

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610078401.4

[51] Int. Cl.

C12N 5/20 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 11 月 29 日

[11] 公开号 CN 1869207A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/53 (2006.01)

[22] 申请日 2006.5.24

[21] 申请号 200610078401.4

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路中国科学院生物物理研究所

[72] 发明人 唐捷 伍艳芳 王云波 周洪哲

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 关畅 任凤华

权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图 2 页

[54] 发明名称

鼠抗人巨噬细胞迁移抑制因子单克隆抗体及其应用

[57] 摘要

本发明公开了一种鼠抗人巨噬细胞迁移抑制因子单克隆抗体及其应用。该鼠抗人巨噬细胞迁移抑制因子单克隆抗体，是由杂交瘤细胞株 10C3 CGM-CC No. 1717 分泌的单克隆抗体。杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体、衍生于该单克隆抗体的单链抗体、人-鼠嵌合抗体或 Fab 片段可以用于治疗败血症，全身炎症反应综合征或急性肺损伤等炎症反应；可以用于治疗类风湿性关节炎，哮喘，多发性硬化症，糖尿病或红斑狼疮等自身免疫性疾病；还可以抑制肿瘤的生成；上述单克隆抗体及其衍生物能够与糖皮质激素联合用药，降低糖皮质激素的用量及副作用。

- 1、杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717。
- 2、杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体及其衍生物，所述单克隆抗体的衍生物为单链抗体、Fab 片段或人-鼠嵌合抗体。
- 3、根据权利要求 2 所述的单克隆抗体及其衍生物，其特征在于：所述杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体、由所述单克隆抗体衍生的 Fab 片段或人-鼠嵌合抗体的重链可变区具有序列表中 SEQ ID NO: 1 的氨基酸残基序列，轻链可变区具有序列表中 SEQ ID NO: 2 的氨基酸残基序列。
- 4、根据权利要求 3 所述的单克隆抗体衍生物，其特征在于：由所述单克隆抗体衍生的人-鼠嵌合抗体的轻链具有序列表中序列 8 的氨基酸残基序列，重链具有序列表中序列 9 的氨基酸残基序列。
- 5、根据权利要求 2 所述的单克隆抗体及其衍生物，其特征在于：由所述单克隆抗体衍生的单链抗体具有序列表中序列 3 的氨基酸残基序列。
- 6、权利要求 2-5 中任一所述的单克隆抗体及其衍生物的编码基因。
- 7、根据权利要求 6 所述的基因，其特征在于：由所述单克隆抗体衍生的人-鼠嵌合抗体的轻链编码基因具有序列表中序列 6 的核苷酸序列，重链编码基因具有序列表中序列 7 的核苷酸序列；由所述单克隆抗体衍生的单链抗体编码基因具有序列表中序列 10 的核苷酸序列。
- 8、权利要求 2-5 中任一所述的单克隆抗体及其衍生物在制备药物中的应用，所述药物为治疗由人巨噬细胞迁移抑制因子参与的炎症反应的药物、治疗由人巨噬细胞迁移抑制因子参与的自身免疫性疾病的药物或治疗由人巨噬细胞迁移抑制因子参与的肿瘤的药物。
- 9、根据权利要求 8 所述的应用，其特征在于：所述炎症反应为败血症，全身炎症反应综合症或急性肺损伤；所述自身免疫性疾病为类风湿性关节炎，哮喘，多发性硬化症，糖尿病或红斑狼疮。
- 10、权利要求 2-5 中任一所述的单克隆抗体及其衍生物在检验人巨噬细胞迁移抑制因子中的应用。

鼠抗人巨噬细胞迁移抑制因子单克隆抗体及其应用

技术领域

本发明涉及一种鼠抗人巨噬细胞迁移抑制因子单克隆抗体及其应用。

背景技术

巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF) 是早期发现的细胞因子之一。MIF 的 cDNA 编码一个具有 115 个氨基酸的蛋白质, 该蛋白不属于任何一个细胞因子超家族, 与哺乳动物细胞中其他任何蛋白都不具有很强同源性。所有哺乳类动物的 MIF 蛋白 (包括人、大鼠、小鼠、牛) 大约有 90% 的同源性。物种间 MIF 的保守性显示了 MIF 可能有重要的生物学功能。

