



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107619443 B

(45)授权公告日 2020.08.14

(21)申请号 201610554612.4

US 2010278832 A1,2010.11.04,

(22)申请日 2016.07.14

Shigeto Kawai et al..Interferon-a

(65)同一申请的已公布的文献号

enhances CD317 expression and the antitumor activity of anti-CD317 monoclonal antibody in renal cell carcinoma xenograft models.《Cancer Science》.2008,第99卷(第12期),第2461-2466页.

申请公布号 CN 107619443 A

(43)申请公布日 2018.01.23

(73)专利权人 深圳宾德生物技术有限公司

地址 518055 广东省深圳市南山区西丽同富裕工业城6栋5楼

(72)发明人 万晓春 刘绿艳 李俊鑫 章桂忠 李欣

Shigeto Kawai et al..Antitumor activity of humanized monoclonal antibody against HM1.24 antigen in human myeloma xenograft models.《Oncology Reports》.2006,第15卷第361-367页.

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202

代理人 郝传鑫 熊永强

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01) (续)

Wei Wang et al..HM1.24 (CD317) is a novel target against lung cancer for immunotherapy using anti-HM1.24 antibody.《Cancer Immunol Immunother》.2008,第58卷第967-976页. (续)

(56)对比文件

- CN 1277632 A,2000.12.20,
CN 104031150 A,2014.09.10,
CN 1250381 A,2000.04.12,
US 2014205605 A1,2014.07.24,
US 2007142627 A1,2007.06.21,
US 2008219974 A1,2008.09.11,
US 2004136982 A1,2004.07.15,

审查员 吴志琳

权利要求书1页 说明书11页
序列表3页 附图3页

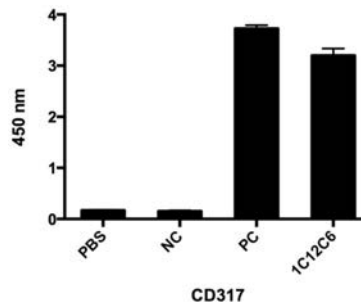
(54)发明名称

抗人和鼠CD317的单克隆抗体及其制备方法和应用

CD317蛋白,能够作为ELISA、Western blot、免疫组化等科研试剂,也能够构建scfv改造T细胞用于免疫细胞治疗,应用性极强。

(57)摘要

本发明提供了一种抗人和鼠CD317的单克隆抗体及其制备方法和应用。所述抗人和鼠CD317的单克隆抗体具有的特异性抗原结合结构域既可以靶向结合人、鼠的CD317蛋白。商品化抗CD317单克隆抗体只能靶向人CD317或只能靶向鼠的CD317蛋白,功能也比较单一,或只能做免疫印迹实验,或只能做免疫组化、流式等实验。本发明提供的抗人和鼠的CD317单克隆抗体既可以靶向结合人的CD317蛋白也可以靶向结合鼠的



CN 107619443 B

[接上页]

(51) Int.Cl.

C12N 15/13(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56) 对比文件

王瑞红. 新型功能分子BST2单克隆抗体的制备、鉴定和初步应用.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》.2013,(第4期), E059-98.

Koichiro Ono et al..The humanized anti-HM1.24 antibody effectively kills multiple myeloma cells by human effector cell-mediated cytotoxicity.《Molecular Immunology》.1999,第36卷第387-395页.

Toshihiko Ohtomo et al..Molecular Cloning and Characterization of a Surface Antigen Preferentially Overexpressed on Multiple Myeloma Cells.《Biochemical and Biophysical Research Communications》.1999,第258卷(第3期),第583-591页.

1. 一种抗人和鼠CD317的单克隆抗体,其特征在于,所述抗人和鼠CD317的单克隆抗体包括至少一条HCVR氨基酸序列和至少一条LCVR氨基酸序列;其中,所述HCVR的氨基酸序列如SEQUENCE NO.1所示,所述LCVR的氨基酸序列如SEQUENCE NO.2所示。

2. 一种制备如权利要求1所述的抗人和鼠CD317的单克隆抗体的方法,其特征在于,包括:

将编码如权利要求1所述的抗人和鼠CD317的单克隆抗体的核苷酸序列用于构建表达所述的抗人和鼠CD317的单克隆抗体的重组表达载体;导入宿主细胞;在表达条件下,培养宿主细胞,表达,分离纯化,获得所述抗人和鼠CD317的单克隆抗体。

3. 一种药物组合物,包括至少一种如权利要求1所述的抗人和鼠CD317的单克隆抗体,及诊断剂、可药用的载剂、赋形剂或稀释剂。

4. 一种核酸分子,其特征在于,编码如权利要求1所述的抗人和鼠CD317的单克隆抗体的氨基酸序列。

5. 一种重组载体,其特征在于,具有如权利要求4所述的任一核酸分子序列。

6. 一种宿主细胞,其特征在于,包含如权利要求5所述的重组载体。

7. 一种检测试剂盒,其特征在于,包括固体检测支持物,所述固体检测支持物包含至少一种如权利要求1所述的抗人和鼠CD317的单克隆抗体;所述固体检测支持物是可连接大分子的固体表面。

8. 如权利要求1所述的抗人和鼠CD317的单克隆抗体在制备诊断、预防、治疗CD317疾病的试剂或药物中的应用。

9. 如权利要求8所述的应用,其特征在于,所述诊断为采用ELISA、Western blot、免疫组化方法检测CD317抗原。

抗人和鼠CD317的单克隆抗体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药和诊疗领域,具体涉及一种抗人和鼠CD317的单克隆抗体及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] CD317,即骨髓基质细胞抗原2 (BST2),高表达于人、小鼠的pDC细胞,病毒感染产生的IFN能够显著上调pDC的CD317表达水平。因此,CD317是pDC表面兼具相对特异性及可(被病毒)诱导性的蛋白,是病毒抗原靶向传输的理想靶点。另外研究发现,CD317也能介导抗原内化,参与抗原处理递呈等过程。与DEC205,Siglec-H相比,CD317介导抗原递呈效率更高。

