



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102079787 A

(43) 申请公布日 2011. 06. 01

(21) 申请号 201010580956. 5

A61P 35/02 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 12. 09

A61P 37/06 (2006. 01)

(71) 申请人 协和干细胞基因工程有限公司

G01N 33/53 (2006. 01)

地址 300384 天津市南开区华苑产业区梅苑路 12 号

C12Q 1/68 (2006. 01)

(72) 发明人 朱卫彬 屈浩 石琳 黄丽华
张宇光 侯士芳

(74) 专利代理机构 天津才智专利商标代理有限公司 12108

代理人 王晓红

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006. 01)

C12N 15/13 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61K 48/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页 序列表 6 页

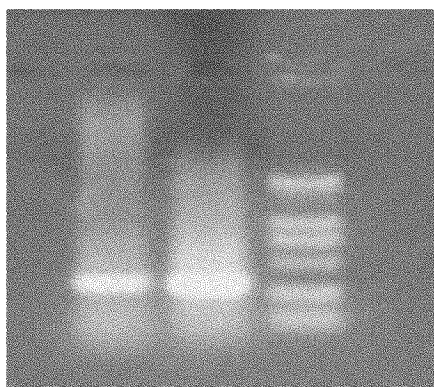
附图 2 页

(54) 发明名称

抗人 CD52 的工程抗体、载体、试剂盒及其用途

(57) 摘要

本发明公开了一种抗人 CD52 的工程抗体、载体、试剂盒及其用途,能够在体内外特异性结合人类 CD52 抗原,通过多种机制单独或协调作用,有目的清除正常免疫细胞活杀伤白血病细胞。本发明涉及抗人 CD52 单克隆抗体 HI52 重链和轻链可变区基因,由所述基因编码的多肽,含有所述基因的载体及所述的基因和多肽在制备用于白血病或自身免疫病的诊断和治疗药物中的应用。重链和轻链可变区基因来自抗人 CD52 单克隆抗体。本发明采用基因工程技术成功制备人源化单链抗人 CD52 基因工程抗体,为白血病和免疫系统疾病的诊断和治疗提供了一种新的有效药物。



1. 一种抗人 CD52 的工程抗体,其特征是包括 SEQ ID NO. 2 重链可变区氨基酸序列和 SEQ ID NO. 4 轻链可变区氨基酸序列。

2. 根据权利要求 1 所述的抗人 CD52 的工程抗体,其特征是编码所述 SEQ ID NO. 2 重链可变区氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示,编码所述 SEQ ID NO. 4 轻链可变区氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示。

3. 含有编码权利要求 1 所述的工程抗体的核苷酸序列的载体,其特征是分别含有 SEQ ID NO. 1 所述的重链可变区 VH 基因核苷酸序列和 SEQ ID NO. 3 所述的轻链可变区 VL 基因核苷酸序列的 cDNA 的 Simple-T 载体。

4. 含有编码权利要求 1 所述的工程抗体的核苷酸序列的载体,其特征是含有 SEQ ID NO. 1 所述的重链可变区 VH 基因核苷酸序列、SEQ ID NO. 3 所述的轻链可变区 VL 基因核苷酸序列和接头序列的 cDNA 的 PET22b(+) 载体。

5. 权利要求 1-5 中任一项所述的抗人 CD52 的工程抗体或 3、4 中任一项所述的载体在制备白血病诊断试剂、免疫抑制类药物或治疗白血病的药物中的应用。

6. 一种免疫检测试剂盒,其特征是:含有至少一种权利要求 1-2 工程抗体或权利要求 3-4 的载体。

7. 权利要求 6 所述的免疫检测试剂盒在诊断恶性肿瘤或自身免疫性疾病;或评价恶性肿瘤或自身免疫性疾病的发展和预后;或指导恶性肿瘤或自身免疫性疾病的治疗中的用途。

抗人 CD52 的工程抗体、载体、试剂盒及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物领域,尤其是一种抗人 CD52 的工程抗体、载体、试剂盒及其用途。

背景技术

[0002] 白血病是威胁人类生命健康的主要几种疾病之一,在我国发病率大约为 2.76/100000 人。其中急性淋巴细胞白血病多见于儿童,急性髓系白血病多见于成年人,而慢性白血病多发于 40 岁以上人群。它是一类起源于造血(或淋巴)干细胞的恶性疾病。由于干细胞受损,白血病细胞失去进一步分化成熟的能力,或者增殖与分化能力不平衡,而停滞在细胞发育的不同阶段,具体表现为细胞在体内无限增殖,而其分化成熟和凋亡受阻。白血病与其它癌症一样,一直因为没有特应性的标志导致无法用常规药物准确杀伤白血病细胞。白血病细胞与正常细胞的区别目前认为主要在于某些生物分子的表达量不同,利用这些特征,特别是与造血干/祖细胞的区别可以在一定程度上杀伤白血病细胞而不影响造血的重建。特异性识别某种细胞膜表面分子的抗体正是实现这一目的的最好工具,目前利用抗体治疗白血病主要是通过以下三种途径:抗体结合白血病细胞后通过补体依赖的细胞毒和抗体依赖细胞介导的细胞毒直接杀伤白血病细胞;抗体结合白血病细胞表面分子,通过所引发的下游信号诱导白血病细胞分化或凋亡;通过抗体的靶向作用将杀伤性药物或效应物带入白血病细胞内达到局部杀伤的目的等。

