鼠源抗 CD47 单克隆抗体的筛选及活性评价

朱中松[1,2]，赵丽丽[1,2]，张贵民[3]，曹　宇[1,2]，刘　忠[3*]

（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. 鲁南制药集团股份有限公司，山东临沂 276000）

摘要：通过杂交瘤技术筛选得到了一株鼠源抗白细胞分化抗原 47（CD47）单克隆抗体。采用聚乙二醇融合法，将小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞融合，通过酶联免疫吸附试验（ELISA）法筛选抗 CD47 的杂交瘤细胞，通过 Protein G 亲和柱纯化抗体，利用十二烷基磺酸钠（SDS）- 聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）法检测目的蛋白的相对分子质量，通过生物分子相互作用分析仪检测目的抗体的亲和力，并通过 ELISA 法测定抗 CD47 抗体的信号调节蛋白 α（SIRPα）的阻断效力。用藻红蛋白（PE）标记的 Raji 细胞与不同浓度的抗 CD47 单抗共同孵育，检测抗 CD47 抗体促进巨噬细胞吞噬的作用。采用血凝试验对抗 CD47 单抗导致红细胞凝集的能力进行了分析，并进一步通过小鼠实体瘤模型，考察抗 CD47 单抗的抑制肿瘤生长作用。结果显示，筛选得到的一株杂交瘤细胞，即抗 CD47 单克隆抗体 3D8，其亲和力常数值为 1.29×10^{-11} mol/L，ELISA 法测得其半数有效浓度（EC_{50}）值为 0.17 nmol/L，可有效阻断 CD47 与 SIRPα 的相互作用，增强巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力，吞噬率达 85%。该抗体在亲和力、阻断力、吞噬率等方面均优于在售抗体，同时不会导致红细胞凝集。在小鼠实体瘤模型中，肿瘤生长抑制率为 95.44%，可明显抑制肿瘤生长。本研究为后期抗 CD47 抗体的人源化和抗 CD47 抗体的临床前研究提供了参考。

关键词：抗 CD47 单克隆抗体；杂交瘤技术；亲和力；红细胞凝集；抗肿瘤活性

中图分类号：R392-33　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2022）05-0672-07

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.05.012

Screening and Activity Evaluation of Mouse-derived Anti-CD47 Monoclonal Antibody

ZHU Zhongsong[1,2], ZHAO Lili[1,2], ZHANG Guimin[3], CAO Yu[1,2], LIU Zhong[3*]

(*1. Shandong New Time Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 273400; 2. State Engineering Lab. of High Expression of Mammalian Cells, Linyi 273400; 3. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276000*)

ABSTRACT: A mouse-derived cluster of differentiation 47 (CD47) monoclonal antibody was screened by hybridoma technology. The polyethylene glycol fusion method was used to fuse mouse splenocytes with SP2/0 cells, and the anti-CD47 hybridoma cells were screened by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The antibody was purified by Protein G affinity column, and the relative molecular mass of the target protein was detected by sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The affinity of the target antibody was detected by biomolecular interaction analyzer, and the blocking efficacy of signal regulatory protein α (SIRPα) of anti-CD47 antibody was determined by ELISA. Raji cells labeled with phycoerythrin (PE) were incubated with different concentrations of anti-CD47 monoclonal antibody, and the anti-CD47 antibody-promoted phagocytosis of macrophages was detected. The ability of anti-CD47 monoclonal antibody to induce red blood cell agglutination was analyzed by hemagglutination test, and the inhibitory effect of anti-CD47 monoclonal antibody on tumor growth was further investigated by mouse solid tumor model. The results showed that the screened hybridoma cell, anti-CD47 monoclonal antibody 3D8, had an affinity constant value of 1.29×10^{-11} mol/L, and its half effective concentration (EC_{50}) value measured by ELISA was 0.17 nmol/L. It could effectively block the interaction between CD47 and SIRPα, and enhance the ability of macrophages to phagocytose tumor cells, with a phagocytosis rate of 85%. The anti-CD47 monoclonal antibody 3D8 was superior to the commercially available antibody in terms of affinity, blocking power, and phagocytosis rate, and did not cause red

cell agglutination. In a mouse solid tumor model, the tumor growth inhibition rate of the product was 95.44%, indicating that it could significantly inhibit tumor growth. This study provided a reference for the later humanization of anti-CD47 antibody and preclinical research of anti-CD47 antibody.

