



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110699327 B

(45) 授权公告日 2021.04.13

(21) 申请号 201911050417.8

C12N 15/13 (2006.01)

(22) 申请日 2019.10.31

G01N 33/68 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

G01N 33/577 (2006.01)

申请公布号 CN 110699327 A

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.01.17

C12R 1/91 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:C2019259 2019.10.29

(56) 对比文件

US 20090028872 A1, 2009.01.29

(73) 专利权人 浙江蓝盾药业有限公司

CN 101605906 A, 2009.12.16

地址 312030 浙江省绍兴市柯桥经济开发区西环路586号科技园起航楼2号楼505-506室

王丽萍.CD27-CD70在淋巴细胞中的作用.《国际免疫学杂志》.2008,第31卷(第1期),39-42.

(72) 发明人 郭志刚 黄子祥 杨洋 李梦晗

Karen Silence等.ARGX-110, a highly potent antibody targeting CD70, eliminates tumors via both enhanced ADCC and immune checkpoint blockade.《MAbs》.2014,第6卷(第2期),523-532.

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

(普通合伙) 32204

代理人 杨晓莉

审查员 陈彦闯

(51) Int. Cl.

C12N 5/20 (2006.01)

G07K 16/28 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

序列表4页 附图3页

(54) 发明名称

杂交瘤细胞株6F9、抗体及其应用

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,具体公开了一种杂交瘤细胞株6F9、其产生的抗人CD70单克隆抗体及其应用,本发明是以具有生物活性的人CD70重组蛋白为抗原,通过杂交瘤技术筛选制备得到在细胞水平能高亲和力结合人CD70特异性单克隆抗体,该抗体在肿瘤免疫治疗中具有潜在的价值。

1. 杂交瘤细胞株6F9,其特征在于,该杂交瘤细胞株的保藏编号为CCTCC NO:C2019259。
2. 权利要求1所述杂交瘤细胞株6F9产生的抗人CD70单克隆抗体。
3. 根据权利要求2所述的抗人CD70单克隆抗体,其特征在于,所述抗人CD70单克隆抗体重链恒定区为IgG1亚型,轻链恒定区为Kappa亚型的。
4. 一种编码权利要求2所述抗人CD70单克隆抗体的核酸,其特征在于,其重链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,其轻链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO:9所示。
5. 一种药物组合物,其特征在于,其包含权利要求2或3所述的单克隆抗体。
6. 一种包含权利要求2所述单克隆抗体的检测试剂。

## 杂交瘤细胞株6F9、抗体及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物基因工程抗体技术,特别是涉及一种杂交瘤细胞株6F9、其产生的抗人CD70单克隆抗体及其应用。

### 技术背景

[0002] CD70是II型跨膜糖蛋白,也属TNF家族。人CD70是一个由193个氨基酸组成的三聚体,其中胞膜外的155个氨基酸序列与TNF配体超家族的其他成员具有一定的同源性。细胞因子受体CD27是肿瘤坏死因子受体(TFNR)超家族的成员,其在细胞生长和分化以及凋亡中起作用。CD27的配体是CD70,属于配体的肿瘤坏死因子家族。

[0003] 正常情况下,CD70只瞬时表达在激活的T和B淋巴细胞及成熟的DC细胞表面,在其他非淋巴正常组织或细胞上一般不表达。然而,在许多血液瘤和实体瘤中,CD70组成型表达在肿瘤细胞表面,包括肾细胞癌、转移性乳腺癌、脑肿瘤、白血病、淋巴瘤和鼻咽癌等。CD27主要表达在成熟T淋巴细胞、记忆B淋巴细胞、生发中心B细胞及NK细胞上,在一些血液肿瘤细胞上也表达CD27。CD70与CD27相互作用后,使得CD27胞内段结合TRAF2/5,从而激活NF- $\kappa$ B和c-Jun激酶信号通路,引起细胞增殖、生存和分化等。另外,CD70与CD27结合后也可能使CD27胞内段结合Siva从而引起Caspase介导的细胞凋亡。

