

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 16/18 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610081079.0

[43] 公开日 2006年10月25日

[11] 公开号 CN 1850863A

[22] 申请日 2006.5.23

[21] 申请号 200610081079.0

[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 王云波 周洪哲 曾明辉

[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 7 页 附图 3 页

[54] 发明名称

针对自身抗原和/或种属间高度保守抗原的抗体及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了针对自身抗原和/或种属间高度保守抗原的抗体及其制备方法。该针对自身抗原和/或种属间高度保守抗原的抗体，按照下述方法制备：是用小鼠自身抗原和/或与小鼠自身抗原高度保守的异源抗原免疫 NZB/W F1 小鼠，得到针对自身抗原和/或种属间高度保守抗原的多克隆抗体或单克隆抗体。本发明可广泛用于生产具有较高效价的针对小鼠自身抗原和/或人鼠间高度保守抗原的抗体。

1、一种制备针对自身抗原和/或种属间高度保守抗原的抗体的方法，是用小鼠自身抗原和/或与小鼠自身抗原高度保守的异源抗原免疫 NZB/W F1 小鼠，得到针对自身抗原和/或种属间高度保守抗原的多克隆抗体或单克隆抗体。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述小鼠自身抗原是小鼠自身蛋白；所述与小鼠自身抗原高度保守的异源抗原是与小鼠自身蛋白具有 75%以上氨基酸序列同源性的异源蛋白。

3、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述小鼠自身蛋白和/或与小鼠自身蛋白具有 75%以上氨基酸序列同源性的异源蛋白的免疫佐剂为雌激素。

4、根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于：所述雌激素为雌二醇、雌三醇、雌酚或 17 β 雌二酯。

5、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述异源蛋白与小鼠自身蛋白具有 89%以上的氨基酸序列同源性。

6、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述小鼠自身蛋白和/或与小鼠自身蛋白具有 75%以上氨基酸序列同源性的异源蛋白的氨基端或羧基端还融合有 T 细胞特异性抗原决定簇。

7、根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于：所述 T 细胞特异性抗原决定簇为可以被小鼠 T 细胞特异性识别，但不能被小鼠 B 细胞识别的任何异源蛋白的一部分，或具有序列中序列 1 的氨基酸残基序列。

8、根据权利要求 2 至 7 中任一所述的方法，其特征在于：所述小鼠自身蛋白为 IL-18；所述与小鼠自身蛋白具有 75%以上氨基酸序列同源性的异源蛋白为人 MIF 或人 HMGB1。

9、根据权利要求 2 至 7 中任一所述的方法，其特征在于：所述方法中还包括纯化针对自身抗原和/或种属间高度保守抗原多克隆抗体或单克隆抗体的步骤。

10、由权利要求 1 至 9 中任一所述的方法制备的针对自身抗原和/或种属间高度保守抗原的多克隆抗体或单克隆抗体。

针对自身抗原和/或种属间高度保守抗原的抗体及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种针对自身抗原和/或种属间高度保守抗原的抗体及其制备方法。

背景技术

利用单克隆抗体治疗疾病是目前医药业的热点，而单克隆抗体药物的研发需要科研和开发两方面的有机配合。在科研方面，需要确证抗体靶点的有效性，这就需要针对鼠抗原的单克隆抗体进行动物试验。目前主要是在大鼠和豚鼠中得到抗小鼠蛋白的单克隆抗体。但大鼠与豚鼠的抗体在小鼠身上是异源蛋白，较长时间的药效学试验会产生排斥反应，而有些种属间高度保守的蛋白在大鼠与豚鼠中也难以得到单克隆抗体。在开发方面，需要针对人的蛋白产生单克隆抗体，而一些抗体药物的理想靶点在种属间是高度保守的，人源性的蛋白与鼠源性的对应蛋白非常相似。由于小鼠对自身蛋白的免疫耐受，高度保守性的蛋白作为抗原免疫小鼠时很难产生较强的免疫反应。对于同源性高于75%以上的蛋白，一般需要免疫相应的基因敲除鼠才能得到高亲和力的抗体。而基因敲除鼠的构建比较困难，很难针对每一种需要产生抗体的高度保守蛋白进行相应的基因敲除，有些基因敲除后小鼠不能存活，或者产生免疫缺陷，还是不能用于免疫。因此迫切需要一种广泛适用的方法，使得种属间高度保守的抗原能在小鼠中产生较好的免疫反应，从而筛选出高亲和力的抗体。

