



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109053887 B

(45)授权公告日 2019.07.23

(21)申请号 201810788895.8

C12N 15/13(2006.01)

(22)申请日 2018.07.18

A61K 39/395(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61P 35/00(2006.01)

申请公布号 CN 109053887 A

A61P 29/00(2006.01)

A61P 19/02(2006.01)

(43)申请公布日 2018.12.21

A61P 9/10(2006.01)

A61P 19/00(2006.01)

(73)专利权人 博奥信生物技术(南京)有限公司

地址 210061 江苏省南京市江北新区龙山

南路3-1号中丹生态生命科学产业园

二期D座5层

(56)对比文件

CN 107257806 A,2017.10.17,

CN 103179985 A,2013.06.26,

CN 106795222 A,2017.05.31,

(72)发明人 陈明久 谭巍

审查员 靳春鹏

(74)专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司

公司 32224

代理人 董建林

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页

序列表6页

(54)发明名称

一种抗人CSF-1R单克隆抗体及用途

(57)摘要

本发明涉及一种抗人CSF-1R单克隆抗体及用途,同时提供了该抗体的编码核酸分子、表达载体、宿主细胞、以及用于表达该抗体的方法。还提供了包括本发明抗体的抗体免疫偶联缀合物、双特异性分子、嵌和抗原受体、药物组合物及用途。相对于现有技术,本发明具有以下优点:本发明的能特异识别人CSF-1R的单克隆抗体,该抗体与人CSF-1R结合的亲和力强于现有抗人CSF-1R单克隆抗体,其序列新颖,且结合独特的抗原表位。

1. 一种抗人CSF-1R单克隆抗体,其特征在于,该抗体包含:重链和轻链;
所述的重链和轻链均包括可变区,该可变区包括互补决定区;
所述重链的互补决定区CDR1、CDR2和CDR3分别用CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3表示;
所述轻链的互补决定区CDR1、CDR2和CDR3分别用CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3表示;
所述的CDR-H1的氨基酸序列为SEQ ID NO:3所示;
所述的CDR-H2的氨基酸序列为SEQ ID NO:4所示;
所述的CDR-H3的氨基酸序列为SEQ ID NO:5所示;
所述的CDR-L1的氨基酸序列为SEQ ID NO:6所示;
所述的CDR-L2的氨基酸序列为SEQ ID NO:7所示;
所述的CDR-L3的氨基酸序列为SEQ ID NO:8所示。
2. 根据权利要求1所述的一种抗人CSF-1R单克隆抗体,其特征在于,重链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO:1所示;轻链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO:2所示。
3. 核苷酸分子,其特征在于,所述核苷酸分子的序列包括SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10;序列SEQ ID NO:9编码权利要求1或2所述的抗人CSF-1R单克隆抗体的重链可变区;序列SEQ ID NO:10编码权利要求1或2所述的抗人CSF-1R单克隆抗体的轻链可变区。
4. 一种表达载体,其特征在于,该表达载体含有如权利要求3所述的核苷酸分子。
5. 一种宿主细胞,其特征在于,该宿主细胞含有如权利要求4所述的表达载体。
6. 一种权利要求1或2所述的抗人CSF-1R单克隆抗体的制备方法,其特征在于,该制备方法包含如下步骤:
步骤1:制备含有表达所述的抗人CSF-1R单克隆抗体的核苷酸分子的表达载体;
步骤2:用步骤1的表达载体转染真核宿主细胞;
步骤3:培养步骤2转染的真核宿主细胞;
步骤4:分离纯化,获得所述的抗体。
7. 根据权利要求6所述的抗人CSF-1R单克隆抗体的制备方法,其特征在于,所述的表达载体包含SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的核苷酸序列。
8. 包括权利要求1或2所述的抗人CSF-1R单克隆抗体的抗体免疫偶联缀合物、双特异性分子、嵌和抗原受体或药物组合物。
9. 权利要求1或2所述的抗人CSF-1R单克隆抗体在制备抗肿瘤药物、类风湿关节炎药物、动脉粥样硬化药物或骨重塑药物中的应用。

一种抗人CSF-1R单克隆抗体及用途

技术领域

[0001] 本发明涉及了一种高亲和力且具有功能性的抗人CSF1R的单克隆抗体或抗体片段。本发明同时提供了该抗体的编码核酸分子、表达载体、宿主细胞、以及用于表达该抗体的方法。还提供了包括本发明抗体的抗体免疫偶联缀合物、双特异性分子、嵌和抗原受体、药物组合物以及诊断和治疗方法。