Key Words: anti-CD47 monoclonal antibody; hybridoma technology; affinity; red cell agglutination; antitumor activity

白细胞分化抗原 47(cluster of differentiation 47，CD47) 又称整合素相关蛋白 (integrin associated protein，IAP)，是免疫球蛋白超家族成员，其结构包括 1 个氨基端细胞外可变区域、由 3 ～ 5 个高度疏水的跨膜片段构成的跨膜区域和 1 个亲水的羧基端胞质尾区 [1]。CD47 广泛表达于各种组织细胞的表面，尤其在肿瘤细胞表面呈高表达，如非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin lymphoma，NHL)、急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia，ALL)、急性骨髓性白血病、卵巢癌、胶质瘤、胶质母细胞瘤等 [2]。MAJETI 等系统研究了多种实体瘤中 CD47 的表达水平，结果表明所有人类实体瘤细胞中的 CD47 都呈高表达，其平均表达水平是对应正常细胞的 3.3 倍左右，实体瘤患者 CD47 的表达水平与预后指数呈负相关 [3]。此外，CD47 在白血病和实体瘤中均被确认为肿瘤干细胞标记。

抗 CD47 单克隆抗体在白血病、淋巴瘤和实体瘤肿瘤动物模型中都表现出良好的治疗效果。已有研究通过体内外试验证实阻断性抗 CD47 单克隆抗体能促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞，从而抑制 ALL 在小鼠体内形成，并消除已在体内迁移成功的 ALL，还可靶向清除白血病干细胞 (leukemia stem cell，LSC) [4]。WILLINGHAM 等用有免疫活性的小鼠建立移植瘤模型，结果表明抗鼠及抗人 CD47 单克隆抗体均可显著抑制肿瘤的生长，并证实抗 CD47 抗体可消除多种实体肿瘤并抑制肿瘤的转移及复发 [5]。此外有研究显示，抗 CD47 单克隆抗体对恶性肿瘤干细胞 (cancer stem cell，CSC) 及其分化亚型也有抑制作用，并能将致瘤性的肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages，TAM) 转变为抗瘤性的效应因子并增强其吞噬作用 [6]。

抗 CD47 抗体也可与其他抗体联合治疗某些疾病，如抗 CD47 抗体联合利妥昔单抗疗法对复发性或难治性 NHL 的治疗效果显著 [7—8]。在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的治疗组中，二者联合治疗的有效率可达 40%，完全缓解率也接近 30%；在滤泡性淋巴瘤的治疗组中，有效率达到 70% [9]，说明抗 CD47 抗体具有良好的抗肿瘤活性。CD47 在几乎所有肿瘤细胞中高表达，可与巨噬细胞表面的信号调节蛋白 α(signal regulatory protein α，SIRPα) 结合并发出信号以逃避免疫监视。因此，破坏肿瘤细胞和巨噬细胞之间 CD47-SIRPα 的相互作用是一种有效的抗肿瘤策略。近年来，抗 CD47 单抗、SIRPα-Fc 融合蛋白以及核酸类药物已成为抗肿瘤新药研发的热点 [10]。

为了提高患者的用药选择性，本研究利用杂交瘤技术，获得一株不与红细胞结合的抗 CD47 抗体，并对获得抗体的理化性质和抗肿瘤作用进行研究，以期为后期抗 CD47 抗体的人源化和抗 CD47 抗体的临床前研究提供参考。

1 仪器与试药

PowerPac Basic 型核酸电泳仪和 Mini-Protean Tetra Cell 型蛋白电泳仪均购于美国 Bio-Rad 公司；Amersham Imager 600 型凝胶成像系统 (美国 GE 公司)；Octet K2 型生物分子相互作用分析仪 (美国 Pall 公司)；FACSCanto Ⅱ型流式细胞仪 (美国 BD 公司)；Neo2 型酶标仪 (美国 BioTek 公司)。

DMEM 培养基 (批号 2085445)、RPMI-1640 培养基 (批号 2191475)、胎牛血清 (FBS，批号 2068801CP) 和青链霉素双抗 (批号 1894149) 均购于美国 Gibco 公司；聚乙二醇 (PEG)2000(批号 RNBF1100)、完全弗氏佐剂 (批号