纯系新西兰黑色小鼠 (New Zealand、Black, NZB) 在出生后 4-6 个月大多数发生自身免疫性溶血性贫血。NZB 与 NZW (New Zealand、white) 杂交产生的 F1 子代动物 NZB/W F1 (NZB×NZW F1)，B 淋巴细胞存在多克隆活化，产生过量抗体及抗自身抗原的抗体，有自发的类似狼疮性肾炎。因此，一般认为它是人类红斑狼疮的最佳天然模型 (Aguas, A. P., Esaguy, N., Grande, N. R., Castro, A. P., and Castelo Branco, N. A. (1999). Acceleration of lupus erythematosus-like processes by low frequency noise in the hybrid NZB/W mouse model. *Aviat. Space Environ. Med.* 70, A132-A136; Morel, L. and Wakeland, E. K. (1998). Susceptibility to lupus nephritis in the NZB/W model system. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 718-725; Granholm, N. A., Graves, K., Izui, S., and Cavallo, T.

(1985). Pathogenic role of anti-DNA antibodies in murine lupus nephritis. *J. Clin. Lab Immunol.* 18, 113-118)。

发明内容

本发明的目的是提供一种制备针对自身抗原和/或种属间高度保守抗原的抗体的方法。

本发明所提供的制备针对自身抗原和/或种属间高度保守抗原的抗体的方法，是用小鼠自身抗原和/或与小鼠自身抗原高度保守的异源抗原免疫 NZB/W F1 小鼠，得到针对自身抗原和/或种属间高度保守抗原的多克隆抗体或单克隆抗体。

所述小鼠自身抗原为小鼠自身蛋白。所述与小鼠自身抗原高度保守的异源抗原是与小鼠自身蛋白具有 75%以上氨基酸序列同源性的异源蛋白。

所述小鼠自身蛋白和/或与小鼠自身蛋白具有 75%以上氨基酸序列同源性的异源蛋白的免疫佐剂可以为雌激素。

所述雌激素可为雌二醇、雌三醇、雌酚或 17 β 雌二酯。

为了提高目的蛋白抗原性，所述小鼠自身蛋白和/或与小鼠自身蛋白具有 75%以上氨基酸序列同源性的异源蛋白的氨基端或羧基端还融合有 T 细胞特异性抗原决定簇。

所述 T 细胞特异性抗原决定簇可为可以被小鼠 T 细胞特异性识别，但不能被小鼠 B 细胞识别的任何异源蛋白的一部分，如具有序列表中序列 1 的氨基酸残基序列。

所述小鼠自身蛋白具体可为 IL-18；所述与小鼠自身蛋白具有 75%以上氨基酸序列同源性的异源蛋白具体可为人 MIF 或人 HMGB1。

所述方法中还包括纯化针对自身抗原和/或种属间高度保守抗原多克隆抗体或单克隆抗体的步骤。

由上述方法制备的针对自身抗原和/或种属间高度保守抗原的多克隆抗体或单克隆抗体也属于本发明的保护范围。

本发明利用 NZB/W F1 小鼠自发产生自身抗体的特点，避免了小鼠的免疫耐受，使得小鼠自身抗原以及人鼠间高度保守的抗原都能在这种小鼠中产生较好的免疫反应。本发明用皮下植入雌激素的方法进一步打破小鼠的免疫耐受，获得更高的免疫效价。本发明用针对鼠 T 细胞的细菌抗原肽与目标蛋白产生重组融合蛋白，从而为 NZB/W F1 小鼠体内的自身抗原特异性 B 细胞提供有效的 T 细胞帮助。本发明可广泛用于生产具有高效价的针对小鼠自身抗原和/或人鼠间高度保守抗原

