

[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 200810117075.2

[51] Int. Cl.

C07K 16/40 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2010年1月27日

[11] 公开号 CN 101633696A

[22] 申请日 2008.7.23

[21] 申请号 200810117075.2

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路15号

[72] 发明人 范祖森 李 翀 吴连锋 刘圣武

唐海东 王 丽 张红莲 侯 强

王德朋

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 吴小明

权利要求书1页 说明书9页 附图1页

[54] 发明名称

抗人颗粒酶 M 的单克隆抗体和杂交瘤细胞株

[57] 摘要

本发明提供了一种产生抗人颗粒酶 M 单克隆抗体的杂交瘤细胞及其分泌的单克隆抗体，特别是 M0428，该单克隆抗体与重组人颗粒酶 M 及表达人天然颗粒酶 M 的细胞呈强阳性反应，而与其它不表达颗粒酶 M 的细胞无交叉反应。本发明还提供了包含单克隆抗体 M0428 的试剂盒和使用单克隆抗体 M0428 检测颗粒酶 M 的含量的方法。

1. 抗人颗粒酶 M 的单克隆抗体。
2. 权利要求 1 所述的单克隆抗体, 其为 M0428, 它由小鼠杂交瘤细胞株 M0428 (CGMCC No. 2580) 产生。
3. 一种产生抗人颗粒酶 M 单克隆抗体 M0428 的杂交瘤细胞, 其特征在于, 它是保藏号为 CGMCC No. 2580 的小鼠杂交瘤细胞株 M0428。
4. 权利要求 1 或 2 所述的单克隆抗体在制备免疫抑制剂中的应用。
5. 权利要求 1 或 2 所述的单克隆抗体在制备导向药物中的应用。
6. 用于检测颗粒酶 M 的含量的试剂盒, 其包含权利要求 1 或 2 所述的单克隆抗体。
7. 根据权利要求 6 的试剂盒, 其中所述颗粒酶 M 的含量可用于肿瘤或自身免疫性疾病的临床监测。
8. 根据权利要求 6 或 7 的试剂盒, 其中所述试剂盒用于检测 NK 细胞、PBMC 或外周大淋巴细胞的颗粒酶 M 的含量。
9. 一种检测细胞的颗粒酶 M 的含量的方法, 该方法包括: (1) 将权利要求 1 或 2 所述的单克隆抗体与待检测的分离的细胞或该细胞的裂解液进行接触; 和 (2) 判断是否有阳性反应。
10. 根据权利要求 9 的方法, 其中所述阳性反应是通过免疫荧光检测进行判断的。

抗人颗粒酶 M 的单克隆抗体和杂交瘤细胞株

技术领域

本发明涉及单克隆抗体领域，更具体地，本发明涉及抗人颗粒酶 M 的单克隆抗体 M0428，它是由小鼠杂交瘤细胞株 M0428 产生的。

背景技术

颗粒酶 (Gzm) 调节的靶细胞杀伤是细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)杀伤病毒感染细胞和肿瘤细胞的主要效应途径。在人当中存在 5 种颗粒酶，分别是颗粒酶 A、B、K、H 和 M。尽管颗粒酶 A 和 B 诱导的细胞死亡途径已经基本阐明，然而其它孤儿颗粒酶 (K、H 和 M) 在 CTL 调节的靶细胞杀伤中的作用远未阐明。

人 GzmM 基因位于染色体 19p13.3，约 1.6kb，包含 5 个外显子和 4 个内含子。GzmM 与一组嗜中性弹性蛋白酶共定位于 19 号染色体上，与 AZU1-PRTN3-ELA2 基因簇相隔 320kb (Bird et al., 2005, 详见后附参考文献列表)。人 GzmM 为含有 232 个氨基酸残基的蛋白酶，非糖基化分子量预计为 27kDa。预测 GzmM 有 3N 糖基化位点，分别为 46NGSH、177NNSR、183NGSL，糖基化后的分子量约为 32kDa。人与大鼠的 Met-ase 66%氨基酸同源，其三联催化位点、8 个 Cys 残基和一些形成底物结合口袋的氨基酸都是保守的(Smyth et al., 1993)，而 GzmM 与其他 Gzm 氨基酸同源性不到 40% (Sattar et al., 2003)。GzmM 的 6 个 Cys 与其他颗粒酶一样形成 3 对二硫键，另外 2 个则没有形成二硫键。尽管 GzmB、GzmA 和 GzmM 的晶体结构已经解析 (Hink-Schauer et al., 2003)，GzmM 的结构尚未见报道。