[0004] 肿瘤细胞表面组成型表达的CD70主要通过四种可能的机制促进肿瘤的免疫逃逸。1. 增加免疫抑制性调节T细胞数量;2. 诱导T细胞凋亡;3. 诱导T细胞耗竭;4. 促进共表达CD27的肿瘤细胞增殖、生存。基于上述特性,CD70作为抗肿瘤治疗靶点,其主要具有以下三方面优势:1. 较为广泛的适应症;2. 特异性较强,毒性作用较小,适合CART选择靶点;3. CD70抗体可以介导内吞从而成为ADC优秀靶点。目前尚未有针对CD70抗体药上市,基本上都处于不同临床时期,而且以ADC为主。

### 发明内容

[0005] 发明目的:针对上述现有技术,本发明提供了一种杂交瘤细胞株6F9、其产生的抗人CD70单克隆抗体,还提供了所述抗人CD70单克隆抗体的制备方法,以及抗人CD70单克隆抗体的可变区氨基酸序列及核酸序列。本发明还进一步提供了上述单克隆抗体的制药应用。

[0006] 技术方案:本发明所述的杂交瘤细胞株6F9,保藏于中国典型培养物保藏中心,其保藏编号为CCTCC NO:C2019259,地址:武汉市武汉大学,保藏时间:2019年10月29日。

[0007] 本发明所述杂交瘤细胞株6F9产生的抗人CD70单克隆抗体。

[0008] 所述抗人CD70单克隆抗体,其重链可变区的CDRH1为SEQ ID NO:4所示氨基酸序列,CDRH2为SEQ ID NO:6所示氨基酸序列,CDRH3为SEQ ID NO:8所示氨基酸序列;其轻链可变区的CDRL1为SEQ ID NO:12所示氨基酸序列,CDRL2为SEQ ID NO:14所示氨基酸序列,CDRL3为SEQ ID NO:16所示氨基酸序列。

[0009] 进一步的,所述抗人CD70单克隆抗体重链可变区为SEQ ID NO:2所示的氨基酸序

列,其轻链可变区为SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。

[0010] 所述抗人CD70单克隆抗体还包括选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM或IgA亚型的重链恒定区,以及选自Kappa或者Lambda亚型的轻链恒定区。

[0011] 优选的,所述抗人CD70单克隆抗体还包括选自IgG1亚型的重链恒定区,以及选自Kappa亚型的轻链恒定区。

[0012] 本发明还公开了一种编码上述抗人CD70单克隆抗体的核酸,其重链可变区如SEQ ID NO:1所示,其轻链可变区如SEQ ID NO:9所示。

[0013] 进一步的,包含上述抗人CD70单克隆抗体的药物组合物、检测试剂或者试剂盒也在本发明的保护范围内。

[0014] 上述单克隆抗体在制备治疗与CD70表达异常或过量、失控相关疾病的药物中的应用也在本发明的保护范围内。所述疾病包括肿瘤、癌症等。

[0015] 本发明以商品化的具有生物活性的重组人CD70-mFc融合蛋白作为免疫原,免疫Balb/c小鼠,待其血清效价达到融合要求,取其脾细胞与SP2/0-Ag14骨髓瘤细胞进行细胞融合,通过HAT选择性培养基筛选得到能稳定分泌抗人CD70单克隆抗体的杂交瘤细胞株6F9,经亚克隆化及扩大培养后,在分子水平上进行抗体重、轻链可变区基因的调取测序。单克隆抗体可通过将杂交瘤细胞注射至小鼠腹腔,取腹水收集后经硫酸铵沉淀法和Protein G亲和层析柱纯化获得,并对其抗体特性进行鉴定及体外生物活性验证。