的抗体。

附图说明

图 1A 为用重组鼠 IL-18 蛋白第二次免疫 NZB/W F1 和野生型小鼠的抗体效价结果

图 1B 为用重组鼠 IL-18 蛋白第二、三、四次免疫 NZB/W F1 小鼠的抗体效价结果

图 2A 为按 0 毫克/只, 0.72 毫克/只, 2.5 毫克/只和 5 毫克/只的剂量植入雌激素的 NZB/W F1 小鼠经重组鼠 IL-18 蛋白第二次免疫后的抗体效价结果

图 2B 为按 0 毫克/只, 0.01 毫克/只, 0.05 毫克/只, 0.18 毫克/只和 0.72 毫克/只的剂量植入雌激素的 NZB/W F1 小鼠经重组鼠 IL-18 蛋白第三次免疫后的抗体效价结果

图 3 为用人 MIF 蛋白免疫 NZB/W F1 小鼠的抗体效价结果

图 4 为用 HMGB1-GST 和 HMGB1-MT 免疫 NZB/W F1 小鼠的抗体效价结果

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、用鼠 IL-18 蛋白免疫 NZB/W F1 小鼠获得较高效价

对 3 个月龄的 NZB/W F1 小鼠 (南京大学模式动物研究所) 和 B6(野生型) 小鼠 (北京维通利华实验动物技术有限公司) 进行如下四次免疫: 10 微克重组鼠 IL-18 (Biosource International, Inc., 货号 PMC0184) 加完全弗氏佐剂皮下免疫 (第一次免疫), 14 天和 21 天后 5 微克重组鼠 IL-18 加不完全弗氏佐剂皮下免疫两次 (第二次和第三次免疫), 再过 14 天后用 5 微克重组鼠 IL-18 静脉注射两次 (隔天一次) 进行第四次免疫。同时按照上述方法, 用 PBS (pH 7.5) 免疫 3 个月龄的 NZB/W F1 小鼠和 B6(野生型) 小鼠四次, 每次免疫剂量为 0.1ml/只, 作为对照。

每次免疫后 1 天取血清, 用重组鼠 IL-18 (10 微克/毫升) 包板, ELISA 检测抗体效价。结果表明 NZB/W F1 鼠的免疫反应明显高于野生型鼠 (图 1A), 第四次免疫的 NZB/W F1 鼠的血清效价可达到 6 万 (图 1B)。

图 1A 和图 1B 中, 效价 OD=0.5 表示 ELISA 读数为 0.5 时血清的稀释度。图 1A 中, BW-728、BW-729、BW-730、BW-731 和 BW-732 表示 PBS 第二次免疫后的五只 NZB/W F1 小鼠的抗体效价; BW-733、BW-734、BW-735、BW-736 和 BW-737 表示重组鼠 IL-18 第二次免疫后的五只 NZB/W F1 小鼠的抗体效价; B6-227、B6-229 和

B6-230 表示 PBS 第二次免疫后的三只 B6 小鼠的抗体效价; B6-247、B6-248、B6-249 和 B6-250 表示 PBS 第二次免疫后的四只 B6 小鼠的抗体效价。图 1B 中, BW733-1st 表示重组鼠 IL-18 第二次免疫后的编号为 BW-733 的 NZB/W F1 小鼠的抗体效价; BW733-2nd、BW734-2nd、BW735-2nd 和 BW736-2nd 表示重组鼠 IL-18 第三次免疫后的编号分别为 BW-733、BW-734、BW-735、BW-736 的 NZB/W F1 小鼠的抗体效价; BW733-IV、BW734-IV、BW735-IV 和 BW736-IV 表示重组鼠 IL-18 第四次免疫后的编号分别为 BW-733、BW-734、BW-735、BW-736 的 NZB/W F1 小鼠的抗体效价。