背景技术

[0002] 集落刺激因子1受体 (CSF-1R), 属于III型的受体酪氨酸激酶家族, 由原癌基因c-fms编码, 蛋白结构包含胞内的激酶结构域和胞外由5个免疫球蛋白类似结构组成的配体结合区。CS1R表达在单核吞噬细胞表面, 对单核吞噬细胞的存活、增殖、分化起关键作用 (Felix, et al., (2015) Structure 23, 1621-1631)。并且CSF1R也高表达在许多种肿瘤细胞表面。例如, CSF1R表达与肿瘤组织大小和低存活密切相关。KLUGER, et al. (2004) Clinical cancer research. vol. 10, no. 1, p. 173-7; SCHOLL, et al. (1994) Journal of the National Cancer Institute. vol. 86, no. 2, p. 120-6.)。在卵巢癌和子宫内膜癌, northern杂交分析显示绝大多数肿瘤组织共表达CSF1和CSF1R, 而正常的子宫内膜组织CSF1R表达很弱 (BAÏOCCHI, et al. (1991) Cancer, vol. 67, no. 4, p. 990-6)。CSF1R也表达于肿瘤浸润性巨噬细胞表面 (CHAMBERS, et al. (1997) .Clinical Cancer Research. vol. 3, no. 6, p. 999-1007)。

[0003] CSF1R的胞外区结合CSF-1后, 引发CSF1R受体二聚化和其胞内的自身磷酸化, 从而起始胞内信号传递。异常的受体酪氨酸激酶III信号传递导致大量炎症疾病和癌症发生提示胞内的RTK III型在先天和获得性免疫反应中起中心作用。例如, 异常的CSF1R信号传递通常出现在诸如类风湿关节炎、动脉粥样硬化及肿瘤生长的多种人类疾病病理状态。(Chitu and Stanley, (2006) , Curr. Opin. Immunol. 18, 39-48; Masteller and Wong, (2014) , Drug Discov. Today, 19, 1212-1216; Pollard (2009) , Nat. Rev. Immunol. 9, 259-270; Stanley and Chitu, (2014) , Perspect. Biol. 6, a021857; Verstraete and Savvides, (2012) , Nat. Rev. Cancer. 12, 753-766)。

[0004] CSF1R信号也被证实在骨重塑中发挥生理作用。基因敲除CSF1或CSF1R的动物通常表现为骨硬化表型。长期以来, CSF1R抑制剂作为一种癌症、炎症性疾病或骨质疏松疾病的潜在疗法被深入研究。Pexidartinib, 一种CSF1R的抑制剂, 在治疗腱鞘巨细胞瘤的3期临床试验中展示出强劲的疗效。另外一种CSF1R抑制剂, Cabiralizumab, 一种靶向肿瘤相关巨噬细胞的单克隆抗体, 正进行转移性胰腺癌的早期临床试验。另一种处于临床II期的药物JNJ-40346527, 一种口服的CSF1R抑制剂, 作用机理为抑制巨噬细胞存活、增殖和分化, 但对于疾病修复型抗风湿药难治性活动性类风湿关节炎 (DMARD-refractory active rheumatoid arthritis) 治疗无效果。

[0005] 尽管CSF1R抗体已有开发, 但对于治疗如上疾病的具备更高亲和力和其他药物关键性质的CSF1R抑制剂, 特别是单克隆抗体还有待深入研究开发。

发明内容

[0006] 为了克服上述缺陷,本发明的目的是提供一种抗人CSF-1R单克隆抗体及用途,该抗体具有高亲和力和功能性,其优于现有的抗人CSF-1R单克隆抗体。

[0007] 为了达到上述目的,本发明提供一种抗人CSF-1R单克隆抗体,其特征在于,该抗体包含:重链和轻链;

[0008] 所述的重链和轻链均包括可变区,该可变区包括互补决定区;

[0009] 所述重链的互补决定区CDR1、CDR2和CDR3分别用CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3表示;

[0010] 所述轻链的互补决定区CDR1、CDR2和CDR3分别用CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3表示;

[0011] 所述的CDR-H1的氨基酸序列为SEQ ID NO:3所示;

[0012] 所述的CDR-H2的氨基酸序列为SEQ ID NO:4所示;

[0013] 所述的CDR-H3的氨基酸序列为SEQ ID NO:5所示;

[0014] 所述的CDR-L1的氨基酸序列为SEQ ID NO:6所示;

[0015] 所述的CDR-L2的氨基酸序列为SEQ ID NO:7所示;

[0016] 所述的CDR-L3的氨基酸序列为SEQ ID NO:8所示。

[0017] 重链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO:1所示;轻链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO:2所示。

[0018] 一种核苷酸分子,该核苷酸分子编码所述的抗人CSF-1R单克隆抗体;

[0019] 该核苷酸分子的序列选自SEQ ID NO:9和/或SEQ ID NO:10;

[0020] 序列SEQ ID NO:9编码所述的抗体的重链可变区;

[0021] 序列SEQ ID NO:10编码所述的抗体的轻链可变区。

[0022] 一种表达载体,该表达载体含有所述的核苷酸分子。

[0023] 一种宿主细胞,该宿主细胞含有所述的表达载体。

[0024] 一种抗人CSF-1R单克隆抗体的制备方法,该制备方法包含如下步骤:

[0025] 步骤1:制备含有表达所述的抗人CSF-1R单克隆抗体的核苷酸分子的表达载体;

