

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710150189.2

[51] Int. Cl.

- C12N 5/18 (2006.01)*
- C07K 16/18 (2006.01)*
- G01N 33/53 (2006.01)*
- G01N 33/577 (2006.01)*
- A61K 39/395 (2006.01)*
- A61P 7/00 (2006.01)*

[43] 公开日 2008年6月18日

[11] 公开号 CN 101200708A

[51] Int. Cl. (续)

*A61P 7/02 (2006.01)*

[22] 申请日 2007.11.16

[21] 申请号 200710150189.2

[71] 申请人 协和干细胞基因工程有限公司

地址 300384 天津市南开区华苑产业区梅苑路12号

[72] 发明人 郭桂庆 何大水 黄丽华 廖晓龙  
 屈浩 余鸣 王冬梅 袁向飞  
 张金香 张丽艳 张毅 张宇光  
 周立

[74] 专利代理机构 天津才智专利商标代理有限公司  
 代理人 王晓红

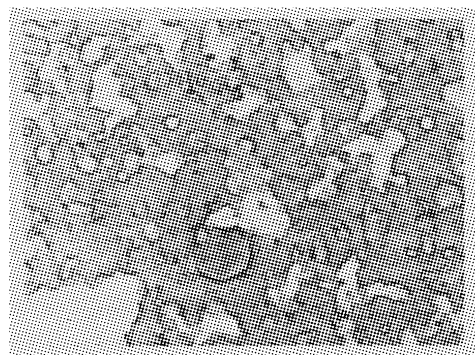
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

[54] 发明名称

鼠抗人 CD41 单克隆抗体杂交瘤细胞系、单克隆抗体、及其免疫组化试剂盒和应用

[57] 摘要

本发明公开了一种鼠抗人 CD41 单克隆抗体杂交瘤细胞系、单克隆抗体、及其免疫组化试剂盒和应用。利用传统的杂交瘤制备技术，获得稳定分泌抗人 CD41 分子单克隆抗体的杂交瘤细胞株，所分泌的抗体可以识别人类 CD41 抗原与 CD61 抗原结合的构象表位，可抑制 ADP，胶原和 HIP2 等引起的聚集作用。该单克隆抗体经过直接标记生物素，并与碱性磷酸酶—链霉卵白素工作液，底物液和坚固红组成用 SAP 法检测巨核细胞的免疫组化试剂盒。本发明所提供的试剂盒及检测方法可缩短检测时间、避免多次洗涤，因而不会出现细胞脱片的情况，大大提高检测效率，适于一般技术人员操作。



1、一种鼠抗人 CD41 单克隆抗体杂交瘤细胞系，其特征在于，所述细胞系的保藏号为 CGMCC NO. 2177。

2、权利要求 1 所述杂交瘤细胞系分泌的能够特异结合 CD41 抗原分子的鼠抗人 CD41 单克隆抗体。

3、根据权利要求 2 所述的单克隆抗体，其特征在于所述的抗体结合表位位于人类 CD41 抗原与 CD61 抗原结合的构象表位。

4、一种荧光素标记的单克隆抗体，其特征在于所述抗体是在权利要求 2 所述的单克隆抗体的基础上进行荧光素标记。

5、一种能够快速准确地识别小巨核细胞的 SAP 法免疫组化试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括生物素标记的权利要求 2 所述的鼠抗人 CD41 单克隆抗体。

6、根据权利要求 5 所述的 SAP 法免疫组化试剂盒，其特征在于试剂盒还包括碱性磷酸酶—链霉卵白素、底物液和坚固红。

7、根据权利要求 6 所述的 SAP 法免疫组化试剂盒，其特征在于所述的底物液为  $\alpha$  磷酸萘酚和 L 左旋咪唑溶解于二甲基甲酰胺中，用 pH8.2 Tris-HCl 缓冲液定容得到。