免疫系统中的巨噬细胞是产生 MIF 的主要细胞, 在其他组织分布也很广。值得注意的是, 表达 MIF 的细胞或是组织, 如肺、皮肤上皮层、胃肠道、泌尿生殖道等, 和宿主的自然环境直接相关。MIF 的另一个与众不同的性质是: 一些内分泌系统的组织可以高水平表达 MIF, 特别是那些和应激反应有关的器官, 如下丘脑、垂体、肾上腺等。

糖皮质激素是一种广谱的抗炎药物, 而 MIF 是人们发现的第一个糖皮质激素功能的拮抗蛋白。MIF 一经释放, 就可以使类固醇 (糖皮质激素) 的免疫抑制效应失效, 从而表现出独特的生理作用, 就好像是一种由糖皮质激素诱导产生的负调控因子 (Bucala, R. (1996). MIF re-discovered: pituitary hormone and glucocorticoid-induced regulator of cytokine production. Cytokine Growth Factor Rev. 7, 19-24; Donnelly, S. C. and Bucala, R. (1997). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critical role in inflammatory disease. Mol. Med. Today 3, 502-507.)。

MIF 作为一个细胞因子在固有性免疫系统有着重要的作用。LPS, TNF- α , IFN- γ 等刺激巨噬细胞释放 MIF, 当 MIF 释放到组织或在全身循环时, 它就充当一个经典的促炎症细胞因子, 通过巨噬细胞、T 细胞活化而促进固有性和适应性免疫应答。

高水平的 MIF 生成在急性感染中是有害的。在动物模型中, 抑制 MIF 的作用, 对于败血症, 急性肺损伤以及全身炎症反应综合症都具有明显的治疗效果

(Calandra, T. and Bucala, R. (1995). Macrophage migration inhibitory factor:

a counter-regulator of glucocorticoid action and critical mediator of septic shock. *J. Inflamm.* 47, 39-51; Calandra, T., Echtenacher, B., Roy, D. L., Pugin, J., Metz, C. N., Hultner, L., Heumann, D., Mannel, D., Bucala, R., and Glauser, M. P. (2000). Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat. Med.* 6, 164-170)。由于全身炎症反应综合症是 SARS 和人禽流感的重要致死原因，抗 MIF 抗体对这类突发性的急性呼吸道感染应有很好的疗效。

MIF 与类风湿性关节炎，哮喘，多发性硬化症，糖尿病等自身免疫疾病也有重要联系。例如在大鼠关节炎模型中，抗 MIF 抗体可以很好地减缓大鼠的病情发展，100%地抑制死亡率。由于 MIF 对糖皮质激素的拮抗作用，抗 MIF 抗体与低剂量糖皮质激素联用，有可能增强激素的抗炎症作用，降低激素的副作用 (Baugh, J. A. and Donnelly, S. C. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation. *J. Endocrinol.* 179, 15-23; Morand, E. F. (2005). New therapeutic target in inflammatory disease: macrophage migration inhibitory factor. *Intern. Med. J.* 35, 419-426)。MIF 在肿瘤生成中也起到关键作用，研究表明，多种肿瘤细胞高表达 MIF，而 MIF 对肿瘤细胞的存活以及肿瘤血管的生成是必须的 (Nishihira, J., Ishibashi, T., Fukushima, T., Sun, B., Sato, Y., and Todo, S. (2003). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): Its potential role in tumor growth and tumor-associated angiogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 995, 171-182; Mitchell, R. A. and Bucala, R. (2000). Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Semin. Cancer Biol.* 10, 359-366)。

综上所述，MIF 是一个非常重要的细胞因子，对 MIF 活性的抑制可望给患有严重败血症和炎症，自身免疫性疾病及癌症的病人提供新的治疗选择。

发明内容

本发明所要解决的一个技术问题是提供一种分泌特异性结合人巨噬细胞迁移抑制因子的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

该杂交瘤细胞系为杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717。

杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 已于 2006 年 5 月 22 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)，保藏中心地址是中国北京市海淀区

区中关村北一条 13 号，其保藏编号为 CGMCC No. 1717。

本发明所要解决的另一个技术问题是提供一种特异性结合人 MIF 蛋白的单克隆抗体，或者衍生于这种单克隆抗体的单链抗体，Fab 片段，或者人-鼠嵌合抗体。

本发明所提供的单克隆抗体是杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体；所述单克隆抗体的衍生物为单链抗体、Fab 片段或人-鼠嵌合抗体。