[0003] 人类 CD52 分子属于一个未命名的短链 GPI(Glycosyl-phosphatidylinositol, 糖基磷脂酰肌醇)锚定糖蛋白家族。它由一条很短的肽链组成,只有 12 个氨基酸残基(GQN DTSQTSSPS),在 C 末端通过 GPI 锚定分子连接于细胞膜表面,N 末端 3 位天冬酰胺连接有一个复杂的糖基。CD52 分子是一种分布比较广泛的抗原,分布于造血系统的淋巴细胞,单核细胞,嗜酸粒细胞上和单核细胞分化的树突状细胞。在雄性生殖系统中的附睾和输精管上皮细胞也有 CD52 分子的表达。在很多淋巴系细胞恶性肿瘤和某些急性髓系白血病细胞上也都有 CD52 分子不同程度的表达。Quigley MM 等报道,在 92% -100% 的毛细胞白血病细胞上都有 CD52 分子表达。最近有报道,血液中存在从细胞表面脱落的可溶性 CD52 分子可以作为慢性淋巴细胞白血病的标志。CD52 在集落形成细胞上没有显著表达,而在某些被认为是淋巴样祖细胞的 CD34+/CD38+ 细胞上有表达,Hale G 等总结了 5000 多例用抗 CD52 单抗处理的干细胞移植研究中证明 CD52 抗原在造血干/祖细胞(CD34+/CD38-)上没有表达。

[0004] CD52 分子本身的功能目前并不清楚,其很多间接功能都是通过其相应抗体获得的,且都与其自身结构特性有关。作为 GPI 锚定蛋白,CD52 分子被其抗体结合后导致细胞膜重排进而引发下游信号,对细胞产生影响。另外 CD52 分子在细胞表面往往呈高度有序排列,并且其分子很小,非常有利于补体的激活。体内应用 CD52 抗体的实验证明,在体内由 CD52 抗体介导的靶细胞杀伤主要是通过补体介导的细胞毒作用(CDC)和抗体介导细胞依赖的细胞毒作用(ADCC)实现的。而 CD52 的高表达和有序排列都利于这些作用在体内的发挥。

[0005] 最近还有很多证据表明 CD52 分子对恶性白血病细胞可能是必须的：高度糖基化带来的负电荷具有抗粘附作用，增加了白血病细胞的迁移能力；CD52 阴性细胞致瘤率降低而回输体内 CD52 分子会重新出现；CD52 分子在同一个个体中在恶性细胞表面的表达显著高于正常细胞。

[0006] 以上这些事实均表明 CD52 分子对于有目的的免疫细胞清除或白血病治疗都是一个良好的靶点，并且对于造血干 / 祖细胞影响较小，特异性识别 CD52 分子的抗体具有巨大的潜在药用价值。

[0007] 目前白血病治疗主要采用控制增殖、诱导凋亡的化疗药物，包括烷化剂、抗代谢药物等。这些药物在杀死白血病细胞的同时，对正常造血细胞也有严重损伤，故对机体存在严重的毒副作用。此外，白血病细胞常会对化疗药物产生耐药，同时化疗后复发率较高，严重影响临床化疗药物治疗的有效性。

发明内容

[0008] 本发明所要解决的技术问题是提供一种抗人 CD52 的工程抗体、载体、试剂盒及其用途，并可用于白血病和自身免疫性疾病的诊断、预后判断，清除正常免疫细胞或杀伤白血病细胞；提供的抗人 CD52 单克隆抗体轻链可变区基因和重链可变区基因及其表达产物，两者重组后表达产生的抗 CD52ScFv 片段，能够特异性结合人 CD52 分子并能够降低鼠源性抗人 CD52 抗体的免疫源性。

[0009] 为了解决上述技术问题，本发明采用的技术方案是：一种抗人 CD52 的工程抗体，包括 SEQ ID NO. 2 重链可变区氨基酸序列和 SEQ ID NO. 4 轻链可变区氨基酸序列。

[0010] 编码所述 SEQ ID NO. 2 重链可变区氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示，编码所述 SEQ ID NO. 4 轻链可变区氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示。

[0011] 含有编码所述的工程抗体的核苷酸序列的载体，分别含有 SEQ ID NO. 1 所述的重链可变区 VH 基因核苷酸序列和 SEQ ID NO. 3 所述的轻链可变区 VL 基因核苷酸序列的 cDNA 的 Simple-T 载体。

[0012] 含有编码所述的工程抗体的核苷酸序列的载体，含有 SEQ ID NO. 1 所述的重链可变区 VH 基因核苷酸序列、SEQ ID NO. 3 所述的轻链可变区 VL 基因核苷酸序列和接头序列的 cDNA 的 PET22b(+) 载体。

