



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115028734 A

(43) 申请公布日 2022.09.09

(21) 申请号 202210750475.7

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2022.06.29

(71) 申请人 广东康盾创新产业集团股份公司

地址 570100 海南省海口市秀英区国家高新区孵化器南海大道266号4楼3A

(72) 发明人 齐国光 湛振键 郑世鑫 刘世豪

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202

专利代理师 王美燕

(51) Int. Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

权利要求书1页 说明书3页
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

一种靶向BCMA的嵌合抗原受体及其用途

(57) 摘要

本发明提出了一种靶向BCMA的嵌合抗原受体及其用途,获得的BCMA抗体与人IgG抗体Fc片段融合,通过引物设计构建原核表达载体BCMA-IgGFc-pCZN1,可有效抑制Daudi细胞的增殖活性,对Daudi细胞毒性具有一定的浓度依赖性,效果随着浓度的增加而提高,通过抗体IgG的Fc段,能够与效应细胞相结合,可快速诱导ADCC效应,有助于效应细胞攻击靶细胞,发挥杀伤肿瘤细胞的作用,细胞死亡率达到19.7%。

1. 一种靶向BCMA的嵌合抗原受体,其特征在于,包括靶向BCMA抗体与人抗体融合获得的靶向BCMA融合抗体。
2. 根据权利要求1的一种靶向BCMA的嵌合抗原受体,其特征在于,所述人抗体为人IgG抗体。
3. 根据权利要求1或2的种靶向BCMA的嵌合抗原受体,其特征在于,所述靶向BCMA融合抗体为人BCMA蛋白免疫单峰驼获得的靶向BCMA抗体与人IgG抗体的Fc片段融合。
4. 根据权利要求3的一种靶向BCMA的嵌合抗原受体,其特征在于,所述靶向BCMA抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。
5. 一种表达载体,其特征在于,所述表达载体含有权利要求1所述的靶向BCMA融合抗体的编码基因。
6. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体和/或权利要求3所述的表达载体在制备抗肿瘤制剂中的应用。
7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述肿瘤为非霍奇金淋巴瘤。

一种靶向BCMA的嵌合抗原受体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及肿瘤治疗技术领域,特别涉及一种靶向BCMA的嵌合抗原受体及其用途。

背景技术

[0002] B细胞成熟抗原(B cell maturation antigen,BCMA)是一种表达在浆细胞,浆母细胞和骨髓浆细胞的抗原,其不在B细胞或者造血干细胞上表达。BCMA的表达与许多癌症,自身免疫性疾病和感染性疾病相关。具有增加的BCMA表达的癌症包括一些血液癌症,例如多发性骨髓瘤,霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤等。其中,非霍奇金淋巴瘤是最常见的恶性淋巴瘤,有85%左右来源于B细胞系。

[0003] 传统抗体含有两条轻链(L)和两条重链(H),而在骆驼科和软骨鱼的血清中,仅含有重链可变区的特殊抗,为单域抗体,分子量约为12-15KD。单域抗体更易于携带靶向药物进入传统抗体难以进图的结合部位,同时具有更好的溶解度和表达性。近年来,更多热点集中于对对骆驼或者羊驼来源的抗体的研究。但单域抗体半衰期较短,开发一种含有靶向BCMA抗体与IgG抗体Fc片段融合的嵌合抗原受体,对治疗肿瘤,尤其是B细胞非霍奇金淋巴瘤,具有一定的临床意义。

发明内容

[0004] 鉴于此,本发明的目的在于提出一种靶向BCMA的嵌合抗原受体及其用途,为BCMA融合抗体在临床的靶向治疗药物、疾病诊断等研发方面提供一定的指导方法和理论依据。

[0005] 本发明的技术方案是这样实现的:

[0006] 一种靶向BCMA的嵌合抗原受体,包括靶向BCMA抗体与人抗体融合获得的靶向BCMA融合抗体。

[0007] 根据权利要求1的一种靶向BCMA的嵌合抗原受体,其特征在于,所述人抗体为人IgG抗体。

[0008] 进一步的,所述靶向BCMA融合抗体为人BCMA蛋白免疫单峰驼获得的靶向BCMA抗体与人IgG抗体的Fc片段融合。

[0009] 进一步的,所述靶向BCMA融合抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0010] 本发明还构建了靶向BCMA融合抗体的表达载体,其特征在于,所述表达载体靶向BCMA融合抗体的编码基因。

[0011] 本发明的嵌合抗原受体和/或构建的靶向BCMA融合抗体表达载体在制备抗肿瘤制剂中的应用。

[0012] 优选的,本发明的嵌合抗原受体和/或构建的靶向BCMA融合抗体表达载体在抗非霍奇金淋巴瘤制剂中的应用。

[0013] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0014] 本发明使用人BCMA蛋白免疫单峰驼,采用ELISA鉴定阳性克隆,将获得的BCMA抗体