8、权利要求 2 中所述的抗人 CD41 单克隆抗体在制备血液病及血栓类疾病诊断试剂或治疗药物中的应用。

## 鼠抗人 CD41 单克隆抗体杂交瘤细胞系、单克隆抗体、 及其免疫组化试剂盒和应用

### 技术领域

本发明涉及一种抗 CD41 的鼠抗人杂交瘤细胞系、单克隆抗体和以生物素标记的该抗体为主要有效成分的 SAP 法免疫组化试剂盒和应用。

### 背景技术

在骨髓增生异常综合征(MDS)、急性髓性白血病(AML)、慢性髓性细胞白血病(CML)、骨髓增殖性疾病(MPD)等恶性血液病中,骨髓巨核系统会发生质和量的异常,以致骨髓中(有时甚至外周血中)出现形态异常的巨核细胞和血小板,这类异常巨核细胞多数核小,胞体也小,故称“小核型巨核细胞(小巨核细胞,SMK)”。在巨幼细胞贫血病人中也可以见到小巨核细胞。小巨核细胞在骨髓及周血中的出现具有重要的临床意义,快速、准确的检出小巨核细胞可为上述疾病的早期诊断提供重要依据,因此该项检测已被列为临床检测的常规检查项目。目前,国内外均利用传统的 APAAP 法、SAP 法进行检测。但传统的 APAAP 法因使用碱性磷酸酶复合物(APAAP),市售的 APAAP 通常为粗提物,含有很多杂质,容易引起非特异性染色,影响结果观察。而纯度较高的 APAAP 因其价格昂贵,很难被一般用户所接受。传统的 SAP 法是对 APAAP 法的改进,使用生物素标记的多抗和链酶卵白素标记的碱性磷酸酶,避免了 APAAP 法中容易引起非特异性染色的缺点,提高了准确率。但上述两种方法均存在耗时长,约需 2.5 小时,多次洗涤容易造成细胞脱片的缺点,因而影响结果的观察与判定。

遗传性血小板减少症(HT)是伴随着多种严重的皮下淤血倾向的疾病,是由血小板的遗传性功能错乱导致的。如血小板胞膜糖蛋白(GPs)的生物合成和功能缺陷,涉及血管活性的血小板释放和储存血小板内颗粒中的凝血因子等,特别是 Glanzmann 氏病(GD)和 Bernard-Soulier 综合症(BSS)。

GD 是由于 GPIIb/IIIa 复合物——主要的血小板  $\beta 3$  整合素的基因缺陷造成的。这个整合素分子负责结合多种出现在血液或内皮细胞群上的配基:纤维蛋白原、VWF、纤维蛋白、玻璃体结合蛋白。它在出血过程中血小板的

粘附聚集中期重要作用。在大多数的 GD 病例中，很多发生在 GPIIb 和 GPIIIa 基因中的导致 GPIIb/IIIa 复合体表达减少或缺失突变被发现。极少数病例中发现其基因的点突变仅导致功能缺陷而复合物的表达正常。GPIIb/IIIa 复合物为纤维蛋白原、纤维蛋白、VWF 因子及玻璃体结合蛋白的受体，在 Ca 离子存在条件下 CD41 和 CD61 才能形成复合物。Glanzmann 型血小板无力症的病人此复合物全部或部分缺如，有报道部分 Glanzmann 病人能够表达正常的 GPIIb/IIIa 分子，但其对 EDTA 所引起的复合物解体过分的敏感，并且这些病人的 GPIIb/IIIa 复合物只能被非复合物限定性的 CD41 抗体识别而不能被复合物限定性的 CD41 抗体正常识别，说明部分 Glanzmann 病人表现为 CD41/CD61 复合物形成不良。

BSS——一种伴随着血小板减少和巨大血小板的 HT，其基因缺陷在 GPIb/IX 复合物中。这一复合物由三条肽链(GPIb  $\alpha$ 、GPIb  $\beta$ 、GPIX，即 CD42b、CD42c、CD42a) 和 GPV (CD42d) 组成。它是主要的 VWF 和凝血酶的受体，参与血小板与内皮细胞的粘附，特别是在高剪切力的条件下。大部分 BSS 病例中，GPs 的基因缺陷导致复合物的减少或缺失，也有极少病例表现为表达量正常而功能异常。