[0013] 所述的抗人 CD52 的工程抗体或载体在制备白血病诊断试剂、免疫抑制类药物或治疗白血病的药物中的应用。

[0014] 一种免疫检测试剂盒，含有至少一种上述工程抗体或的载体。

[0015] 免疫检测试剂盒在诊断恶性肿瘤或自身免疫性疾病；或评价恶性肿瘤或自身免疫性疾病的发展和预后；或指导恶性肿瘤或自身免疫性疾病的治疗中的用途。

[0016] CD52 高表达在很多白血病恶性细胞表面。有文献表明，在病人体内，恶性细胞表面的 CD52 密度远远大于体内的正常细胞，CD52 抗原具有的高度糖基化带来的细胞表面负电荷的增加被认为与细胞的恶性程度成正相关性。还有观察报道恶性细胞表面 CD52 抗原分子可能脱落于血液中，检测病人血清中的可溶性 CD52 分子可以作为诊断白血病的一个标志。

[0017] CD52 还表达在正常淋巴细胞表面，单核细胞核和多种抗原提呈细胞表面，CD52 表

达量的多少可以对细胞的分类和免疫力的判断提供重要指标。

[0018] 当准备使用 CD52 抗体药物治疗疾病时,检测细胞表面的 CD52 表达情况可以为治疗提供数据支持,治疗过程中继续检测细胞表面的 CD52 表达情况或者表达 CD52 的细胞群状况有助于帮助了解治疗效果和病程进展。

附图说明

[0019] 图 1 是抗人 CD52 单克隆抗体对白血病细胞系生长状态的影响。

[0020] 图 2 是 PCR 扩增 VL, VH 基因片段电泳图。1:VL 2:VH 3:Marker。

[0021] 图 3 是 PCR 扩增单链抗体 (ScFv) 基因片段图谱。1-3:ScFv 4:Marker。

[0022] 图 4 是 cFv 表达产物的 SDS-PAGE(10%) 图谱。1:未诱导菌体蛋白;2:诱导后全菌蛋白;3:Marker;4:包涵体及不溶性全菌蛋白;5:可溶性蛋白。

[0023] 图 5 是抗人 CD52-ScFv 的 Western blot 分析。1:未诱导菌体蛋白;2:诱导后全菌蛋白;3:Marker;4:包涵体及不溶性全菌蛋白;5:可溶性蛋白。

具体实施方式

[0024] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步的详细说明:

[0025] 一种抗人 CD52 的工程抗体,包括 SEQ ID NO. 2 重链可变区氨基酸序列和 SEQ ID NO. 4 轻链可变区氨基酸序列。

[0026] 编码所述 SEQ ID NO. 2 重链可变区氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示,编码所述 SEQ ID NO. 4 轻链可变区氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示。

[0027] 含有编码所述的工程抗体的核苷酸序列的载体,分别含有 SEQ ID NO. 1 所述的重链可变区 VH 基因核苷酸序列和 SEQ ID NO. 3 所述的轻链可变区 VL 基因核苷酸序列的 cDNA 的 Simple-T 载体。

[0028] 含有编码所述的工程抗体的核苷酸序列的载体,含有 SEQ ID NO. 1 所述的重链可变区 VH 基因核苷酸序列、SEQ ID NO. 3 所述的轻链可变区 VL 基因核苷酸序列和接头序列的 cDNA 的 PET22b(+) 载体。

[0029] 所述的抗人 CD52 的工程抗体或载体在制备白血病诊断试剂、免疫抑制类药物或治疗白血病的药物中的应用。

[0030] 一种免疫检测试剂盒,含有至少一种上述工程抗体或的载体。

[0031] 免疫检测试剂盒在诊断恶性肿瘤或自身免疫性疾病;或评价恶性肿瘤或自身免疫性疾病的发展和预后;或指导恶性肿瘤或自身免疫性疾病的治疗中的用途。

[0032] 实施例 1 小鼠抗人 CD52 单克隆抗体的制备及荧光标记

[0033] 以分离的人扁桃腺细胞为抗原,常规方法免疫 6 周龄 Balb/c 小鼠,首次基础免疫使用福氏完全佐剂,每隔 3 周进行一次基础免疫,共三次, 2×10^7 细胞/只·次,最后一次基础免疫后 3 周后脾内注射加强免疫, 1×10^7 细胞/只;3 天后取脾,与 NS1 小鼠骨髓瘤细胞进行融合,按常规杂交瘤制备方法进行。融合 12 天后,收集单克隆生长的融合孔上清,利用间接免疫荧光法,选择 CD52 阳性的靶细胞系进行筛选鉴定,选择反应性好,生长状态好的杂交瘤细胞进行亚克隆,得到稳定分泌抗人 CD52 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,命名为 HI52,液氮冻存。于 1996 年提交国际白细胞分化抗原会议,被确认为识别人类 CD52 抗原。采用

小鼠腹腔内诱生法,将 HI52 细胞株接种 Ba1b/c 小鼠腹腔, 1.5×10^6 /只,1 周后采集腹水,经 Protein G Sepharose4FF 亲和层析柱层析,制备 HI52 抗体纯品。

[0034] 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。

[0035] 实施例 2 抗人 CD52 单克隆抗体检测白血病细胞系细胞表面的 CD52 表达情况

[0036] 取生长良好的 REH 细胞离心收集,用 PBS 调制 1×10^7 /ml,每 100 μ l 加入流式管,一管加入 PE 标记 CD52 抗体,一管加入 PE 标记的小鼠 IgG1 同型对照,室温避光反应 20 分钟。加入约 2ml PBS 洗一次,1000rpm 离心 10 分钟,弃上清,加入 300 μ l PBS,流式细胞仪检测。

