038] 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,同时使用超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。

[0039] 同时,用相同方法制备相应的病毒包装辅助质粒。

[0040] 3) 病毒包装

[0041] 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。

[0042] 4) CHO-K1细胞病毒侵染及加压筛选

[0043] 将病毒溶液加入到CHO-K1(北京北纳)细胞中,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。

[0044] 5) 单克隆培养

[0045] 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。

[0046] 6) 流式检测

[0047] 应用商品化小鼠抗人SIRP α 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SIRP α 蛋白表达量。间接免疫荧光标记的样品制备方法如下:

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 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。

[0051] d) 加入50 μl 商品化小鼠抗人SIRP α 单抗(R&D SYSTEMS MAB4546,10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)混匀,置室温下避光反应30min。

[0052] e) 用1ml PBS洗涤细胞1次,2000rpm,5min离心,吸弃上清液。

[0053] f) 加入50 μl 20倍稀释的APC标记山羊抗小鼠IGG荧光二抗(R&D SYSTEMS F0101B,2.5 $\mu\text{l}/2.5 \times 10^5$)混匀,室温下避光反应20min。

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

[0055] h) 加入200 μl PBS重悬成单细胞悬液,用流式细胞仪上机检测。

[0056] 检测结果表明,最终各筛选到两株高表达人SIRP α 和食蟹猴SIRP α 的稳定细胞株,分别如图2中的(1)和(2)所示,各选择其中一株SIRP α 表达量最高的细胞株作为后续实验使

用。

[0057] 实施例2:动物免疫及抗血清ELISA效价与流式细胞术测定

[0058] 选取2只6~8周龄Ba1b/c小鼠(北京斯贝福)同笼饲养,分别编号#1、#2。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SIRP α -hFc融合蛋白免疫原(Acro Biosystems SIA-H5251)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。

[0059] 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SIRP α -his融合蛋白(Acro Biosystems SIA-H5225)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 ImmunoResearch 115-035-072),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2只小鼠的抗血清效价均达到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SIRP α 的高亲和力抗体。

[0060] 采用流式细胞术检测抗血清与人细胞膜上SIRP α 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中最终选取的人SIRP α 表达量最高的细胞株。检测结果显示,2只小鼠的抗血清均能结合细胞膜上人SIRP α ,而#1小鼠结合活性较高(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SIRP α 的高亲和力抗体。

[0061] 第三次免疫后间隔28天选取与人细胞膜上SIRP α 结合活性最高的#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。

[0062] 实施例3杂交瘤单克隆细胞株的制备

[0063] 1.细胞融合

[0064] 细胞融合采用聚乙二醇法。具体操作如下:

[0065] 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。

[0066] 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。

[0067] 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℃,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 μ m筛网过滤制成单细胞悬液。

[0068] 4) 将预先处理好的SP2/0-Ag14细胞和脾细胞混合均匀,离心1000rpm×5min,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在干净。取1ml 37℃预温的PEG1450(SIGMA),缓慢滴加到细胞沉淀上,作用90s,立即加入37℃预温的无血清RPMI1640基础培养基,5分钟内加完,混匀后离心800×5min,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,80μl/每孔,于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养。

[0069] 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,120μl/每孔,继续培养5~7天。

[0070] 2. 阳性融合细胞的筛选及亚克隆化

[0071] 通过间接ELISA检测各孔中细胞分泌抗体的情况。以重组人SIRPα-his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SIRPα-his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SIRPα和食蟹猴SIRPα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CD47蛋白与细胞表面SIRPα结合情况,最终选择了一个能够较好阻断CD47蛋白与细胞表面SIRPα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12G6,保藏于中国典型培养物保藏中心,其保藏编号为CCTCC NO:C2019261,地址:武汉市武汉大学,保藏时间:2019年10月29日。

[0072] 实施例4抗人SIRPα单克隆抗体的制备及纯化

[0073] 1. 腹水制备

[0074] 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℃,长时间保存在-20℃。

[0075] 2. 抗体纯化

[0076] 1) 取上述保存腹水14000rpm离心10min,除去细胞碎片和颗粒杂质。

[0077] 2) 转移上清液并用滤纸过滤,收集滤出液并测量体积。

[0078] 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。

[0079] 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℃静置过夜,使蛋白质充分沉淀。

[0080] 5) 第二天取出直接10000rpm离心30min,弃上清保留沉淀晾干。

[0081] 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。

[0082] 7) 加入滤出液两倍体积的结合缓冲液稀释浓缩液,并用0.45μm滤膜过滤。

[0083] 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。

[0084] 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。

[0085] 3. 抗体浓度及纯度测定

[0086] 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)。

[0087] 实施例5抗人SIRP α 单克隆抗体的特性鉴定

[0088] 1. 抗体亚型的鉴定

[0089] 采用Mouse单克隆抗体亚型鉴定试剂盒 (Proteintech) 鉴定得到的抗人SIRP α 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SIRP α 单克隆抗体的重链亚型为IgG2b,轻链亚型为Kappa。