与其他四种 Gzm 不同，人 GzmM 在活化的 CTL 细胞中没有表达。与 GzmA 和 PFP 一样，它组成型高表达于自然杀伤细胞 (NK)和外周大淋巴细胞(LGL)，在 CD3+CD56+T 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞中有少量表达，而 GzmB 在新分离的 NK 中几乎检测不到 (Hink-Schauer et al., 2002)。GzmM 独特的酶活性、基因定位及特定的表达谱提示它有不同杀伤作用，可能在先天

免疫中发挥重要作用。KHYG, 一种强细胞毒性的 NK 细胞系, 可能通过 PFP/GzmM 途径引起肿瘤细胞凋亡 (Suck et al., 2005)。

到目前为止, GzmM 介导细胞凋亡的机理尚不清楚。Symth 等对 GzmM 在细胞凋亡中的作用进行了初步研究 (Kelly et al., 1996), 发现在穿孔素的协助下, GzmM 很快破坏细胞膜的完整性并引起 DNA 的破坏, 此过程早于 GzmB 介导的细胞死亡。电镜观察发现 GzmM 能够引起染色体浓缩, 细胞核萎缩变小, 内质网肿胀, 胞质电子密度增加并有液泡出现。GzmM 切割 ICAD 释放 CAD 的活性, 并切割 DNA 修复酶 PARP 加速了核的破坏。GzmM 引起的细胞凋亡激活了 caspase3, 产生 17kDa 的酶活形式 (Lu et al., 2006)。

最近的研究发现, GzmM 能够有效的水解 GzmM 的抑制剂 PI9 (protease inhibitor 9)。而某些肿瘤细胞通过高表达 PI9 抑制 GzmB 的活性, 从而逃避 CTL 对其杀伤作用 (Mahrus et al., 2004)。这提示, GzmM 能够抑制 PI9, 使得 CTL 细胞通过 GzmB 途径杀伤肿瘤细胞。参与细胞毒性抑制作用的丝氨酸蛋白酶抑制剂 SPI-CI (serine protease inhibitor involved in cytotoxicity inhibition) 能够不可逆的与纯化的 GzmM 结合, 并且能保护细胞免受穿孔素/GzmM 介导的细胞死亡。

颗粒酶 M 单抗的潜在用途包括: 1. 检测组织和细胞或其裂解液中颗粒酶 M 的含量, 可用于肿瘤和自身免疫性疾病的临床监测; 2. 偶联靶向分子, 可用于导向药物的开发。例如, 可以将待导向的药物与颗粒酶 M 单抗缀合, 而颗粒酶 M 单抗能够特异识别颗粒酶 M, 从而将药物导向颗粒酶 M 相关的细胞 (如表达颗粒酶 M 的细胞), 从而发挥作用。

然而, 到目前为止, 由于 GzmM 的研究较新, 其晶体结构尚未解析, 致使一直未有获得人颗粒酶 M 的单抗的报道。

发明内容

本发明的目的是提供抗人颗粒酶 M 的单克隆抗体, 更具体地一种抗人颗粒酶 M 的单克隆抗体 M0428。

本发明提供了一种抗人颗粒酶 M 的单克隆抗体 M0428, 其特征在于, 它是由小鼠杂交瘤细胞株 M0428 产生的。以重组人颗粒酶 M 免疫 Balb/C

小鼠，应用淋巴细胞杂交瘤技术制备的一株能稳定分泌特异性抗人颗粒酶单克隆抗体的细胞株 M0428。M0428 单抗与重组人颗粒酶 M 及表达人天然颗粒酶 M 的细胞呈强阳性反应，而与其它不表达颗粒酶 M 的细胞无交叉反应。