[0026] 步骤2:用步骤1的表达载体转染真核宿主细胞;

[0027] 步骤3:培养步骤2转染的真核宿主细胞;

[0028] 步骤4:分离纯化,获得所述的抗体。

[0029] 本发明还涉及包括前述的抗人CSF-1R单克隆抗体的抗体免疫偶联缀合物、双特异性分子、嵌和抗原受体或药物组合物。

[0030] 本发明还涉及抗人CSF-1R单克隆抗体在制备抗肿瘤药物、类风湿关节炎药物、动脉粥样硬化药物或骨重塑药物中的应用。

[0031] 所述的重链和轻链都还包括恒定区,该恒定区为人IgG的恒定区,优选地为IgG1的恒定区。

[0032] 相对于现有技术,本发明具有以下优点:本发明的能特异识别人CSF-1R的单克隆抗体,该抗体与人CSF-1R结合的亲和力强于现有抗人CSF-1R单克隆抗体,序列新颖。

具体实施方式

[0033] 以下结合实施例对本发明的技术方案做进一步的说明。

[0034] 一、抗体的获得

[0035] 实施例1通过融合杂交瘤技术获得特异性抗CSF1R的小鼠单克隆抗体

[0036] 1.1动物免疫

[0037] 根据文献中(E Harlow,D.Lane,Antibody:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1998)通用的方法免疫小鼠。免疫原为C端含有人IgG1Fc标签的重组人CSF1R(氨基酸区间I 1e20-Glu 512)蛋白(Acro biosystems,Cat#CSR-H5258)。使用重组人CSF1R带his标签的蛋白(Acro biosystems, cat#CSR-H5228)作为测定血清效价和杂交瘤筛选的检测抗原。简要地,取出适量的福氏佐剂到1.5ml EP管中,振荡器混匀。用PBS配制抗原蛋白溶液。按照需要量混匀佐剂和蛋白抗原溶液,通过注射器互推充分乳化抗原形成稳定油包水的溶液,而后进行动物注射。根据血清效价测定结果,首次免疫后通常需要进行2到3次加强免疫后才能达到良好的免疫效果。选择血清效价高的免疫小鼠行腹腔注射终免后进行细胞融合。

[0038] 1.2杂交瘤融合和筛选

[0039] 细胞融合前,培养小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0-Ag14,ATCC#CRL-1581)处于对数生长期。处死免疫后小鼠无菌环境取脾,根据文献中方法使用PEG化学融合脾B淋巴细胞和SP2/0骨髓瘤细胞(E Harlow,D.Lane,Antibody:A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1998);Kohler G,and Milstein C,“Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity,”Nature,256:495-497(1975))。融合后的细胞铺板96孔细胞培养板,通常7到10天后显微镜下可观察到存活的杂交瘤细胞生长出来。细胞铺板两周后,收集各孔培养上清,以ELISA方法用人CSF1R-his蛋白抗原进行杂交瘤筛选。简述如下,用60ul 2ug/ml的人CSF1R-his抗原的PBS溶液包被酶标板,4度(本发明中的“度”指摄氏度)过夜。而后PBST洗板4次后,加入200ul/孔的5%脱脂奶粉的PBST溶液置于37度封闭2小时。再次洗板,加入60ul/孔的杂交瘤上清,37度孵育40分钟,而后洗板4次。以100ul/孔加入稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠二抗(Jackson Immuno research,cat#115-036-071),37度孵育40分钟,而后洗板4次,拍干。添加100ul/孔的TMB显色底物,室温显色5到15分钟,而后用1M的硫酸溶液终止,测定450纳米处各孔的吸光值。挑出ELISA显色阳性的杂交瘤孔细胞,转移到24孔板中,继续培养。并通过ELISA方法进行第二轮复筛,筛选出特异识别CSF1R抗原且能阻断CSF1R/CSF1结合的杂交瘤(结果见表1,其中1D4是本发明得到的杂交瘤,该杂交瘤表达本发明所制得的抗人CSF-1R单克隆抗体),通过有限稀释法亚克隆,获得目标单克隆细胞株。而后通过无血清培养小量表达生产这些单克隆抗体,纯化抗体进行下一步的功能测评分析。

[0040] 表1CSF1R小鼠杂交瘤上清的ELISA测评

[0041]

CSF1R 小鼠杂交瘤上清 ELISA 测评数据				
序号	杂交瘤编号	间接 ELISA OD450 (对人的 CSF1R 结合)	捕获 ELISA OD450 (对人的 CSF1R 结合)	配体受体结合阻断 ELISA OD450 (CSF1/CSF1R)
1	1D4	0.901	0.705	0.039
对照	融合小鼠血清 (1:1000)	1.731	/	0.065
	No-blocking	/	/	0.608
	Blank	0.007	/	0.01