收稿日期：2021-06-17

作者简介：朱中松 (1984—)，男，硕士，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

SLBR1681V)、不完全弗氏佐剂（批号 SLCB3267)、HAT 培养基添加物（批号 SLBR7249V)、HT 培养基添加物（批号 SLBQ1115V）和 PKH26 试剂盒（批号 MKCK8658）均购于美国 Sigma 公司；辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗鼠 IgG 二抗（美国 Jackson 公司，批号 138730）；CD47-his 蛋白（批号 LC10OC2506）和 CD47-Fc 蛋白（批号 12283-H02H）均购于北京义翘神州科技有限公司；红细胞裂解液（德国 Miltenyi 公司，批号 5190311200）；B6H12 抗体（批号 4291443）和 APC 标记的大鼠抗人 CD11b 抗体（批号 12011281）均购于美国 Invitrogen 公司；牛血清白蛋白（BSA，国药集团化学试剂有限公司，批号 20200407）；HRP 标记的鼠抗 his 抗体（美国 SBA 公司，批号 L0120-S021）；SIRPα-His 蛋白（上海近岸生物技术公司，批号 0331197）；杜氏磷酸盐缓冲液（DPBS，美国康宁公司，批号 21031047）；磷酸盐缓冲液（PBS，北京索莱宝生物技术有限公司，批号 20201216）；3,3',5,5'- 四甲基联苯胺显色液（TMB，博奥龙生物公司，批号 KLA9043896）；其他化学试剂均为分析纯。

BALB/c 小鼠［5 只，雌性，6 ～ 8 周龄，18 ～ 20 g，无特定病原体（SPF）级，实验动物生产许可证编号 SCXK（京）2016-0006，实验动物质量合格证编号 11400700348951］和 NOD/SCID 小鼠［24 只，雌性，7 ～ 8 周龄，18 ～ 20 g，SPF 级，实验动物生产许可证编号 SCXK（京）2016-0006，实验动物质量合格证编号 11400700381943］均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，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。

A20 细胞（ATCC® TIB-208)、SP2/0 细胞（ATCC® CRL-1581）和 Raji 细胞（ATCC® CCL-86）均购于美国模式培养物集存库（ATCC）；去白细胞的悬浮红细胞（由山东省临沂市中心血站提供，编号 0221211412)。

2　方法与结果

2.1　融合杂交瘤细胞

选用 6 ～ 8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 5 只，采用 CD47-his 蛋白进行 4 次免疫注射：首次免疫注射，将 CD47-his 蛋白与完全弗氏佐剂以体积比 1 ∶ 1 混合，待完全乳化后，按每只小鼠 100 μg 的剂量于背部皮下注射；第 2 和第 3 次免疫，将 CD47-his 蛋白与不完全弗氏佐剂以体积比 1 ∶ 1 混合，待完全乳化后，按每只小鼠 50 μg 的剂量于背部皮下注射；选择效价最高的小鼠进行第 4 次加强免疫注射，细胞融合前 3 d 用 CD47-his 蛋白以尾静脉注射的方法进行加强免疫，剂量为 25 μg，并于加强免疫第 4 d 进行融合。采用颈椎脱臼法处死小鼠，用 70％乙醇浸湿消毒，腹部切口，剪开腹膜取脾脏，将脾脏置 DMEM 培养基 8 ml 中，用注射器内芯挤压脾脏，制备脾细胞悬液，用 70 μm 滤网过滤，将细胞转移至 50 ml 离心管中，吹打 3 次，静置 10 min，吸取上清液置另一试管中，加入 DMEM 培养基 30 ml，离心（250×*g*）5 min，弃去上清液，加入 3 倍细胞体积的红细胞裂解液，静置 2 min，离心（250×*g*）5 min，加入 DMEM 培养基 20 ml 清洗 3 遍，进行细胞计数。

将准备好的同系骨髓瘤细胞（SP2/0 细胞）与小鼠脾细胞按一定比例（1 ∶ 5 至 1 ∶ 10）混合，并加入 PEG 2000，于 37 ℃水浴中静置 90 s，在 2 ～ 4 min 内加入无血清 RPMI-1640 培养基 15 ml，离心（250×*g*）10 min，弃去上清液后加 HAT 培养基 35 ml，分装至 96 孔板进行培养。每 3 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 培养基培养，结果显示融合成功的杂交瘤细胞能正常生长，获得杂交瘤细胞母克隆。