本发明提供抗人颗粒酶 M 的单克隆抗体。更具体地，本发明提供以下各项：

1) 一种抗人颗粒酶 M 的单克隆抗体 M0428，它由小鼠杂交瘤细胞株 M0428 (CGMCC No. 2580) 产生。

2) 一种产生抗人颗粒酶 M 单克隆抗体 M0428 的杂交瘤细胞，其特征在于，它是保藏号为 CGMCC No. 2580 的小鼠杂交瘤细胞株 M0428。

3) 以上 1) 所述的单克隆抗体 M0428 在制备免疫抑制剂中的应用。所述免疫抑制剂可以含有其它辅剂或佐剂，其制备是本领域技术人员所公知的技术。

4) 以上 1) 所述的单克隆抗体 M0428 在制备导向药物中的应用。

5) 用于检测颗粒酶 M 的含量的试剂盒，其包含以上 1) 所述的单克隆抗体 M0428。试剂盒的制备可以通过本领域技术人员所公知的方法来进行。

6) 根据以上 5) 的试剂盒，其中所述颗粒酶 M 的含量可用于肿瘤或自身免疫性疾病的临床监测。

7) 根据以上 5) 或 6) 的试剂盒，其中所述试剂盒用于检测 NK 细胞、PBMC 或外周大淋巴细胞的颗粒酶 M 的含量。

8) 一种检测细胞的颗粒酶 M 的含量的方法，该方法包括：(1) 将以上 1) 所述的单克隆抗体 M0428 与待检测的分离的细胞或该细胞的裂解液进行接触；和 (2) 判断是否有阳性反应。在一个实施方案中，所述分离的细胞是从人体分离的。细胞裂解液的制备可以通过本领域技术人员所公知的方法来进行。

9) 根据以上 8) 的方法，其中所述阳性反应是通过免疫荧光检测进行判断的。免疫荧光检测可以通过本领域技术人员所公知的方法来进行。

附图说明

图 1 表示 M0428 单抗,按常规方法对重组人颗粒酶 M(泳道 1)、NK92 细胞裂解液(泳道 2)、PBMC 裂解液(泳道 3)、K562 细胞裂解液(泳道 4)进行 Western blot。

具体实施方式

CTL 细胞和 NK 细胞在抗病毒及细胞内细菌感染、器官移植排斥和抗肿瘤应答中具有重要意义。Gzm 是丝氨酸蛋白酶家族的成员,存在于活化的 CTL 和 NK 细胞中,是其发挥细胞毒作用的主要效应分子。NK 和 CTL 细胞通过直接释放细胞毒性颗粒杀伤靶细胞的机理已成为近年来分子免疫学及肿瘤生物学的研究热点。大量的实验小组 GzmA 和 GzmB 进行了广泛而深入的研究,但是 GzmA 基因敲除小鼠、GzmB 基因敲除小鼠以及 GzmA 和 GzmB 基因双敲除的小鼠尽管存在某些免疫缺陷,这三类小鼠的 CTL 仍然能够裂解靶细胞。这提示我们其它孤儿 Gzm 在 CTL 及 NK 细胞的杀伤过程中也发挥重要作用。

GzmM 引起一种不同于 GzmA 及 GzmB 的新的细胞死亡;GzmM 诱导的细胞死亡不依赖 caspase 的活化及线粒体的破坏;PI 染色 DNA 含量 GzmM 不引起 DNA 片段化(Kelly et al., 1996)。Caspase 广谱抑制剂 Z-VAD(100 μ m)等的研究显示高浓度的 Z-VAD(200 μ m)也不能抑制 GzmM 诱导的细胞死亡;GzmM 诱导的细胞死亡不激活 caspase,也不引起磷脂酰丝氨酸跨膜外翻。Caspase 是多种 GzmB 的作用下裂解为两个亚单位并形成有活性的异四聚体形式(Adrain et al., 2005)。尽管多种 caspase 均为 GzmB 的底物,在 GzmB/PFP 处理的细胞中,caspase3 和 7 很快被切割(Yang et al., 1998)。尽管我们用的转导试剂 Gzm 与 GzmM 的浓度不同,但 GzmM(1 μ m)/PJ 与 GzmM(83nM)/PFP 诱导了相似的细胞凋亡率。

本发明包括:一种特异性的抗人颗粒酶 M 单克隆抗体 M0428,它是由小鼠杂交瘤细胞株 M0428 产生的。以重组人颗粒酶 M 免疫 Balb/C 小鼠,应用淋巴细胞杂交瘤技术制备的一株能稳定分泌特异性抗人颗粒酶单克隆抗体的细胞株 M0428。

本发明中的一种阳性杂交瘤细胞为抗人颗粒酶 M 单克隆抗体杂交瘤细胞株 M0428,该杂交瘤细胞株于 2008 年 7 月 9 日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, 中国, 北京), 保藏号为 CGMCC No. 2580。

本发明中的抗人颗粒酶 M 单克隆抗体 M0428 的实验表明, M0428 单抗与重组人颗粒酶 M 及表达人天然颗粒酶 M 的细胞呈强阳性反应, 而与其它不表达颗粒酶 M 的细胞无交叉反应。

本发明中的抗人颗粒酶 M 单克隆抗体 M0428 具有以下的特点和性能:

(1) 与重组人颗粒酶 M 呈强阳性反应; (2) 与人 NK 肿瘤细胞系 NK92 呈强阳性反应; (3) 与人外周血单核细胞 PBMC 呈强阳性反应; (4) 与人白血病细胞 K562 呈阴性反应。