与人IgG抗体Fc片段融合,通过引物设计构建原核表达载体BCMA-IgG Fc-pCZN1,可有效抑制Daudi细胞的增殖活性,对Daudi细胞毒性具有一定的浓度依赖性,效果随着浓度的增加而提高,通过抗体IgG的Fc段,能够与效应细胞相结合,可快速诱导ADCC效应,有助于效应细胞攻击靶细胞,发挥杀伤肿瘤细胞的作用,细胞死亡率达到19.7%。

[0015] 本发明获得的靶向BCMA融合抗体,可为该融合抗体在临床的靶向治疗药物、疾病诊断等研发方面提供一定的指导方法和理论依据。

附图说明

[0016] 图1为本发明对Daudi细胞增殖的抑制效果图;

[0017] 图2为本发明对Daudi细胞毒性结果图。

具体实施方式

[0018] 为了更好地理解本发明技术内容,下面提供具体实施例,对本发明做进一步的说明。

[0019] 本发明实施例所用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0020] 本发明实施例所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0021] 实施例1-靶向BCMA抗体的筛选

[0022] (1) BCMA体外免疫骆驼

[0023] 选取三岁健康无疾病的单峰驼,免疫前进行颈静脉采血5mL,常温放置凝固后,以1000r/min离心10min,取血清,置于-20℃储存备用。等比例将人BCMA蛋白与弗氏完全佐剂混合,振荡,充分乳化,进行免疫接种;加强免疫时选用弗氏不完全佐剂,免疫间隔周期为2周,免疫6次。

[0024] (2) 采用ELISA检测血清抗体效价

[0025] 将人BCMA蛋白包被至浓度为5μg/mL,每孔加入100uL至96孔酶标板,,4℃包被过夜。弃去酶标板内的液体,每孔加入300uL的PBST (PBS+1mL/LTweeN-20) 进行清洗,清洗3-5次,每次5min。每孔加入300uL的PBSM封闭液 (PBS+3% milk),于25℃、5%CO条件下封闭2h。弃去酶标板内的液体,每孔加入300uL PBST进行清洗,清洗3-5次,每次5min。每孔加入100uL稀释1万倍的抗血清,37℃培育1h。每孔加入300uL PBST进行清洗,清洗3-5次,每次5min。每孔加入100uL稀释5000倍的HRP标记的山羊抗骆驼的二抗,37℃孵育1h,每孔加入300uL PBST进行清洗,清洗3-5次,每次5min。每孔加入100uL TMB显色液,37℃避光10min,每孔加入50uL ELISA终止液,于波长450nm处记录OD值,当样品OD值大于阴性对照OD值两倍以上时,视为阳性抗体。

[0026] 选取阳性抗体进行测序,其中,选取亲水性较好的阳性克隆作为获得的免疫骆驼的靶向BCMA抗体,氨基酸序列如SEQ ID NO.1:

[0027] GVGVLGAGGSVGMAGSGPGLVTPSGITHSSLAASAAAGVLLISGLASGAGAATTCMAAVPGGALIGMAVGVLGAGGSVGMAGSGPG LVTPSGITHSSLAASAAAGVLLISGLASGAGAATTCMAAVPGGALIGMAVGPA GLGGSAGTGCAGLGLAPIGAPTRVTVSFTISRDIYQPKYADSVANHILSLRLSCRGSAFNNYVCASS。

[0028] 实施例2-BCMA融合抗体的构建

[0029] (1) 构建BCMA-IgG Fc-pCZN1载体

[0030] 使用NdeI,XbaI限制性内切酶对pCZN1质粒进行双酶切,将筛选获得的阳性抗体与

人IgG Fc片段偶联在聚合酶链反应下接入pCZN1双酶切位点,采用Nimble Cloning试剂盒进行NC克隆反应,并转化DH5a感受态细胞,而后进行PCR菌落筛选阳性克隆,获得载体BCMA-IgG Fc-pCZN1;以接入阳性抗体为对照,获得载体BCMA-pCZN1。

[0031] (2) BCMA融合抗体的表达、纯化

[0032] 挑取单克隆菌落接种至5mL LB液体培养基(含有50 μ g/mL卡那霉素),37 $^{\circ}$ C,220r/min过夜培养。取1mL培养菌液接种至100mL的LB液体培养基(含有50 μ g/mL卡那霉素),37 $^{\circ}$ C,220r/min培养至OD₆₀₀值为0.6~0.8。以4000r/min离心5min,弃去上清液,收集菌体,超声破碎,经Ni柱亲和纯化后,进行Western blot验证,纯化蛋白的大小约为50000。

[0033] 实施例3-BCMA融合抗体的抗肿瘤作用

[0034] (1) BCMA融合抗体对Daudi细胞增殖的抑制作用

[0035] 细胞株选用Burkit's lymphoma Daudi细胞,复苏Daudi细胞,采用RPMI培养基重悬细胞,加入至T25培养瓶中,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养,经2次传代后,取Daudi细胞,加入细胞密度为1 \times 10⁵个至流式管,使用PBS清洗细胞,去除上清,吹打细胞分散,将Daudi细胞加入至96孔酶标板,每孔细胞密度为1 \times 10³个,使用RPMI培养基将BCMA融合抗体稀释成不同浓度,加入至酶标板,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养36h。去除上清液,每孔快速加入CCK-8试剂,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养2h,未加入CCK-8试剂的为空白组。于波长450nm处记录OD值,以未加入BCMA融合抗体为对照组。