实施例 2、用缓释雌激素药片植入 NZB/W F1 小鼠皮下, 提高小鼠对自身抗原的免疫反应。

将含有 0.01 至 5 毫克 17β 雌二酯的缓释雌激素药片 (Innovative Research of America, Sarasota, FL) 植入小鼠颈部皮下, 每只小鼠一片。7 天后用实施例一中所述方法进行免疫和效价检测。结果表明雌激素可以提高 NZB/W F1 鼠对自身抗原的免疫反应, 雌激素的剂量以 0.72 毫克/只小鼠为最佳 (图 2A 和图 2B)。

图 2A 和图 2B 中, 效价 OD=0.5 表示 ELISA 读数为 0.5 时血清的稀释度。图 2A 中, E-4, E-5, E-6, E-7 和 E-8 表示按 0 毫克/只的剂量植入雌激素的五只 NZB/W F1 小鼠经重组鼠 IL-18 蛋白第二次免疫后的抗体效价结果; E-9, E-10, E-11, E-12 和 E-13 表示按 0.72 毫克/只的剂量植入雌激素的五只 NZB/W F1 小鼠经重组鼠 IL-18 蛋白第二次免疫后的抗体效价结果; E-14, E-15, E-16, E-17 和 E-18 表示按 2.5 毫克/只的剂量植入雌激素的五只 NZB/W F1 小鼠经重组鼠 IL-18 蛋白第二次免疫后的抗体效价结果; E-19, E-20, E-21, E-22 和 E-23 表示按 5 毫克/只的剂量植入雌激素的五只 NZB/W F1 小鼠经重组鼠 IL-18 蛋白第二次免疫后的抗体效价结果。图 2B 中, E3p-666, E3p-667 和 E3p-668 表示按 0 毫克/只的剂量植入雌激素的四只 NZB/W F1 小鼠经重组鼠 IL-18 蛋白第三次免疫后的抗体效价结果; E3-670, E3-671、E3-672 和 E3-673 表示按 0.01 毫克/只的剂量植入雌激素的四只 NZB/W F1 小鼠经重组鼠 IL-18 蛋白第三次免疫后的抗体效价结果; E3-674, E3-676 和 E3-677 表示按 0.05 毫克/只的剂量植入雌激素的三只 NZB/W F1 小鼠经重组鼠 IL-18 蛋白第三次免疫后的抗体效价结果; E3-679, E3-680 和 E3-681 表示按 0.18 毫克/只的剂量植入雌激素的三只 NZB/W F1 小鼠经重组鼠 IL-18 蛋白第三次免疫后的抗体效价结果; E3-682, E3-683、E3-684 和 E3-685 表示按 0.72 毫克/只的剂量植入雌激素的四只 NZB/W F1 小鼠经重组鼠 IL-18 蛋白第三次免疫后的抗体效价结果。

实施例 3、用 MIF 蛋白免疫 NZB/W F1 小鼠，获得高亲和力单克隆抗体。

MIF 是一个与糖皮质激素相拮抗的细胞介素，广泛参与炎症反应。这个蛋白在败血症，类风湿性关节炎，哮喘等疾病中是很好的药物靶点。人和鼠的 MIF 氨基酸序列 89% 相同，小鼠对人的 MIF 蛋白只产生很弱的免疫反应，需要用 MIF 基因敲除鼠来得到抗 MIF 的单克隆抗体。本发明用大肠杆菌表达的人 MIF 蛋白（将人 MIF 蛋白（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。）免疫野生型 Balb/C 小鼠和 NZB/W F1 小鼠，80 微克 MIF 加 MPL+TDM 乳液状佐剂（sigma）足底免疫，一周一次，共三次。第三次免疫后取血清，用带有 GST 标签的人 MIF 蛋白（GST-MIF 重组蛋白）（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，GST-MIF 重组蛋白的浓度为 10 微克/毫升，ELISA 检测效价。结果表明在 NZB/W F1 小鼠中的效价比野生型的效价要高很多（图 3）。图 3 中，1、2 和 3 表示三只 NZB/W F1 小鼠，4、5 和 6 表示三只 Balb/C 小鼠。