实施例 1

M0428 单抗的制备和纯化

(1) 杂交瘤的制备

以重组人颗粒酶 M(制备参见 Lu H., Hou Q., Zhao, T., Zhang, H., Zhang Q., Wu L., Fan, Z. Granzyme M directly cleaves ICAD to unleash caspase-activated DNase leading to DNA fragmentation. *The Journal of Immunology*. 2006, 177: 1171-1178) 免疫 Balb/C 小鼠 (购自北京维通利华实验动物技术有限公司), 腹腔注射, 每只小鼠每次 50 微克重组人颗粒酶 M。2 周后对小鼠进行再次免疫, 注射量和方法不变。待小鼠血清效价达到要求, 即效价达到 1: 200 以上, 之后准备进行细胞融合, 融合前三天对小鼠进行冲击免疫。

在免疫小鼠的同时准备小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 (ATCC CRL-1772)。

将以上获得的致敏的 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合 (《实用免疫学》, 杨廷彬主编, 长春出版社, 1994 年 12 月出版), 用 HAT 培养基 (购于 Invitrogen 公司, HAT 系次黄嘌呤 (hypoxantin)、氨基蝶呤 (aminopterin) 和胸腺嘧啶脱氧核苷 (thymidin) 三种物质各英文首字之缀列, HAT 培养基也就是指含有这三种物质的细胞培养基) 进行选择培养 (以小鼠腹腔巨噬细胞为饲养细胞)。

接着, 用 ELISA 方法检测杂交瘤细胞培养上清: 以重组人颗粒酶 M 包被 96 孔板, 4°C 过夜。用含 0.05% tween-20 的磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,

加待检上清 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。用含 0.05% tween-20 的磷酸盐缓冲液洗涤 3 次，加酶标二抗（抗小鼠 IgG-HRP）（购自北京中杉金桥生物技术有限公司），37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。洗涤 3 次，加底物显色剂四甲基联苯胺（TMB）（购自北京中杉金桥生物技术有限公司）50 μ l，室温静置 5 分钟，加终止液（2 mol/L 的硫酸）50 μ l。结果用 BIORAD 680 型酶标仪测定，检测波长为 450nm 值，OD 值高于阴性对照 2 倍以上者可视为阳性。

然后，将选出的阳性杂交瘤细胞克隆化培养（有限稀释法，以小鼠腹腔巨噬细胞为饲养细胞）。经过 2-3 轮克隆化培养，获得稳定的能够产生高效价单抗的杂交瘤细胞克隆。将杂交瘤细胞克隆扩大培养，并冻存保种。

本发明中的一种阳性杂交瘤细胞为抗人颗粒酶 M 单克隆抗体杂交瘤细胞株 M0428，该杂交瘤细胞株于 2008 年 7 月 9 日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，中国，北京），保藏号为 CGMCC No. 2580。

（2）M0428 单抗的制备和纯化

将上述杂交瘤细胞 M0428 接种至 Balb/C 小鼠腹腔，制备腹水，再从腹水中提取单抗。单抗 M0428 的纯化：采用 Protein G 亲和层析法。首先制备 Protein G 亲和层析柱（购于“GE”公司），用 PBS（磷酸盐缓冲液）平衡柱子后，取含 M0428 单抗的腹水过柱，然后用 PBS 洗柱子，至 OD 值接近于零，以 0.2 M 的甘氨酸-HCl 溶液（pH 2.8）洗脱，收集洗脱液，测定各收集管的 OD 值，保留峰值区的洗脱液，洗脱液经透析浓缩后-20 $^{\circ}$ C 冻存。

实施例 2

M0428 单抗的鉴定

将在实施例 1 中制备和纯化的 M0428 单抗，按常规方法对重组人颗粒酶 M、人 NK 肿瘤细胞系 NK92 细胞（ATCC：CRL-2407）的裂解液、人外周血单核细胞 PBMC（制备参考《实用免疫学》，杨廷彬主编，长春出版社，1994 年 12 月出版）的裂解液、人白血病细胞 K562 细胞（ATCC：CCL-243）的裂解液进行 western blotting，结果如图 1 所示。结果表明，M0428 单抗与重组人颗粒酶 M 及表达人天然颗粒酶 M 的细胞（NK92 和

PBMC) 呈强阳性反应, 而与其它不表达颗粒酶的细胞 (K562) 无交叉反应。

在实施例 1 中制备的 M0428 单抗, 按常规方法对 NK92 细胞 (ATCC: CRL-2407)、PBMC (制备参考《实用免疫学》, 杨廷彬主编, 长春出版社, 1994 年 12 月出版)、和 K562 细胞 (ATCC: CCL-243) 进行免疫荧光反应。结果表明, M0428 单抗与表达人天然颗粒酶 M 的细胞 (NK92 和 PBMC) 呈强阳性反应, 而与其它不表达颗粒酶的细胞 (K562) 无交叉反应。