2.2　酶联免疫吸附试验（ELISA）法筛选单克隆细胞株

采用 ELISA 法检测“**2.1**”项下 96 孔板中的杂交瘤细胞的培养上清，方法如下。以 CD47-his 蛋白包被酶标板，每孔 100 μl，于 4 ℃包被过夜。弃去包被液，每孔加入含 1% BSA 的 PBST 封闭液（即 PBS+0.01％ Tween-20）200 μl，于 37 ℃封闭 2 h，用 PBST 洗涤 3 次，加杂交瘤细胞培养上清 100 μl，于 37 ℃孵育 1 ～ 2 h。用 PBST 洗涤 3 遍后，加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗，于 37 ℃孵育 1 h。用 PBST 洗涤 3 遍，加 TMB 50 μl 显色 10 min，再加入 2.0 mol/L 硫酸溶液 50 μl 终止显色。用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度（OD_{450}）值。根据检测结果，将具有高吸光度值的杂交瘤细胞进行克隆，通过有限稀释法铺 96 孔板，培养 10 d，在显微镜下挑出单克隆，用 ELISA 和流式细胞术检测，共

获得 4 株能产生高效价单克隆抗 CD47 抗体的杂交瘤细胞克隆 3D8、3D5、1C6 和 3E7，扩大培养上述细胞株并冻存保种。

2.3 抗体的制备及纯化

将“**2.2**”项下的抗 CD47 杂交瘤细胞单克隆细胞株 3D8、3D5、1C6、3E7 转至含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基 100 ml 中扩大培养，并收集细胞培养上清。采用 Protein G 亲和色谱法纯化抗体。首先制备 Protein G 亲和柱，用 PBS（pH 7.4）平衡柱子；将离心（1 500×*g*）10 min 并经 0.4 μm 滤膜过滤的细胞培养上清过柱，然后用 PBS（pH 7.4）洗至 OD_{450} 值接近于零；以 50 mmol/L、pH 3.5 的甘氨酸 - 盐酸缓冲液（50 mmol/L 甘氨酸溶液，用 1 mol/L 盐酸调至 pH 3.5）洗脱，收集峰值区的洗脱液，调至 pH 6.0，得到纯化抗体，于 －20 ℃保存备用。

2.4 目的蛋白的相对分子质量及纯度检测

采用十二烷基磺酸钠（SDS）- 聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）法检测“**2.3**”项下得到的 3D8、3D5、1C6、3E7 抗 CD47 单克隆抗体的相对分子质量及纯度。结果见图 1，4 种抗 CD47 单克隆抗体的轻链约 25 000、重链约 50 000，蛋白灰度扫描法显示纯化的抗体纯度均大于 95%。

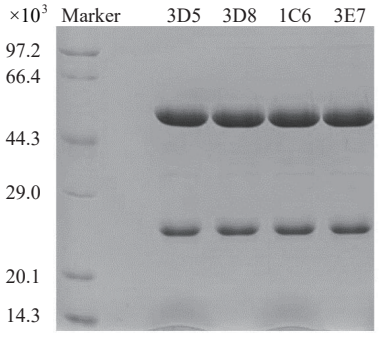


图 1 不同抗 CD47 单抗的 SDS-PAGE 检测结果

Fig.1 SDS-PAGE Detection Results of Different Anti-CD47 Monoclonal Antibodies

2.5 抗体亲和力的测定

用生物分子相互作用分析仪测定 4 种抗 CD47 单克隆抗体和对照抗体 B6H12 的亲和力。用 Protein A 传感器分别固化纯化后的 3D8、3D5、1C6、3E7、B6H12 抗体；将 CD47-his 蛋白自 10 μg/ml 倍比稀释 6 个浓度，与固化抗 CD47 抗体的 Protein A 传感器结合，解离，分别得到结合常数（K_{on}）、解离常数（K_{off}），最后得出 5 种抗体的亲和力常数（*KD*）。结果见表 1，与市售抗体 B6H12 相比，抗体 3D8 具有更高的亲和力，*KD* 值为 1.29×10^{-11} mol/L。

