

[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 200810103221.6

[51] Int. Cl.

C07K 16/40 (2006.01)
C12N 5/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 10 月 7 日

[11] 公开号 CN 101550192A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 21/64 (2006.01)

[22] 申请日 2008.4.2

[21] 申请号 200810103221.6

[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 王德朋 李 翀 刘圣武

唐海东 张红莲 侯 强

[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 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称

抗人颗粒酶 K 的单克隆抗体 K42 - D2 和分泌
该抗体的杂交瘤细胞系

[57] 摘要

本发明提供了一种产生抗人颗粒酶 K 单克隆抗体的杂交瘤细胞及其分泌的单克隆抗体 K42 - D2, 该单克隆抗体与重组人颗粒酶 K 及表达人天然颗粒酶 K 的细胞呈强阳性反应, 而与其它不表达颗粒酶的细胞无交叉反应。本发明还提供了包含单克隆抗体 K42 - D2 的试剂盒和使用单克隆抗体 K42 - D2 检测颗粒酶 K 的含量的方法。

1. 一种抗人颗粒酶 K 的单克隆抗体 K42-D2，它由小鼠杂交瘤细胞系 K42-D2 (CGMCC No. 2309) 产生。
2. 一种产生抗人颗粒酶 K 单克隆抗体 K42-D2 的杂交瘤细胞，其特征在于，它是保藏号为 CGMCC No. 2309 的小鼠杂交瘤细胞系 K42-D2。
3. 权利要求 1 所述的单克隆抗体 K42-D2 在制备免疫抑制剂中的应用。
4. 用于检测颗粒酶 K 的含量的试剂盒，其包含权利要求 1 所述的单克隆抗体 K42-D2。
5. 根据权利要求 4 的试剂盒，其中所述颗粒酶 K 的含量可作为临床病人固有性免疫和适应性免疫水平的指徵。
6. 根据权利要求 4 或 5 的试剂盒，其中所述试剂盒用于检测 NK92 细胞或 PBMC 的颗粒酶 K 的含量。
7. 一种检测细胞的颗粒酶 K 的含量的方法，该方法包括：(1) 将权利要求 1 所述的单克隆抗体 K42-D2 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。
8. 根据权利要求 7 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 K 的单克隆抗体 K42-D2 和分泌该抗体的杂交瘤细胞系

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 K 的单克隆抗体 K42-D2，它是由小鼠杂交瘤细胞系 K42-D2 产生的。

背景技术

颗粒体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。颗粒酶 K 和颗粒酶 A 均属类胰蛋白酶，它们位于同一染色体上。研究发现颗粒酶 K 介导了快速的靶细胞死亡。类似于颗粒酶 A，磷脂酰丝氨酸外翻、染色体凝集、核形态变化及单链断裂为颗粒酶 K 介导靶细胞死亡的主要特征。颗粒酶 K 介导的靶细胞死亡不依赖于 caspase 的激活。Caspase 抑制剂 Z-VAD 及 Bcl-xL 的过量表达均不能阻断颗粒酶 K 介导的靶细胞死亡。此外，颗粒酶 K 亦不能够激活细胞裂解液及细胞内的 Caspase3。颗粒酶 K 水解重组、细胞裂解液以及细胞内的 SET。SET 既是核小体装配蛋白，又是 DNA 酶 NM23H1 的抑制剂。颗粒酶 K 切割 SET 破坏了小体装配功能及对 NM23H1 的抑制作用。颗粒酶 K 进入靶细胞以后，DNA 酶 NM23H1 及其抑制剂 SET 共同进入细胞核。DNA 酶 NM23H1 的激活导致了染色体 DNA 的单链断裂。此外，颗粒酶 K 能够切割 SET 复合物中颗粒酶 A 的另外两个底物 DNA 结合蛋白 HMG2 及 DNA 氧化还原修复酶 ApeI，表明颗粒酶 K 部分的提供了颗粒酶 A 的功能备份。

线粒体途径在细胞凋亡过程中发挥重要作用。在凋亡进程中，一些凋亡前体蛋白如 Cyto c、EndoG、SMAC、HtrA2 和 AIF 等释放到细胞质中去。研究发现颗粒酶 K 能够诱导靶细胞线粒体肿胀、膨大及脊消失等形