用 M0428 单抗按常规方法对 NK92、PBMC 和 K562 细胞进行免疫荧光检测。结果如表 1 所示。

表 1 K42-D2 单抗与人细胞系的反应性

| 细胞系 | M0428 单抗 |
|------|----------|
| NK92 | +++ |
| PBMC | + |
| K562 | - |

“-”表示无反应, “+”表示有反应。

尽管本发明的具体实施例已经描述如上, 但是可以知道本发明可以进行除了上述说明以外的实践。本发明的保护范围不受说明书的限制。

参考文献

- Bird CH, Sun J, Ung K, Karambalis D, Whisstock JC, Trapani JA, Bird PI.
Cationic sites on granzyme B contribute to cytotoxicity by promoting its uptake into target cells.
Mol Cell Biol. 2005 Sep;25(17):7854-67.
- Smyth MJ, Sayers TJ, Wiltrout T, Powers JC, Trapani JA.
Met-ase: cloning and distinct chromosomal location of a serine protease preferentially expressed in human natural killer cells.
J Immunol. 1993 Dec 1;151(11):6195-205
- Sattar R, Ali SA, Abbasi A.
Bioinformatics of granzymes: sequence comparison and structural studies on granzyme family by homology modeling.
Biochem Biophys Res Commun. 2003 Sep 5;308(4):726-35.
- Hink-Schauer C, Estébanez-Perpiñá E, Kurschus FC, Bode W, Jenne DE.
Crystal structure of the apoptosis-inducing human granzyme A dimer.
Nat Struct Biol. 2003 Jul;10(7):535-40.
- Hink-Schauer C, Estébanez-Perpiñá E, Wilharm E, Fuentes-Prior P, Klinkert W, Bode W, Jenne DE.
The 2.2-Å crystal structure of human pro-granzyme K reveals a rigid zymogen with unusual features.
J Biol Chem. 2002 Dec 27;277(52):50923-33. Epub 2002 Oct 15.
- Suck G, Branch DR, Smyth MJ, Miller RG, Vergidis J, Fahim S, Keating A.
KHYG-1, a model for the study of enhanced natural killer cell cytotoxicity.
Exp Hematol. 2005 Oct;33(10):1160-71
- Kelly JM, O'Connor MD, Hulett MD, Thia KY, Smyth MJ.
Cloning and expression of the recombinant mouse natural killer cell granzyme Met-ase-1.
Immunogenetics. 1996;44(5):340-50.
- Lu, H., Hou, Q., Zhao, T., Zhang, H., Zhang, Q., Wu, L., and Fan, Z.
Granzyme M directly cleaves inhibitor of caspase-activated DNase (CAD) to unleash CAD leading to DNA fragmentation. *J Immunol* 2006. 177, 1171-1178.
- Mahrus S, Kisiel W, Craik CS.
Granzyme M is a regulatory protease that inactivates proteinase inhibitor 9, an endogenous inhibitor of granzyme B.
J Biol Chem. 2004 Dec 24;279(52):54275-82. Epub 2004 Oct 19.

Kelly JM, O'Connor MD, Hulett MD, Thia KY, Smyth MJ.
Cloning and expression of the recombinant mouse natural killer cell granzyme Met-ase-1.
Immunogenetics. 1996;44(5):340-50.

Adrain C, Murphy BM, Martin SJ.
Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T
lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B.
J Biol Chem. 2005 Feb 11;280(6):4663-73. Epub 2004 Nov 29.

Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dotsch, V.,
Andrews, N.C., Caput, D., and McKeon, F. p63, a p53 homolog at3q27-29, encodes multiple
products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. Molecular
cell 1998. 2, 305-316.

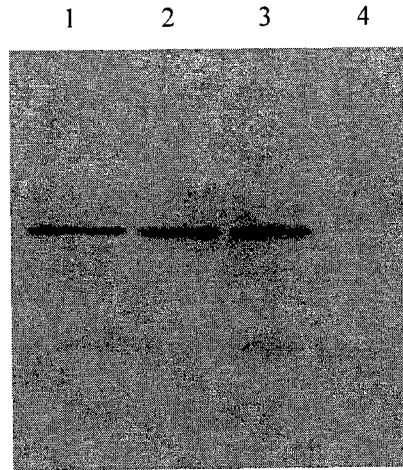


图 1