[0042] 二、体外分析方法

[0043] 实施例2用于测定CSF1R单克隆抗体功能活性的体外分析方法

[0044] 2.1基于捕获ELISA测定抗体的结合能力

[0045] 用1xPBS配制羊抗小鼠IgG Fc γ 2b特异的二抗(Jackson Immuno Research,#115-006-071),使其终浓度为2 μ g/ml,以100 μ l/孔加液于96孔酶标板,4度包被过夜。次日,用含0.05%的吐温20的PBS溶液(即1xPBST)洗板4次后,加入200 μ l/孔的5%脱脂奶粉的PBST溶液置于37度封闭2小时。再次洗板,加入100 μ l/孔的稀释抗体溶液或杂交瘤上清后,37度孵育40分钟,而后洗板4次。以100 μ l/孔加入配制的60nM生物素标记人CSF1R Fc蛋白溶液(在2.5%脱脂奶粉的PBST中),37度孵育40分钟,而后洗板4次。以100 μ l/孔加入1:10000稀释的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(Jackson Immuno Research,#016-030-084),37度孵育40分钟,而后洗板4次,拍干。添加100 μ l/孔的ELISA显色底物TMB,室温显色5到15分钟,而后用1M的硫酸溶液终止显色,测定450纳米处各孔的吸光值。

[0046] 2.2流式细胞术测评抗体结合细胞膜表面CSF1R抗原的结合能力

[0047] 收集处于对数生长期的膜表面过表达人CSF1R的293F细胞系,用PBS洗细胞2次后用FACS缓冲液(含2%胎牛血清的PBS溶液)重悬细胞。调节密度,以2 \times 10⁵个细胞/孔铺板于96孔U底板中,300g离心5分钟,倾去上清,添加已梯度稀释的CSF1R抗体溶液而后置于冰上孵育40分钟。洗细胞2次,添加100 μ l/孔藻红蛋白荧光标记的羊抗小鼠二抗(Jackson Immunoresearch,Cat#115-116-072,1:1000稀释),4度避光孵育40分钟后,洗细胞3次,而后每孔加100 μ l的FACS缓冲液重悬,吹匀细胞后上机检测。使用BD公司Canto II型号流式细胞仪测定每孔细胞的荧光强度。使用Graphpad prism软件进行数据处理,得出抗体结合细胞的EC₅₀浓度值(即达到该抗体最大荧光结合信号50%时对应的抗体浓度值)。

[0048] 2.3竞争ELISA

[0049] 2.3.1配体受体结合阻断ELISA

[0050] 通过竞争ELISA方法测评CSF1R抗体对CSF1R/CSF1结合的阻断能力。简述如下,用1xPBS配制人的CSF1-his蛋白(BSI,cat#BS-TA1601154-96),使其终浓度为2 μ g/ml,以100 μ

1/孔加液于96孔酶标板,4度包被过夜。次日,用含0.05%的吐温20的PBS溶液(即PBST)洗板4次后,加入200 μ l/孔的5%脱脂奶粉的PBST溶液置于37度封闭2小时。再次洗板4次。

[0051] 把CSF1R抗体或对照抗体梯度稀释在含有生物素标记的人CSF1R FC蛋白溶液中,配好后室温预孵40分钟。而后把已孵育的抗体和CSF1R Fc biotin的溶液以100 μ l/孔加到包被好CSF1-his的板上,37度孵育40分钟后,再次洗板4次。而后以100 μ l/孔加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素,37度孵育40分钟后洗板4次,拍干。添加100 μ l/孔的TMB显色和50 μ l/孔的1M硫酸终止反应,测定450纳米处的吸收值。使用Graphpad prism软件进行数据处理,得出抗体阻断CSF1R/CSF1结合的IC50浓度值。

[0052] 2.3.2参照抗体阻断ELISA

[0053] 通过竞争ELISA方法测评CSF1R抗体阻断参照抗体/CSF1R抗原结合的阻断能力。简述如下,用1xPBS配制参照抗体(cabiralizumab),使其终浓度为1 μ g/ml,以100 μ l/孔加液于96孔酶标板,4度包被过夜。次日,用含0.05%的吐温20的PBS溶液(即PBST)洗板4次后,加入200 μ l/孔的5%脱脂奶粉的PBST溶液置于37度封闭2小时,再次洗板4次。

[0054] 把CSF1R抗体或对照抗体梯度稀释在含有生物素标记的人CSF1R FC蛋白溶液(10nM)中,配好后室温预孵40分钟。而后把已孵育的抗体和CSF1R Fc biotin的溶液以100 μ l/孔加到包被好参照抗体的板上,37度孵育40分钟后,再次洗板4次。而后以100 μ l/孔加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素,37度孵育40分钟后洗板4次,拍干。添加TMB显色和1M硫酸溶液终止反应,测定450纳米处的吸收值。使用Graphpad prism软件进行数据处理,得出抗体阻断参照抗体/CSF1R结合的IC50浓度值。