所述杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体、由所述单克隆抗体衍生的 Fab 片段或人-鼠嵌合抗体的重链可变区具有序列表中 SEQ ID NO: 1 的氨基酸残基序列，轻链可变区具有序列表中 SEQ ID NO: 2 的氨基酸残基序列。

由所述单克隆抗体衍生的人-鼠嵌合抗体的轻链具有序列表中序列 8 的氨基酸残基序列，重链具有序列表中序列 9 的氨基酸残基序列。其名称为 ch-10C3。

由所述单克隆抗体衍生的单链抗体具有序列表中序列 3 的氨基酸残基序列，其名称为 10C3scFV。

上述单克隆抗体及其衍生物的编码基因。

由所述单克隆抗体衍生的人-鼠嵌合抗体的轻链编码基因可具有序列表中序列 6 的核苷酸序列，重链编码基因可具有序列表中序列 7 的核苷酸序列。

单链抗体 10C3scFV 的编码基因可具有序列表中序列 10 的核苷酸序列。

实验证明杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体、衍生于该单克隆抗体的单链抗体 10C3scFV、人-鼠嵌合抗体 ch-10C3 或 Fab 片段与人 MIF 的解离常数分别为 3nM, 30nM, 3nM, 10nM。杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体、衍生于该单克隆抗体的单链抗体 10C3scFV、人-鼠嵌合抗体 ch-10C3 或 Fab 片段可以阻断人 MIF 刺激 Raw264.7 细胞产生炎症因子 NO 和 TNF- α ，在 LPS 诱导的小鼠败血症模型中具有保护作用。

上述单克隆抗体及其衍生物能够高亲和力特异性识别人巨噬细胞迁移抑制因子，并中和其生物学活性，可以用于治疗败血症，全身炎症反应综合征或急性肺损伤等炎症反应；可以用于治疗类风湿性关节炎，哮喘，多发性硬化症，糖尿病或红斑狼疮等自身免疫性疾病；还可以抑制肿瘤的生成；上述单克隆抗体及其衍生物能够与糖皮质激素联合用药，降低糖皮质激素的用量及副作用。

上述单克隆抗体及其衍生物可用于临床检验 MIF 的水平。

附图说明

图 1 为 ELISA 检测杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体与人 MIF 的解离曲线

图 2 为杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体抑制人 MIF 刺激 Raw264.7 细胞产生 NO 曲线

图 3 为杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体抑制人 MIF 刺激 Raw264.7 细胞产生 TNF- α 的结果

图 4 为注射 LPS 和注射 LPS 和杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体的小鼠的存活情况

具体实施方式

下述实验方法，如无特别说明，均为常规方法。

实施例 1、抗 MIF 单克隆抗体的制备和鉴定

1、杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体的制备

本发明用大肠杆菌表达的人 MIF 蛋白 (huMIF) (将 huMIF 的编码区克隆至删除了 GST 编码区的 PET-41a 载体 (Novagen, USA), 克隆的质粒在 DH5 α 里扩增, 再经由 BL21 中表达。融合蛋白中带有 6 \times his Tag, 通过 Ni-NTA 亲和层析纯化。) 免疫 NZB/W F1 小鼠 (南京大学模式动物研究所), 80 微克人 MIF 加 MPL+TDM 乳液佐剂 (sigma) 足底免疫, 一周一次, 共三次。第三次免疫 3 天后的 NZB/W F1 小鼠取淋巴结中的免疫细胞与鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞以 5: 1 比例混合, 用聚乙二醇进行融合, HAT 筛选后得到杂交瘤。

分泌特异性结合 MIF 抗体的杂交瘤检测: 以大肠杆菌表达的 GST-MIF 重组蛋白 (10 微克/毫升) (将 huMIF 的编码区克隆至 PET-41a 载体 (Novagen, USA), 克隆的质粒在 DH5 α 里扩增, 再经由 BL21 中表达。融合蛋白中带有 GST Tag, 通过谷胱甘肽亲和层析纯化。) 包板, 杂交瘤上清 (进行梯度稀释) 为一抗, HRP 偶联的羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体 (R&D Systems) 为二抗进行 ELISA 检测, 获得解离曲线。ELISA 最大读数的 50% 相对应的抗体浓度为抗体的解离常数。

亚克隆: 用限制性稀释法多次克隆分泌特异性抗体的杂交瘤细胞, 最后获得杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717。ELISA 检测杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体与 MIF 的解离曲线如图 1 所示, 表明杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体与人 MIF 的解离常数为 3nM (即 480ng/ml)。图 1 的横坐标是杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体的浓度, 纵坐标是 ELISA 显色后的光吸收值。