[0003] 商品化抗CD317单克隆抗体只能靶向人CD317 (Biolegend,348405,peanti-human cd317)或只能靶向鼠的CD317蛋白 (Biolegend,127008 Fitc anti-mouse cd317),功能也比较单一,或只能做免疫印迹实验,或只能做免疫组化、流式等实验,浪费人力物力和时间,不利于开展科研实验和临床试验。

[0004] 人CD317和鼠CD317的同源性比较高,存在同一种抗原表位,理论上可同时靶向结合人和鼠细胞表面的CD317蛋白。另外,抗原的表位分为线性表位和空间表位,免疫印迹(western blot)检测的是抗原的线性表位,而免疫组化检测的有可能是线性表位也有可能是空间表位,这两个实验往往需要购买和使用两种单克隆抗体,加上如果既要做人CD317的检测又要做鼠CD317的检测,那么需要购买的单克隆抗体就更多了。

[0005] 本发明旨在提供一种既可以靶向结合人的CD317蛋白也可以靶向结合鼠的CD317蛋白,同时能够作为ELISA、Western blot、免疫组化等应用的CD317单克隆抗体,大大节约科研的成本和时间。

发明内容

[0006] 第一方面,本发明提供了一种抗人和鼠CD317的单克隆抗体,所述抗人和鼠CD317的单克隆抗体具有的特异性抗原结合结构域,既可以靶向结合人的CD317蛋白也可以靶向结合鼠的CD317蛋白。

[0007] 本发明的示例性抗人和鼠CD317的单克隆抗体列于文中的表1和表2。本发明提供的抗人和鼠CD317的单克隆抗体包括重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR)。表1列出了本发明提供的抗人和鼠CD317的单克隆抗体的HCVR、LCVR的氨基酸序列,及其在序列表中的序列号。表2列出了编码本发明所述的HCVR、LCVR氨基酸序列对应的核苷酸序列,及其在序列表中的序列号。

[0008] 本发明提供的抗人和鼠CD317的单克隆抗体的氨基酸序列包括:至少一条HCVR氨基酸序列、至少一条LCVR氨基酸序列;具体HCVR和LCVR优选为任一选自表1的氨基酸序列。

[0009] 编码本发明提供的抗人和鼠CD317的单克隆抗体的核苷酸序列包括:至少一条HCVR核苷酸序列、至少一条LCVR核苷酸序列;具体HCVR和LCVR优选为任一选自表2的核苷酸序列。

[0010] 表1 序列列表中的氨基酸序列

	氨基酸序列	
	HCVR	LCVR
抗人和鼠 CD317 的单克隆抗体种类及名称		
1C12C6-1 抗体	SEQUENCE NO. 1	SEQUENCE NO. 2
与 1C12C6-1、1C12C6-2 或 1C12C6-3 抗体具有同源序列的抗体	与 1C12C6-1、1C12C6-2 或 1C12C6-3 抗体氨基酸序列具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%同源性的氨基酸序列	

[0012] 在本发明一实施例中,3条不同序列的抗人和鼠CD317的单克隆抗体,在表1中编号分别为1C12C6-1、1C12C6-2、1C12C6-3,其中1C12C6-1是经过筛选出的最佳效果的抗人和鼠CD317的单克隆抗体。

[0013] 在本发明一些实施例中,表1各序列具体为:

[0014] SEQUENCE NO.1 (1C12C6.HCVR) 的氨基酸序列为:

[0015] EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATINSNGANTYYPDSVKGRF TISRDNKNTLYLQMSLKS EDTAMYYCARIYDAYSSWFTYWGEGTFVTNVL;

[0016] SEQUENCE NO.2 (1C12C6.LCVR) 的氨基酸序列为:

[0017] DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGIKNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSG TDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGAGTKLEINGGGGSGGGGSGGGGS。

[0018] 表2 序列列表中的核苷酸序列

	氨基酸序列	
	HCVR	LCVR
抗人和鼠 CD317 的单克隆抗体种类及名称		
1C12C6-1 抗体	SEQUENCE NO. 3	SEQUENCE NO. 4
与 1C12C6-1、1C12C6-2 或 1C12C6-3 抗体具有同源序列的抗体	与 1C12C6-1、1C12C6-2 或 1C12C6-3 抗体氨基酸序列具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%同源性的氨基酸序列	

[0020] 在本发明一些实施例中,表2各序列具体为:

[0021] SEQUENCE NO.3 (1C12C6.HCVR) 的核苷酸序列为:

[0022] gaggtgcagctggtggagtctggggaggcttagtgcagcctggagggtccctgaaactctcctgtgc agcctctggattcactttcagtagttatggcatgtcttgggttcgccagactccagacaagaggctggagtggtc gcaaccattaatagtaatggtgctaacacctattatccagacagtgtaagggccgattcaccatctccagagaca atgccaagaacaccctgtacctgcaaatgagcagcttgaagctctgaggacacagccatgtattactgtgcaaggat ctatgatgcttactcctcctggtttacttactgggggtgaaggaacttttgtcacagtcaatctc;

[0023] SEQUENCE NO.4 (1C12C6.LCVR) 的核苷酸序列为:

[0024] gatatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatcagttg cagtgcaagtcaggggattaaaaattttaaactgggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctgatc tattacacatcaagtttacactcaggagtcccatc aaggttcagtggcagtggtctgggacagattattctctc accatcagcaacctggaacctgaagatattgccacttactattgtcagcagtatagtaagcttccgtacacgttcg

gcgcagggcacaaaattggaaatcaatgggtggcggtggctcgggcggtgggtgggtcgggtggcgcgatct。

[0025] 具体地,SEQUENCE NO.3-4分别对应编码SEQUENCE NO.1-2的氨基酸序列。

[0026] 鉴于序列同源性,本领域技术人员可以理解的是,如下实施方案应纳入本发明保护范围:

[0027] 在本发明一些实施例中,所述的HCVR为与表1中所示任一HCVR氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的氨基酸序列。

[0028] 在本发明一些实施例中,所述的LCVR为与表1中所示任一LCVR氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的氨基酸序列。

[0029] 在本发明一些实施例中,所述的编码HCVR的序列为与表2中所示任一HCVR核苷酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的核苷酸序列。

[0030] 在本发明一些实施例中,所述的编码LCVR的序列为与表2中所示任一LCVR核苷酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的核苷酸序列。

[0031] 可以理解的,由于“核苷酸序列”具有碱基简并、突变等情况,行业内普通技术人员可调整某些碱基的种类,所述的碱基变化虽然导致了密码子的变化,但不会引起密码子翻译的氨基酸的变化,很常见的,亮氨酸的密码子就具有多种密码子,比如:UUA、UUG、CUU。

[0032] 在本发明一个实施例中,HCVR(V_H)和LCVR(V_L)之间还连接有连接肽,连接肽的氨基酸序列为(GGGGS) n ($n=1-4$)、(GGG) 4 或(Gly) n ($n=6-8$),但不限于此。该连接肽主要采用了以甘氨酸和丝氨酸为主构成的多肽序列,其中,甘氨酸是分子量最小、侧链最短的氨基酸,可增加侧链的柔韧性;丝氨酸是亲水性最强的氨基酸,可增加肽链的亲水性。

[0033] 在本发明一些实施例中,所述抗人和鼠CD317的单克隆抗体的N段具有免疫球蛋白 κ 链信号肽的氨基酸序列。

[0034] 本发明提供的所述抗人和鼠CD317的单克隆抗体的N端加上了免疫球蛋白轻链 κ 链的分泌信号肽,从而保证抗体的表达并分泌到宿主细胞外。

[0035] 第二方面,本发明还提供了一种如第一方面所述的抗人和鼠CD317的单克隆抗体的制备方法,该方法包括:将第一方面所述的抗人和鼠CD317的单克隆抗体的核苷酸序列用于构建表达所述的抗人和鼠CD317的单克隆抗体的重组表达载体;导入宿主细胞;在表达条件下,培养宿主细胞,表达,分离纯化,获得所述抗人和鼠CD317的单克隆抗体。

[0036] 第三方面,本发明还提供了如第一方面所述的抗人和鼠CD317的单克隆抗体按下述一种或多种方法进行应用:

[0037] (1) 将所述抗人和鼠CD317的单克隆抗体单独进行应用;

[0038] (2) 将所述抗人和鼠CD317的单克隆抗体与化疗、放疗、手术、生物治疗、免疫治疗中的一种或几种联合应用;

[0039] (3) 结合CAR-T技术对如权利要求1所述抗人和鼠CD317的单克隆抗体进行应用。

[0040] 在本发明一些实施例中,应用(1)中,采用体内投递的方式将所述抗人和鼠CD317的单克隆抗体直接投递到患者体内进行治疗。

[0041] 在本发明一些实施例中,应用(1)中,先通过体外转染技术将所述抗人和鼠CD317的单克隆抗体与免疫效应细胞混合,然后将所述混有抗人和鼠CD317的单克隆抗体的免疫效应细胞输回患者体内实施治疗。

[0042] 在本发明一些实施例中,应用(1)或(2)中,向患者施用如上抗人和鼠CD317的单克

隆抗体或含抗人和鼠CD317的单克隆抗体的药物组合物,可向患者施用多于一次。

[0043] 在本发明一些实施例中,应用(1)或(2)中,所述的投递的方式为靶向投递,包括但不限于采用可靶向投递的liposome脂质体(或其多聚体)等行业常用载体进行投递。

[0044] 通过向包括人的哺乳动物施用本发明第一方面提供的抗体或第四方面提供的药物组合物,可预防或治疗骨髓瘤、乳腺癌、结肠癌或其他CD317的相关疾病,比如CD317表达异常或紊乱相关的疾病。

[0045] 本领域技术人员可以理解的是,可以将本发明第一方面提供的抗人和鼠CD317的单克隆抗体进行常见改造并应用,以CAR-T技术为例(如本发明第三方面应用(3)所述的:结合CAR-T技术对如权利要求1所述抗人和鼠CD317的单克隆抗体进行应用):将本发明第一方面提供的抗人和鼠CD317的单克隆抗体做成CAR,转染T细胞,靶向杀伤肿瘤。可以理解的是,本发明所述的“CAR-T技术”为:通过将识别肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)的scFv和胞内信号域“免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, ITAM,通常为CD3 ζ 或Fc ϵ RI γ)”在体外进行基因重组,生成重组质粒,再在体外通过转染技术转染到患者的T细胞,使患者T细胞表达肿瘤抗原受体,转染后经过纯化和大规模扩增后的T细胞,称之为嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)。

