抗 SIRPα 单克隆抗体的制备及其体外活性

赵丽丽[1,2]，赵文鹏[3]，许永亮[1,2]，张贵民[4]，曹　宇[1]，刘　忠[4*]
（1. 山东新时代药业有限公司，山东临沂 273400；2. 哺乳动物细胞高效表达国家工程实验室，山东临沂 273400；
3. 沈阳药科大学，辽宁沈阳 110016；4. 鲁南制药集团股份有限公司，山东临沂 276000）

摘要：利用分子生物学技术构建可表达带有小鼠抗体 Fc 端（mFc）的信号调节蛋白 α（SIRPα）的质粒，并转染至中国仓鼠卵巢癌细胞（CHO 细胞）中来制备 SIRPα-mFc 蛋白。将获得的 SIRPα-mFc 蛋白作为抗原免疫 BALB/c 小鼠，并将免疫后的小鼠脾脏细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合。经过酶联免疫吸附反应（ELISA）和流式细胞仪的多轮筛选后，得到 7 株靶向 SIRPα 的单克隆抗体。其中，40F3 和 57B10 这 2 株单克隆抗体结合活性较高，半数效应浓度（EC_{50}）分别为 5.866、5.457 ng/mL；半数抑制浓度（IC_{50}）分别为 65.31、63.29 ng/mL，均优于商业化抗体 SE5A5（抗 SIRPα/β 抗体，EC_{50} 为 22.47 ng/mL，IC_{50} 为 121.2 ng/mL）。并且，这 2 株抗体的亲和力数量级在 1×10^{-11} 且不与 SIRPg 结合，为后续的抗体人源化以及临床前研究提供了参考。

关键词：信号调节蛋白α（SIRPα）；单克隆抗体；抗体亲和力；制备；体外活性
中图分类号：R392-33　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2023）03-0366-08
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.03.010

Preparation and *in vitro* Activity of Anti-SIRPα Monoclonal Antibody

ZHAO Lili[1,2], ZHAO Wenpeng[3], XU Yongliang[1,2], ZHANG Guimin[4], CAO Yu[1], LIU Zhong[4*]
(*1. Shandong New Time Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 273400; 2. State Engineering Lab. of High Expression of Mammalian Cells, Linyi 273400; 3. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016; 4. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276000*)

ABSTRACT: The signal regulatory protein α（SIRPα）-mFc expression plasmid constructed by molecular biological technique was transfected into Chinese hamster ovary（CHO）cell lines in order to express SIRPα-mFc protein. The BALB/c mice were immunized with SIRPα-mFc protein antigens, then the spleen cells of the immunized BALB/c mice were fused with SP2/0 myeloma cells. After multiple rounds screening through enzyme linked immunosorbent assay（ELISA）and flow cytometry, seven monoclonal antibodies targeting SIRPα protein were obtained. Two of the seven clones named 40F3 and 57B10 showed higher binding activity, the median effective concentration（EC_{50}）of 40F3 and 57B10 were 5.866 and 5.457 ng/mL, and the half maximal inhibitory concentration（IC_{50}）were 65.31 and 63.29 ng/mL, both were better than the commercial product SE5A5（anti-SIRPα/β antibody, EC_{50}=22.47 ng/mL, IC_{50}=121.2 ng/mL）. The affinity activity level tested of these two clones were 1×10^{-11}, and the antibodies 40F3 and 57B10 could not bind to SIRPg protein, which provided a reference for the subsequent antibodies humanization and preclinical studies.

Key Words: signal regulatory protein α（SIRPα）; monoclonal antibody; antibody affinity; preparation; *in vitro* activity

收稿日期：2022-09-08
基金项目：山东省重点研发计划——泰山产业领军人才工程（2018TSCYCX-30、tscy20200329）
作者简介：赵丽丽（1977—），女，博士，从事蛋白药物的研究。
通信作者：刘　忠（1975—），男，博士，高级研究员，从事蛋白药物的研究与开发。
E-mail：clevertree@163.com

免疫逃逸是肿瘤细胞的重要标志，在肿瘤治疗过程中，免疫反应对肿瘤的治疗和干预在临床上已取得了显著疗效，靶向 T 细胞抑制型受体的抗体能够激发人体免疫系统中的获得性免疫，可对肿瘤细胞进行长期持久的抗肿瘤免疫[1]。靶向程序性死亡

因子 1(programmed cell death 1，PD-1)、程序性死亡因子配体 1(programmed death ligand 1，PD-L1)、细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4(CTLA-4) 等 T 细胞检查位点的抗体通过提高获得性免疫可达到抗肿瘤治疗的目的。但是仍有大量的患者存在肿瘤抗原性差、肿瘤以及肿瘤微环境中的其他抑制性检查点和肿瘤浸润性 T 细胞的缺乏，以及存在免疫抑制性细胞等原因，导致抗体对检查位点没有反应，导致疾病进一步发展，这就需要寻找可替代或协同的方法来增强抗肿瘤免疫力 [2]。