[0037] 实施例 3 抗人 CD52 单克隆抗体可以在体外有效抑制白血病细胞系的生长

[0038] 取生长良好的 CD52 阳性白血病细胞系,用含 20% FBS 的 RPMI1640 培养液调至 1×10^5 /ml,按每孔 100 μ l 加入 96 孔培养板。将细胞分为 4 组。对照组 1:不添加任何抗体;对照组 2:加入 20 μ g/ml 羊抗鼠第二抗体;实验组 1:加入 10 μ g/ml Campath-1;实验组 2:加入 10 μ g/ml Campath-1 和 20 μ g/ml 羊抗鼠第二抗体。置 37°C,5%二氧化碳培养箱培养 24-144 小时。

[0039] (1) 细胞形态变化。白血病细胞系与 HI52 共培养后,可明显表现出分散形态,不再具有聚集生长的特征。HI52 单独或联合第二抗体作用时,细胞数目虽然相对对照组有一定的减少,但细胞的聚集生长形态特征仍可见。见图 1。

[0040] (2) 胎盼兰拒染法检测细胞生长。HI52 可抑制多种白血病细胞系的增殖。

[0041] 实施例 4 抗人 CD52 单克隆抗体可以诱导白血病细胞系凋亡

[0042] 取生长良好的 CD52 阳性白血病细胞系,用含 20% FBS 的 RPMI1640 培养液调至 1×10^5 /ml,按每孔 100 μ l 加入 96 孔培养板。将细胞分为 4 组。对照组 1:不添加任何抗体;对照组 2:加入 20 μ g/ml 羊抗鼠第二抗体;实验组 1:加入 10 μ g/ml HI52;实验组 2:加入 10 μ g/ml HI52 和 20 μ g/ml 羊抗鼠第二抗体。置 37°C,5%二氧化碳培养箱培养 48 小时。收集细胞,PBS 洗涤,Annexin-V 试剂盒 (Annexin-V-FLOUS staining Kit; ROCHE) 检测细胞早期凋亡。经检测,HI52 对白血病细胞系作用 48 小时后,白血病细胞的早期凋亡率明显增高。见下表 1。

[0043] 表 1 Annexin V 试剂盒检测 HI52 单独或联合第二抗体作用于 CD52 阳性细胞系时诱导细胞凋亡的结果,表中所示为早期凋亡阳性率。

[0044] 对照组	3.49%
[0045] 第二抗体	2.62%
[0046] 抗人 CD52 单克隆抗体	2.72%
[0047] 抗人 CD52 单克隆抗体 + 第二抗体	8.43%

[0048] 实施例 5 抗 CD52 抗体的轻重链可变区基因克隆

[0049] (1) RNA 提取:采用 Trizol 一步法,1) 取杂交瘤细胞约 10^6 ,加入 1ml Trizol,吹打混匀,室温静置 5 分钟。2) 加入 0.2ml 氯仿,剧烈振荡 15 秒,室温静置 2-3 分钟。3) 12000rpm,4°C,离心 15 分钟。4) 取上清,加入 0.5ml 异丙醇室温静置 15 分钟。5) 12000rpm,4°C,离心 15 分钟。6) 弃上清,加入 1ml 75% 的乙醇洗,7500rpm,4°C,离心 5 分钟。7) 弃上清,沉淀晾干,加入 30 μ l DEPC 水溶解。

[0050] (2) 逆转录为 CDNA (40 μ l) : 取 2.5mM dNTP 4 μ l, 5 \times first strand buffer 8 μ l, DTT 4 μ l, OligodT 2 μ l, 水 16.6 μ l, 混匀后加入 RNA 约 2 μ g, 65 $^{\circ}$ C 水浴 5 分钟, 快速冰浴 2-3 分钟。加入 50u/ μ l RNasin 0.4 μ l, Superscript II (200u/ μ l) 1 μ l 混匀后 37 $^{\circ}$ C 水浴 > 1 小时。取出后 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。-20 $^{\circ}$ C 保存。

[0051] (3) PCR 扩增抗 CD44 抗体的轻重链可变区基因

[0052] 轻链可变区基因 PCR 扩增反应体系 (50 μ l) : 设计通用简并引物, 上游引物 5'-GAC ATT GTG CTC ACC CAG WCT SMH-3'; 下游引物 5'-CCG TTAGAT CTC CAR BTT KGT SCS-3'。以 cDNA 为模板, 高保真 PfuDNA 聚合酶扩增。PCR 循环程序为 94 $^{\circ}$ C 5 分钟; 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 55 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 30 秒, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。

[0053] 重链可变区基因 PCR 扩增反应体系 (50 μ l) : 上游引物 5'-CAG GTS MARCTG CAG SAG TCW GG-3'; 下游引物 5'-TGA GGA GAC KGT GAC HGT GGT SCC-3'。以 cDNA 为模板, 高保真 PfuDNA 聚合酶扩增。PCR 循环程序为 94 $^{\circ}$ C 5 分钟; 94 $^{\circ}$ C, 30 秒, 55 $^{\circ}$ C, 30 秒, 72 $^{\circ}$ C, 30 秒, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。