[0046] 第四方面,本发明提供了一种药物组合物,包括至少一种如第一方面所述的抗人和鼠CD317的单克隆抗体,及可药用的载剂、赋形剂或稀释剂。

[0047] 本发明提供的药物组合物可根据常规方法制成药物制剂。制剂过程中,优选将抗体与载体混合或用载体稀释,或装入容器形式的载体中。当载体作为稀释剂时,其可以为固体、半固体或液体,用作用于抗体的囊泡、赋形剂或培养基。因此,制剂可以是片剂、丸剂、粉剂、袋装剂、胶囊、酏剂、混悬剂、乳剂、溶液剂、糖浆剂、气溶胶、软和硬明胶胶囊、注射用无菌溶液、无菌粉剂等形式。合适的载体、赋形剂或稀释剂的实例包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟苯甲酸甲酯、羟苯甲酸丙酯、滑石粉、硬脂酸镁和矿物油。制剂还可以包括填充剂、抗凝血剂、润滑剂、润湿剂、调味剂、乳化剂、防腐剂等。

[0048] 第五方面,本发明提供了一种诊断试剂,包括至少一种如第一方面所述的抗人和鼠CD317的单克隆抗体,及诊断剂,所述的诊断剂包括但不限于荧光团、发色团、染料、放射性同位素、化学发光分子、顺磁性离子或自旋捕获试剂。

[0049] 第六方面,本发明提供了一种如第一方面所述的抗人和鼠CD317的单克隆抗体在ELISA、Western blot、免疫组化检测CD317抗原中的应用。

[0050] 第七方面,本发明提供了一种核酸分子,编码如第一方面所述的抗人和鼠CD317的单克隆抗体的氨基酸序列;在某些实施方式中,所述的核酸分子编码的氨基酸序列,为与如第一方面所述抗人和鼠CD317的单克隆抗体的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的氨基酸序列。

[0051] 第八方面,本发明提供了一种表达如第一方面所述的抗人和鼠CD317的单克隆抗体的重组载体;在某些实施方式中,所述的重组载体具有本发明第七方面提供的任一核酸分子序列。

[0052] 在本发明一些实施例中,所述的载体为质粒载体。具体地,所述重组载体是在空质粒的多克隆位点中插入本发明第七方面提供的任一核酸分子序列获得,具体插入方法可采

用常规的基因克隆,也可采用无缝克隆(Seamless cloning)。

[0053] 在本发明一些实施例中,所述的重组载体还包含表达目的多肽(本发明中为抗人和鼠CD317的单克隆抗体)所需的所有必要元件的基因表达系统,通常其包括以下元件:启动子、编码多肽的基因序列,终止子;此外还可选择性包括信号肽编码序列等;这些元件是操作性相连的。

[0054] 如本文所用,所述的“可操作地连接”是指两个或多个核酸区域或核酸序列的功能性的空间排列。例如:启动子区被置于相对于目的基因核酸序列的特定位置,使得核酸序列的转录受到该启动子区域的引导,从而,启动子区域被“可操作地连接”到该核酸序列上。优选地,所述信号肽为免疫球蛋白κ链信号肽。优选地,所述标签为His标签、GST标签、c-myc标签和Flag标签中的至少一种。以上的信号肽和标签种类为本发明人的优选方式,本领域技术人员可以根据具体需要选择合适的信号肽和标签。

[0055] 第九方面,本发明提供了一种具有如第八方面所述载体的宿主细胞(优选为真核细胞或包括人在内的哺乳动物细胞);还提供了将如第八方面所述载体导入宿主细胞中的方法;还提供了通过在允许产生抗体的条件下培养具有所述载体的宿主细胞,并分离力所产生的抗体的方法。

[0056] 第十方面,本发明提供了一种检测试剂盒,包括固体检测支持物,所述的固体检测支持物包含至少一种如第一方面所述的抗人和鼠CD317的单克隆抗体。在一些实施方式中,所述固体支持物是可连接大分子如抗体、蛋白质、多肽、肽、多核苷酸的固体表面,如磁性珠、胶乳珠、微量滴定板孔、玻璃平板、尼龙、琼脂糖、聚丙烯酰胺、二氧化硅颗粒、硝酸纤维素膜等。

[0057] 第十一方面,本发明提供了一种在待测样品中检测异常细胞的方法,其包括使所述样品与至少一种如第一方面所述的抗人和鼠CD317的单克隆抗体相接触。在一些实施方式中,所述的样品来自骨髓、乳腺、结肠或经切除的肿瘤床。

[0058] 如本发明所述,“异常细胞”是具有对于该细胞类型为非典型特征(包括非典型生长、非典型位置处的典型生长或针对非典型靶标的典型作用)的任何细胞。这样的细胞包括癌细胞、良性增生细胞或发育异常细胞或炎性细胞。

[0059] 在本发明一些实施例中,采用如第十一方面所述的方法对移植前捐赠的组织或器官进行筛选,以提供基本不含CD317的组织或器官。

[0060] 在本发明一些实施例中,采用如第十一方面所述的方法对血液供给品进行筛选,以提供基本不含CD317的血液供给品。

[0061] 第十二方面,如第一方面所述的抗人和鼠CD317的单克隆抗体或如第八方面所述的重组载体在制备诊断、预防、治疗CD317相关疾病的试剂或药物中的应用。

[0062] 如本发明所述的,所述的“CD317疾病”包括但不限于CD317表达异常或紊乱相关疾病,比如,CD317抗原阳性的骨髓瘤、乳腺癌、结肠癌。

[0063] 商品化抗CD317单克隆抗体只能靶向人CD317或只能靶向鼠的CD317蛋白,功能也比较单一,或只能做免疫印迹实验,或只能做免疫组化、流式等实验,浪费人力物力和时间,不利于开展科研实验和临床试验。