信号调节蛋白 (signal regulatory protein，SIRP) 属于免疫球蛋白超家族，主要包括 SIRPα、SIRPβ 和 SIRPg。SIRPα 广泛表达在巨噬细胞、树突状细胞 (dendritic cells)、中性粒细胞和单核细胞等髓系细胞表面 [3]。SIRPα 是一种跨膜蛋白，细胞外区域包含 3 个免疫球蛋白 (immunoglobulin，Ig) 样结构域，细胞质区域包含 4 个酪氨酸磷酸化位点，介导着与蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatase substrate，SHP) 1 和 2(SHP-1 和 SHP-2) 的结合 [4—5]。SIRPα 的酪氨酸磷酸化不仅受各种生长因子和细胞因子的调节，还受分化群 (cluster of differentiation，CD)47 介导的细胞与细胞外基质蛋白的黏附调节 [6]。

SIRPg 也被称为 SIRPβ2 或 CD172g，是一种带有细胞外 Ig 样结构域的跨膜糖蛋白，在 T 淋巴细胞和活化的自然杀伤 (NK) 细胞中优先表达 [7]。SIRPg 也可以与 CD47 相互作用，对抗原特异性 T 细胞的增殖和共刺激起重要作用，但 CD47/SIRPα 的亲和力是 CD47/SIRPg 的 10 倍 [8]。

CD47 是 SIRPα 的胞外结构域配体，也属于 Ig 超家族，而且 CD47 在大多数细胞中普遍表达 [9]。CD47 和细胞外的 SIRPα 之间的相互作用会导致 SIRPα 细胞内结构域中的免疫受体酪氨酸抑制基序 (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif，ITIM) 结构域中的 2 个酪氨酸残基磷酸化 [10—11]，磷酸化后的 ITIM 随后募集并激活 SHP-1 和 SHP-2 蛋白，活化后的 SHP-1 和 SHP-2 进一步将细胞内的一系列蛋白去磷酸化，从而负向调节吞噬作用。当使用抗体或小分子抑制剂阻断或干扰 CD47 与 SIRPα 间的联系时，CD47 与 SIRPα 的相互作用就会被破坏，从而导致巨噬细胞的吞噬功能被激活。CD47/SIRPα 构成了重要的先天免疫检查点 [12]，CD47 与 SIRPα 的相互作用可调节巨噬细胞和树突状细胞对靶细胞的吞噬作用，向吞噬细胞发送“不要吃我”的抑制信号，防止骨髓细胞吞噬健康细胞 [13—14]。然而，肿瘤细胞利用了 CD47/SIRPα 检查点，通过过度表达 CD47 蛋白，逃脱免疫细胞的破坏。

在过去的 30 年中，治疗型抗体彻底改变了靶向于恶性肿瘤的治疗。在 KOHLER 和 MILSTEIN 于 1975 年提出杂交瘤技术后，单克隆抗体的治疗应用开始出现 [15]。随后提出的抗体人源化技术促进了单克隆抗体在肿瘤治疗中的应用 [16]。目前，SIRPα/CD47 已经成为重要的免疫检查点，针对 SIRPα/CD47 信号通路的治疗方法可通过提高先天性免疫反应和获得性免疫反应从而达到抗肿瘤的作用。本研究的目的是制备针对 SIRPα 的单克隆抗体，破坏 SIRPα 与 CD47 的相互作用，以期为促进肿瘤细胞的清除和恶性肿瘤的治疗提供参考。

1 仪器与试药

PowerPac Basic 型核酸电泳仪、Mini-Protean Tetra Cell 型蛋白电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)；FACS Canto Ⅱ型流式细胞仪 (美国 BD 公司)；Neo2 型酶标仪 (美国 BioTek 公司)；Amersham Imager 600 型凝胶成像系统、Biacore T200 型表面等离子共振生物分子相互作用分析仪 (美国 GE Healthcare 公司)；AKTA pure04 型蛋白纯化仪 (美国 Cytiva 公司)；Nano drop one 型微量紫外分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

抗 SIRPα/β 的商业化抗体 SE5A5(美国 BioLegengd 公司，批号 FGV25148)；鼠抗人 SIRPα 商业化抗体 Kwar23 (美国 Creative Biolabs 公司，批号 HNG2G34G)；鼠抗 SIRPg 商业化抗体 LSB2.20(美国 Santa Cruz 公司，批号 23650102)；SIRPg(批号 H5235265) 和 CD47(批号 H82E9254) 均购于美国 ARCO 公司；限制性内切酶 *Hind* Ⅲ(批号 10119502)、*EcoR* Ⅰ (批号 1017914) 和 T4 DNA 连接酶 (批号 10114462) 均购于美国 NEB 公司；质粒小提试剂盒 (批号 24921A1)、胶回收试剂盒 (批号 AKG2503A) 均购于日本 TAKARA 公司；完全弗氏佐剂 (批号 SLBR1681V)、不