表 1 抗体亲和力的测定结果

Tab.1 Affinity Determination Results of Antibodies

抗体	*KD*/mol·L^{-1}	K_{on}/L·mol^{-1}·s^{-1}	K_{off}/s^{-1}
3D8	1.29×10^{-11}	8.53×10^{5}	1.10×10^{-5}
3D5	4.48×10^{-11}	1.99×10^{6}	3.81×10^{-4}
1C6	2.58×10^{-9}	1.00×10^{5}	2.58×10^{-4}
3E7	6.22×10^{-8}	3.15×10^{4}	1.96×10^{-3}
B6H12	7.16×10^{-9}	6.47×10^{4}	4.63×10^{-4}

2.6 抗体阻断试验

通过 ELISA 法测定抗 CD47 单抗的 SIRPα 阻断效力。将重组 CD47-Fc 融合蛋白倍比稀释 6 个浓度后包被在微孔板上，于 4 ℃反应 12 h。用含 1% BSA 的 PBST 于室温封闭 1 h 后，将 SIRPα-His 融合蛋白加至含有或没有抗 CD47 单抗的微孔中，于室温反应 1 h。用 PBST 连续洗涤微孔板 3 次并加入 HRP 标记的鼠抗 his 抗体，于室温孵育 2 h。用 PBST 洗涤 3 次后，向每个微孔中加入 TMB 50 μl 反应 10 min，并用 2.0 mol/L 硫酸溶液 50 μl 终止反应，用酶标仪测定 OD_{450} 值，计算得抗体 3D8、3D5、1C6、3E7 和 B6H12 的半数有效浓度（EC_{50}）值分别为 0.17、0.70、3.65、1.81、1.80 nmol/L，抗体 3D8 和 3D5 相较于市售抗体 B6H12，均显示出增强的 SIRPα 阻断效力，其中 3D8 抗体的阻断效力最优。

2.7 抗 CD47 单抗促进巨噬细胞吞噬的作用

应用 PKH26 试剂盒将 Raji 细胞染色，使其带有藻红蛋白（PE）荧光，离心（250×*g*）5 min 收集已染色的 Raji 细胞，用含 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基重悬细胞，并调整至所需的细胞密度，加入 3D8、3D5、1C6、3E7、B6H12 抗体和 PBS（对照），于 37 ℃培养箱中共同孵育 1 h。收集巨噬细胞，再用含 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基重悬，并调整至所需的细胞密度，加入到上述 6 种

Raji 细胞的混悬液中，于 37 ℃培养箱中共同孵育 1 h。将 96 孔板离心（250×*g*）5 min，弃去上清后收集所有细胞，每孔加入 1 ∶ 2 000 稀释的 APC 标记大鼠抗人 CD11b 抗体 30 μl 对巨噬细胞进行染色；用流式细胞仪进行分析。结果见图 2，以巨噬细胞本底的吞噬率作为对照，按式①计算各个样品的吞噬率。结果显示，4 个抗 CD47 单克隆抗体和对照抗体 B6H12 的吞噬率分别为 85%、79%、35%、41%、45%，不加抗体的 PBS 对照组吞噬率为 6%，4 个抗 CD47 单克隆抗体均能促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞，其中抗体 3D8 的促吞噬效果最佳，吞噬率达 85%。