[0016] 有益效果:本发明成功制备了杂交瘤细胞株6F9,并通过其产生了抗人CD70单克隆抗体,该抗体特异性好,亲合力高,在细胞水平上可以高亲和力结合人和食蟹猴CD70,该抗人CD70单克隆抗体是肿瘤免疫治疗的潜在药物。

## 附图说明

[0017] 图1:人CD70与食蟹猴CD70过表达CHO-K1稳定细胞系构建中使用的穿梭载体结构示意图,MCS为多克隆位点,靶基因插入此位置;

[0018] 图2:人和食蟹猴CD70过表达稳定细胞株的流式检测结果,图(1)中A柱形图代表CHO-K1母细胞,B柱形图代表人CD70过表达细胞株,图(2)中A柱形图代表CHO-K1母细胞,B柱形图代表食蟹猴CD70过表达细胞株(横坐标为荧光强度,纵坐标为细胞数量);

[0019] 图3:3只免疫小鼠在第3次免疫后第7天抗血清与人CD70重组蛋白间接ELISA反应效价结果(横坐标为抗血清稀释倍数,单位为千,纵坐标为波长450nm下光密度值(OD));

[0020] 图4:3只免疫小鼠在第3次免疫后第7天抗血清与786-0肾癌细胞系结合流式检测结果,A柱形图代表PBS对照组,B、C、D柱形图分别代表#1、#2、#3小鼠抗血清(横坐标为荧光强度,纵坐标为细胞数量);

[0021] 图5:纯化的抗人CD70单克隆抗体变性还原SDS-PAGE电泳结果;

[0022] 图6:抗人CD70单克隆抗体亚型鉴定ELISA检测结果;

[0023] 图7:纯化的抗人CD70单克隆抗体与786-0肾癌细胞系结合流式检测结果,A柱形图代表PBS对照组,B柱形图代表一株商品化小鼠抗人CD70单抗,C柱形图代表本发明中纯化小鼠抗人CD70单抗(横坐标为荧光强度,纵坐标为细胞数量)。

## 具体实施方式

[0024] 下面结合具体实施例对本申请作出详细说明。

[0025] 实施例1:人CD70和食蟹猴CD70过表达CHO-K1稳定细胞系构建

[0026] 1) 穿梭载体构建

[0027] 人源CD70蛋白序列

[0028] NP\_001243 CD70 antigen isoform 1[Homo sapiens]

[0029] MPEEGSGCSVRRRYPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPL ESLGWDVAELQLNHTGP  
QQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPTTLAVGICSPASRSISLLR  
LSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLPSRNTDETFFGVQWVRP

[0030] 21,118Da,193aa,1-17为胞内域,18-38为跨膜螺旋,39-193为胞外域。

[0031] 食蟹猴CD70蛋白序列

[0032] XP\_005587773PREDICTED:CD70 antigen[Macaca fascicularis]

[0033] MNGPRKNEVEREIGRSGGEGLTGNSVAHPRPLPGPSGNHLHPLCELQTGSSWREFPLANRSSPSRPA  
GHPQRGAGWSPDKLRQVDAQEPREGAAVAFLPFPAAALCAPLAPPALAEVIAAAMPPEEGSGCAVRRRYPYACVLRAAVV  
PLVAGLAIICLVVCVQRLSRAQQQLPLESLGWDIAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLRGPELDKGQLRIIRD  
GIYMVHIQVTLAICSSTSTSRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRSLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLPS  
SRNTDETFFGVQWVRP

[0034] 33,971Da,316aa。

[0035] 分别合成编码以上两种蛋白的全基因并克隆至pUC57载体(苏州金唯智),通过限制性内切酶进行酶切酶连将其插入慢病毒过表达载体(如图1)的MCS区。

[0036] 2) 病毒包装质粒制备

[0037] 测序正确的重组质粒,转入克隆菌DH5 $\alpha$ (武汉伯尔)中进行扩增,质粒抽提使用无内毒素质粒大抽试剂盒(武汉伯尔)。提取后,核酸电泳确定分子量大小,同时使用超微量分光光度计评估质粒的质量。A260/A280比例在1.7~1.9,OD260/230比例在>20,浓度高于0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 为高质量质粒。