[0054] (4) 测序载体的构建: Simple-T 载体购自大连宝生物公司。将轻重链可变区基因 PCR 产物回收, 与 Simple-T 载体连接后, 按常规方法氯化钙转化, 以 100 μ g/ml 氨苄浓度筛选阳性克隆, 送测序, 该基因完全符合蛋白数据库中抗体所具有的若干保守的框架氨基酸的特点, 该序列为抗体基因序列。分别命名为 T-VH 及 T-VL。

[0055] 实施例 6 单链抗体基因表达载体 PET22b(+) ScFv 的构建

[0056] 根据轻、重链可变区的酶切图谱及构建载体 PET22b(+) 的酶切位点, 设计并合成了用于 VH, VL 基因扩增和拼接的引物。

[0057] VH 上游引物

[0058] 5'-GAC TCG CCATGG ACC AGG TGC AGC TGC AGG AA-3' ;

[0059] VH 下游引物

[0060] 5'-ACC TCC AGA GCC TCC ACC TCC AGA TCC ACC TCC ACC TGA GGA GAC GGT GACAGG-3'。

[0061] VL 上游引物

[0062] 5'-GGA TCT GGA GGT GGAGGC TCT GGA GGT GGA GGC TCT GAC ATT GTG ATG ACC CAG-3' ;

[0063] VL 下游引物

[0064] 5'-CTCGAG CCG TTT GAT TTC CTG-3'。

[0065] 引入克隆用的 Nco I/Xho I 限制性酶切位点及单链抗体的 linker 序列 (采用最广泛的 (GGGGS)₃ 为 linker)。从所构建的 T-VH 及 T-VL 载体中 PCR 扩增 VH, VL 片段, 回收后, 经重叠延伸拼接法 (SOE) 通过 PCR 直接合成 ScFv 基因。将 PET22b(+) 载体及回收的 ScFv 基因分别用 Nco I/Xho I 双酶切, 回收后按常规方法进行连接和转化构建抗人 CD52 ScFv 表达载体 PET22b(+) ScFv。阳性克隆用 Nco I/Xho I 双酶切鉴定后测序确定。正确的克隆用于表达。测序结果表明正确, 按氨基酸序列推测 738bp, ScFv 约为 26.8KD 的蛋白, 见图 3、4

[0066] 实施例 7 抗人 CD52 ScFv 抗体片段的表达、纯化

[0067] (1) 抗人 CD52 单链抗体 (ScFv) 在大肠杆菌中的表达及 SDS-PAGE 分析: 在 3ml 含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中接种一阳性单菌落, 37 $^{\circ}$ C 震荡培养过夜后, 接种 30 μ l

于 3ml 含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 28 $^{\circ}$ C 震荡培养约 4 小时后, 加 IPTG 至终浓度为 0.1mmol/L, IPTG 诱导 7 小时后收获菌液, 加入细菌渗透性释放液 (Tris-HCl 25mM, EDTA 1mM, PMSF 0.1mM, 蔗糖 (20%, w/v), NaCl 200mM) 20ml, 4 $^{\circ}$ C 轻摇 1 小时。12000g 再次离心, 分别收集上清和菌体。各取适量, 加入 20 μ l 2XSDS 上样 buffer, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5min。取 5 μ l 上样, 10% SDS-PAGE 检测表达蛋白, 考马斯亮蓝染色。实验证明实现了重组质粒 pET22b(+)-ScFv 在大肠杆菌中的表达, 738bp 片段表达出约 28Kd 的带 (His)₆ 的蛋白, 见图 7。

[0068] (2) 抗人 CD52 单链抗体 (ScFv) 纯化: 将按上步收集的菌体沉淀重悬于 1/10 培养体积的冰预冷 20mmol/L Tris-HCl (PH 7.2), 超声破碎细胞, 13000rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 30min, 取上清用于纯化。上步收集的上清直接用于纯化。

[0069] 蛋白采用 Pharmacia 公司的 Chelating Sepharose Fast Flow 进行纯化, 按操作手册平衡镍柱, 挂镍, 清洗。将粗分离的样品加入镍离子亲和层析柱, 使目的蛋白结合到柱子上, 洗涤后, 用 6 倍柱床体积的含 500mM 咪唑的 Tris-HCl 缓冲液洗脱, 洗脱液用 PBS 缓冲液透析 48 小时。

[0070] (3) Western blot 鉴定: 主要参考分子克隆方法进行 Western 印迹, 结果证明条带为表达产物, 见图 5

[0071] 实施例 8 抗人 CD52ScFv 抗体活性测定

[0072] 竞争性免疫荧光抑制试验:

[0073] 1) 细胞系检测

[0074] 取 CD52 表达阳性细胞 HPB-ALL 细胞系, 制成 1×10^6 细胞悬液; 加入不同量的 HI52-ScFv, 室温避光孵育 1 小时; 再加入 0.5 μ g PE 标记的 HI52 单克隆抗体, 室温避光孵育 20 分钟; 加入 2ml 冷 PBS 缓冲液, 重悬, 1000 转 / 分钟离心 5 分钟, 弃上清; 加入 300 μ l 含 1% 多聚甲醛的 PBS 缓冲液, 流式细胞仪检测。