2.8　红细胞凝集试验

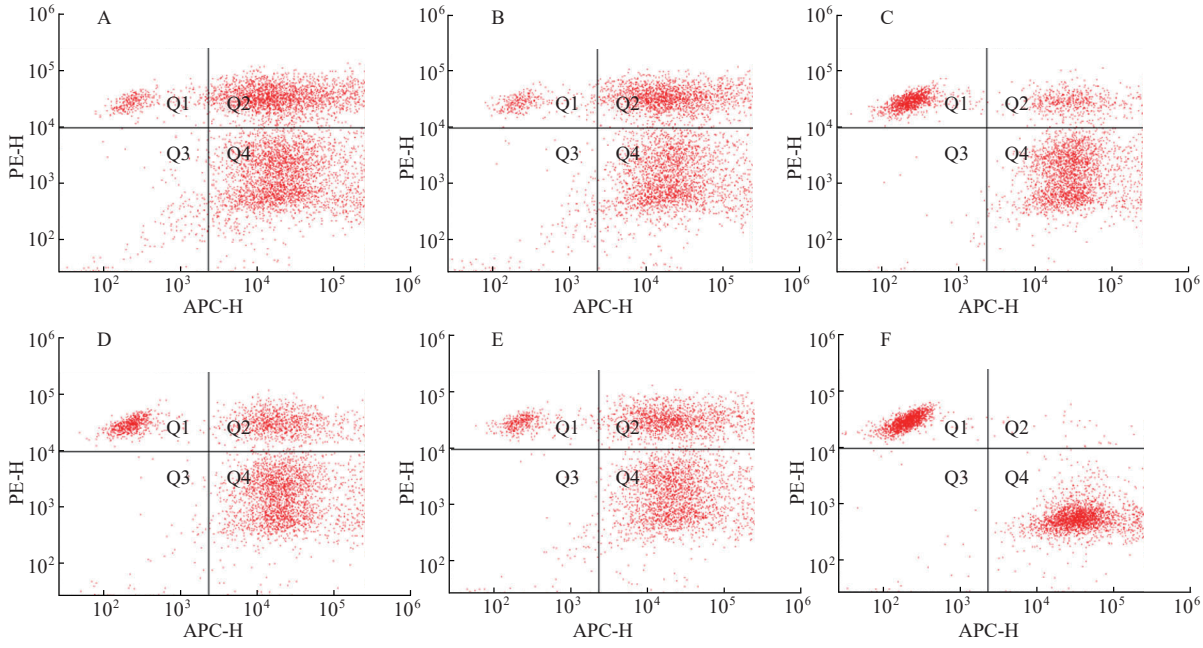
抗 CD47 单抗是否会导致红细胞凝集主要取决于单抗在 CD47 分子上的识别表位。利用经典的血凝试验分析抗 CD47 单抗是否会导致红细胞凝聚。

取去白细胞的悬浮红细胞，温度平衡至室温，用 DPBS 洗涤 2 遍，再用 DPBS 重悬红细胞，离心（200×*g*）10 min 并洗涤沉淀，分离人红细胞。红细胞用 DPBS 洗涤 2 遍后，再用 DPBS 重悬，铺 U 型 96 孔板，分别加入 100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39、0.20、0.10、0.05 μg/ml 的不同抗 CD47 单抗［3D8、3D5、1C6、3E7、B6H12、CC-90002（根据专利报道序列制备[11]，其中国同族 CN 107530421A）］，于 37 ℃、含 5% CO_2 培养箱中静置培养 1 h 后，采用凝胶成像系统拍照，分别用市售抗体 B6H12 和 CC-90002 作为阳性和阴性对照。结果见图 3，可见 3D5、3D8 抗体不引起红细胞凝集，而高浓度 1C6、3E7 抗体会引起红细胞凝集。

2.9　单克隆抗体 3D8 抑制淋巴瘤生长的作用

根据上述研究结果，筛选亲和力、SIRPα 阻断效力、促进巨噬细胞吞噬作用均较好并且不引起

$$\text{吞噬率}=\frac{\text{已发生吞噬的巨噬细胞数(Q2)}}{\text{已发生吞噬的巨噬细胞数(Q2)+未发生吞噬的巨噬细胞数(Q4)}}\times 100\%\qquad \text{式①}$$



A：3D8 抗体，B：3D5 抗体，C：1C6 抗体，D：3E7 抗体，E：B6H12 抗体，F：PBS（对照）

图 2　不同抗 CD47 单抗介导的巨噬细胞对 Raji 细胞的吞噬作用比较

Fig.2　Comparison of Different Anti-CD47 Monoclonal Antibodies Induced Phagocytosis of Raji Cells by Macrophages