[0038] 同时,用相同方法制备相应的病毒包装辅助质粒。

[0039] 3) 病毒包装

[0040] 严格参照转染试剂(南京诺唯赞)操作说明,主要流程为当HEK293T细胞(北京北纳)密度达到80%汇合度时加入上述所有质粒和转染试剂进行转染。转染6h后换新鲜培养基,转染后48-72h收集含病毒颗粒的培养液。

[0041] 4) CHO-K1细胞病毒侵染及加压筛选

[0042] 将病毒溶液加入到CHO-K1细胞(北京北纳)中,培养3天后,加入嘌呤霉素(武汉伯尔,工作浓度为2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),继续培养3天(此后细胞培养全部使用含抗生素培养基),传代。

[0043] 5) 单克隆培养

[0044] 将细胞稀释至1个细胞每孔,挑取单克隆细胞,用含工作浓度嘌呤霉素的培养基培养2-3周。传代,并逐级扩大培养至T25细胞培养瓶,保种。

[0045] 6) 流式检测

[0046] 应用商品化小鼠抗人CD70单抗进行间接免疫荧光染色,检测所构建细胞株相对于未转染对照细胞CD70蛋白表达量。间接免疫荧光标记的样品制备方法如下:

[0047] a) 培养细胞用0.25%的胰酶(GIBCO)充分消化(切记消化过度否则易形成絮状)并用PBS轻轻吹打制备单细胞悬液。

[0048] b) 10ml PBS洗涤细胞1次,1000rpm,5min离心,再用1ml PBS悬浮细胞,细胞计数。

[0049] c) 取 $2.5 \times 10^5$ 个细胞于1.5ml离心管中,1ml PBS洗涤细胞1次,2000rpm,5min离心,吸弃上清液。

[0050] d) 加入50 $\mu$ l商品化小鼠抗人CD70单抗(Abcam ab77868,10 $\mu$ g/ml)混匀,置室温下避光反应30min。

[0051] e) 用1ml PBS洗涤细胞1次,2000rpm,5min离心,吸弃上清液。

[0052] f) 加入50 $\mu$ l 20倍稀释的APC标记山羊抗小鼠IGG荧光二抗(R&D SYSTEMS F0101B, 2.5 $\mu$ l/ $2.5 \times 10^5$ )混匀,室温下避光反应20min。

[0053] g) 用1ml PBS洗涤细胞1次,2000rpm,5min离心,吸弃上清液。

[0054] h) 加入200 $\mu$ l PBS重悬成单细胞悬液,用流式细胞仪上机检测。

[0055] 检测结果表明,最终各筛选到一株高表达人CD70和食蟹猴CD70的稳定细胞株,分别如图2中的(1)和(2)所示。

[0056] 实施例2:动物免疫及抗血清ELISA效价与流式细胞术测定

[0057] 选取3只6~8周龄Balb/c小鼠(北京斯贝福)同笼饲养,分别编号#1、#2、#3。首次免疫前4天,每只小鼠通过尾静脉采血约0.05ml,4 $^{\circ}$ C放置半小时,然后10000rpm,4 $^{\circ}$ C离心10min,分离血清作为以后实验阴性对照血清。首次免疫时以重组人CD70-mFc融合蛋白免疫原(Acro Biosystems CDL-H525a)与等体积弗氏完全佐剂(SIGMA)充分混合,超声乳化完全,采取皮下两点和腹腔两点注射,免疫剂量为每只小鼠50 $\mu$ g免疫原,注射体积为0.2ml。分别间隔14天和35天进行第二、第三次免疫,此两次免疫与首次免疫区别在于将弗氏完全佐剂改成弗氏不完全佐剂(SIGMA),同时将免疫剂量调整为25 $\mu$ g。第三次免疫后第7天,每只小鼠通过尾静脉采血约0.05ml,4 $^{\circ}$ C放置半小时,然后10000rpm,4 $^{\circ}$ C离心10min,分离血清检测抗血清ELISA效价和流式细胞术测定。