抗体亚型鉴别实验: 以大肠杆菌表达的 GST-MIF 重组蛋白 (10 微克/毫升) 包

板，杂交瘤上清为一抗，HRP 偶联的大鼠抗小鼠 IgG1, IgG2a, 或 IgG2b 单克隆抗体 (BD Pharmingen) 为二抗进行 ELISA 检测。实验证明杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体为 IgG2b 亚型。

腹水的制备方法：Balb/C 小鼠腹腔注射降植烷 0.5ml/只十天后，将杂交瘤细胞悬液接种于小鼠腹腔，待小鼠腹腔有明显肿胀后收集腹水，离心取上清。通过蛋白 A/G 亲和层析柱 (Pierce) 纯化抗体，0.1M Glycine/HCl (pH2.5) 洗脱。

2、杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体的生物活性鉴定

(1) 杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体可以阻断人 MIF 刺激 Raw264.7 细胞产生 NO

重组人 MIF (制备方法同上) 和步骤 1 纯化的杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体混合后刺激 Raw264.7 细胞 16 小时。共设六个处理：终浓度为 3ug/ml 重组人 MIF 和终浓度为 100ug/ml 的步骤 1 纯化的杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体混合处理、终浓度为 3ug/ml 重组人 MIF 和终浓度为 33.3ug/ml 的步骤 1 纯化的杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体混合处理、终浓度为 3ug/ml 重组人 MIF 和终浓度为 11.1ug/ml 的步骤 1 纯化的杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体混合处理、终浓度为 3ug/ml 重组人 MIF 和终浓度为 3.7ug/ml 的步骤 1 纯化的杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体混合处理、终浓度为 3ug/ml 重组人 MIF 和终浓度为 1.23ug/ml 的步骤 1 纯化的杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体混合处理、终浓度为 3ug/ml 重组人 MIF 和终浓度为 0.41ug/ml 的步骤 1 纯化的杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体混合处理。细胞培养液中新产生的一氧化氮量用 Griess 试剂显色法测量。结果如图 2 所示，表明步骤 1 纯化的杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体 (抗体起始浓度为 100ug/ml, 3 倍稀释) 与 MIF 混合后能显著降低 MIF 刺激 Raw264.7 细胞引起的 NO 的分泌。反应中加过量的多粘菌素 B 以消除步骤 1 纯化过程中残留的 LPS 影响。图 2 的横坐标是杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体的浓度。

(2) 杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体可以阻断 MIF 刺激 Raw264.7 细胞产生肿瘤坏死因子 (TNF- α)

重组人 MIF (制备方法同上) 和步骤 1 纯化的杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体混合后刺激 Raw264.7 细胞 3 小时后收集上清液，稀释成 1/100 来刺激 L929 细胞，16h 后加入 5mg/ml MTT 20ul/孔，继续培养 3h 后弃上清，

加入 150 μ l DMSO, 震荡后测 A₅₅₀ 吸光值。用未经刺激的 Raw264.7 细胞上清样品的吸光值减去刺激后的 Raw264.7 细胞上清样品的吸光值, 得到相对杀伤, 对比鼠 TNF- α 标准曲线, 得到对应的浓度, 再乘以样品体积, 得到 TNF- α 的量。其中, 重组人 MIF 和步骤 1 纯化的杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体共有六种混合处理: 终浓度为 0 μ g/ml 重组人 MIF 和终浓度为 0 μ g/ml 的步骤 1 纯化的杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体混合处理、终浓度为 3 μ g/ml 重组人 MIF 和终浓度为 0 μ g/ml 的步骤 1 纯化的杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体混合处理、终浓度为 0 μ g/ml 重组人 MIF 和终浓度为 100 μ g/ml 的步骤 1 纯化的杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体混合处理、终浓度为 3 μ g/ml 重组人 MIF 和终浓度为 100 μ g/ml 的步骤 1 纯化的杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体混合处理、终浓度为 3 μ g/ml 重组人 MIF 和终浓度为 33 μ g/ml 的步骤 1 纯化的杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体混合处理、终浓度为 3 μ g/ml 重组人 MIF 和终浓度为 11 μ g /ml 的步骤 1 纯化的杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体混合处理。结果如图 3 所示, 表明步骤 1 纯化的杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体与 MIF 混合后能显著降低 MIF 刺激 Raw264.7 细胞引起的 TNF- α 的分泌。图 3 中, 10C3 Ab 表示杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体。