态特征的变化。通过线粒体氧化还原电势特异性染料 DiOC6(3)染色，我们发现颗粒酶 K 能够诱导靶细胞氧化还原电势降低，从而使线粒体发生去极化。氧自由基特异性染料 HE 染色证明颗粒酶 K 诱导了细胞内 ROS 的升高。抗氧化剂 NAC 及氧自由基清除剂 Tiron 能够抑制颗粒酶 K 引起的 ROS 的升高，从而拮抗颗粒酶 K 引起的靶细胞死亡。颗粒酶 K 既能够切割体外重组的 Bid 又能破坏细胞裂解液及细胞内的 Bid，从而引起线粒体 Cyto c 和 EndoG 释放。颗粒酶 K 通过作用于线粒体途径，加速了靶细胞死亡进程。

颗粒酶 K 单抗的潜在用途包括：1.用于检测组织和细胞或其裂解液中颗粒酶 K 的含量，可作为临床病人固有性免疫和适应性免疫水平的指徵；2. 阻断颗粒酶 K 引起的细胞凋亡，临床上可作为免疫抑制剂用于器官移植和自身免疫病的治疗。

发明内容

本发明的目的是提供一种抗人颗粒酶 K 的单克隆抗体 K42-D2。

本发明提供了一种抗人颗粒酶 K 的单克隆抗体 K42-D2，其特征在于，它是由小鼠杂交瘤细胞系 K42-D2 产生的。以重组人颗粒酶 K 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膀胱癌单克隆抗体的细胞株 K42-D2。K42-D2 单抗与重组人颗粒酶 K 及表达人天然颗粒酶 K 的细胞呈强阳性反应，而与其它不表达颗粒酶的细胞无交叉反应。

更具体地，本发明提供以下各项：

1) 一种抗人颗粒酶 K 的单克隆抗体 K42-D2，它由小鼠杂交瘤细胞系 K42-D2 (CGMCC No. 2309) 产生。

2) 一种产生抗人颗粒酶 K 单克隆抗体 K42-D2 的杂交瘤细胞，其特征在于，它是保藏号为 CGMCC No. 2309 的小鼠杂交瘤细胞系 K42-D2。

3) 以上 1) 所述的单克隆抗体 K42-D2 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) 用于检测颗粒酶 K 的含量的试剂盒，其包含以上 1) 所述的单克

隆抗体 K42-D2。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。

5) 根据以上 4) 的试剂盒, 其中所述颗粒酶 K 的含量可作为临床病人固有性免疫和适应性免疫水平的指徵。

6) 根据以上 4 或 5 的试剂盒, 其中所述试剂盒用于检测 NK92 细胞或 PBMC 的颗粒酶 K 的含量。

7) 一种检测细胞的颗粒酶 K 的含量的方法, 该方法包括: (1) 将以上 1) 所述的单克隆抗体 K42-D2 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。

8) 根据以上 7) 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 K42-D2 单抗, 按常规方法对重组人颗粒酶 K(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

颗粒酶 K 在激活的 CTL 和 NK 细胞中高度表达, 尤其是在 CD8⁺和 CD56^{bright}NK 细胞中, 此外在 CD56⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、TCR $\gamma\delta$ ⁺T 细胞亚类中亦有表达 (Detection of soluble human granzyme K in vitro and in vivo. Eur J Immunol. 2005 Oct;35(10):2940-8. Bade B, Lohrmann J, ten Brinke A, Wolbink AM, Wolbink GJ, ten Berge IJ, Virchow JC Jr, Luttmann W, Hack CE.); Differential expression of human granzymes A, B, and K in natural killer cells and during CD8⁺ T cell differentiation in peripheral blood. Eur J Immunol. 2005 Sep;35(9):2608-16. Bratke K, Kuepper M, Bade B, Virchow JC Jr, Luttmann W.)。在鼠 CTL 和 LAK 细胞中颗粒酶 K 的表达量远远低于颗粒酶 A, 而有研究认为在大鼠 NK (RNK-16) 细胞中颗粒酶 K 表达