单克隆抗体是诊断 GD 和 BSS 的有用工具。GPs 的减少或缺失可以很容易的用流式细胞仪分析并且可以通过免疫沉淀和免疫印迹分析病人的血小板得到证实。后一种方法也可以发现在血小板胞内的变异或不完整的 GPs。通过用流式细胞仪分析患者家族成员的血象可以诊断。他们都有复合物表达相对对照明显减少的现象。这是一种重要的遗传学研究解决方法。

形成抗自身血小板的抗体会导致免疫介导的血小板减少症。包括新生儿同种免疫血小板减少症中的同种抗体，输血性紫癜和 PTR，先天或获得性自身免疫性血小板减少性紫癜中的自身抗体。

血小板同种抗体是由血小板膜糖蛋白基因的变化性导致的，点突变导致单个氨基酸的替换，造成 GPs 的抗原性改变。

人类血小板抗原 (HPA) 是造成 NAITP 和 PTP 的几乎全部原因。IgG 类的同种抗体结合到血小板的 GPs 上后，敏感的血小板就会被巨噬细胞所破坏。然而，在 PTR 中是 HLA-I 同种抗体而很少是 HPA 主要造成输血后血小板的恢复失常。

在 AITP 中血小板同种抗原的特性很清楚了。自身抗原主要定位于胞膜 GPs, 主要是 GPIIb/IIIa 和 GPIb/IX 复合物, 有时也在 GPIa/IIa 或 CD36 上。后者在 TTP 的病例过程中起重要作用。

血小板的激活在包括创伤、外周动脉血管疾病和心肌梗死等动脉血管的病理异常中期重要作用。循环的血小板有可能是这些疾病中本位凝血事件发生的有用标志。血小板激活也发生在体外循环和血小板的浓缩储存过程中。利用流式细胞仪可以检测激活血小板的出现。通过检测: (1) 光反射角特性, 反映血小板形状的改变和微颗粒的形成。在全血中, 血小板和微粒可以被确认。(2) 血小板结合的纤维蛋白原或激活的 GPIIb/IIIa 的特异性抗体。(3) 脱颗粒后, 由血小板颗粒膜表面转移到血小板表面的蛋白的特异性抗体。

这些方法似乎适于体外研究或对血小板的体外储存的研究以及证实出血伤口的血小板激活。抗体的范围随着微粒的增加快速显著的增加。但是在体内条件下, 没有或仅有边缘的变化被检测出, 这是由于激活的血小板被扣押在局部组织而不进入循环的趋势。因此, 检测血浆中激活血小板的产物:  $\beta$ -凝血酶球蛋白、可溶性 CD62P、GPIb 的剪切产物 glyocalicin 等有可能是更恰当的研究体内激活的方式。

血小板糖蛋白的特异性单克隆抗体不仅仅结合它们的靶抗原, 而且还会影响这些抗原与其配体的结合进而抑制糖蛋白的功能。这样的抑制作用使单克隆抗体可以用来研究配体结合位点特性的更多细节; 更重要的是, 这些抑制性抗体可以用来治疗涉血小板的凝聚和释放时期重要步骤的疾病。如: 基因工程产品, 抗 CD41 抗体 7E3; 嵌合抗体 Fab 段 c7E3 Fab。

## 发明内容

本发明所要解决的技术问题是: 提供一种鼠抗人 CD41 单克隆抗体杂交瘤细胞系、单克隆抗体, 其可以识别人类 CD41 抗原, 可以为涉血小板类疾病的诊断及治疗提供有力工具及其免疫组化试剂盒, 克服传统的 APAAP 法和 SAP 法的不足, 简便、快捷、准确地检测小巨核细胞的免疫组化试剂盒。