实施例 2、抗 MIF 人-鼠嵌合抗体 ch-10C3 的制备

鼠抗体在人体内会产生免疫排斥反应, 因此只能由于急症的治疗, 一旦人体内产生针对鼠抗体的抗抗体, 作为药物的鼠抗体就会失效。为了克服这一缺点, 本发明对鼠抗体进行了人源化, 制备了人-鼠嵌合抗体 ch-10C3。该抗体的可变区序列来自鼠抗体-杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体, 不变区序列来自人 IgG1。这种抗体保持了鼠单抗的抗原结合特异性, 同时降低了在人体内诱导的免疫排斥反应。制备嵌合抗体的步骤如下:

从杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 中分离纯化 mRNA, 用 oligo-dT 合成第一链 cDNA。用 PCR 方法分别扩增抗体轻链和重链可变区, 轻链引物为 5' GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA 3' 和 5' CTC CAG ATG TTA ACT GCT CAC 3'; 重链引物为: 5' ATG SAR GTN MAG CTG SAG SAG TC 3' 和 5' GGT CAA GGT CAC TGG CTC AGG3'。其中, R=G 或 A, Y=T 或 C, M=A 或 C, S=G 或 C, W=T 或 A, N=G 或 A 或 C 或 T。将 PCR 产物分别克隆到 T 载体中测序。结果表明杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体的重链可变区的编码基因具有序列表中序列 4

的核苷酸序列，编码具有序列表中 SEQ ID NO: 1 的氨基酸残基序列的重链可变区；杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体的轻链可变区的编码基因具有序列表中序列 5 的核苷酸序列，编码具有序列表中 SEQ ID NO: 2 的氨基酸残基序列的轻链可变区。

将杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体的轻链和重链可变区基因分别与人的轻链和重链不变区基因连接，构建可编码嵌合抗体 ch-10C3 的融合基因，该嵌合抗体轻链的编码基因具有序列表中序列 6 的核苷酸序列，编码具有序列表中序列 8 的氨基酸残基序列的 ch-10C3 轻链；该嵌合抗体重链的编码基因具有序列表中序列 7 的核苷酸序列，编码具有序列表中序列 9 的氨基酸残基序列的 ch-10C3 重链。

将该嵌合抗体轻链的编码基因插入到有选择性标记（鸟嘌呤磷酸核糖转移酶，gpt）和基因表达调控区（CMV 启动子，终止子）的表达载体 pCI-gpt（以 promega 载体 pCI 为模板构建，将鸟嘌呤磷酸核糖转移酶的编码基因插入 pCI 的多克隆位点得到表达载体 pCI-gpt）中，得到该嵌合抗体轻链表达载体 pCI-gpt-10C3L。将该嵌合抗体重链的编码基因插入到有选择性标记（二氢叶酸还原酶 DHFR）和基因表达调控区（CMV 启动子，终止子）的表达载体 pCI-DHFR（以 promega 载体 pCI 为模板构建，将二氢叶酸还原酶的编码基因插入 pCI 的多克隆位点得到表达载体 pCI-DHFR）中，得到该嵌合抗体重链表达载体 pCI-DHFR-10C3H。

用电转染的方法将含有嵌合抗体基因的表达载体 pCI-gpt-10C3L 和 pCI-DHFR-10C3H 一同导入到哺乳动物细胞 NS/O（购自 ECACC）中。用霉酚酸酯（Mycophenolate）在含黄嘌呤（Xanthine）的培养基中筛选转化细胞，获得稳定转染的细胞株。按照实施例 1 的方法用 ELISA 鉴定抗体的分泌，结果显示得到的 ch-10C3 抗体保留了杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体的特异性和亲和力，ch-10C3 抗体与 MIF 的解离常数为 3nM。

实施例 3、抗 MIF 单链抗体 10C3 scFV 的制备

PCR 方法分别扩增杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体的轻链和重链可变区基因，然后用 PCR 方法将重链和轻链可变区用富含甘氨酸和丝氨酸的 15 氨基酸片段连接起来，获得抗 MIF 单链抗体 10C3 scFV 的编码基因序列（序列 10）。将 10C3 scFV 的编码基因序列克隆到表达载体 pET-26b（Novagen, USA）中，克隆的质粒在 DH5 α 里扩增，再经由 BL21 中表达。融合蛋白中带有 6 \times his Tag，通过 Ni-NTA 亲和层析纯化。表达的 10C3 scFV 具有序列表中序列 3 的氨基酸残基