[0090] 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。

[0091] 2. 流式细胞术检测抗体与细胞膜上SIRP α 的反应性

[0092] 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SIRP α 单克隆抗体与人和食蟹猴SIRP α 过表达细胞膜上SIRP α 结合情况。如图7结果表明,我们得到的抗人SIRP α 单克隆抗体能以较高亲和力结合细胞膜上人SIRP α ,而与食蟹猴SIRP α 结合能力稍弱于与人SIRP α 结合能力。

[0093] 3. 流式细胞术检测抗体阻断CD47蛋白与细胞表面SIRP α 结合

[0094] 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SIRP α 单克隆抗体阻断CD47与细胞表面的SIRP α 结合。人SIRP α 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 CD47-hFc蛋白 (Acro Biosystems CD7-H5256),同时将抗人SIRP α 单克隆抗体加入共孵育,流式细胞术检测CD47-hFc蛋白与人SIRP α 过表达细胞株的结合情况。从流式结果来看(图8),抗人SIRP α 单克隆抗体可以较好的阻断CD47蛋白与细胞表面SIRP α 结合。

[0095] 实施例6杂交瘤细胞株重轻链可变区基因的克隆

[0096] 1. 抗人SIRP α 单克隆抗体重轻链可变区基因提取、扩增及初步鉴定

[0097] 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' sTMmRNA 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。

[0098] 2. 抗人SIRP α 单克隆抗体重轻链可变结构域的基因测序及分析

[0099] 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96%,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。

[0100] 抗体可变区核酸及氨基酸序列

[0101] SEQ ID N01:

[0102] CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAG
GCTTCTGGATATACCTTCACAACTATGGAATGCACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGATTTGAAGTGGATGGG
CTGGATAAACACCTACACTGGAGAGCCAACAAATGCTGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGAAACCT
CTGACAGGACTGCCTTTTTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCAACATATTTCTGTGCAAGAGGGCAT
CACTATGGTAACTACGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0103] SEQ ID N02:

[0104] QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTNYGMHWVKQAPGKDLKWMGWINTYTGEPTNADDFKGRFA
FSLETSDRTAFLQINNLKNETATYFCARGHHYGNIAWFAYWGQGLVTVSA

[0105] SEQ ID N03:

[0106] AACTATGGAATGCAC

[0107] SEQ ID N04:

[0108] NYGMH

[0109] SEQ ID N05:

[0110] TGGATAAACACCTACACTGGAGAGCCAACAAATGCTGATGACTTCAAGGGA

[0111] SEQ ID N06:

[0112] WINTYTGEPTNADDFKG

[0113] SEQ ID N07:

[0114] GGGCATCACTATGGTAACTACGCCTGGTTTGCTTAC

[0115] SEQ ID N08:

[0116] GHYGNIAWFAY

[0117] SEQ ID N09:

[0118] GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGC
AAGGCCAGTCAGGATGTGAGTCTTGCTGTAGCCTGGTATCAACAAAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGTACTGATTTA
TTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCGCAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTATACTCTACCA
TCAGTAGTGTTTCAGGCTGAAGACCTGGCACTTTATTACTGTCAGCAACATTATAGCACTCCGTGGACGTTTCGGTGA
GGCACCAAGCTGGAAATCAAT

[0119] SEQ ID N010:

[0120] DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSLAVAWYQQKPGQSPKVLIIYWASTRHTGVPDRFAGSGSGT
DYTLTISSVQAEDLALYYCQQHYSTPWFVGGGKLEIN

[0121] SEQ ID N011:

[0122] AAGGCCAGTCAGGATGTGAGTCTTGCTGTAGCC

[0123] SEQ ID N012:

- [0124] KASQDVSLAVA
- [0125] SEQ ID N013:
- [0126] TGGGCATCCACCCGGCACACT
- [0127] SEQ ID N014:
- [0128] WASTRHT
- [0129] SEQ ID N015:
- [0130] CAGCAACATTATAGCACTCCGTGGACG
- [0131] SEQ ID N016:
- [0132] QQHYSTPWT

序列表

<110> 浙江蓝盾药业有限公司

<120> 杂交瘤细胞株12G6、抗体及其应用

<160> 16

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```
cagatccagt tgggtcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
tcctgcaagg cttctggata taccttcaca aactatggaa tgcactgggt gaagcaggct 120
ccaggaaagg atttgaagtg gatgggctgg ataaacacct aactggaga gccaacaaat 180
gctgatgact tcaagggacg gtttgcttc tctttgaaa cctctgacag gactgccttt 240
ttcgatgca acaacctcaa aaatgaggac acggcaacat atttctgtgc aagagggcat 300
cactatggta actacgcctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct 360
gca 363
```

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