完全弗氏佐剂（批号 SLCB3267）、聚乙二醇（PEG）2000（批号 RNBF1100）、DMEM 培养基（批号 2085445）、无血清培养基（SFM，批号 2360253）、胎牛血清（FBS，批号 2068801CP）、青链霉素双抗（批号 1894149）、HAT 培养基添加物（批号 SLBR7249V）、HT 培养基添加物（批号 SLBQ1115V）均购于美国 Sigma 公司；牛血清白蛋白（BSA，国药集团化学试剂有限公司，批号 20210407）；Tween-20（德国 SAFC Biosciences 公司，批号 K53839472）；带有辣根过氧化物酶（HRP）的羊抗鼠 IgG（美国 Southern Biotech 公司，批号 138731）；杜氏磷酸盐缓冲液（DPBS，美国康宁公司，批号 21031064）；3,3',5,5'- 四甲基联苯胺（TMB）显色液（美国 Seracare 公司，批号 10573402）；0.22 μm 滤膜（德国 Sartorius 公司，批号 80169103）；小鼠 IgG（mIgG）血清（批号 0631222512505）、红细胞裂解液（批号 073022221025）（上海碧云天生物技术有限公司）；去内毒素质粒大提试剂盒（美国 Omega 公司，批号 D6926030000L23SO12）；MabSelect™ Protein A 预装色谱柱（美国 Cytiva 公司，批号 FNV2105）；Expi Fectamine™ CHO Transfection Kit CHO 细胞转染试剂盒（美国 Gibco 公司，批号 2474280）。

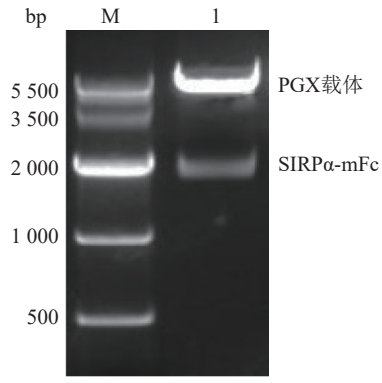
真核表达载体 PGX、大肠埃希菌 DH5α、中国仓鼠卵巢癌细胞（CHO 细胞）均为本实验室保存；小鼠骨髓瘤细胞（SP2/0 细胞）（美国典型培养物保藏中心，ATCC® CRL-1581）。

BALB/c 小鼠［雌性，6 ～ 8 周龄，体质量 18 ～ 20 g，无特定病原体（SPF）级］购于北京维通利华实验动物技术有限公司，所有小鼠均在洁净区饲养，垫料每周更换，维持水和食物充足，日光灯 12 h 自动切换；实验动物生产许可证号 SCXK（京）2016-0006，实验动物质量合格证编号 11400700348951，小鼠使用伦理号 AN-IACUC-2018-036。

2　方法与结果

2.1　SIRPα- 小鼠抗体 Fc 端（mFc）蛋白表达质粒的构建

根据 UniProt 网站公布的人 SIRPα 蛋白的全长序列（UniProt 登记号：P78324），选取 31 ～ 373 号位氨基酸，通过连接肽（3 个 GGGGS）将 SIRPα 胞外区与小鼠 IgG2a 的重链恒定区相连接，并由金斯瑞生物科技股份有限公司合成 SIRPα-mFC-pUC57 序列。将合成的 SIRPα-mFc-PUC57 质粒与 PGX 质粒用 *Hind* Ⅲ和 *EcoR* Ⅰ双酶切后，在 T4 DNA 连接酶的作用下将目的片段与载体在 16 ℃下连接过夜。次日，将质粒转化至 DH5α 感受态细胞，提取质粒后进行双酶切鉴定。鉴定结果如图 1 泳道 1 所示，SIRPα-mFc 目的基因大小为 1 800 bp，酶切结果正确。



M—Marker；1—SIRPα-mFc-PGX 质粒的双酶切鉴定。

图 1　SIRPα-mFc-PGX 质粒的双酶切鉴定结果

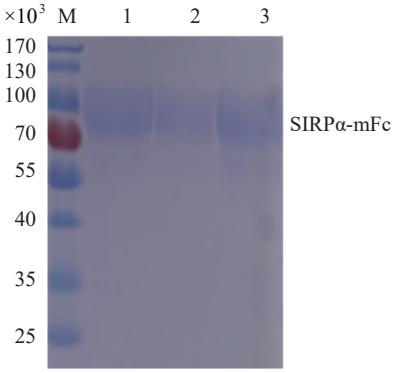
Fig.1　Identification Result of Double Digestion of SIRPα-mFc-PGX Plasmid