[0064] 本发明提供的抗人和鼠的CD317单克隆抗体既可以靶向结合人的CD317蛋白也可以靶向结合鼠的CD317蛋白,能够作为ELISA、Western blot、免疫组化等科研试剂,应用性

极强。

附图说明

- [0065] 图1为本发明实施例1提供的单克隆抗体的制备方法流程图；
- [0066] 图2为本发明实施例1提供的间接ELISA测定抗血清效价结果；
- [0067] 图3为本发明实施例2提供的Western Blot检测CD317抗体与CD317的结合的结果；
- [0068] 图4为本发明实施例3提供的CD317 1C12C6株单克隆抗体亚型鉴定的结果；
- [0069] 图5本发明实施例4提供的CD317单抗与JURKET细胞表面的CD317分子结合的流式检测结果；
- [0070] 图6本发明实施例4提供的CD317单抗与RAW细胞表面的CD317分子结合的流式检测结果；
- [0071] 图7本发明实施例5提供的琼脂糖凝胶电泳鉴定结果。

具体实施方式

[0072] 以下所述是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也视为本发明的保护范围。

[0073] 本发明实施例中无特别说明外,所用试剂及耗材均为市售商品。

[0074] 实施例1 单克隆抗体的制备

[0075] 本发明实施例1提供的单克隆抗体的制备方法流程图如图1所示。

[0076] 结合图1,本发明实施例2提供了一种单克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0077] (1) 动物免疫

[0078] 1) 每只老鼠标记后,断尾取血约20u1,-20度保存作为免疫前对照。

[0079] 2) 以本发明以纯化的人CD317蛋白为免疫抗原免疫Balb/c小鼠,100μg/kg体重,共注射六只。首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂,颈背部皮下多点注射,每个注射点注射30-50u1左右混有佐剂的抗原,每只小鼠注射6-8个点为宜;

[0080] 间隔1周进行二免和三免,方法剂量同一免;

[0081] 取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化,继续四免、方法剂量同一免,四免一周后尾部采血检测血清效价及抑制,待检测符合要求时腹腔冲击免疫一次,3天后取脾细胞。

[0082] (2) 细胞融合和克隆化

[0083] 取免疫Balb/c小鼠脾细胞,按5:1比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争ELISA测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0084] (3) 细胞冻存和复苏

[0085] 取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 5×10^6 个/ml的细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0086] (4) 单克隆抗体的制备与纯化

[0087] 采用体内诱生法,将8周龄的Balb/c小鼠腹腔注入弗氏不完全佐剂0.5ml/只,7天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^6 个/只,7天后采集腹水。用亲和层析柱进行腹水纯化,紫外分光光度计测定蛋白浓度,-20℃保存备用。

[0088] 间接ELISA测定抗血清效价。以包被抗原的最佳浓度包板,阳性血清及阴性血清(作为阴性对照)从1:4000起倍比稀释,同时以PBS作空白对照:

[0089] 试剂:包被缓冲液(pH9.6,0.05M碳酸盐缓冲液),0.015M,pH7.4的PBS-T洗涤缓冲液,封闭液,终止液。

[0090] (1)包被:将抗原用包被缓冲液作系列稀释25ng/well,每个板孔加入100μL,37℃孵育3h,甩净孔内液体,PBS-T洗涤三次;

[0091] (2)封闭:每孔加入200μL 5%的脱脂奶粉,37℃孵育1h,甩净孔内液体,PBS-T洗涤三次;

[0092] (3)孵育一抗:每孔加入100μL细胞培养上清,37℃孵育1h,甩净孔内液体,PBS-T洗涤三次;

[0093] (4)孵育二抗:每孔加入100μL稀释度为1:8000的羊抗鼠IgG-HRP二抗,37℃孵育30min,甩净孔内液体,PBS-T洗涤五次;

[0094] (5)显色:每孔加入100μL TMB底物,避光反应10min;

[0095] (6)终止:每孔加入50μL 2mol/L硫酸;

[0096] (7)酶标仪测定OD450。

[0097] 结果如图2所示,PC为CD317免疫血清、1C12C6为本发明制备的单克隆抗体。结果表明,纯化的抗体表现出较高的特异性和灵敏性。

[0098] 实施例2 Western Blot检测CD317抗体与CD317的结合

[0099] 本发明实施例2提供了一种Western Blot检测CD317抗体与CD317的结合的方法,包括:

[0100] 试剂:HRP标记山羊抗小鼠IgG(H+L),CD317免疫血清,实施例1制备的CD317 1C12C6株。

[0101] 1) 12%分离胶,3%浓缩胶配制。

[0102] 2) 样本预处理:40ul样本+10ul上样缓冲液混合均匀,100℃热处理5min上样;上样顺序:蛋白预染marker,CD317;电泳的条件:首先跑浓缩胶,80V,30min,然后分离胶,120V,50min,直至染料离底部1cm处停止电泳。

[0103] 3) 转膜,转膜条件:电泳条件为100V,4℃,90min。

[0104] 4) 封闭,适量5%脱脂奶粉加入膜中,室温摇床孵育1h。

[0105] 5) 一抗孵育:抗CD317鼠单克隆抗体,稀释度1:8000,37℃孵育1h。PBST洗5次,每次5min。

[0106] 6) 二抗孵育:HRP标记山羊抗小鼠IgG(H+L),稀释度1:8000,室温摇床孵育30min。PBST洗5次,每次5min。

[0107] 7) 曝光:在暗室中向膜上加入曝光底物,于暗盒中曝光,然后将胶片放入显影液中显影5min,再在定影液中漂洗几次晾干即可。结果如图3所示,由图3可知,本发明实施例制备的CD317-1C12C6株可与CD317高效结合。