序列。

按照实施例 1 的方法用 ELISA 鉴定抗 MIF 单链抗体 10C3scFV, 结果显示抗 MIF 单链抗体 10C3scFV 保留了杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体的特异性和亲和力, 抗 MIF 单链抗体 10C3scFV 与 MIF 的解离常数为 30nM。

实施例 4、抗 MIF 的 Fab 片段 10C3Fab 的制备

利用 ImmunoPure[®]Fab 制备试剂盒 (Pierce) 中的固定化木瓜蛋白酶消化杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体, 将全长抗体降解成为 Fab 和 Fc 片段。酶解后的产物用试剂盒中提供的固定化蛋白 A 柱纯化得到 Fab 的抗体片段。按照实施例 1 的方法用 ELISA 鉴定杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体的 Fab 片段 10C3Fab, 结果显示杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体的 Fab 片段 10C3Fab 保留了杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体的特异性和亲和力, 抗 MIF 的 Fab 片段 10C3Fab 与 MIF 的解离常数为 10nM。

实施例 5、抗 MIF 抗体在败血症小鼠模型中的应用

8 周龄 C57BL/6 雌性小鼠 20 只, 重 17.5g--18.5g, 按体重匹配均分为两组: LPS 组 (LPS) 和抗体组 (LPS+anti-MIF)。实验前在 SPF 级动物房中同笼 48 小时, 自由进食及水。注射前 2 小时禁食。LPS 组和抗体组小鼠依体重给予 LPS (Sigma O111:B4) 22.5mg/kg。抗体组在给 LPS 后, 给予杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体 100ug/只。两种药物均用无菌 PBS 稀释到终体积 200ul, 腹腔内注射。将两组分笼喂养, 观察给药后情况。在 12hr 后, 均出现相似的颤抖, 体毛直立, 对外界刺激不敏感表现。16 小时后, LPS 组和抗体组开始有小鼠死亡; 60 小时, 抗体组的存活率为 40%, LPS 组的存活率为 20% (图 4)。说明杂交瘤细胞株 10C3 CGMCC No. 1717 分泌的单克隆抗体在 LPS 诱导的小鼠败血症模型中具有保护作用。

序列表

<160> 10

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Gln	Val	Gln	Leu	Glu	Glu	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1			5						10					15	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Asp	Tyr	Thr	His	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val
		50				55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Arg	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Phe	Tyr	Cys
					85					90				95	
Ala	Arg	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Tyr	Trp	Phe	Tyr	Asp	Val	Trp	Gly
			100						105					110	
Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
			115					120							

<210> 2

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Val Ser Ile Ile Ala Ser Arg Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Arg Thr Ser Ile Leu Ala Ser Gly Val Leu Asp Ser Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Glu Thr Ser Asp Thr Leu Thr Ile Ser Cys Met Gln
 65 70 75 80
 Asp Glu Val Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Ser Pro
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 3

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

Gln Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Thr His Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

caagtacagc tggaggagtc tgggggagcc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt acctatgcca tgtcttgggt tcgccagact	120
ccagagaaga ggctggagtg gtcgcaacc attagtagtg gtggtgatta caccactat	180
ccagacagtg tgaagggctg attcaccatc tccagagaca atgccaggaa caccctatac	240
ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt tttactgtgc aagaccctac	300
tacggcagta gttactggtt ctacgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc	360
tca	363

<210> 5

<211> 327

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

gatattgtgc tgacccaaac tccagtgtcc ataattgctt ctcgagggga gaaggtcacc	60
atcacctgcc gtgccagatc aagtataagt tccacttact tacactggta ccagcagaag	120
ccaggatcct ccctaaact tttgatttat aggacatcca tcctggcatc tggagtccta	180
gacagcttca gtggcagtgg gtctgagacc tctgacactc tgacaatcag ctgcatgcag	240
gacgaagttg ctgccactta ctattgtcag caggggagta gtagcccgtc cacgttcggt	300
gctgggacca agctggagct gaaacgg	327