[0055] 实施例3抗CSF1R小鼠单克隆抗体的结合活性

[0056] 根据实施例2中描述的分析方法,测评CSF1R抗体的结合活性总结如表2。其中Benchmark(Cabiralizumab)作为对照,是现有的未商业化的抗人CSF1R单克隆抗体。从表2可知,本发明的抗人CSF-1R单克隆抗体与人CSF1R抗原的结合活性明显优于Benchmark。

[0057] 表2纯化CSF1R小鼠单克隆抗体的结合活性

鼠 mAb	人 CSF1R	
	细胞结合 FACS (2.2 的方法) (EC ₅₀ , nM)	捕获 ELISA (EC ₅₀ , nM)
	[0058]	
1D4-1	1.56	0.37
Benchmark : cabiralizumab	0.51	0.31

[0059] 实施例4功能性阻断实验(参照2.3的分析方法),得到基于ELISA的抗体功能性实验测评数据。

[0060] 如下表3,汇总了抗CSF1R小鼠单克隆抗体的功能性测评结果。

[0061] 表3纯化CSF1R小鼠单克隆抗体的功能性测评

CSF1R 小鼠单克隆抗体的功能性测评		
竞争性 ELISA (IC50, nM)		
[0062]	鼠 mAb	人 CSF1/人 CSF1R Benchmark/人 CSF1R
	1D4-1	0.42 0.16
	Benchmark	0.37 0.25

[0063] 表3中抗体对人CSF1/CSF1R的竞争ELISA实验表明,本发明的1D4-1抗体可特异阻断CSF1R结合其配体CSF1,其阻断能力与Benchmark相当;同时抗体对benchmark/humanCSF1R的竞争ELISA实验表明,1D4-1抗体可阻断BM结合人CSF1R抗原,表明1D4-1结合的抗原表位近似但不同于Benchmark抗体。

[0064] 实施例5DNA克隆和测序,抗CSF1R小鼠单克隆抗体的可变区蛋白测序

[0065] 使用Trizol试剂(Invitrogen,catalog#15596-018)从培养的小鼠单克隆细胞株中提取总RNA。过程简述如下,离心收集 5×10^6 的细胞到1.5ml离心管中,吸干上清。添加1ml的Trizol试剂并反复吹打数次后室温放置5分钟用于裂解细胞。紧接着,每管加入0.2ml的氯仿溶液,剧烈震荡15秒后室温放置3分钟。而后,离心管4度12000g离心10分钟,取出离心管,吸取上层水相溶液到新的1.5ml离心管中,再加入0.4ml的异丙醇用于从水相中沉淀RNA。手动混匀EP管并放置室温10min后,4度12000g离心10分钟,弃上清。加入1ml 75%的乙醇,再次4度7500rpm离心5min,弃上清。管底RNA沉淀于室温干燥10分钟后,加入30到50ul的无菌DEPC处理水溶解RNA样品。

[0066] 紧接着,选用Taraka的逆转录cDNA试剂盒(catalog#6110A)把总RNA变为cDNA。实验体系配制如下,5 μ l的总RNA+0.5 μ l Oligo(dT)+8.5 μ l RNase-free水(共14 μ l)先置于65度5min预变性,而后放冰上2分钟。进一步加入4 μ l的5x缓冲液+1 μ l的dNTP混合物+0.5 μ l的RNase抑制剂+1 μ l逆转录酶(总共20.5 μ l体系),配好后混匀,使用PCR仪运行40度50分钟,70度10min,完成cDNA合成。

[0067] cDNA进一步在3'端加Poly G,反应体系配制如下:5 μ l的cDNA样品+33.5 μ l的ddH₂O+5 μ l的10xTdT缓冲液+5 μ l的CoC12+1 μ l的dGTP+0.5 μ l的末端脱氧核苷酸转移酶(总体积50 μ l),配好后混匀,使用PCR仪运行37度30分钟,70度10min,完成Poly G加尾。

[0068] 进一步,以加尾的cDNA为模板进行抗体可变区的基因扩增。对于扩增抗体重链可变区序列,配制PCR反应体系:10x Taq酶缓冲液5 μ l+通用poly C引物(正向引物)0.5 μ l+小鼠IgG1反向引物0.5 μ l+dNTP 1 μ l+Taq聚合酶1 μ l+cDNA 1 μ l+ddH₂O 41 μ l。对于扩增抗体轻链可变区序列,配制PCR反应体系:10x Taq酶缓冲液5 μ l+通用poly C引物(正向引物)0.5 μ l+小鼠IgG kappa链反向引物0.5 μ l+dNTP 1 μ l+Taq聚合酶1 μ l+cDNA 1 μ l+ddH₂O 41 μ l。抗体重链和轻链可变区PCR扩增的温度循环如下(其中步骤2到4,重复25个循环):

[0069] 1-预变性95 $^{\circ}$ C.5min.

[0070] 2-变性95 $^{\circ}$ C.20sec.

[0071] 3-退火56 $^{\circ}$ C.20sec.

[0072] 4-延伸72°C .30sec.