免疫后的 NZB/W F1 小鼠取淋巴结中的免疫细胞与 SP2/0 细胞以 5: 1 比例进行杂交瘤融合，筛选后得到 6 株分泌特异性结合人 MIF 抗体的杂交瘤。表 1 显示其中三种单克隆抗体的解离常数在 nM 水平。

表 1 抗 MIF 单克隆抗体

克隆号	4E10	2A12	10C3
抗体亚型	IgG2a	IgG2b	IgG2b
解离常数	$1 \times 10^{-9}M$	$1 \times 10^{-10}M$	$3 \times 10^{-9}M$

实施例 4、用带有 T 细胞特异性抗原决定簇融合标签的 HMGB1 蛋白免疫 NZB/W F1 小鼠获得较高效价。

HMGB1 是一个核蛋白，同时也能分泌到细胞外作为细胞介素参与炎症反应。这个蛋白在败血症中是个很好的药物靶点。人和鼠的 HMGB1 氨基酸序列 98% 相同，小鼠对人的 HMGB1 蛋白不产生免疫反应。而 HMGB1 基因敲除鼠出生几天后就死去了，不可能用于免疫反应。因此目前还没有针对此蛋白的单克隆抗体。本发明表达了人 HMGB1 与结核杆菌（Mycobacterium tuberculosis, MT）Psts-1 蛋白氨基酸 326-344 小肽（DQVHFQPLPPAVVKLSDAL, 序列 1）的融合蛋白（HMGB1-MT）（将人

HMGB1 (hu HMGB1) 编码 N 端 181 氨基酸的 cDNA 与序列 1 的小肽编码序列通过 PCR 方法重组, 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。)用此作为抗原免疫 NZB/W F1 小鼠, 共免疫两次: 10 微克 HMGB1-MT 加完全弗氏佐剂皮下免疫 (第一次免疫), 14 天后 5 微克 HMGB1-MT 加不完全弗氏佐剂皮下免疫 (第二次免疫)。第二次免疫后, 取血清, 用 His6-HMGB1 (将 hu HMGB1 编码 N 端 181 氨基酸的 cDNA 通过 PCR 方法扩增, 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。)包板, 浓度为 10 微克/毫升, ELISA 检测效价。结果表明有两只免疫鼠的效价达到 1: 16000 (图 4)。

同时用 GST 与人 HMGB1 融合蛋白 (HMGB1-GST) (将 hu HMGB1 编码 N 端 181 氨基酸的 cDNA 通过 PCR 方法扩增, 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。)按照上述方法免疫 NZB/W F1 小鼠, 并按照上述 ELISA 方法检测效价, 其中包板的 His6-HMGB1 浓度为 10 微克/毫升, 结果得到的最高效价是 1: 4000 (图 4), 此结果比免疫野生型小鼠要好些, 但还不够用于杂交瘤的筛选。

图 4 中, 效价 OD=0.5 表示 ELISA 读数为 0.5 时血清的稀释度; HMGB1-GST-1、HMGB1-GST-2 和 HMGB1-GST-3 表示三只免疫 HMGB1-GST 的 NZB/W F1 小鼠; HMGB1-MT-1、HMGB1-MT-2 和 HMGB1-MT-3 表示三只免疫 HMGB1-GST 的 NZB/W F1 小鼠。