2.2　SIRPα-mFc 蛋白的表达及纯化

利用去内毒素质粒大量抽提试剂盒提取 SIRPα-mFc-PGX 质粒并转染 CHO 细胞。转染前将细胞以每毫升 3×10^5 个传代，转染当天调整细胞密度为每毫升 6×10^6 个，取 SIRPα-mFc-PGX 质粒 100 μg，加至 SFM 4 mL 中，混匀；取 ExpiFectamine™ CHO Reagent 转染试剂 320 μL 与 SFM 3.7 mL，混匀后室温静置 5 min。将转染试剂混合液缓慢加至 DNA 混合液中，混匀后室温静置 5 min 后加至 CHO 细胞混悬液 100 mL 中。置 37 ℃、8 % CO_2、130 r/min 的摇床中培养，18 ～ 22 h 后补加 ExpiCHO™ Enhancer 600 μL 和 ExpiCHO™ Feed（均为 ExpiFectamine™ CHO Reagent 转染试剂盒中的成分）16 mL。3 d 后收集细胞上清液，过 0.22 μm 滤膜，然后采用柱色谱法进行蛋白纯化，色谱条件为：色谱柱 HiTrp™ MabSelect™ Prism A 柱（1 mL）；流动相 结合缓冲液（含 150 mmol/L 氯化钠的 20 mmol/L 磷酸二氢钠和磷酸氢二钠缓冲液，pH 7.4），洗脱缓冲液（50 mmol/L 乙酸钠缓冲液，pH 3.5）；检测波

长 280 nm；流速 5 mL/min；柱温 室温。

先用结合缓冲液冲洗色谱柱直至紫外吸光度值至基线，用 5 mL 的上样环上样一次，并用结合缓冲液冲洗至紫外吸光度值再次达到平衡，再用洗脱缓冲液洗脱蛋白，收集并调节洗脱液的 pH 值为 7.0。将纯化后的蛋白与上样缓冲液混合，煮沸 10 min 后，进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。结果如图 2 所示。SIRPα 蛋白的理论相对分子质量为 63 000，因为糖基化的原因，实际相对分子质量会大于理论相对分子质量，所以真核细胞表达的蛋白的相对分子质量会在 SDS-PAGE 电泳时发生位置的偏移，比实际理论值偏大。



M—Marker；1、2、3—3 次试验所得的 SIRPα-mFc 蛋白。

图 2 SIRPα-mFc 蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.2 SDS-PAGE Electrophoresis Results of SIRPα-mFc Proteins

2.3 小鼠免疫及细胞融合

选用 6 ～ 8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠进行小鼠免疫，首次免疫时将 SIRPα-mFc 蛋白与完全弗式佐剂按体积比 1 ∶ 1 混合并充分乳化。通过皮下注射方式免疫小鼠，免疫剂量为每只 150 μg，每只小鼠注射 100 μL；首次免疫 10 ～ 14 d 后进行二次免疫，将 SIRPα-mFc 抗原蛋白与不完全弗式佐剂按体积比 1 ∶ 1 混合并充分乳化，通过皮下注射方式免疫小鼠，免疫剂量为每只 150 μg；第二次免疫 14 d 后进行第三次免疫，将 SIRPα-mFc 抗原蛋白与不完全弗式佐剂按体积比 1 ∶ 1 混合并充分乳化后通过皮下注射方式免疫小鼠，免疫剂量为每只 150 μg。第三次免疫后第 3 天，取小鼠尾静脉血，采用酶联免疫吸附（ELISA）法测定免疫小鼠的血清效价。

细胞融合前一天制备饲养层细胞用于杂交瘤细胞培养，取一只未免疫的 BALB/c 小鼠，断颈处死后，置 75% 乙醇中浸泡 5 min 进行消毒，在无菌环境中，打开小鼠腹腔，不要撕破腹膜，将 DMEM 培养基 5 mL 用注射器注入小鼠的腹腔内，并用镊子在小鼠腹膜左右两侧轻轻敲击数次，再将腹腔内的培养基用注射器轻轻吸出，即得到带有巨噬细胞的培养基；将细胞稀释后铺于 96 孔板中，每孔 100 μL，并置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。

选择效价最高的小鼠用于细胞融合。小鼠断颈处死后置 70% 乙醇中浸泡消毒 5 min。腹部切口，剪开腹膜后摘取小鼠脾脏。将脾脏置 0.22 μm 滤膜上，用注射器内芯轻轻碾压，制得脾细胞悬液。将脾细胞转移至 50 mL 离心管中，加入 DMEM 培养基 30 mL，离心（300×*g*）5 min，弃去上清液，剩余物中加入 3 倍体积的红细胞裂解液，于室温反应 2 min，离心（300×*g*）5 min，加入 DMEM 培养基 20 mL 洗涤 3 次并进行细胞计数。将准备好的 SP2/0 细胞与小鼠脾脏细胞按一定比例（1 ∶ 5 ～ 1 ∶ 10）混合，并在 1 min 之内加入 PEG 1 mL，随后置 37 ℃水浴静置 90 s，2 ～ 4 min 内加入无血清的 DMEM 培养基 15 mL，离心（300×*g*）5 min，弃去上清液，剩余物中加入 HAT 培养基 35 mL，分装至已有饲养层细胞的 96 孔板中进行培养。7 d 换 1 次 HAT 培养基，连续 2 周观察杂交瘤是否出现。2 周后，用 HT 培养基进行培养。