[0108] 实施例3 CD317 1C12C6株单克隆抗体亚型鉴定

[0109] 本发明实施例3提供了一种CD317 1C12C6株单克隆抗体亚型鉴定的方法,包括:

[0110] 试剂:包被缓冲液(pH9.6,0.05M碳酸盐缓冲液),0.015M,pH7.4的PBS-T洗涤缓冲液,封闭液,终止液

[0111] 实验步骤:采用间接ELISA测定抗体亚型,以包被抗原的最佳浓度包板,同时以PBS作空白对照,具体过程包括:

[0112] (1)包被:将抗原用包被缓冲液作系列稀释25ng/well,每个板孔加入100μL,37℃孵育3h,甩净孔内液体,PBS-T洗涤三次;

[0113] (2)封闭:每孔加入200μL 5%的脱脂奶粉,37℃孵育1h,甩净孔内液体,PBS-T洗涤三次;

[0114] (3)孵育一抗(实施例1制备的1C12C6株单克隆抗体):每孔加入100μL细胞培养上清,37℃孵育1h,甩净孔内液体,PBS-T洗涤三次;

[0115] (4)孵育二抗:每孔加入100μL稀释度为1:1000的抗体亚型检测试剂,37℃孵育30min,甩净孔内液体,PBS-T洗涤五次;

[0116] (5)孵育三抗:每孔加入100μL稀释度为1:8000的山羊抗兔IgG-HRP三抗,37℃孵育15min,甩净孔内液体,PBS-T洗涤五次;

[0117] (6)显色:每孔加入100μL TMB底物,避光反应10min;

[0118] (7)终止:每孔加入50μL 2mol/L硫酸;

[0119] (8)酶标仪测定OD450。结果如图4所示,分析所得结果显示:1C12C6株为IgG2a亚型。

[0120] 实施例4 流式检测1C12C6单克隆抗体同时靶向人和鼠的CD317

[0121] 本发明实施例4提供了一种流式检测实施例1筛选的CD317单抗与JURKET细胞表面的CD317分子的结合的方法,包括:

[0122] 试剂:同型对照IgG,PE-抗鼠IgG二抗

[0123] 实验步骤:

[0124] 1.收集JURKET细胞,确定细胞总数。

[0125] 2.用冰冷PBS(3%FBS)重悬细胞成约 $1-5 \times 10^6$ 个细胞每毫升。

[0126] 3.每管加入100uL的细胞悬液。

[0127] 4.加入0.1-10ug/ml的一抗(实施例1制备的1C12C6株单克隆抗体),4度避光孵育30min。

[0128] 5.400g离心5min并用冰冷PBS(3%FBS)重悬细胞。

[0129] 6.用PBS(3%FBS)稀释二抗至最佳浓度,并重悬细胞,4度避光孵育30min。

[0130] 7.洗涤细胞三次,每次400g离心5min并用冰冷PBS(3%FBS)重悬细胞。

[0131] 8.将细胞悬液立即放于4度避光保存,流式分析。结果如图5所示,由图5可知,本发明实施例提供的CD317 1C12C6单抗与JURKET细胞表面的CD317分子的靶向结合效率较高。

[0132] 本发明实施例4还提供了一种流式检测实施例1所筛选的CD317单抗与RAW细胞表面的CD317分子的结合的方法,包括:

[0133] 试剂:同型对照IgG,PE-抗鼠IgG二抗

[0134] 实验步骤:

[0135] 1.收集RAW细胞,确定细胞总数。

- [0136] 2. 用冰冷PBS (3%FBS) 重悬细胞成约 $1-5 \times 10^6$ 个细胞每毫升。
- [0137] 3. 每管加入100uL的细胞悬液。
- [0138] 4. 加入0.1-10ug/ml的一抗,4度避光孵育30min。
- [0139] 5. 400g离心5min并用冰冷PBS (3%FBS) 重悬细胞。
- [0140] 6. 用PBS (3%FBS) 稀释二抗至最佳浓度,并重悬细胞,4度避光孵育30min。
- [0141] 7. 洗涤细胞三次,每次400g离心5min并用冰冷PBS (3%FBS) 重悬细胞。
- [0142] 8. 将细胞悬液立即放于4度避光保存,流式分析。结果如图6所示,其中,曲线1位RAW-1C12C6结合检测结果;曲线2为RAW-空白对照。由图6可知,本发明实施例提供的CD317 1C12C6单抗与RAW细胞表面的CD317分子的靶向结合效率较高。

[0143] 实施例5可变区核苷酸检测

[0144] 本发明实施例5对实施例1所筛选的CD317单抗的可变区核苷酸进行检测,包括:

[0145] 1. 总RNA的提取

[0146] 1) 培养1C12C6细胞至铺满瓶底的80%~90%时,收集 5×10^6 个细胞到1.5ml离心管,2000xg,离心5min,弃上清。

[0147] 2) 按每管加入1ml Trizol,反复吹打细胞,室温放置5min。

[0148] 3) 每管加入200ul氯仿,剧烈震荡15s,室温放置3min。

[0149] 4) 10000xg,4度离心15min,此时样品分为三层,无色水相,中间层和有机相。转移无色水相于新的1.5ml离心管,加入500ul异丙醇,室温放置10min。