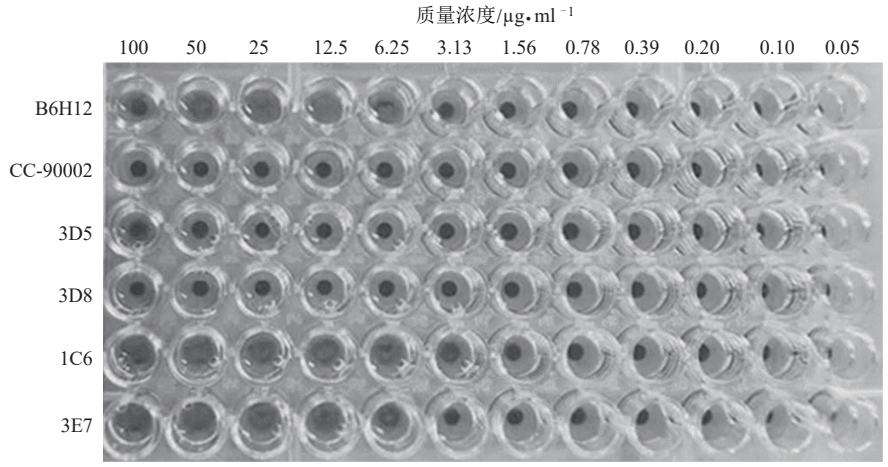


图 3 不同抗体引起的红细胞凝集作用

Fig.3 Red Cell Agglutination Induced by Different Antibodies

红细胞凝集的抗 CD47 单抗 3D8 进行抑瘤作用研究。选取 7 ～ 8 周龄的雌性 NOD/SCID 小鼠共 24 只，收集处于对数生长期的 A20 细胞，用 PBS 调节细胞密度至每毫升 5×10^6 个，每只小鼠右侧背部皮下接种细胞悬液 100 μl。待小鼠肿瘤体积生长至 100 mm^3 时，将小鼠按肿瘤体积和体质量随机分为 4 组，每组 6 只，试验组（3D8）给药剂量分别为 1、3、10 mg/kg，对照组注射相同体积的 PBS，分别腹腔给予相应药物。所有给药组均为每周给药 2 次，给药当天记为 d0，每周用电子游标卡尺测量肿瘤的长径（D）和短径（d），按式②计算肿瘤体积（V），并按式③和④计算各给药组的肿瘤生长抑制率（TGI）。

$$V=[D\times d^2]/2 \qquad 式②$$

$$RTV_n=\frac{V_{nt}}{V_{n0}} \qquad 式③$$

$$TGI=(1-\frac{\text{mean RTV}_{treat}}{\text{mean RTV}_{vehicle}})\times100\% \qquad 式④$$

式中，V_{nt} 表示编号为 n 的小鼠在第 t 天的肿瘤体积；V_{n0} 表示编号为 n 的小鼠 d0 时的肿瘤体积；RTV_{nt} 表示编号为 n 的小鼠在第 t 天的肿瘤相对体积；mean RTV_{treat} 表示给药组 RTV 的平均值；mean $RTV_{vehicle}$ 表示对照组 RTV 的平均值。

结果见图 4，在给药后的 d27，对照（PBS）组的平均肿瘤体积为（1 712.16±256.47）mm^3；3D8 抗体的 3 个剂量组（1、3、10 mg/kg）平均肿瘤体积分别为（771.81±206.46）、（179.76±189.36）和（78.12±64.00）mm^3，TGI 分别为 54.93%、89.5%和 95.44%。所有给药组相对于对照组均有显著性差异（P<0.01），说明抗 CD47 单克隆抗体 3D8 对肿瘤生长具有明显抑制作用。此外，在整个试验过程中，小鼠健康状态良好，无动物死亡，试验结束时，各组小鼠体质量均出现增长（图 5），与 PBS 对照组小鼠体质量相比较无显著性差异（P>0.05）。

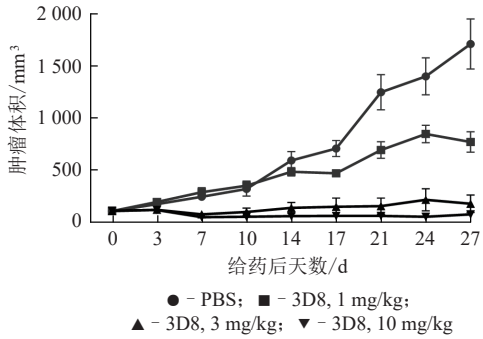


图 4 不同剂量 3D8 抗体的肿瘤生长抑制作用（n=6）

Fig.4 Tumor Growth Inhibition Effects of 3D8 Antibody with Different Dosages (n=6)