2.4 阳性克隆的筛选

用 ELISA 法检测杂交瘤细胞培养上清液中的抗体。将 SIRPα 蛋白作为抗原包被酶标板，用 DPBS 调节抗原浓度至 0.5 μg/mL，每孔 200 μL 并于 4 ℃包被过夜。次日弃去包被液后，每孔加入含 5% BSA 的封闭液（PBST，即含 0.05% Tween-20 的 DPBS）200 μL，于 37 ℃封闭 2 h，用 PBST 洗涤 3 次，加入杂交瘤细胞培养上清液 50 μL，于 37 ℃孵育 1 h。弃去上清液后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗，于 37 ℃孵育 1 h。用 PBST 洗涤 3 次，

加入 TMB 显色液 50 μL，于 37 ℃显色 10 min，再加入 1 mol/L 盐酸 50 μL 终止显色。用酶标仪在检测 450 nm 波长处的吸光度（OD_{450}）值。结果显示，经过 ELSIA 法第一轮筛选后一共得到了 328 株阳性克隆。

采用流式细胞仪检测能与 CHO 细胞结合的阳性克隆。分别用带有人 SIRPα（hu-SIRPα）和食蟹猕猴 SIRPα（cyno-SIRPα）的表达质粒转染 CHO 细胞来构建表达有 hu-SIRPα 和 cyno-SIRPα 的 CHO 细胞，用于检测抗体与细胞表面蛋白的结合能力。收集 CHO-hu-SIRPα 和 CHO-cyno-SIRPα 细胞，将细胞分别以每孔 1×10^5 个的密度铺板于 96 孔板中，离心（400×*g*）5 min，洗涤 1 次。取经 ELISA 法筛选出的阳性克隆上清液与 CHO 细胞 100 μL 在 37 ℃孵育 1 h，离心（400×g）5 min，弃去上清液后，将 1 ∶ 400 倍稀释后的带 PE 标记的抗小鼠 IgG Fc 的二抗与细胞在 37 ℃孵育 1 h，用 DPBS 200 μL 洗涤 2 次，弃去上清液后用 DPBS 50 μL 重悬细胞，利用流式细胞仪检测待测细胞的荧光强度（MFI），并用 FlowJo 软件（版本 18.0.0.0）进行 MFI 平均值的数据分析和计算，选择 MFI 高于阴性对照且数值最高的杂交瘤细胞。结果如表 1 所示，经过流式细胞仪筛选后，得到了 7 株能与表达有 hu-SIRPα 蛋白和 cyno-SIRPα 蛋白的 CHO 细胞结合较强的杂交瘤细胞，分别命名为 36D6、36G4、39D8、40F3、52B3、55G4、57B10。

2.5　单克隆抗体的制备以及纯化

使用有限稀释法对获得的阳性杂交瘤细胞进行克隆以确保其单克隆性[17]。调整杂交瘤细胞密度至每 1 mL 10 个细胞，用 HT 培养基将细胞铺在带有饲养层细胞的 96 孔细胞板内，每孔 100 μL，置 37 ℃培养箱中培养 10 d。待细胞状态良好时转移至有 SFM 30 mL 的 T125 摇瓶中，置 37 ℃、200 r/min 培养箱中培养 2 d 后收集细胞上清液，用于抗体纯化。

将收集的细胞培养上清液离心（1 000×*g*）10 min，收集上清液后用 0.22 μm 的滤膜过滤后开始纯化，色谱条件同“**2.2**”项下，用结合缓冲液平衡色谱柱至分光光度计测得的基线平衡，将处理后的样品过色谱柱纯化，待样品全部流过色谱柱时再用结合缓冲液平衡色谱柱至基线稳定，接着用洗脱缓冲液进行抗体的洗脱，并根据紫外吸光度值收集纯化后的抗体。将纯化后的抗体调至 pH 7.0，用分光光度计测定其在波长为 280 nm 处的吸光度值（D_{280}），按式①计算纯化后抗体的浓度。

表 1　单克隆抗体与 CHO-hu-SIRPα 和 CHO-cyno-SIRPα 结合的 MFI 值

Tab.1　MFI Values of Monoclonal Antibodies Binding to CHO-hu-SIRPα and CHO-cyno-SIRPα

单克隆抗体名称	单克隆抗体与 CHO-hu-SIRPα 的结合 MFI	单克隆抗体抗体与 CHO-cyno-SIRPα 的结合 MFI
36D6	9 268	4 997
36G4	9 517	4 560
39D8	17 253	8 652
40F3	17 151	7 568
52B3	13 578	6 985
55G4	12 194	6 719
57B10	18 480	9 230
mIgG	86.56	76.36

抗体浓度 $=D_{280}$/ 消光系数　　式①

2.6　抗 SIRPα 单克隆抗体的亲和力测定

使用表面等离子共振生物分子相互作用分析仪测定单克隆抗体 36D6、36G4、39D8、40F3、52B3、55G4、57B10 与 SIRPα 抗原的亲和力。将 SIRPα 单克隆抗体原液稀释至 6 μg/mL 作为配体，将 SIRPα 蛋白从 100 nmol/L 起始，2 倍梯度稀释 8 个点。设置程序：配体流速 10 μL/min，20 s，分析物 30 μL/min，结合时间 100 s，解离时间 600 s，再生液 30 μL/min，30 s。采用 Biacore T200 Evaluation 分析软件（版本 3.1）进行数据处理。