[0150] 5) 10000xg,4度离心10min,弃上清,加入1ml 75%的乙醇,并剧烈涡旋。

[0151] 6) 7500xg,4度离心5min,弃上清,室温晾干沉淀5min左右。

[0152] 7) 用DEPC水溶解RNA,55℃~60℃水浴中孵育10min。

[0153] 2. 单链cDNA的合成

[0154] 将RNA反转录成cDNA,反应分两步进行

[0155] 1) 在PCR管中,RNA 10ul,RNA水21ul,用枪头反复吹打均匀,70度保温5min,之后立即冰上放置,防止RNA复性。

[0156] 2) 以上体系中加入以下试剂,反应体系如下:

	试剂	体系
[0157]	5X Buffer	10ul
	dNTP	2ul
	Oligo (dT)	4ul
[0158]	RNase Inhibitor	1ul
	逆转录酶	2ul

[0159] 表1 RT-PCR反应体系

[0160] 3. PCR扩增VH、VL

[0161] 1) 根据鼠抗体轻链重链可变区第一骨架区和J段序列,分别设计扩增重链可变区引物和轻链可变区引物,提取的mRNA经反转录后PCR扩增VH和VL基因。

	试剂	体系
	10X PCR Buffer	5 ul
	dNTP mixture	5 ul
[0162]	VH 上	1 ul
	VH 下	1 ul
	单链 cDNA	1 ul
	Taq-Plus	0.5 ul
	DdH ₂ O	37.5 ul

[0163] 表2 VH-PCR反应体系

	试剂	体系
	10X Buffer	5 ul
	dNTP mixture	4 ul
[0164]	VL 上	1 ul
	VL 下	1 ul
	单链 cDNA	1 ul
	Taq-Plus	0.5 ul
	DdH ₂ O	37.5 ul

[0165] 表3 VL-PCR反应体系

[0166] PCR扩增程序:94℃预变性5min,(94℃变性50s,52℃复性35s,72℃延伸50s,30 cycles),72℃延伸5min。4℃保留。

[0167] 2) 1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定

[0168] 琼脂糖凝胶电泳鉴定结果如图7所示,图7中,注:1~8为VL,9~16为VH。

[0169] 纯化产物送测序公司测序。得到1C12C6单克隆抗体重链、轻链可变区核苷酸序列分别如SEQUENCE NO.3及SEQUENCE NO.4所示。

[0170] 具体地,1C12C6单克隆抗体重链可变区核苷酸序列表如下所示:

[0171] Gagggtgcagctggtggagtctgggggaggcttagtgcagcctggagggtcctgaaactctcctgtgc agcctctggattcactttcagtagttatggcatgtcttgggttcgccagactccagacaagaggctggagtggtc gcaaccattaatagtaatggtgtaacacctattatccagacagtgtgaaggccgattcaccatctccagagaca atgccaagaacacctgtacctgcaaatgagcagctctgaagtctgaggacacagccatgtattactgtgcaaggat ctatgatgcttactcctcctggtttacttactgggggtgaaggaacttttgtcacagtcaatctc;

[0172] 具体地,1C12C6单克隆抗体轻链可变区核苷酸序列表如下所示:

[0173] Gatatccagatgacacagactacatcctcctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatcagttg cagtgcaagtcaggggattaaaaatttttaactggtatcagcagaaaccagatggaactgttaactcctgatc tattacacatcaagtttacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtggtctgggacagattattctctca ccatcagcaacctggaacctgaagatattgccacttactattgtcagcagtatagtaagcttccgtacacgttcgg cgcaggcacaaaattggaatcaatggtggcgggtggctcgggcgggtgggtcgggtggcggcgatct。

[0174] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 深圳先进技术研究院
 <120> 抗人和鼠 CD317 的单克隆抗体及其制备方法和应用
 <130> 2016
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

[0001] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ile Tyr Asp Ala Tyr Ser Ser Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Glu
 100 105 110

Gly Thr Phe Val Thr Val Asn Leu

115 120

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Lys Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

[0002] Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

115 120

<210> 3

<211> 360

<212> DNA

	<213> 人工序列	
	<400> 3	
	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc	60
	tctgtgcag cctctggatt cactttcagt agttatggca tgtcttgggt tcgccagaact	120
	ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attaatagta atggtgctaa cacctattat	180
	ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac	240
	ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aaggatctat	300
	gatgcttact cctcctggtt tacttactgg ggtgaaggaa cttttgtcac agtcaatctc	360
	<210> 4	
[0003]	<211> 366	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 4	
	gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc	60
	atcagttgca gtgcaagtca ggggattaaa aattatntaa actggtatca gcagaaacca	120
	gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca	180
	aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct	240
	gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttccgtacac gttcggcgca	300
	ggcacaaaat tggaaatcaa tgggtggcgt ggctcgggcg gtggtgggtc ggggtggcggc	360
	ggatct	366