量大于颗粒酶 A。最近有研究表明颗粒酶 A 基因敲除的小鼠 (GzmA^{-/-}) 中, 颗粒酶 K 表达未见异常, 小鼠能够正常成长发育, 其淋巴细胞亦能够正常发育、激活和增值, 能够杀伤病毒感染和癌变细胞, 但对某些病毒感染如小鼠痘病毒和单纯疱疹病毒缺少抵抗能力 (Residual cytotoxicity and granzyme K expression in granzyme A-deficient cytotoxic lymphocytes. *J Biol Chem.* 1997 Aug 8;272(32):20236-44. Shresta S, Goda P, Wesselschmidt R, Ley TJ.). 颗粒酶 A 介导了一条新的不依赖于 Caspase 的靶细胞凋亡的通路, 作为处在同一染色体相同基因簇的颗粒酶 K 是否发挥同 A 相类似的作用呢? 目前为止, 对于人颗粒酶 K 深入的杀伤作用尚未阐明。我们采用原核及真核表达并纯化颗粒酶 K, 研究了颗粒酶 K 的杀伤效应。结果发现颗粒酶 K 既具有相同于颗粒酶 A 的作用机制, 如颗粒酶 K 介导了不依赖于 Caspase 的靶细胞死亡, 通过作用于 SET 复合物(切割 SET、HMG2 及 Apel) 引起靶细胞 DNA 单链断裂及诱导线粒体 ROS 产生、氧化还原电势降低等; 又具有不同于颗粒酶 A 的作用机制。如切割 Bid, 诱导线粒体 Cyto c 及 EndoG 的释放等类似于颗粒酶 B 的作用特点。

本发明包括: 一种特异性的抗人颗粒酶 K 单克隆抗体 K42-D2, 它是由小鼠杂交瘤细胞系 K42-D2 产生的。以重组人颗粒酶 K 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膀胱癌单克隆抗体的细胞株 K42-D2。

本发明中的一种阳性杂交瘤细胞为抗人颗粒酶 K 单克隆抗体杂交瘤细胞株 K42-D2, 该杂交瘤细胞株于 2007 年 12 月 27 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. 2309。

本发明中的抗人颗粒酶 K 单克隆抗体 K42-D2 的实验表明, K42-D2 单抗与重组人颗粒酶 K 及表达人天然颗粒酶 K 的细胞呈强阳性反应, 而与其它不表达颗粒酶的细胞无交叉反应。

本发明中的抗人颗粒酶 K 单克隆抗体 K42-D2 具有以下的特点和性能: (1)与重组人颗粒酶 K 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

K42-D2 单抗的制备和纯化

(1) 杂交瘤的制备

以重组人颗粒酶 K (制备参见 Zhao, T., Zhang, H., Guo, Y., Zhang, Q., Hua, G., Lu, H., Hou, Q., Liu, H., Fan, Z., 2007b. GzmK cleaves the nucleosome assembly protein SET to induce single-stranded DNA nicks of target cells. *Cell Death Differ.* 14, 489–499) 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 K。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 K 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°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°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 K 杂交瘤细胞系 K42-D2，该杂交瘤细胞系于 2007 年 12 月 27 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. 2309。

（2）K42-D2 单抗的制备和纯化

将上述杂交瘤细胞 K42-D2 接种至 Balb/C 小鼠腹腔，制备腹水，再从腹水中提取单抗。单抗 K42-D2 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 K42-D2 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℃冻存。

实施例 2

K42-D2 单抗的鉴定

在实施例 1 中制备的 K42-D2 单抗，按常规方法对重组人颗粒酶 K、人 NK 肿瘤细胞系 NK92 细胞裂解液、人外周血单核细胞 PBMC 裂解液、人白血病细胞 K562 细胞裂解液进行 western blotting，结果如图 1 所示。结果表明，K42-D2 单抗与重组人颗粒酶 K 及表达人天然颗粒酶 K 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 K42-D2 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，K42-D2 单抗与表达人天然颗粒酶 K 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 K42-D2 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	K42-D2 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。

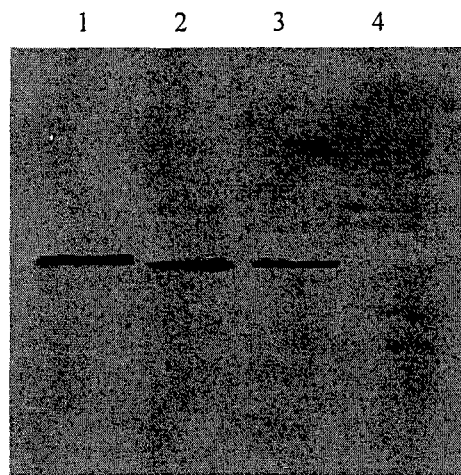


图 1