结果显示，单克隆抗体 36D6、36G4、39D8、40F3、52B3、55G4、57B10 以及对照抗体 SE5A5 的亲和力常数（KD）分别为 2.21×10^{-9}、2.11×10^{-9}、1.07×10^{-10}、8.29×10^{-11}、1.22×10^{-10}、7.12×10^{-11}、4.73×10^{-11}、3.15×10^{-8} mol/L；其中抗体 40F3、55G4 和 57B10 亲和力数量级在 1×10^{-11}；7 种抗体的亲和力均优于对照抗体 SE5A5（3.15×10^{-8} mol/L）。

2.7　ELISA 测定 SIRPα 单克隆抗体的半数效应浓度（EC_{50}）

将 SIRPα 蛋白以 1 μg/mL、每孔 200 μL 的量包被在 ELISA 板上并包被过夜，用含 2% BSA 的

PBST 于 37 ℃封闭 1 h，用 PBST 洗涤 3 次后加入梯度稀释的抗体（抗体质量浓度以 1 000 ng/mL 为起点，用 DPBS 以 3 倍梯度稀释 7 个浓度）后，在 37 ℃下孵育 2 h。以 SE5A5 为阳性对照抗体，mIgG 为阴性对照抗体。加入 1 ∶ 1 000 倍稀释的带 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗，每孔 100 μL，于 37 ℃孵育 1 h；用 PBST 洗涤 3 次，加入 TMB 显色液 50 μL 显色 15 min，每孔再加入 1 mol/L 的盐酸 50 μL 终止反应并读取 OD_{450} 值，并以 OD_{450} 值（*Y*）为纵坐标，质量浓度对数值（*x*）为横坐标，绘制剂量效应曲线，按式②计算相应的 EC_{50} 值。

$$Y=(A-D)/[1+(x/C)^B]+D \quad 式②$$

式中：*D* 为曲线下渐近线的估值，*A* 为曲线上渐近线的估值，*C* 为 EC_{50}，*B* 为曲线斜率。

结果显示，单克隆抗体 36D6、36G4、39D8、40F3、52B3、55G4、57B10 的 EC_{50} 值分别为 19.15、23.49、8.06、5.866、7.358、19.48、5.457 ng/mL；抗体 39D8、40F3、52B3 和 57B10 的 EC_{50} 值均优于对照抗体 SE5A5（EC_{50} 值为 22.47 ng/mL）；抗体 36D6、36G4 和 55G4 的 EC_{50} 值同对照抗体相当。

2.8 抗 SIRPα 单克隆抗体的竞争活性测定

将 CD47 蛋白以 2 μg/mL、每孔 100 μL 包被在 ELISA 板上，4 ℃过夜，用含 2% BSA 的 PBST 于 37 ℃封闭 1 h，用 PBST 洗涤 3 次后，加入“**2.5**”项下纯化后的抗体（用 PBST 调节抗体的质量浓度为 40 μg/mL，并以 4 倍梯度向下稀释 11 个梯度）50 μL 和 SIRPα 蛋白溶液（用 PBST 调节质量浓度至 2 μg/mL）50 μL，充分混合后，加入包被有 CD47 的 ELISA 板中，于 37 ℃下孵育 2 h。以 SE5A5 为阳性对照抗体，mIgG 为阴性对照抗体。加入 1 ∶ 1 000 倍稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗，每孔 100 μL，于 37 ℃孵育 1 h；用 PBST 洗涤 3 次，加入 TMB 显色液 50 μL 显色 15 min，每孔再加入 1 mol/L 盐酸 50 μL 终止反应并读取 OD_{450} 值。并以 OD_{450} 值（*Y*）为纵坐标，浓度对数值（*x*）为横坐标，绘制剂量效应曲线，按式③计算相应的半数抑制浓度（IC_{50}）值。

$$Y=(A-D)/[1+(x/C)^B]+D \quad 式③$$

式中：*C* 为 IC_{50}，其他同式②。

结果显示，单克隆抗体 36D6、36G4、39D8、40F3、52B3、57B10 的 IC_{50} 值分别为 247.9、150.4、113.2、65.31、120.6、63.29 ng/mL，抗体 55G4 与 SIRPα 不存在竞争作用。结果表明，本研究筛得的抗体 36G4、39D8 和 52B3 的竞争作用同抗体 SE5A5（IC_{50} 为 121.2 ng/mL）相当；抗体 40F3 和 57B10 优于对照抗体 SE5A5 的竞争作用。

2.9 采用 ELISA 法鉴定单克隆抗体是否影响 CD47 与 SIRPg 的结合

取“**2.8**”项下竞争活性较好的 4 株单克隆抗体 39D8、52B3、40F3、57B10 进行进一步测定，采用 ELISA 法鉴定其是否会影响 CD47 与 SIRPg 的结合。