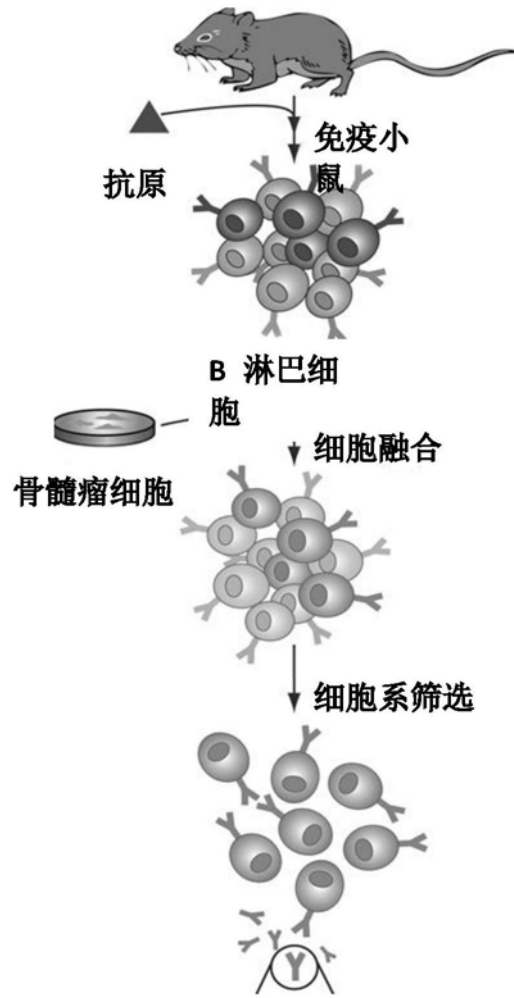


图1

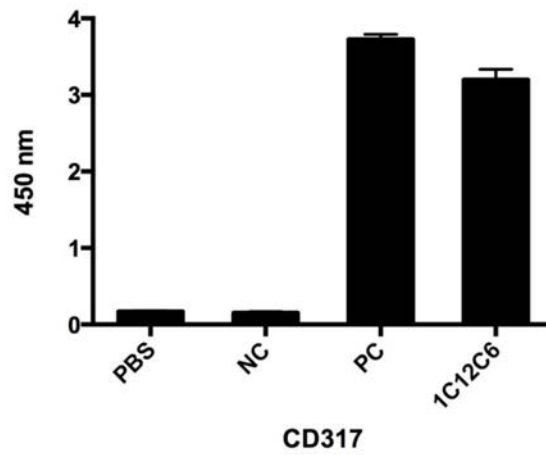


图2

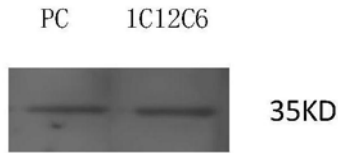


图3

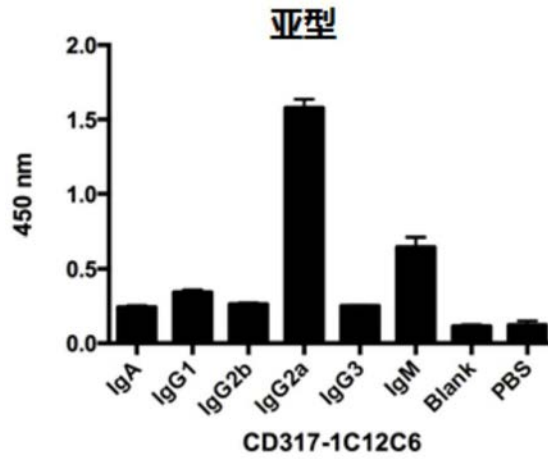


图4

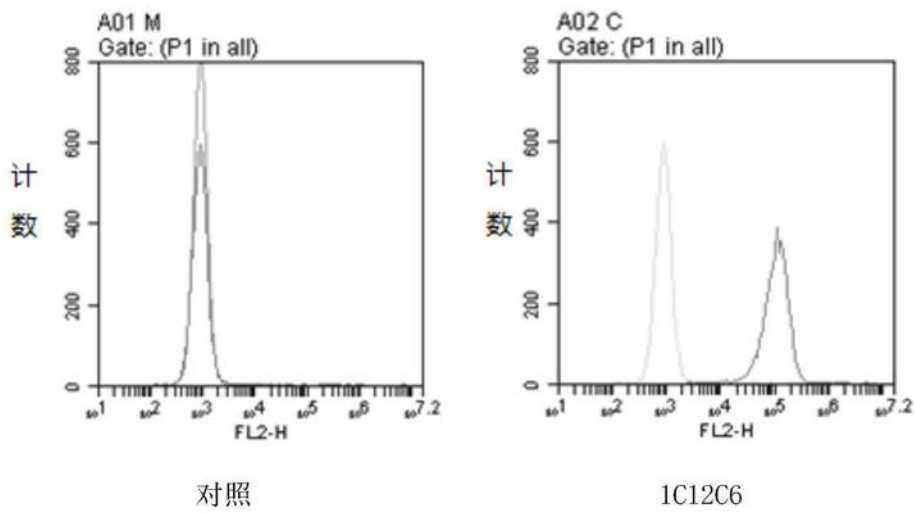


图5

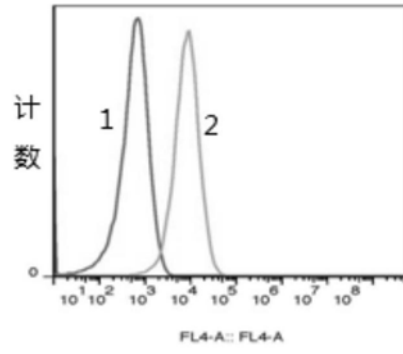


图6

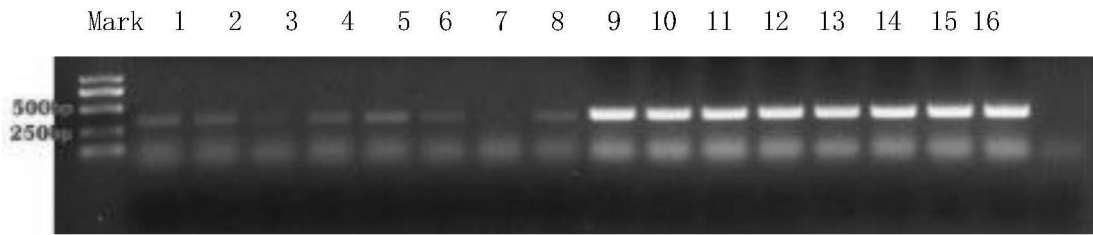


图7