为了解决上述技术问题, 本发明采用的技术方案是: 一种鼠抗人 CD41 单克隆抗体杂交瘤细胞系, 所述细胞系的保藏号为 CGMCC NO. 2177。

所述杂交瘤细胞系分泌的能够特异结合 CD41 抗原分子的鼠抗人 CD41 单

克隆抗体。

所述的抗体结合表位位于人类CD41抗原与CD61抗原结合的构象表位。

一种荧光素标记的单克隆抗体，所述抗体是在权利要求2所述的单克隆抗体的基础上进行荧光素标记，可抑制ADP，胶原和HIP2等引起的聚集作用。

一种能够快速准确地识别小巨核细胞的SAP法免疫组化试剂盒，所述试剂盒包括生物素标记的上述的鼠抗人CD41单克隆抗体。

所述的SAP法免疫组化试剂盒，还包括碱性磷酸酶—链霉卵白素、底物液和坚固红。

所述的底物液为 $\alpha$ 磷酸萘酚和L左旋咪唑溶解于二甲基甲酰胺中，用pH8.2 Tris-HCl缓冲液定容得到。

所述的抗人CD41单克隆抗体在制备血液病及血栓类疾病诊断试剂或治疗药物中的应用。

本发明的有益效果：简便、省时、敏感、特异是该试剂盒主要优势和特点。

1、简便、省时：简便、省时的特点主要表现在对标本涂片的染色过程中，缩短一抗孵育的时间；省去二抗孵育的时间。

2、敏感：本发明敏感性较好，尽管省去二抗孵育步骤，但是标本染色后，阳性强度仍旧可以达到+++~++++，符合临床检验标准。

3、特异：主要来自于HIP-8杂交瘤细胞株所产单抗的良好生物活性，以及避免了长时间、多步骤染色时所带来的非特异性染色。

#### 附图说明

图1是本发明的荧光素标记的CD41单克隆抗体与正常人血小板反应的流式细胞仪检测结果图。

图2是本发明的荧光素标记的CD41单克隆抗体与正常人外周血反应的流式细胞仪检测结果图。

图3是本发明的试剂盒染色的血液病患者骨髓涂片（标本染色前于-20℃保存6个月，成熟巨核细胞）。

图4是本发明的试剂盒染色的血液病患者骨髓涂片（标本染色前于-20℃保存6个月，左下角为多核巨核细胞，右上角为单元核小巨核细胞）。

制备特异结合 CD41 抗原分子的鼠抗人单克隆抗体的杂交瘤保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 CGMCC NO: 2177, 保藏日 2007-09-18, 分类命名: 小鼠抗人 CD41 杂交瘤细胞系。

### 具体实施方式

下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细说明:

一种鼠抗人 CD41 单克隆抗体杂交瘤细胞系, 所述细胞系的保藏号为 CGMCC NO. 2177。

所述杂交瘤细胞系分泌的能够特异结合 CD41 抗原分子的鼠抗人 CD41 单克隆抗体。

一种分离、纯化的抗原, 能够特异性结合到保藏号为 CGMCC NO. 2177 的杂交瘤产生的鼠抗人 CD41 单克隆抗体上。

所述的抗体结合表位位于人类 CD41 抗原与 CD61 抗原结合的构象表位。

一种荧光素标记的单克隆抗体, 所述抗体是在权利要求 2 所述的单克隆抗体的基础上进行荧光素标记, 可抑制 ADP, 胶原和 HIP2 等引起的聚集作用。

一种能够快速准确地识别小巨核细胞的 SAP 法免疫组化试剂盒, 所述试剂盒包括生物素标记的上述的鼠抗人 CD41 单克隆抗体。

所述的 SAP 法免疫组化试剂盒, 还包括碱性磷酸酶-链霉卵白素、底物液和坚固红。

所述的底物液为  $\alpha$  磷酸萘酚和 L 左旋咪唑溶解于二甲基甲酰胺中, 用 pH8.2 Tris-HCl 缓冲液定容得到。

所述的抗人 CD41 单克隆抗体在制备血液病及血栓类疾病诊断试剂或治疗药物中的应用。

所述杂交瘤细胞系分泌的能够特异结合 CD41 抗原分子的鼠抗人 CD41 单克隆抗体。该抗体识别 CD41, 对 EDTA 敏感, 说明其识别 CD41 和 CD61 结合后的构象抗原部位, 非还原状态下与 GPIIb/IIIa 复合物免疫共沉淀, 为抑制性抗体, 可抑制 ADP, 胶原和 HIP2 等引起的聚集作用, 但对 Ristocetin 引起的聚集没有影响。该抗体可以用于涉血小板类血液病及血栓类疾病的诊断和治疗。