<210> 6

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

gatattgtgc tgacccaaac tccagtgtcc ataattgctt ctcgagggga gaaggtcacc	60
atcacctgcc gtgccagatc aagtataagt tccacttact tacactggta ccagcagaag	120
ccaggatcct ccctaaact tttgatttat aggacatcca tcctggcatc tggagtccta	180
gacagcttca gtggcagtgg gtctgagacc tctgacactc tgacaatcag ctgcatgcag	240

gacgaagttg ctgccactta ctattgtcag caggggagta gtagcccgct cacgttcggt	300
gctgggacca agctggagct gaaacggact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg	360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc	480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacccctg	540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag	600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt	645

<210> 7

<211> 1359

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

atgcaagtac agctggagga gtctggggga gccttagtga agcctggagg gtcctgaaa	60
ctctcctgtg cagcctctgg attcactttc agtacctatg ccatgtcttg ggttcggcag	120
actccagaga agaggctgga gtgggtcgca accattagta gtgggtgtga ttacaccac	180
tatccagaca gtgtgaaggg tcgattcacc atctccagag acaatgccag gaacacccta	240
tacctgcaaa tgagcagtct gaggtctgag gacacggcca tgttttactg tgcaagacc	300
tactacggca gtagttactg gttctacgat gtctggggcg cagggaccac ggtcaccgtc	360
tcctcagcgt cgaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc	420
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg	480
gtgtcgtgga actcaggegc cctgaccagc ggcgtgcaca cttcccggc tgcctacag	540
tcctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc	600
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt	660
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg	720
gggggaccgt cagtcttctt cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg	780
accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag	900
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	960
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc	1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1080
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccagcct 1200
 cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agctcacctg ggacaagagc 1260
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaata 1359

<210> 8

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 8

Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Val Ser Ile Ile Ala Ser Arg Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Arg Thr Ser Ile Leu Ala Ser Gly Val Leu Asp Ser Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Glu Thr Ser Asp Thr Leu Thr Ile Ser Cys Met Gln
 65 70 75 80
 Asp Glu Val Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Ser Pro
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

145		150		155		160									
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
				165					170					175	
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val
			180					185					190		
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys
		195						200				205			
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
	210						215								

<210> 9

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 9

Met	Gln	Val	Gln	Leu	Glu	Glu	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Gly
1				5					10					15	
Gly	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr
			20					25					30		
Tyr	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp
		35					40					45			
Val	Ala	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Asp	Tyr	Thr	His	Tyr	Pro	Asp	Ser
	50					55					60				
Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Arg	Asn	Thr	Leu
65					70					75					80
Tyr	Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Phe	Tyr
				85					90					95	
Cys	Ala	Arg	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Tyr	Trp	Phe	Tyr	Asp	Val	Trp
			100					105					110		
Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
		115					120					125			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
	130					135					140				
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145					150					155					160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450

<211> 735

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 10

caagtacagc tggaggagtc tgggggagcc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt acctatgcca tgtcttgggt tcgccagact	120
ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtgatta cacccactat	180
ccagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaggaa caccctatac	240
ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt tttactgtgc aagaccctac	300
tacggcagta gttactggtt ctacgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc	360
agcggcagca gcggcagcgg cagcagcggc agcggcagca gcggcagcga tattgtgctg	420
acccaaactc cagtgtccat aattgcttct cgaggggaga aggtcaccat cacctgccgt	480
gccagatcaa gtataagttc cacttactta cactggtacc agcagaagcc aggatcctcc	540
cctaaacttt tgatttatag gacatccatc ctggcatctg gagtcctaga cagcttcagt	600
ggcagtgggt ctgagacctc tgacactctg acaatcagct gcatgcagga cgaagttgct	660
gccacttact attgtcagca ggggagtagt agcccgtca cgttcggtgc tgggaccaag	720
ctggagctga aacgg	735