将 SIRPg 蛋白以 2 μg/mL、每孔 200 μL 包被在 ELISA 板上，4 ℃过夜，用 PBST 洗涤 3 次后，用含 2% 的 BSA 的 PBST 于 37 ℃封闭 1 h，洗涤 3 次后，加入以上 4 株稀释后的单克隆抗体（用 PBST 调节抗体的质量浓度为 40 μg/mL，并以 4 倍梯度向下稀释 11 个梯度）50 μL 和 CD47 蛋白溶液（用 PBST 调节质量浓度至 2 μg/mL）50 μL；用 PBST 洗涤 3 次，加入 1 ∶ 1 000 倍稀释的带 HRP 标记的链霉亲和素（每孔 100 μL），于 37 ℃反应 1 h 后，用 PBST 洗涤 3 次，每孔加入 TMB 显色液 50 μL 显色 15 min，再每孔加入 1 mol/L 盐酸 50 μL 终止反应，用多功能酶标仪读取 OD_{450}。以鼠抗人 SIRPα 商业化抗体 Kwar23 为阳性对照，mIgG 为阴性对照，并按式③计算相应的 IC_{50} 值。

结果显示，抗体 39D8、52B3 的 IC_{50} 分别为 0.152、0.196 μg/mL，而抗体 40F3 与 57B10 与 SIRPg 没有竞争活性，说明本研究中的单克隆抗体 40F3 和 57B10 完全不影响 CD47 与 SIRPg 的结合。

2.10 ELISA 检测法单克隆抗体与 SIRPg 的结合

进一步测定“**2.9**”中不影响 CD47 与 SIRPg 结合的 40F3 和 57B10 抗体是否会与 SIRPg 结合。

将 SIRPg 蛋白以 1 μg/mL、每孔 200 μL 包被在 ELISA 板上，4 ℃过夜，每孔加入梯度稀释的 40F3 和 57B10 单克隆抗体（用 PBST 调节抗体质

量浓度至 1 000 ng/mL，以 2 倍梯度向下稀释 4 个梯度）各 100 μL，于 37 ℃孵育 1 h，以 Kwar23 和 LSB2.20 为阳性对照抗体，mIgG 为阴性对照；用 PBST 洗涤 3 次后，加入 1 ∶ 10 000 倍稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗，于 37 ℃孵育 1 h，用 PBST 洗涤 3 次后每孔加入 TMB 显色液 50 μL，显色 20 min 后，每孔加入 1 mol/L 盐酸 50 μL 终止反应；用酶标仪读取 OD_{450}，并记录原始数据。

结果如图 3 所示，抗 SIRPα 抗体 40F3 和 57B10 不结合 SIRPg，而已知抗体 Kwar23 和 LSB2.20 显示出与 SIRPg 的显著结合作用。

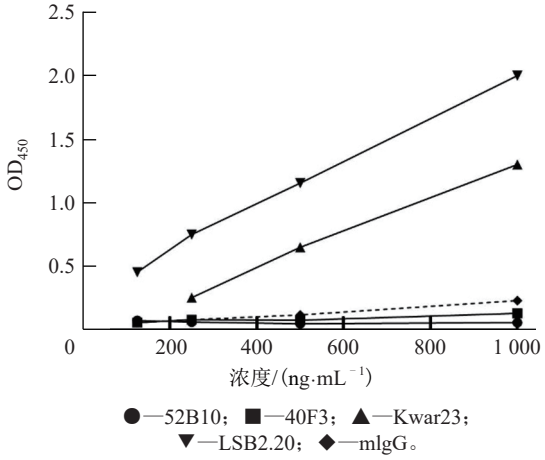


图 3　抗体与 SIRPg 的结合

Fig.3　The Binding of Antibodies to SIRPg

3　小结

固有免疫与肿瘤细胞的免疫逃逸关系已经成为研究的热点[18]。在过去，科学家一直致力于利用巨噬细胞来治疗肿瘤，但效果却不理想。有研究[19]表明，阻断 CD47 与 SIRPα 的相互作用可以发挥巨噬细胞以及树突状细胞对肿瘤细胞的免疫作用，为肿瘤治疗提供了新的靶点 SIRPα[20]。

本研究通过传统的杂交瘤技术制备靶向 SIRPα 的单克隆抗体，在细胞融合后的 2 周开始筛选，在第一轮 ELISA 法筛选后得到了 328 株能与 SIRPα 蛋白结合的阳性杂交瘤细胞。经过第二轮流式细胞术筛选后，又成功筛选出 7 株能与表达有 hu-SIRPα 和 cyno-SIRPα 蛋白的 CHO 细胞有较强结合的克隆株。利用 ELISA 法对获得的抗体进一步评价，其中 40F3 和 57B10 这 2 株单克隆抗体的亲和力数量级在 1×10^{-11}，明显优于商业化的阳性抗体。利用 ELISA 法测得本研究制备的 40F3 和 57B10 这 2 株单克隆抗体阻断 SIRPα 与 CD47 作用的 IC_{50} 值分别为 65.31、63.29 ng/mL，而商业抗体 SE5A5 的 IC_{50} 值为 121.2 ng/mL，说明在阻断 SIRPα 与 CD47 的相互作用时，40F3 和 57B10 的用量明显要低于 SE5A5 的用量。

本研究利用杂交瘤技术筛选出的靶向 SIRPα 的高亲和力鼠源单克隆抗体，该抗体亲和力较好，ELISA 结合活性和阻断活性均优于对照抗体并且不影响 CD47 与 SIRPg 的结合，后续研究将对 SIRPα 抗体进行人源化处理以降低其免疫源性，并继续探讨人源化抗体的体内外的活性，为抗 SIRPα 单抗申报临床研究做好前期准备。

参考文献：

[1] SIM J, SOCKOLOSKY J T, SANGALANG E, *et al*. Discovery of high affinity, pan-allelic, and pan-mammalian reactive antibodies against the myeloid checkpoint receptor SIRPα [J]. *MAbs*, 2019, **11**(6): 1036-1052.