本发明利用传统的杂交瘤制备技术, 获得稳定分泌抗人 CD41 分子单克

隆抗体的杂交瘤细胞株，由此获得的单克隆抗体经过直接标记生物素（无色透明液体），并与碱性磷酸酶—链霉卵白素工作液（无色无味透明粘稠液体），底物液（无色透明液体）和坚固红（白色或浅黄色粉末）组成用 SAP 法检测巨核细胞的免疫组化试剂盒。

本发明是通过传统杂交瘤融合技术得到一株鼠抗人单克隆抗体（后被国际命名为 HIP8）。该抗体特异的识别表达在巨核细胞和血小板上的 GP II b/IIIa 复合物 (CD41/CD61) 中  $\alpha$  亚单位 (GP II b)，即 CD41 分子（保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 CGMCC NO: 2177，保藏日 2007—09—18 的杂交瘤细胞株所分泌产生）。

### 一、鼠抗人 CD41 单克隆抗体制备

1、由人外周血分离单个核细胞，免疫 BALB/C 小鼠（8~12 周龄）。免疫方法为：初次免疫腹腔注射  $2 \times 10^7$  细胞，加强免疫 3~4 次，融合前 4 天末次免疫，尾静脉注射。

2、取小鼠脾细胞与 NS-1 细胞系融合，融合剂采用 50%PEG (MW 1,540)。

3、用人外周血来源的血小板 (Pt)，以间接免疫荧光法筛选阳性杂交瘤克隆。

4、以有限稀释法克隆化 2~3 次，取培养上清与血小板或者 He1 细胞系，以及其它非巨核系细胞系，例如 Molt-4, HPB-ALL, CEM, Daudi, HL-60 等反应，行间接免疫荧光检测。

5、将阳性杂交瘤细胞株于液氮中保存。

6、复苏冻存的杂交瘤细胞株，将经过间接免疫荧光法鉴定合格的杂交瘤细胞扩大培养并收集，腹腔接种已注射 pristane (0.5ml) 一周的 BALB/C 小鼠，每只小鼠注射 0.5ml 细胞悬液，细胞浓度约为每只  $1-2 \times 10^6$ 。7 天后，每天观察小鼠，待小鼠腹部较大时便可采集腹水。

7、腹水经蛋白 G 层析纯化。

8、应用利用共价连接的方法把荧光素偶联到抗体上，经分离纯化制备出偶联复合物，即荧光标记抗体。（见图 1、图 2）

### 二、试剂盒组成及制备

#### 1、组成：

生物素—鼠抗人 CD41 单克隆抗体 1 ml

碱性磷酸酶—链霉卵白素 1 ml

底物液 10 ml

坚固红 20mg

## 2、生物素—鼠抗人 CD41 工作液制备

- (1) 将 CD41 纯品置换入 0.1M pH8.4 碳酸盐缓冲体系。
- (2) 将抗体与生物素按比例混合，置室温避光反应 2 小时。
- (3) 用洗脱液将反应的抗体和生物素通过 PD10 柱洗脱。

## 3、底物液制备

称取  $\alpha$  磷酸萘酚 20mg 和 L 左旋咪唑 24mg 溶解于 2ml 二甲基甲酰胺(BMF)，用 0.1M pH8.2 Tris-HCl 缓冲液定容至 100ml。