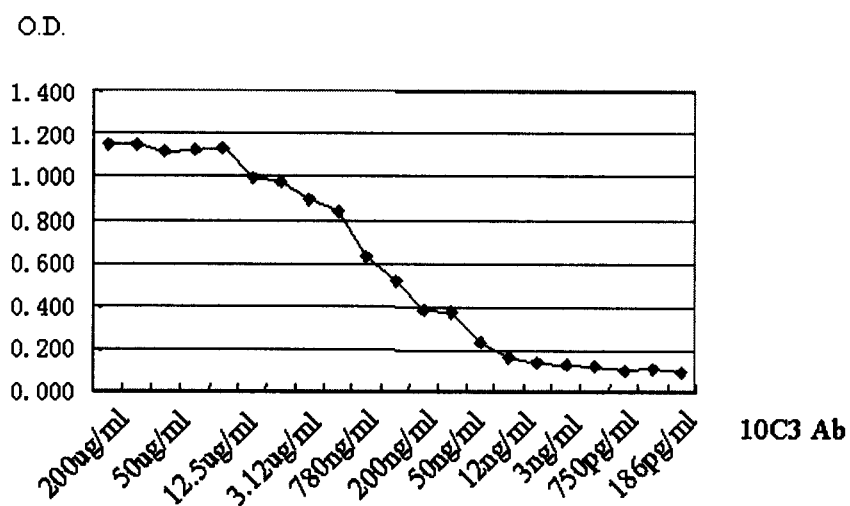


图 1

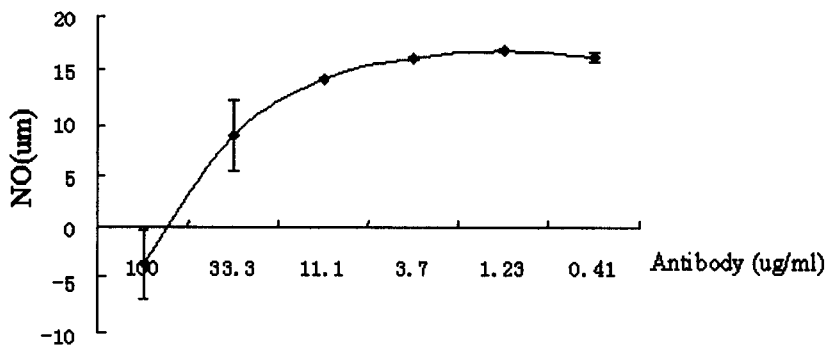


图 2

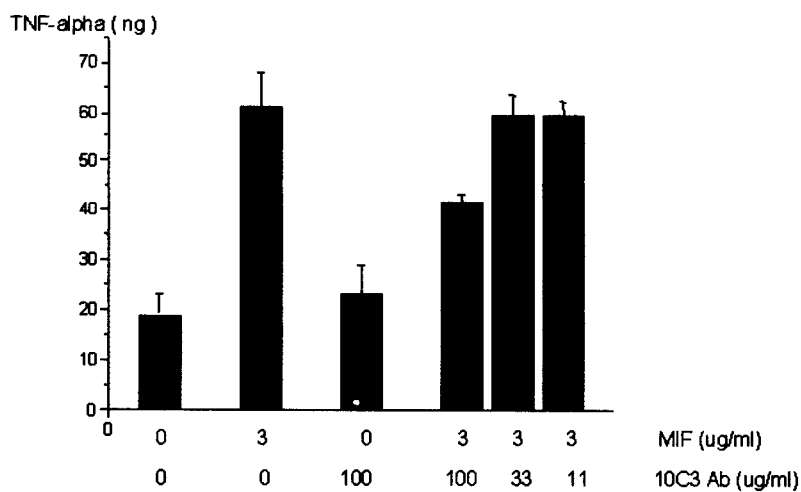


图 3

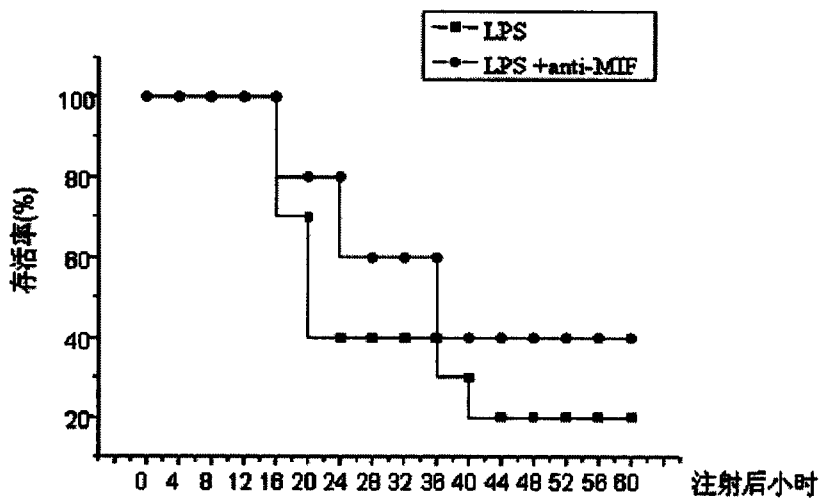


图 4