效价OD=0.5

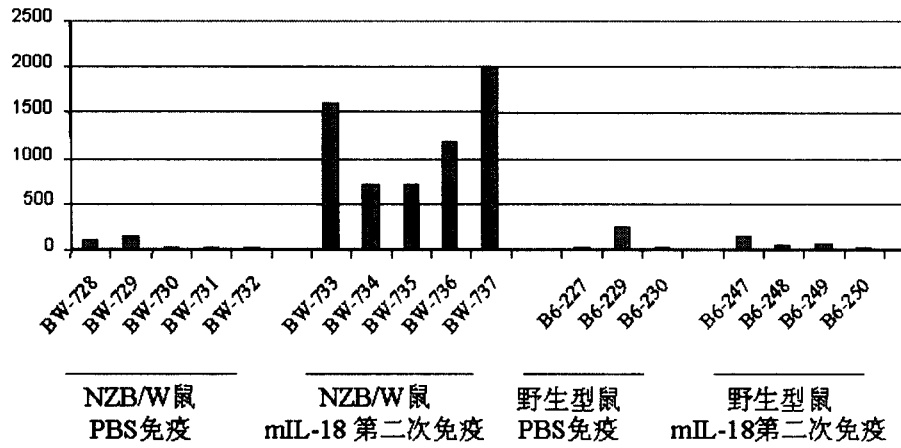


图 1A

效价OD=0.5

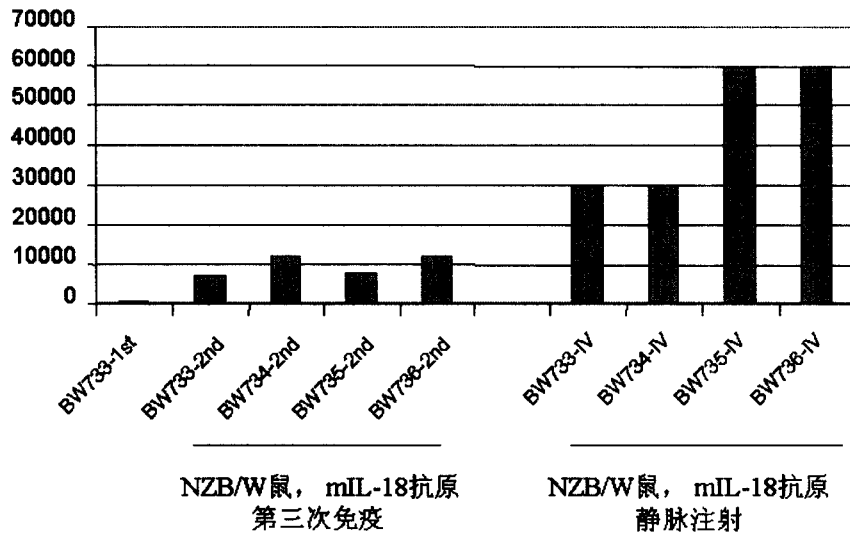


图 1B

效价OD=0.5

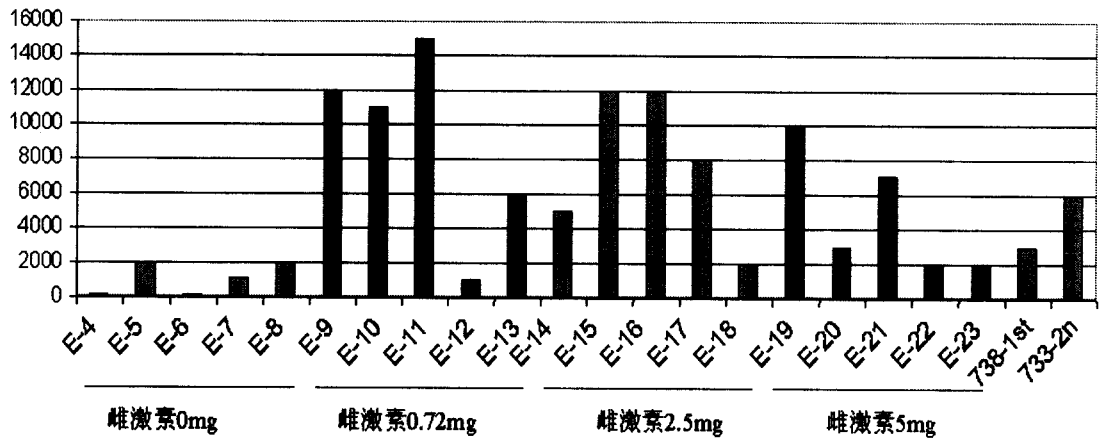