## 4、坚固红

外购。

## 5、碱性磷酸酶—链霉卵白素

外购。

## 6、试剂盒操作方法：

- (1) 常规方法制备骨髓涂片或外周血涂片。
- (2) 将涂片标本放入固定液中（甲醇：丙酮=1：1）固定 90 秒，晾干，做好标记。
- (3) 加生物素—鼠抗人 CD41（盖满标本）30—50 分钟，室温。用 PBS 将抗体冲净，用 PBS 浸泡 2 次，每次 5 分钟。
- (4) 加碱性磷酸酶—链霉卵白素（盖满标本）20—40 分钟，室温。用 PBS 将抗体冲净，用 PBS 浸泡 2 次，每次 5 分钟。
- (5) 显色：取 1ml 底物液溶解 1mg 坚固红（现用现配）滴加于标本上，显色 10-20 分钟。镜下观察，待胞膜或胞浆出现明显的红色，自来水轻轻冲净，晾干。
- (6) Mayer 苏木素复染 60 分钟，自来水冲净；用 0.5%氨水返蓝 5 秒，自来水冲净晾干。
- (7) 标本如需保存用明胶甘油封片。

如图 3、4 所示，图 3 是本发明的试剂盒染色的血液病患者骨髓涂片（标本染色前于-20℃保存 6 个月，成熟巨核细胞）。图 4 是本发明的试剂盒染色的血液病患者骨髓涂片（标本染色前于-20℃保存 6 个月，左下角为多核