[0058] 检测抗血清效价时采用间接ELISA方法,其中间接ELISA方法如下:用重组人CD70-hFc融合蛋白(Acro Biosystems TN7-H526x)包被酶标板,0.5 $\mu$ g/ml,50 $\mu$ l/孔,4 $^{\circ}$ C过夜。次日倾去包被液,用0.05%PBST人工洗板3次后,加入0.5%BSA(SIGMA)封闭,200 $\mu$ l/孔,37 $^{\circ}$ C,1h。弃去封闭液,0.05%PBST人工洗板3次后,加入自1:1000开始倍比稀释的上述抗血清共10个稀释度,空白对照为PBS,上述免疫前血清为阴性对照,50 $\mu$ l/孔,37 $^{\circ}$ C,1h。0.05%PBST人工洗板3次后,加入1:20000稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG(Fab)二抗(Jackson ImmunoResearch 115-035-072),50 $\mu$ l/孔,37 $^{\circ}$ C,1h。0.05%PBST人工洗板5次后,加入显色底物TMB(湖州英创),50 $\mu$ l/孔,室温,10min,最后加入1M硫酸终止反应。在酶标仪上读取OD450nm,结果显示3只小鼠的抗血清效价均达到1:256000(如图3),说明使用所述免疫原免疫小鼠产生了能在重组蛋白水平结合人CD70的高亲和力抗体。

[0059] 采用流式细胞术检测抗血清与人细胞膜上CD70结合活性,具体方法参见实施例1中所述间接免疫荧光标记的样品制备方法,此处所使用细胞系为一种人肾癌细胞系786-0(北京北纳),该细胞已验证其细胞膜上高表达CD70。检测结果显示,3只小鼠的抗血清均能结合786-0细胞膜上CD70,而#1小鼠结合活性最高(如图4),说明使用所述免疫原免疫小鼠产生了能在细胞水平结合人CD70的高亲和力抗体。

[0060] 第三次免疫后间隔28天选取与人细胞膜上CD70结合活性最高的#1小鼠进行第四次免疫,此次免疫不使用佐剂,采取尾静脉注射,免疫剂量为25 $\mu$ g免疫原,注射体积为0.2ml。此次免疫间隔4天后进行细胞融合。

[0061] 实施例3杂交瘤单克隆细胞株的制备

[0062] 1. 细胞融合

[0063] 细胞融合采用聚乙二醇法。具体操作如下:

[0064] 1) 融合前一周,复苏SP2/0-Ag14骨髓瘤细胞(北京北纳)。在细胞融合前两天,扩大培养SP2/0-Ag14,使其在融合当天处于对数生长期。

[0065] 2) 进行细胞融合前半小时,预先处理SP2/0-Ag14细胞,重悬SP2/0-Ag14细胞后计数,取2-3 $\times 10^7$ 个细胞置于37 $^{\circ}$ C水浴锅待用。

[0066] 3) 将待融合的小鼠进行心脏取血,同上操作收集血清,保存在-20 $^{\circ}$ C,可做融合后筛选的阳性对照。断颈处死小鼠,浸泡于75%酒精中,转移到细胞房。取脾脏进行研磨,经70 $\mu$ m筛网过滤制成单细胞悬液。

[0067] 4) 将预先处理好的SP2/0-Ag14细胞和脾细胞混合均匀,离心1000rpm $\times$ 5min,弃上清。用无血清的RPMI1640基础培养基(GIBCO)洗涤混合细胞两次,最后一次将上清倾倒在干净。取1ml 37 $^{\circ}$ C预温的PEG1450(SIGMA),缓慢滴加到细胞沉淀上,作用90s,立即加入37 $^{\circ}$ C预温的无血清RPMI1640基础培养基,5分钟内加完,混匀后离心800 $\times$ 5min,细胞沉淀重悬在含HAT(SIGMA)的10%FBS(Royace1)+杂交瘤补充物(ROCHE)-RPMI1640培养基中,均匀铺至96孔板中,80 $\mu$ l/每孔,于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养。