[0036] 由图1可知,单独使用BCMA抗体作用Daudi细胞36h,细胞的存活率仍较高,而BCMA融合抗体在相同作用浓度下,则对Daudi细胞具有显著的增殖抑制效果,使Daudi细胞增殖效率降低,IgG抗体协同增效BCMA抗体,使BCMA融合抗体具有较高的生物学活性。

[0037] (2) BCMA融合抗体对Daudi细胞毒性的作用

[0038] 采用含5%FBS的RPIM培养基将BCMA融合抗体稀释成不同浓度,加入至96孔酶标板,采用含5%FBS的RPIM培养基将Daudi细胞稀释成细胞密度为1 \times 10⁵个,加入至96孔酶标板,复苏PBMC细胞(PB009C-2),30min后加入PBMC细胞培养液,其中靶细胞和效应细胞的比值为1:10,以未加入Daudi细胞、加入PBMC细胞培养液的为效应细胞释放值,以加入Daudi细胞、未加入PBMC细胞培养液的为靶细胞最大释放值,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养5。以1000r/min离心4min,取上清液50 μ L至96孔酶标板,根据CytoTox96试剂盒测定靶细胞和效应细胞释放乳酸脱氢酶的OD值,于波长492nm处记录OD值,细胞毒性计算公式:细胞毒性(%) = $(A_{\text{样品}} - A_{\text{效应}}) / A_{\text{靶}} \times 100$,式中, $A_{\text{样品}}$ 为测得的样品OD值, $A_{\text{效应}}$ 为效应细胞释放值的OD值, $A_{\text{靶}}$ 为靶细胞最大释放值,

[0039] 由图2可知,BCMA融合抗体对Daudi细胞的死亡率效果显著,并具有一定的浓度依赖性,效果随着浓度的增加而提高,通过抗体IgG的Fc段,能够与效应细胞相结合,可快速诱导ADCC效应,有助于效应细胞攻击靶细胞,发挥杀伤肿瘤细胞的作用,细胞死亡率达到19.7%。

[0040] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 广东康盾创新产业集团股份有限公司
 <120> 一种靶向BCMA的嵌合抗原受体及其用途

<160> 7

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

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

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

gtgcgcaatt tgggtgtgtg agaccgatgt 30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3
gtgggtttgt cctcgatggt aggcaaagcc 30
<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 4
cgaccttcaa gtcgcatgt 20
<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 5
ttctgaagat aggctcttca 20
<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 6
ggctgggaag ttgactaagg 20
<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 7
actagacggt cactcaataa 20

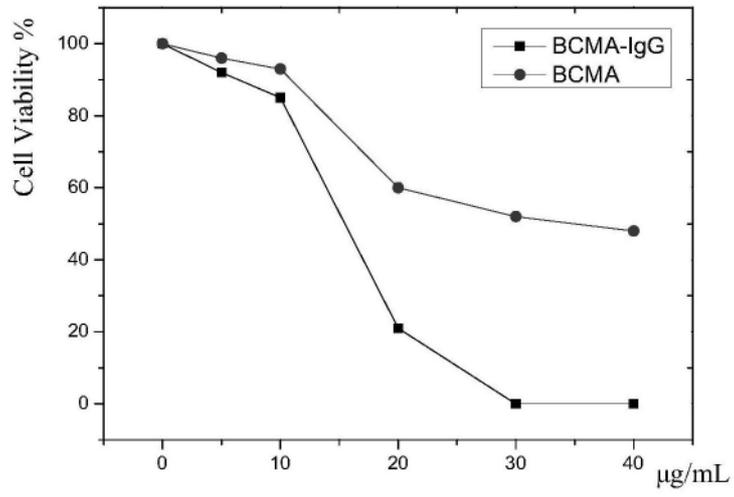


图1

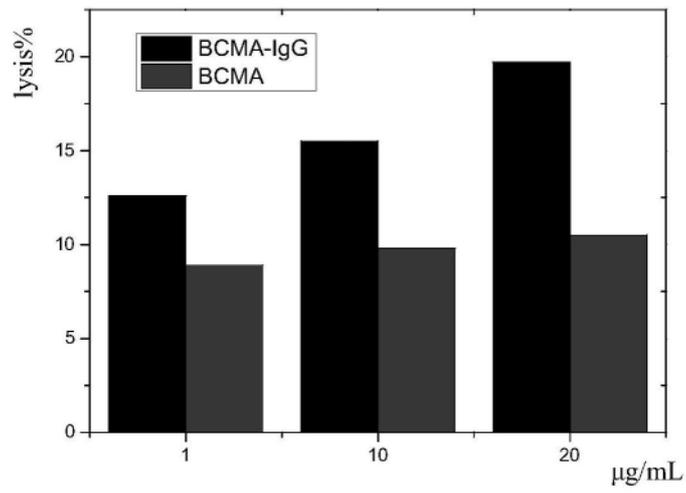


图2