---

巨核细胞，右上角为单元核小巨核细胞）。

本发明所提供的试剂盒及检测方法可缩短检测时间（约需 1 小时）、避免多次洗涤，因而不会出现细胞脱片的情况，大大提高检测效率。适于一般技术人员操作。

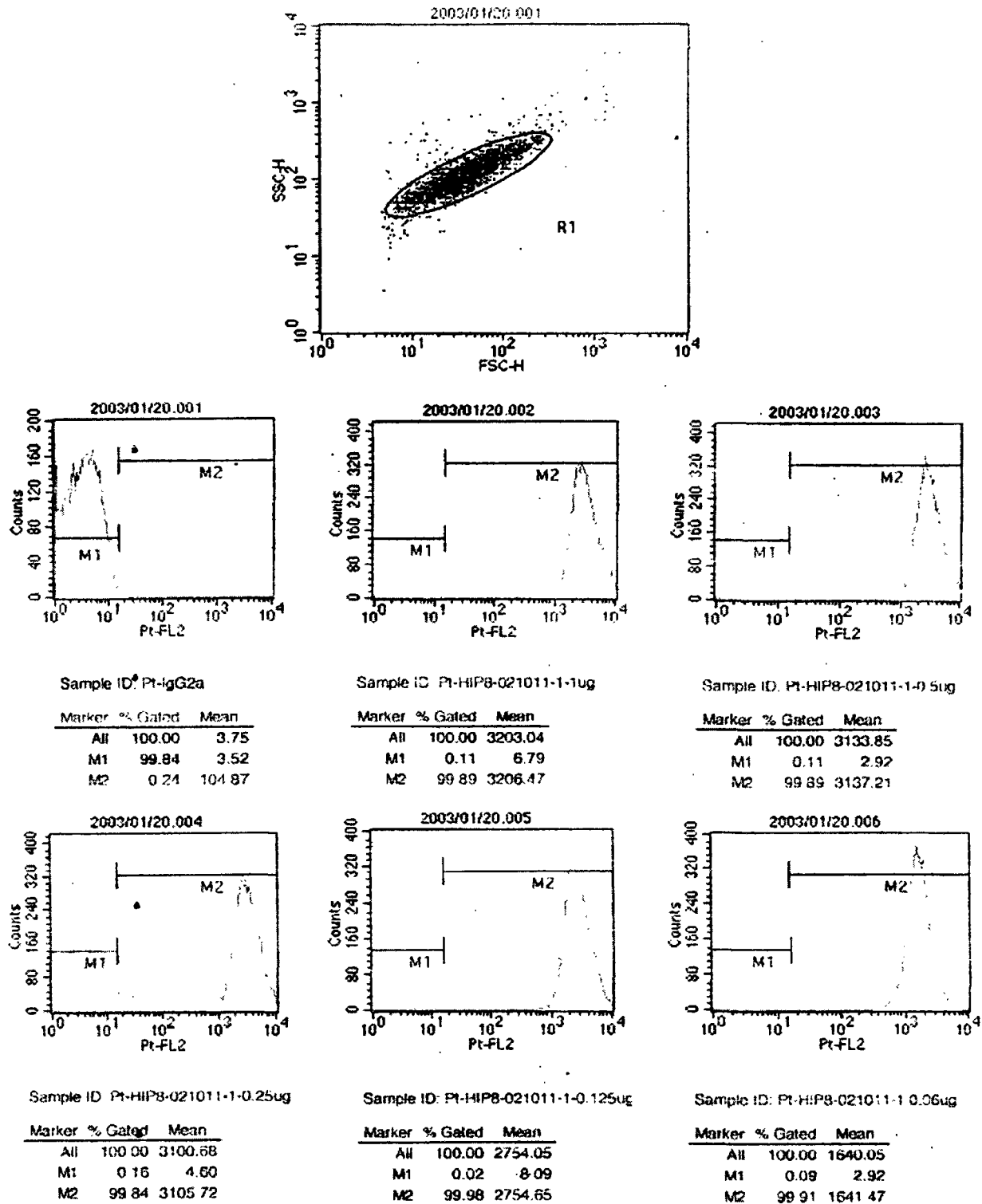


图 1

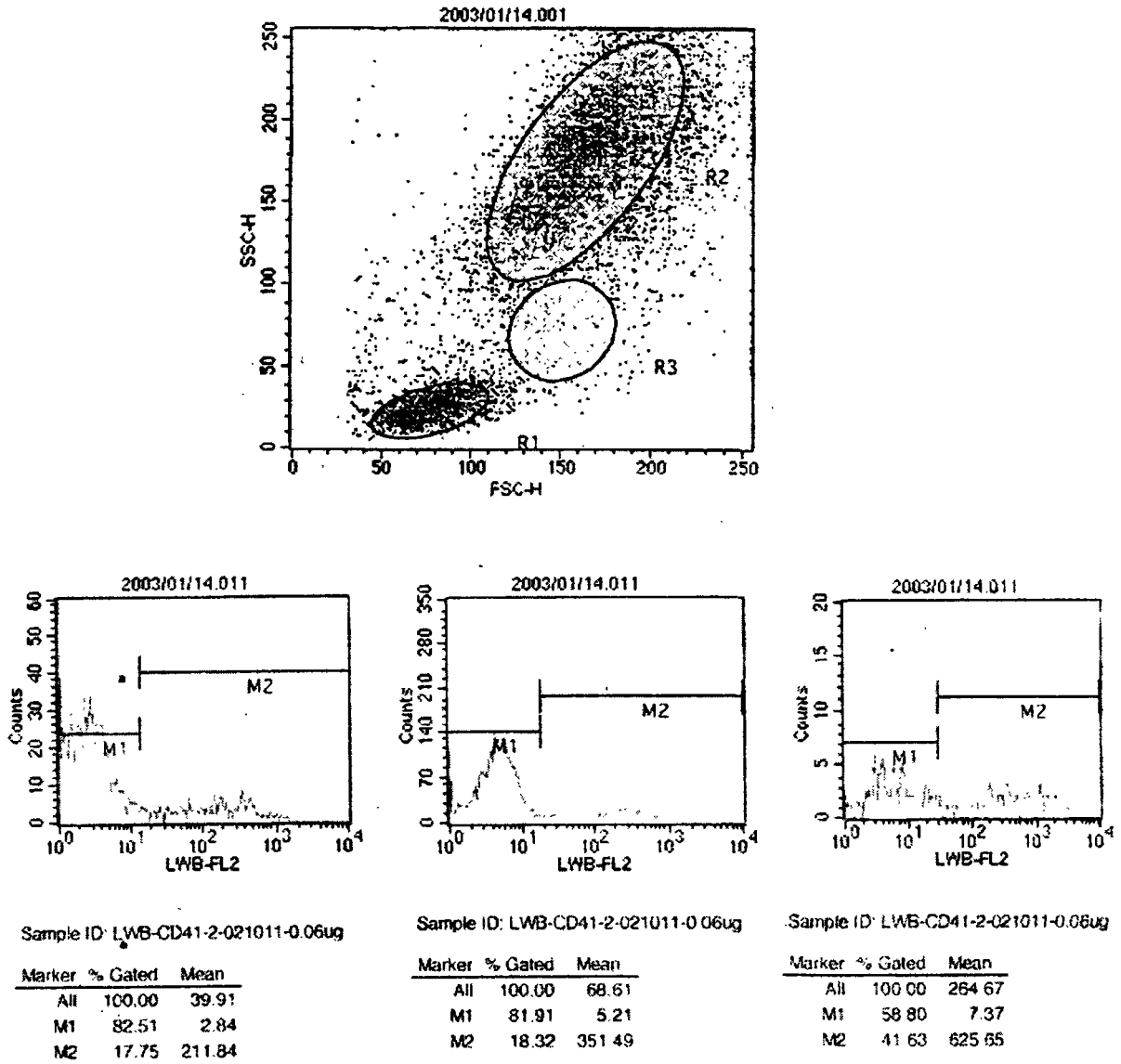


图 2

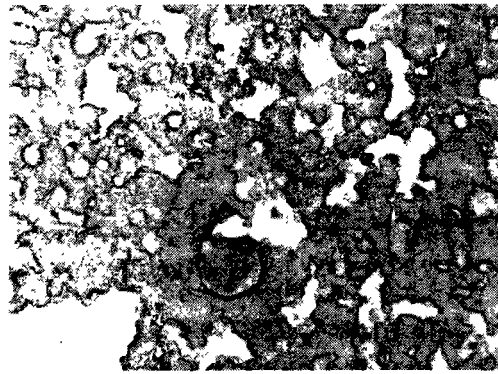


图 3

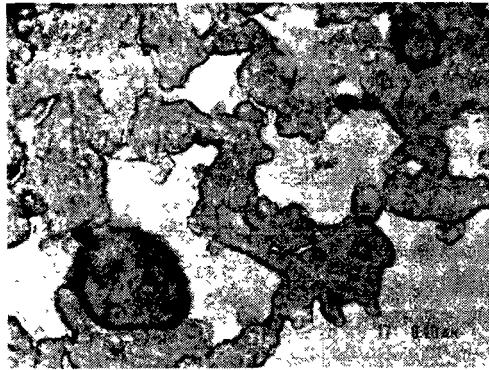


图 4

专利名称(译)	鼠抗人CD41单克隆抗体杂交瘤细胞系、单克隆抗体、及其免疫组化试剂盒和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101200708A</a>	公开(公告)日	2008-06-18
申请号	CN200710150189.2	申请日	2007-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	协和干细胞基因工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	协和干细胞基因工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	协和干细胞基因工程有限公司		