3 讨论

CD47 在几乎所有肿瘤细胞中均呈高表达，并与临床愈后密切相关，因此目前抗 CD47 抗体药物

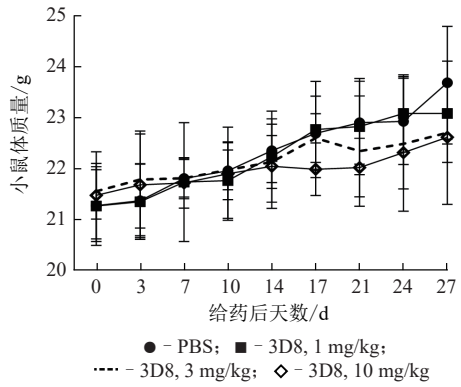


图 5　不同剂量 3D8 抗体导致的小鼠体质量变化（n=6）

Fig.5　Body Weight Changes in Mice Induced by 3D8 Antibody with Different Dosages（n=6）

的研发及应用十分广泛，然而单克隆抗体固有的亲和性和局限的生物活性限制了其应用范围。由于抗 CD47 单抗亲和力低，使得其应用剂量加大，这样不仅会增加企业成本，同时也会增加患者的用药负担。目前在售和在研的抗 CD47 单抗药物多数都存在导致贫血的不良反应。

本研究通过杂交瘤技术筛选获得 4 种抗 CD47 单抗，即 3D8、3D5、1C6、3E7 抗体，并就其亲和力、SIRPα 阻断效力、促进巨噬细胞吞噬作用、肿瘤抑制作用等进行比较，最终获得鼠源的抗 CD47 单克隆抗体 3D8，其抗体纯度 >95%，采用分子相互作用仪测得该抗体的亲和力常数为 1.29×10^{-11} mol/L。本试验中 3D8 抗体亲和力高、阻断效力强、促吞噬作用明显，在高剂量条件下也不会产生溶血现象。同时，小鼠实体瘤试验显示 3D8 抗体在 10 mg/kg 时的肿瘤生长抑制率为 95.44%，显示出较好的抗肿瘤效果。后续研究将对 3D8 抗体进行人源化处理以降低其免疫源性，探讨人源化抗体的体内外的活性，为抗 CD47 单抗申报临床研究做好前期准备。

参考文献：

[1] 王玉树, 周兆平, 苏庆宁. 靶向CD47的抗肿瘤抗体研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志, 2013, **40**(11): 817-820.

[2] WANG Y, XU Z, GUO S, *et al*. SiRNA, CD47, melanoma [J]. *Mol Ther*, 2013, **21**(10): 1919-1929.

[3] MAJETI R, CHAO M P, ALIZADEH A A, *et al*. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells [J]. *Cell*, 2009, **138**(2): 286-299.

[4] RAUH M J, HO V, PEREIRA C, *et al*. Ship represses the generation of alternatively activated macrophages [J]. *Immunity*, 2005, **23**(4): 361-374.

[5] WILLINGHAM S B, VOLKMER J P, GENTLES A J, *et al*. The CD47-signal regulatory protein alpha(SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, **109**: 6662-6667.

[6] LIU L, ZHANG L, YANG L, *et al*. Anti-CD47 antibody as a targeted therapeutic agent for human lung cancer and cancer stem cells [J]. *Front Immunol*, 2017, **8**: 404.

[7] ABRISQUETA P, SANCHO J M, CORDOBA R, *et al*. Anti-CD47 antibody, CC-90002, in combination with rituximab in subjects with relapsed and/or refractory non-Hodgkin lymphoma(R/R NHL) [J]. *Blood*, 2019, **134**(1): 4089-4089.

[8] ADVANI R H, FLINN I, POPPLEWELL L, *et al*. Activity and tolerabilty of the first-in-class anti-CD47 antibody Hu5F9-G4 with rituximab tolerated in relapsed/refractory non-Hodgkin lymphoma: initial phase 1b/2 results [J]. *J Clin Oncol*, 2018, **36**(15): 7504.

[9] ADVANI R, FLINN I, POPPLEWELL L, *et al*. CD47 blockade by hu5F9-G4 and rituximab in non-Hodgkin's lymphoma [J]. *New Engl J Med*, 2018, **379**(18): 1711.

[10] 朱孔黎, 王艳萍, 宋海燕. CD47分子在抗肿瘤免疫中的应用[J]. 中国新药与临床杂志, 2020, **39**(6): 21-27.

[11] SATO A, STAFFORD R, YANG J H. Anti-CD47 antibodies and uses thereof: US, 20170369572A1 [P]. 2017-12-28.