```
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1           5           10           15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
           20           25           30
Gly Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Asp Leu Lys Trp Met
           35           40           45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Asn Ala Asp Asp Phe
           50           55           60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Asp Arg Thr Ala Phe
65           70           75           80
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
           85           90           95
Ala Arg Gly His His Tyr Gly Asn Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
           100          105          110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
           115          120
```

<210> 3
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 3
 aactatggaa tgcac 15
 <210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 4
 Asn Tyr Gly Met His
 1 5
 <210> 5
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 5
 tggataaaca cctacactgg agagccaaca aatgctgatg acttcaagg a 51
 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 6
 Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Asn Ala Asp Asp Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 7
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 7
 gggcatcact atggtaacta cgcttggttt gcttac 36
 <210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 8
 Gly His His Tyr Gly Asn Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr

<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 12
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Leu Ala Val Ala
1 5 10
<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 13
tgggcatcca cccggcacac t 21
<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 14
Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5
<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 15
cagcaacatt atagcactcc gtggacg 27
<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 16
Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

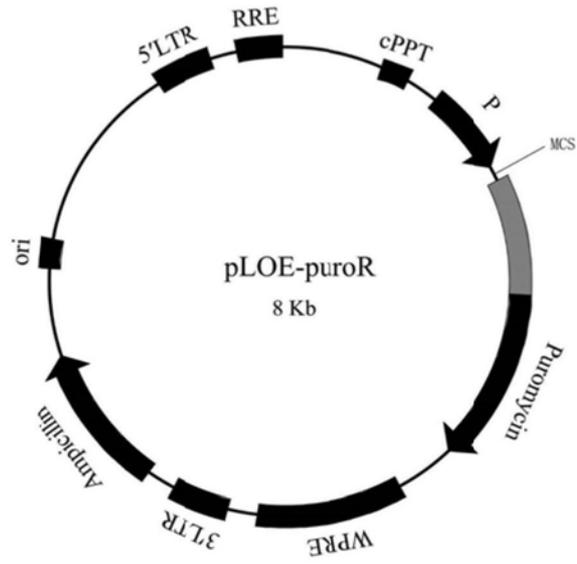


图1

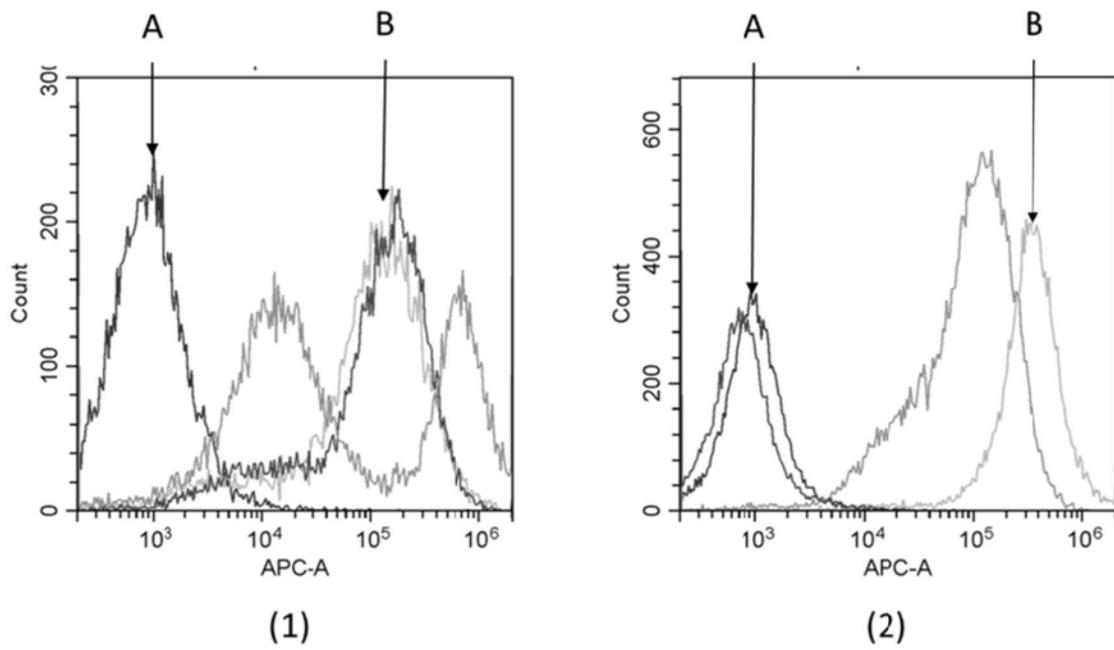


图2

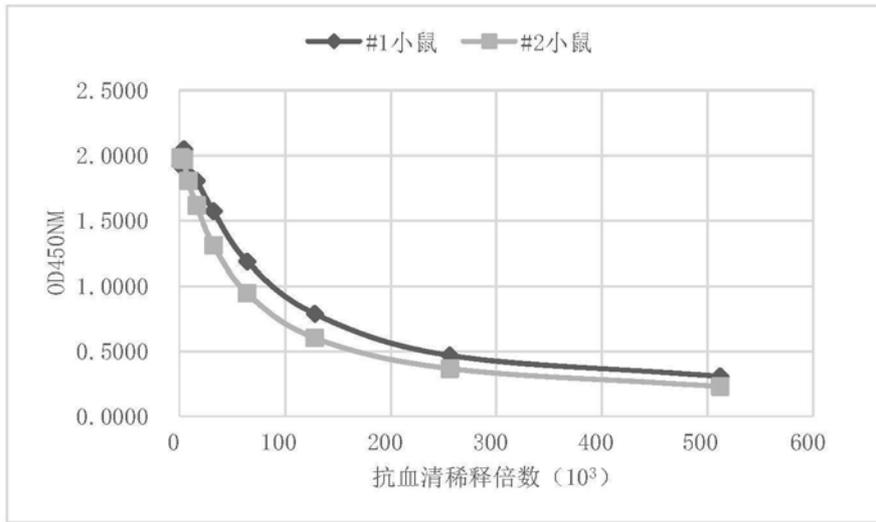


图3

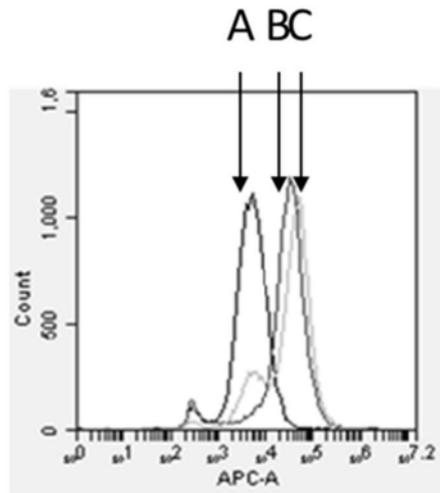


图4

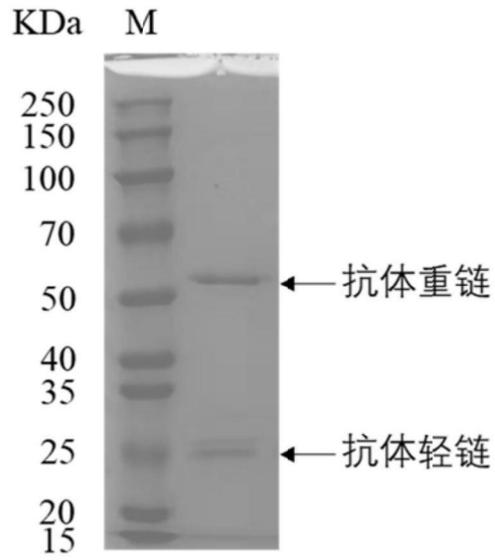


图5

抗体亚型	OD450nm
IgG1	0.109
IgG2a	0.1196
IgG2b	2.7380
IgG2c	0.0862
IgG3	0.0957
IgM	0.0754
Kappa	1.0934
Lambda	0.0886

图6

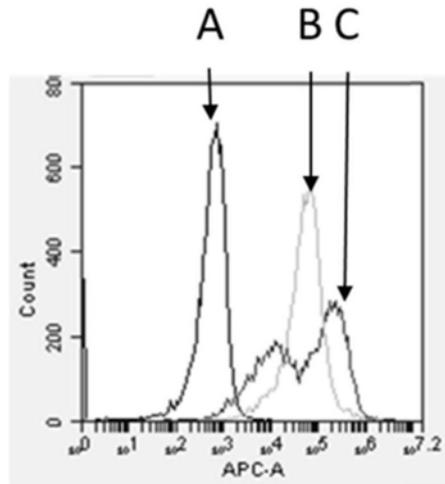


图7

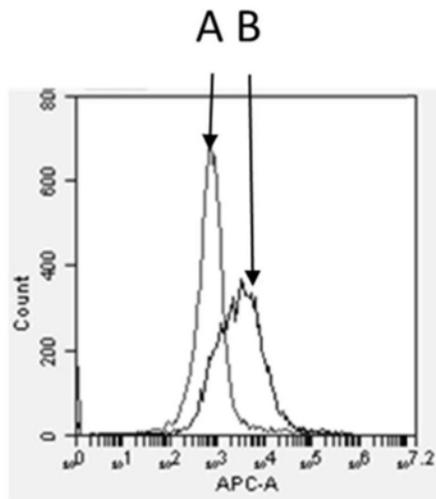


图8