[0073] 5-保存25°C .60min;

[0074] PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分析,切出对应大小的DNA区段条带(VH的约600bp, Vkappa轻链约500bp),用Qiagen的凝胶DNA回收试剂盒(catalog#28704)进行DNA的抽提。简述如下:凝胶称重,加3倍凝胶体积的QG缓冲液,而后50度孵育10分钟直到凝胶完全溶解。加入1倍胶体积的异丙醇混匀后,样品移至QIA纯化柱,离心13000rpm 1分钟。加入750u1的PE缓冲液到柱中,而后13000rpm离心1分钟。并再次13000rpm离心1分钟去除柱中液体残留。加入30u1的水洗脱柱离心1分钟,获得制备的DNA样品,纯化的PCR产物经测序获得抗体的可变区序列如表4所示,CSF1R小鼠单克隆抗体的氨基酸全长序列如表5所示,CSF1R小鼠单克隆抗体的核苷酸序列如表6所示。

[0075] 表4CSF1R小鼠单克隆抗体的可变区氨基酸序列和CDR区

[0076]

鼠抗人 CSF1R 单克隆抗体的 VH 和 VL 的氨基酸序列			
SEQ ID No. :		蛋白区域	序列
1	VH 1D4-1		QVQLQQSGAELARPGASVRMSCKASGYTFSNYTVHWVT QRPGQGLEWIGYIDPSSGYTDYSQKFKDKATLTADKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYYCSTWGTNWDDYWGQGTTLT VSS

[0077]

3	VH 1D4-1 CDR-H1	序列1的第26-33 氨基酸	GYTFSNYT
4	VH 1D4-1 CDR-H2	序列1的第51-58 氨基酸	IDPSSGYT
5	VH 1D4-1 CDR-H3	序列1的第 97-106氨基酸	STWGTNWDDY
2	VL 1D4-1		DILLTQSPAFLSVSPGERVFSFCRASQNI ² TSIH ² WY ² Q ² RTNGSPRLLIK ² SASES ² FSG ² IPSR ² FSG ² SG ² SG ² TEFTLRIN ² SVESEDIAHY ² CQ ² Q ² SK ² SWPLTFGAGTKLELK
6	VL 1D4-1 CDR-L1	序列2的第24-34 氨基酸	RASQNI ² TSIH ²
7	VL 1D4-1 CDR-L2	序列2的第50-56 氨基酸	SASES ² FS ²
8	VL 1D4-1 CDR-L3	序列2的第89-97 氨基酸	Q ² Q ² SK ² SWPLT

[0078] 表5CSF1R小鼠单克隆抗体的氨基酸全长序列

[0079]

1D4-1 小鼠 CSF1R 单克隆抗体的氨基酸序列

VH (重链可变区)

QVQLQQSGAELARPGASVRMSCKASGYTFSNYTVHWVTQRPQGLEWIGYIDPSSGYTDYSQKFKDKATLT
ADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCSTWGTNWDDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID No. 1)

CH (重链恒定区)

[0080]

AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV
PSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLTI TLTPKVTCVV
VDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIE
KTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGS
YFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK (SEQ ID No. 11)

VL (轻链可变区)

DILLTQSPAFLSVSPGERVSFSCRASQNI GTSIHWYQQRTNGSPRLLIKSASESFGIPSRFSGSGSGTEF
TLRINSVESEDIAHYQCQSKSWPLTFGAGTKLELK (SEQ ID No. 2)

CL (轻链恒定区)

RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSS
TLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRGEC (SEQ ID No. 12)

[0081] 表6CSF1R小鼠单克隆抗体的编码DNA序列

[0082]

重链可变区的 DNA 序列

5' -CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAGGATGTCCTGCA
AGGCTTCTGGCTACACCTTTTCTAACTACACGGTGCAGTGGGTAACACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAA
TGGATTGGATACATTGATCCTAGCAGTGGTTATACTGATTACAGTCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATT
GACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCT
ATTACTGTTCAACATGGGGAACTAACTGGGATGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
-3' (SEQ ID No. 9)

重链恒定区的 DNA 序列

5' -GCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAACTCC
ATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGA ACTCTGGAT
CCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGT
GACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACC
AAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTAT
CATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTG

[0083]

```

TGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTG
CACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCA
TCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTCCCTGCCCC
CATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCC
AAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTA
CTGTGGAGTGGCAGTGAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCATGGACACAGA
TGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTCACC
TGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAA-3
’ (SEQ ID No. 13)

```

轻链可变区的 DNA 序列

```

5’ -GACATCTTACTGACTCAGTCTCCAGCCTTCCGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTTCTCCT
GCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGTATTCAGTGGTATCAGCAAAGAACAAATGGTTCTCCAAGGCTT
CTCATAAAGTCTGCTTCTGAGTCTTCTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCGGGGACTGA
ATTTACTCTTAGAATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCACATTATTACTGTCAACAAAGTAAGTCTT
GGCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA-3’ (SEQ ID No. 10)