[0068] 5) 融合后定期观察细胞状态。在融合第5~7天,进行换液,即用新鲜含HAT的10%FBS+杂交瘤补充物-RPMI1640培养基换出培养孔板中全部培养基,120 $\mu$ l/每孔,继续培养5~7天。

[0069] 2. 阳性融合细胞的筛选及亚克隆化

[0070] 通过间接ELISA检测各孔中细胞分泌抗体的情况。以重组人CD70-hFc融合蛋白作为ELISA筛选包被抗原,HRP标记的山羊抗小鼠IgG(Fab)二抗作为检测抗体,选择与重组人CD70-hFc融合蛋白反应呈阳性的孔。然后采用流式细胞术检测这些孔中克隆上清分别与人CD70和食蟹猴CD70过表达CHO-K1细胞系结合活性,最终选择了一个与这两个细胞系均有较高结合活性的克隆,显微镜下观察若有成活的杂交瘤细胞或细胞团,进行标记,采用有限稀释法将孔中的细胞进行克隆化,经过两次亚克隆后建立稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并进行扩大培养。杂交瘤细胞株命名为6F9,保藏于中国典型培养物保藏中心,其保藏编号为CCTCC N0:C2019259,地址:武汉市武汉大学,保藏时间:2019年10月29日。

[0071] 实施例4抗人CD70单克隆抗体的制备及纯化

[0072] 1. 腹水制备

[0073] 分别取3只10~16周龄balb/c雌鼠(北京斯贝福),每只小鼠提前12~18天腹腔左右各注射0.25ml腹水制备佐剂(北京博奥龙)。取生长对数期杂交瘤细胞计数,取6 $\times 10^6$ 个细胞用10ml无菌PBS洗两次,离心时用1000rpm,5min,最终用无菌PBS调整细胞浓度至2 $\times 10^6$ 个/ml,然后给上述小鼠腹腔左右各注射0.5ml细胞悬液并按摩腹部使细胞分布均匀。约10~14天后小鼠腹部明显隆起并开始收集腹水,一般隔天收集一次,共收集三次。每次收集好腹水,2000rpm离心5min后收集上清(用移液枪尽量吸走最上层油脂),短时间保存在4 $^{\circ}$ C,长