图 2A

效价OD=0.5

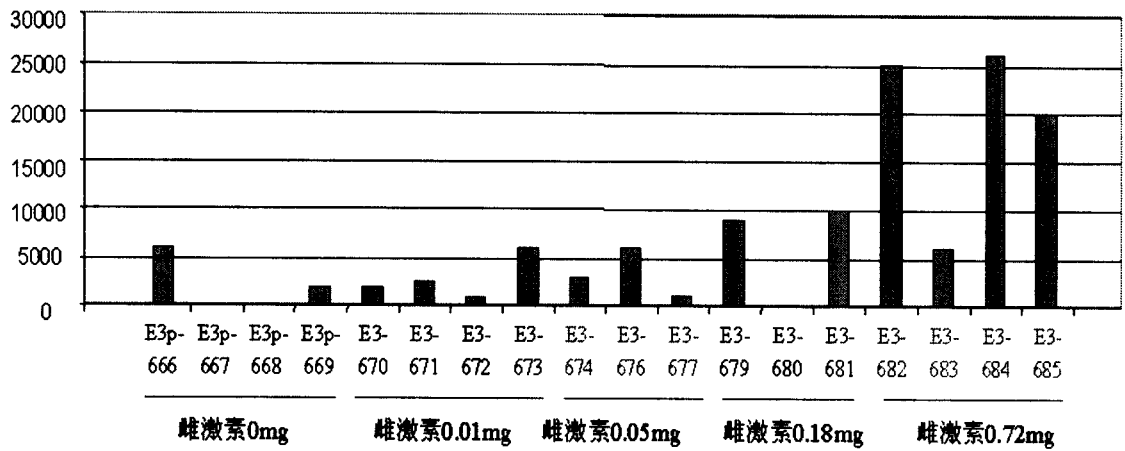


图 2B

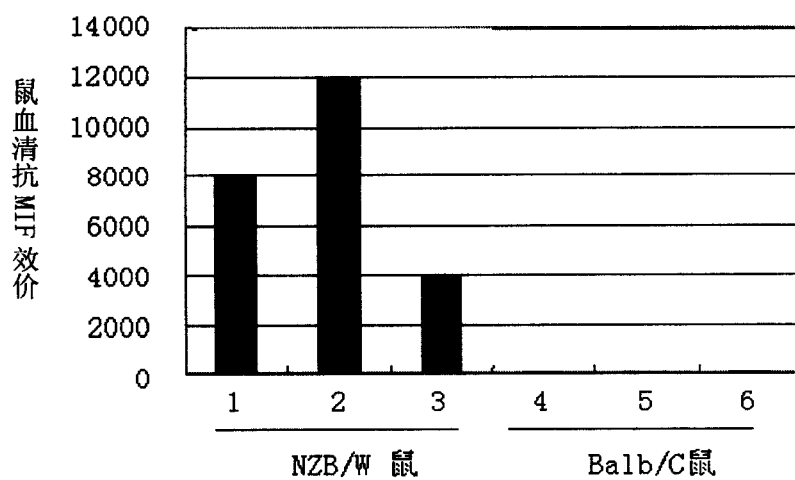


图 3

效价OD=0.5

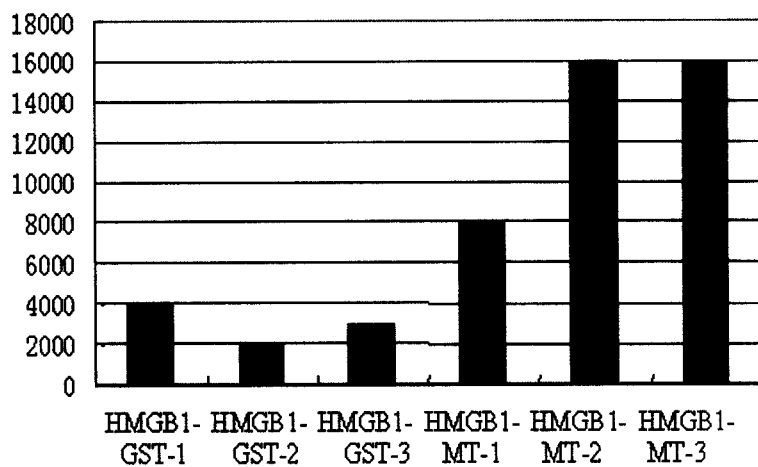


图 4