[2] ANDREJEVA G, CAPOCCIA B J, HIEBSCH R R, *et al*. Novel SIRPα antibodies that induce single-agent phagocytosis of tumor cells while preserving T Cells [J]. *J Immunol*, 2021, **206**(4): 712-721.

[3] 徐　进, 刘　涛, 赵自叶, 等. 重组信号调节蛋白α(SIRPα)胞外段及其高亲和力突变体的表达、纯化与活性鉴定[J]. 现代免疫学, 2014, **34**(5): 353-357.

[4] IWAMURA H, SAITO Y, SATO-HASHIMOTO M, *et al*. Essential roles of SIRPα in homeostatic regulation of skin dendritic cells [J]. *Immunol Lett*, 2011, **135**(1/2): 100-107.

[5] KANG B, LIANG Y, SHAN Y, *et al*. SIRPalpha negatively regulates differentiation of PC12 cell [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005, **138**(2): 205-214.

[6] MURATA Y, SAITO Y, KANEKO T, *et al*. Autoimmune animal models in the analysis of the CD47-SIRPα signaling pathway [J]. *Methods*, 2014, **65**(2): 254-259.

[7] XU C, JIN G, WU H, *et al*. SIRPγ-expressing cancer stem-like cells promote immune escape of lung cancer via Hippo

signaling［J］. *J Clin Invest*, 2022, **132**(5): e141797.

［8］ DEHMANI S, NERRIERE-DAGUIN V, NEEL M, *et al*. SIRPγ-CD47 interaction positively regulates the activation of human T Cells in situation of chronic stimulation［J］. *Front Immunol*, 2021, **12**: 732530.

［9］ LIN Y, YAN XQ, YANG F, *et al*. Soluble extracellular domains of human SIRPα and CD47 expressed in *Escherichia coli* enhances the phagocytosis of leukemia cells by macrophages *in vitro*［J］. *Protein Expr Purif*, 2012, **85**(1): 109-116.

［10］ FRANKE K, PILLAI S Y, HOOGENBOEZEM M, *et al*. SIRPα on mouse B1 cells restricts lymphoid tissue migration and natural antibody production［J］. *Front Immunol*, 2020, **11**: 570963.

［11］ ZEN K, GUO Y, BIAN Z, *et al*. Inflammation-induced proteolytic processing of the SIRPα cytoplasmic ITIM in neutrophils propagates a proinflammatory state［J］. *Nat Commun*, 2013, **4**: 2436.

［12］ MILLER T W, AMASON J D, GARCIN E D, *et al*. Quantitative high-throughput screening assays for the discovery and development of SIRPα-CD47 interaction inhibitors［J］ *PLoS One*, 2019, **14**(7): e0218897.

［13］ MORRISSEY M A, KERN N, VALE R D. CD47 ligation repositions the inhibitory receptor SIRPα to suppress integrin activation and phagocytosis［J］. *Immunity*, 2020, **53**(2):290-302.

［14］ KIDDER K, BIAN Z, SHI L, *et al*. Inflammation unrestrained by SIRPα induces secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis independent of IFN-γ［J］. *J Immunol*, 2020, **205**(10): 2821-2833.

［15］ HANNCK K, MESSERSCHMIDT K, LISTEK M. Antibodies and selection of monoclonal antibodies［J］. *Adv Exp Med Biol*, 2016, **917**: 11-22.

［16］ JIN S, SUN Y, LIANG X, *et al*. Emerging new therapeutic antibody derivatives for cancer treatment［J］. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, **7**(1): 39.

［17］ 王 敏, 马瑞玉, 李先平, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素C3单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国微生态学杂志, 2014, **26**(2): 134-138.

［18］ 甘雨来. CD47-SIRPα通路在弥漫大B细胞淋巴瘤中的意义探索[D]. 北京协和医学院博士学位论文, 2019.

［19］ 林 燕, 李玉品, 虎崇康, 等. 小鼠可溶性信号调节蛋白α(SIRPα)胞外段蛋白增强巨噬细胞对L1210白血病细胞的吞噬能力[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, **34**(12): 1057-1062.

［20］ YANG H, SHAO R, HUANG H, *et al*. Engineering macrophages to phagocytose cancer cells by blocking the CD47/SIRPα axis［J］. *Cancer Med*, 2019, **8**(9): 4245-4253.