[0075] 2) 正常人外周血检测

[0076] 每管加入正常人抗凝外周血 100 μ l, 加入不同量的 HI52-ScFv, 室温避光孵育 1 小时; 再加入 0.5 μ g PE 标记的抗人 CD52 单克隆抗体, 室温避光孵育 20 分钟; 加入 2ml 溶血素室温避光反应 10 分钟后 1000 转 / 分钟离心 5 分钟, 弃上清; 加入 2ml 冷 PBS 缓冲液, 重悬, 1000 转 / 分钟离心 5 分钟, 弃上清; 加入 300 μ l 含 1% 多聚甲醛的 PBS 缓冲液, 流式细胞仪检测。

[0077] 经抗人 CD52 ScFv 竞争后, HI52 与 HPB-ALL 细胞系结合的阳性率降低为未竞争时的 33%, 与外周血白细胞反应时荧光强度明显下降, 证明抗人 CD52 ScFv 可竞争性抑制 HI52 与 HPB-ALL 细胞系及正常人外周血白细胞的结合, 即抗人 CD52 ScFv 能够与细胞表面的 CD52 抗原特异性结合, 见图 9。结合变性细胞膜 CD52 分子活性的 Western Blot 检测:

[0078] 取生长良好的 HPB-ALL 细胞约 1×10^7 , 用冰冷的 PBS 洗涤细胞, 4 $^{\circ}$ C, 3000g 离心 5 分钟。向细胞沉淀中加入 200 μ l 预冷的 $1 \times$ 细胞裂解液裂解细胞, 4 $^{\circ}$ C, 30 分钟。4 $^{\circ}$ C 离心, 10000g, 10 分钟, 取上清。尽快加入 40 μ l $6 \times$ 加样缓冲液, 沸水浴 10 分钟。室温 10000g 离心 10 分钟, 弃沉淀取上清。上样, 每孔加 50 μ l 上清, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳结束后, 分别应用抗人 CD52 单克隆抗体和抗人 CD52 ScFv, 进行 western blot 检测。

[0079] 结果显示抗人 CD52 ScFv 与抗人 CD52 单克隆抗体的反应性一致, 均能识别分子量

大约为 30KD 的蛋白。

[0001]

说明书核苷酸和氨基酸序列表

序列表 SEQUENCE LISTING

<110> 协和干细胞基因工程有限公司

<120> 抗人 CD52 的工程抗体、载体、试剂盒及其用途

<130>

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 384

<212> DNA

<213> 小鼠(Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<400> 1

cag gtg cag ctg cag gaa gga ttt agt ggc ttc gac ctg caa tct ccc 48

Gln Val Gln Leu Gln Glu Gly Phe Ser Gly Phe Asp Leu Gln Ser Pro

1 5 10 15

gac atg aaa atc tct tgt gct gcc tct gga ctg ttc gga gga aaa gga 96

Asp Met Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Phe Gly Gly Lys Gly

[0002]

说明书核苷酸和氨基酸序列表

20	25	30	
gcc tgg cag atg tgg gtc tca gat atc gca acg aag ggg ctt gag tgg			144
Ala Trp Gln Met Trp Val Ser Asp Ile Ala Thr Lys Gly Leu Glu Trp			
35	40	45	
atc ggg gct agt gag aaa aag gct aaa agc cgt aat cat gta tca cca			192
Ile Gly Ala Ser Glu Lys Lys Ala Lys Ser Arg Asn His Val Ser Pro			
50	55	60	
cct tat ctg tac aaa agg ttc tcc atc aga gac gaa agt gat aaa aat			240
Pro Tyr Leu Tyr Lys Arg Phe Ser Ile Arg Asp Glu Ser Asp Lys Asn			
65	70	75	80
gta cac tac gac agt agt ctc aag cca aac tta agt cct gaa cct ggc			288
Val His Tyr Asp Ser Ser Leu Lys Pro Asn Leu Ser Pro Glu Pro Gly			
85	90	95	
att tat tgt acc acc ctc aga tgg tct aac aac aag gga agg ttc aaa			336
Ile Tyr Cys Thr Thr Leu Arg Trp Ser Asn Asn Lys Gly Arg Phe Lys			
100	105	110	
gac aag aag agt agt tgg ggc caa ggc act cct gtc acc gtc tcc tca			384
Asp Lys Lys Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser			
115	120	125	

<210> 2

<211> 128

<212> PRT

[0003]

说明书核苷酸和氨基酸序列表

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 2

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

Asp Met Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Phe Gly Gly Lys Gly
 20 25 30

Ala Trp Gln Met Trp Val Ser Asp Ile Ala Thr Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Ala Ser Glu Lys Lys Ala Lys Ser Arg Asn His Val Ser Pro
50 55 60

Pro Tyr Leu Tyr Lys Arg Phe Ser Ile Arg Asp Glu Ser Asp Lys Asn
65 70 75 80

Val His Tyr Asp Ser Ser Leu Lys Pro Asn Leu Ser Pro Glu Pro Gly
 85 90 95

Ile Tyr Cys Thr Thr Leu Arg Trp Ser Asn Asn Lys Gly Arg Phe Lys
 100 105 110

[0004]