```

轻链恒定区的 DNA 序列

```

5’ -CGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTG
CCTCAGTCGTGTGCTTC
TTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCG
TCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGAC
TAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTACCCATT
GTCAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT-3’ (SEQ ID No. 14)

```

[0084] 综上所述,本发明的能特异识别人CSF-1R的单克隆抗体,该抗体与人CSF-1R结合的亲和力强,序列新颖。

[0085] 尽管本发明的内容已经通过上述优选实施例作了详细介绍,但应当认识到上述的描述不应被认为是对本发明的限制。在本领域技术人员阅读了上述内容后,对于本发明的多种修改和替代都将是显而易见的。因此,本发明的保护范围应由所附的权利要求来限定。

[0001] 序列表

[0002] <110> 博奥信生物技术(南京)有限公司

[0003] <120> 一种抗人CSF-1R单克隆抗体及用途

[0004] <130> xhx2018071802

[0005] <141> 2018-07-18

[0006] <160> 14

[0007] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0008] <210> 1

[0009] <211> 117

[0010] <212> PRT

[0011] <213> Homo sapiens

[0012] <400> 1

[0013] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

[0014] 1 5 10 15

[0015] Ser Val Arg Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr

[0016] 20 25 30

[0017] Thr Val His Trp Val Thr Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

[0018] 35 40 45

[0019] Gly Tyr Ile Asp Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Ser Gln Lys Phe

[0020] 50 55 60

[0021] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[0022] 65 70 75 80

[0023] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

[0024] 85 90 95

[0025] Ser Thr Trp Gly Thr Asn Trp Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

[0026] 100 105 110

[0027] Leu Thr Val Ser Ser

[0028] 115

[0029] <210> 2

[0030] <211> 107

[0031] <212> PRT

[0032] <213> Homo sapiens

[0033] <400> 2

[0034] Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Ser Pro Gly

[0035] 1 5 10 15

[0036] Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Thr Ser

[0037] 20 25 30

[0038] Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile

[0039] 35 40 45
 [0040] Lys Ser Ala Ser Glu Ser Phe Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 [0041] 50 55 60
 [0042] Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Arg Ile Asn Ser Val Glu Ser
 [0043] 65 70 75 80
 [0044] Glu Asp Ile Ala His Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Ser Trp Pro Leu
 [0045] 85 90 95
 [0046] Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 [0047] 100 105
 [0048] <210> 3
 [0049] <211> 8
 [0050] <212> PRT
 [0051] <213> Homo sapiens
 [0052] <400> 3
 [0053] Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr Thr
 [0054] 1 5
 [0055] <210> 4
 [0056] <211> 8
 [0057] <212> PRT
 [0058] <213> Homo sapiens
 [0059] <400> 4
 [0060] Ile Asp Pro Ser Ser Gly Tyr Thr
 [0061] 1 5
 [0062] <210> 5
 [0063] <211> 10
 [0064] <212> PRT
 [0065] <213> Homo sapiens
 [0066] <400> 5
 [0067] Ser Thr Trp Gly Thr Asn Trp Asp Asp Tyr
 [0068] 1 5 10
 [0069] <210> 6
 [0070] <211> 11
 [0071] <212> PRT
 [0072] <213> Homo sapiens
 [0073] <400> 6
 [0074] Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Thr Ser Ile His
 [0075] 1 5 10
 [0076] <210> 7
 [0077] <211> 7

[0078] <212> PRT
 [0079] <213> Homo sapiens
 [0080] <400> 7
 [0081] Ser Ala Ser Glu Ser Phe Ser
 [0082] 1 5
 [0083] <210> 8
 [0084] <211> 9
 [0085] <212> PRT
 [0086] <213> Homo sapiens
 [0087] <400> 8
 [0088] Gln Gln Ser Lys Ser Trp Pro Leu Thr
 [0089] 1 5
 [0090] <210> 9
 [0091] <211> 351
 [0092] <212> DNA
 [0093] <213> Homo sapiens
 [0094] <400> 9
 [0095] caggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaggatg 60
 [0096] tcctgcaagg cttctggcta caccttttct aactacacgg tgcactgggt aacacagagg 120
 [0097] cctggacagg gtctggaatg gattggatac attgataccta gcagtggtta tactgattac 180
 [0098] agtcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 [0099] atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgttc aacatgggga 300
 [0100] actaactggg atgactactg gggccaagge accactetca cagtctcctc a 351
 [0101] <210> 10
 [0102] <211> 321
 [0103] <212> DNA
 [0104] <213> Homo sapiens
 [0105] <400> 10
 [0106] gacatcttac tgactcagtc tccagccttc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt 60
 [0107] ttctcctgca gggccagtc gaacattggc acaagtattc actggtatca gcaaagaaca 120
 [0108] aatggttctc caaggcttct cataaagtct gcttctgagt ctttctctgg gatcccttcc 180
 [0109] aggttttagtg gcagtggatc ggggactgaa ttactctta gaatcaacag tgtggagtct 240
 [0110] gaagatattg cacattatta ctgtcaacaa agtaagtctt ggccgctcac gttcgggtgct 300
 [0111] gggaccaagc tggagctgaa a 321
 [0112] <210> 11
 [0113] <211> 324
 [0114] <212> PRT
 [0115] <213> Homo sapiens
 [0116] <400> 11