[标]发明人	郭桂庆 何大水 黄丽华 廖晓龙 屈浩 余鸣 王冬梅 袁向飞 张金香 张丽艳 张毅 张宇光 周立		
发明人	郭桂庆 何大水 黄丽华 廖晓龙 屈浩 余鸣 王冬梅 袁向飞 张金香 张丽艳 张毅 张宇光 周立		
IPC分类号	C12N5/18 C07K16/18 G01N33/53 G01N33/577 A61K39/395 A61P7/00 A61P7/02		
代理人(译)	王晓红		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种鼠抗人CD41单克隆抗体杂交瘤细胞系、单克隆抗体、及其免疫组化试剂盒和应用。利用传统的杂交瘤制备技术，获得稳定分泌抗人CD41分子单克隆抗体的杂交瘤细胞株，所分泌的抗体可以识别人类CD41抗原与CD61抗原结合的构象表位，可抑制ADP，胶原和HIP2等引起的聚集作用。该单克隆抗体经过直接标记生物素，并与碱性磷酸酶—链霉卵白素工作液，底物液和坚固红组成用SAP法检测巨核细胞的免疫组化试剂盒。本发明所提供的试剂盒及检测方法可缩短检测时间、避免多次洗涤，因而不会出现细胞脱片的情况，大大提高检测效率，适于一般技术人员操作。