说明书核苷酸和氨基酸序列表

Asp Lys Lys Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 3

<211> 354

<212> DNA

<213> 小鼠(Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<400> 3

gac att gtg atg acc cag ctc cca ctc act agt ttc tgc ttc acc gga 48

Asp Ile Val Met Thr Gln Leu Pro Leu Thr Ser Phe Ser Phe Thr Gly

1 5 10 15

cca gcc gca tcc atc tct tgc aag gct tca agt acg aca cag aga gga 96

Pro Ala Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Ser Thr Thr Gln Arg Gly

20 25 30

atg gga aag cat aaa tat ctg aat tgg ttg cag cag aga cat gac cag 144

Met Gly Lys His Lys Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg His Asp Gln

35 40 45

tct tac ggc aag cgc atc atc tat gca gat tct ggc cct gga gtc agg 192

[0005]

说明书核苷酸和氨基酸序列表

Ser Tyr Gly Lys Arg Ile Ile Tyr Ala Asp Ser Gly Pro Gly Val Arg	
50	55 60
ttc ggc aat agt ggg aca ggt gat ctg ttc aca ctg atc aga aac caa	240
Phe Gly Asn Ser Gly Thr Gly Asp Leu Phe Thr Leu Ile Arg Asn Gln	
65	70 75 80
aga aca gct gag tac gga gtg gag att tat tat gcc tca caa gcg tgc	288
Arg Thr Ala Glu Tyr Gly Val Glu Ile Tyr Tyr Ala Ser Gln Ala Cys	
	85 90 95
tgg cat ttt ccg gat tgg gtc aca ata cta acg ttc ggt gga ggc acc	336
Trp His Phe Pro Asp Trp Val Thr Ile Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr	
	100 105 110
aag cag gaa atc aaa cgg	354
Lys Gln Glu Ile Lys Arg	
	115
<210> 4	
<211> 118	
<212> PRT	
<213> 小鼠(Mus musculus)	
<400> 4	
Asp Ile Val Met Thr Gln Leu Pro Leu Thr Ser Phe Ser Phe Thr Gly	
1	5 10 15
[0006]	

说明书核苷酸和氨基酸序列表

Pro Ala Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Ser Thr Thr Gln Arg Gly
 20 25 30

Met Gly Lys His Lys Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg His Asp Gln
 35 40 45

Ser Tyr Gly Lys Arg Ile Ile Tyr Ala Asp Ser Gly Pro Gly Val Arg
 50 55 60

Phe Gly Asn Ser Gly Thr Gly Asp Leu Phe Thr Leu Ile Arg Asn Gln
 65 70 75 80

Arg Thr Ala Glu Tyr Gly Val Glu Ile Tyr Tyr Ala Ser Gln Ala Cys
 85 90 95

Trp His Phe Pro Asp Trp Val Thr Ile Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 100 105 110