[0117]	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala
[0118]	1				5					10					15	
[0119]	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr
[0120]				20					25					30		
[0121]	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser
[0122]			35					40					45			
[0123]	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu
[0124]		50					55					60				
[0125]	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr	Val
[0126]	65					70					75					80
[0127]	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys
[0128]				85						90					95	
[0129]	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Gly	Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro
[0130]				100						105					110	
[0131]	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu
[0132]			115						120					125		
[0133]	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser
[0134]		130						135						140		
[0135]	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu
[0136]	145					150					155					160
[0137]	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr
[0138]				165						170					175	
[0139]	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Leu	Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
[0140]				180						185					190	
[0141]	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro
[0142]			195						200					205		
[0143]	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln
[0144]		210						215					220			
[0145]	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val
[0146]	225					230					235					240
[0147]	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Thr	Asp	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val
[0148]				245						250					255	
[0149]	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly	Gln	Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln
[0150]				260					265					270		
[0151]	Pro	Ile	Met	Asp	Thr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn
[0152]			275						280					285		
[0153]	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu	Ala	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val
[0154]		290						295					300			
[0155]	Leu	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His

[0156]	305	310	315	320
[0157]	Ser Pro Gly Lys			
[0158]	<210> 12			
[0159]	<211> 107			
[0160]	<212> PRT			
[0161]	<213> Homo sapiens			
[0162]	<400> 12			
[0163]	Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu			
[0164]	1	5	10	15
[0165]	Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe			
[0166]		20	25	30
[0167]	Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg			
[0168]		35	40	45
[0169]	Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser			
[0170]		50	55	60
[0171]	Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu			
[0172]		65	70	75
[0173]	Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser			
[0174]		85	90	95
[0175]	Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
[0176]		100	105	
[0177]	<210> 13			
[0178]	<211> 972			
[0179]	<212> DNA			
[0180]	<213> Homo sapiens			
[0181]	<400> 13			
[0182]	gccaaaacga caccgccatc tgtctatcca ctggcccctg gatctgctgc ccaaactaac	60		
[0183]	tccatggtga ccctgggatg cctgggtcaag ggctatttcc ctgagccagt gacagtgacc	120		
[0184]	tggaactctg gatccctgtc cagcgggtgtg cacaccttcc cagctgtcct gcagtctgac	180		
[0185]	ctctacactc tgagcagctc agtgactgtc ccctccagca cctggcccag cgagaccgtc	240		
[0186]	acctgcaacg ttgcccaccc ggccagcagc accaaggtgg acaagaaaat tgtgcccagg	300		
[0187]	gattgtgggtt gtaagccttg catatgtaca gtcccagaag tatcatctgt cttcatcttc	360		
[0188]	ccccaaagc ccaaggatgt gctcaccatt actctgactc ctaaggtcac gtgtgttggtg	420		
[0189]	gtagacatca gcaaggatga tcccgaggtc cagttcagct ggttttaga tgatgtggag	480		
[0190]	gtgcacacag ctgagacgca accccgggag gagcagttca acagcacttt ccgctcagtc	540		
[0191]	agtgaacttc ccatcatgca ccaggactgg ctcaatggca aggagttcaa atgcagggtc	600		
[0192]	aacagtgcag ctttccctgc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa aggcagaccg	660		
[0193]	aaggctccac aggtgtacac cattccacct cccaaggagc agatggccaa ggataaagtc	720		
[0194]	agtctgacct gcatgataac agacttcttc cctgaagaca ttactgtgga gtggcagtggtg	780		

[0195] aatgggcagc cagcggagaa ctacaagaac actcagccca tcatggacac agatggctct 840
[0196] tacttcgtct acagcaagct caatgtgcag aagagcaact gggaggcagg aaatactttc 900
[0197] acctgctctg tgttacatga gggcctgcac aaccaccata ctgagaagag cctctccac 960
[0198] tctcctggta aa 972
[0199] <210> 14
[0200] <211> 321
[0201] <212> DNA
[0202] <213> Homo sapiens
[0203] <400> 14
[0204] cgggctgatg ctgcaccaac tgtatccatc ttcccacat ccagtgagca gttaacatct 60
[0205] ggaggtgcct cagtcgtgtg cttcttgaac aacttctacc ccaaagacat caatgtcaag 120
[0206] tggaagattg atggcagtga acgacaaaat ggcgtcctga acagttggac tgatcaggac 180
[0207] agcaaagaca gcacctacag catgagcagc accctcacgt tgactaagga cgagtatgaa 240
[0208] cgacataaca gctatacctg tgaggccact cacaagacat caacttcacc cattgtcaag 300
[0209] agcttcaaca ggggagagtg t 321