Lys Gln Glu Ile Lys Arg
 115

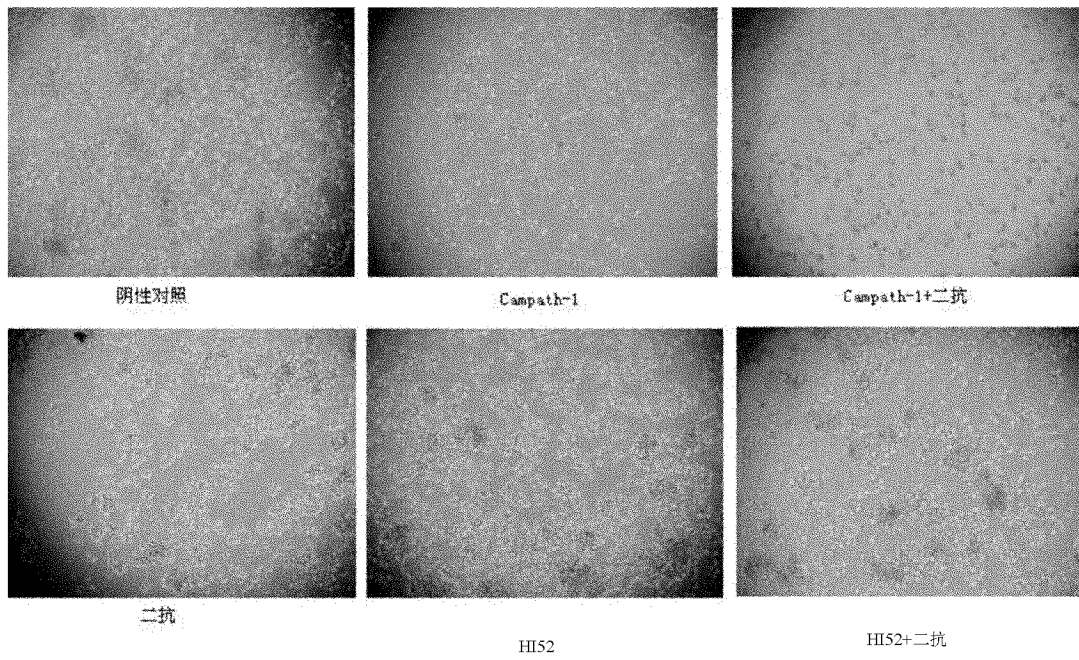


图 1

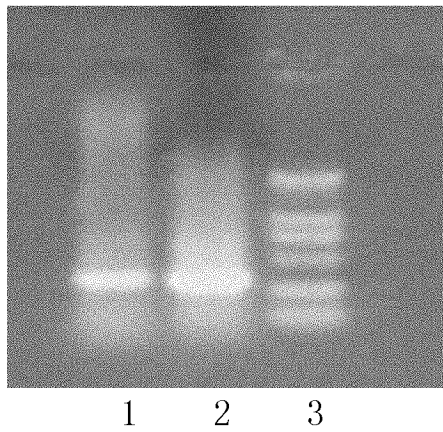


图 2

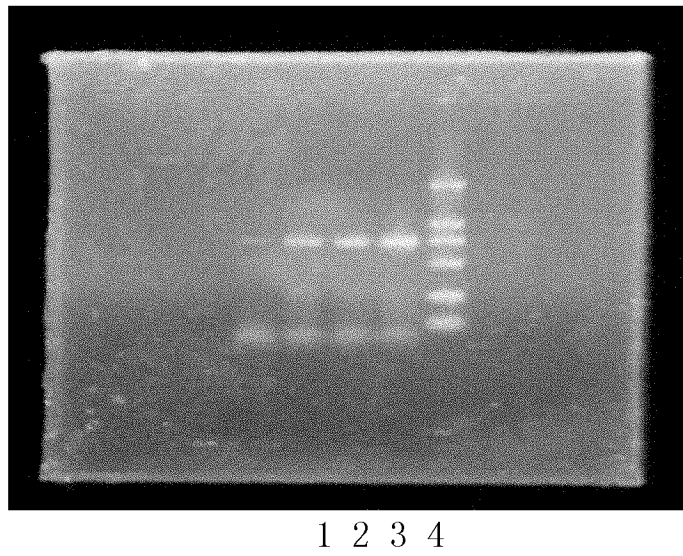


图 3

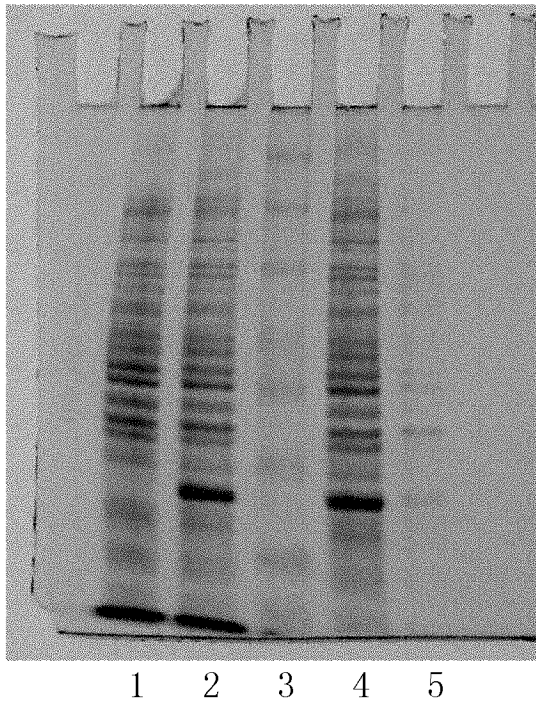


图 4

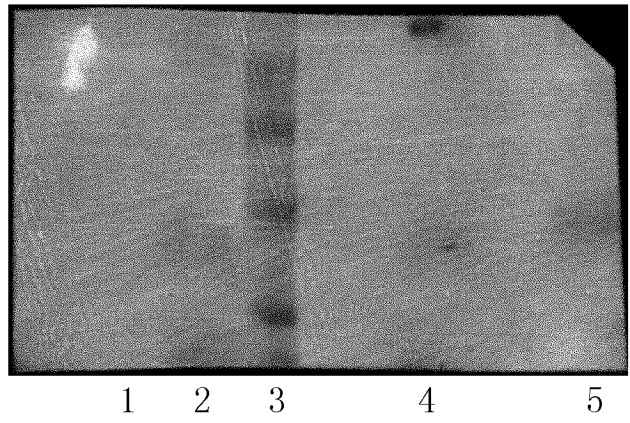


图 5

专利名称(译)	抗人CD52的工程抗体、载体、试剂盒及其用途		
公开(公告)号	CN102079787A	公开(公告)日	2011-06-01
申请号	CN201010580956.5	申请日	2010-12-09
[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	朱卫彬 屈浩 石琳 黄丽华 张宇光 侯士芳		
发明人	朱卫彬 屈浩 石琳 黄丽华 张宇光 侯士芳		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/13 C12N15/63 A61K39/395 A61K48/00 A61P35/02 A61P37/06 G01N33/53 C12Q1/68		
代理人(译)	王晓红		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种抗人CD52的工程抗体、载体、试剂盒及其用途，能够在体内外特异性结合人类CD52抗原，通过多种机制单独或协调作用，有目的清除正常免疫细胞活杀伤白血病细胞。本发明涉及抗人CD52单克隆抗体HI52重链和轻链可变区基因，由所述基因编码的多肽，含有所述基因的载体及所述的基因和多肽在制备用于白血病或自身免疫病的诊断和治疗药物中的应用。重链和轻链可变区基因来自抗人CD52单克隆抗体。本发明采用基因工程技术成功制备人源化单链抗人CD52基因工程抗体，为白血病和免疫系统疾病的诊断和治疗提供了一种新的有效药物。