时间保存在-20℃。

[0074] 2. 抗体纯化

[0075] 1) 取上述保存腹水14000rpm离心10min,除去细胞碎片和颗粒杂质。

[0076] 2) 转移上清液并用滤纸过滤,收集滤出液并测量体积。

[0077] 3) 边搅拌边慢慢加入等体积的饱和硫酸铵到滤出液中,终浓度为1:1。

[0078] 4) 将溶液放在磁力搅拌器上室温温和搅拌2小时再分装至高速离心管4℃静置过夜,使蛋白质充分沉淀。

[0079] 5) 第二天取出直接10000rpm离心30min,弃上清保留沉淀晾干。

[0080] 6) 加入0.5倍滤出液体积的PBS溶解沉淀,然后超滤离心脱盐浓缩。

[0081] 7) 加入滤出液两倍体积的结合缓冲液稀释浓缩液,并用0.45μm滤膜过滤。

[0082] 8) 收集滤出液用protein G预装柱(常州天地人和)按照厂家说明书进行亲和纯化。

[0083] 9) 收集洗脱液用截留分子量为50KD的超滤离心管(Millipore)进行脱盐浓缩。

[0084] 3. 抗体浓度及纯度测定

[0085] 脱盐浓缩后的抗体采用Bradford法测定抗体浓度,并用SDS-PAGE电泳初步鉴定抗体纯度(如图5)。

[0086] 实施例5抗人CD70单克隆抗体的特性鉴定

[0087] 1. 抗体亚型的鉴定

[0088] 采用Mouse单克隆抗体亚型鉴定试剂盒(Proteintech)鉴定得到的抗人CD70单克隆抗体的亚型,酶标板上预包被了针对小鼠IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3、IgM、kappa light chain、lambda light chain的特异性抗体,具体实验操作见试剂盒说明书。结果如图6,我们得到的抗人CD70单克隆抗体的重链亚型为IgG1,轻链亚型为Kappa。

[0089] 本发明的抗体可以作为其他同型重组表达,例如IgG2, IgG3, IgG4, IgM和IgA。

[0090] 2. 流式细胞术检测抗体与细胞膜上CD70的反应性

[0091] 选择细胞表面高表达CD70的细胞系786-0,参照实施例1中所述间接免疫荧光标记的样品制备方法,采用流式细胞术检测纯化的抗人CD70单克隆抗体与细胞膜上CD70结合情况。如图7结果表明,我们得到的抗人CD70单克隆抗体能以优于对照商品化抗体的亲和力结合细胞膜上CD70。

[0092] 实施例6杂交瘤细胞株重轻链可变区基因的克隆

[0093] 1. 抗人CD70单克隆抗体重轻链可变区基因提取、扩增及初步鉴定

[0094] 实施例3中阳性杂交瘤细胞株扩大培养后,收集对数生长期的细胞,使用Novagen鼠源抗体可变区基因克隆的整套试剂并按照其说明书对本发明中所述抗体的重轻链可变区基因进行克隆测序。具体方法路线为:使用Straight A's™ mRNA Isolation Kits从收集杂交瘤细胞株中分离总RNA,然后使用First Strand cDNA Synthesis Kit和Ig-3' constant region primer合成第一条cDNA链,接着使用Ig-5' primers和NovaTaq DNA Polymerase以第一条cDNA链为模板进行PCR扩增,得到的PCR扩增产物使用Vector Cloning Kit克隆到克隆载体中,并进行筛选,分离DNA进行基因测序。

[0095] 2. 抗人CD70单克隆抗体重轻链可变结构域的基因测序及分析

[0096] 在GenBank中,比对测序结果与小鼠抗体核酸序列,结果显示该抗体的轻链和重链

的可变区序列与提交的小鼠IgG可变区序列的同源性超过95%，确定测序得到的基因序列为小鼠抗体序列。利用IMGT/V-QUEST与ABYSSIS软件分析得到抗体轻链和重链可变区的氨基酸序列及CDR区、FR区的划分。分析结果表明：

[0097] 杂交瘤细胞株抗体重链可变结构域VH的核苷酸序列和氨基酸序列如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示；杂交瘤细胞株抗体轻链可变结构域VL的核苷酸序列和氨基酸序列如SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10所示；重链可变结构域VH依次包含高变区CDRH1、CDRH2和CDRH3，所述的核苷酸序列依次为SEQ ID NO:3、5、7，氨基酸序列依次为SEQ ID NO:4、6、8；轻链可变结构域VL依次包含高变区CDRL1、CDRL2和CDRL3，所述的核苷酸序列依次为SEQ ID NO:11、13、15，氨基酸序列依次为SEQ ID NO:12、14、16。

[0098] 抗体可变区核酸及氨基酸序列如下：

[0099] SEQ ID N01：

[0100] CAGGTGCAGCTGAATCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGACCCTGTCCATCACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAACCACCTATGGTGTACACTGGATTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGAGTGATATGGAGTGGTGAAGCACAGACTATGACACTACTTTCATATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAGCTCCAGAGCCAAGTTTTCTTTAAATAAACAGTCTGCAAGCTGATGACACAGCCATGTACTACTGTGCCAGAAATACCTACTATGGTAACCTTTATGCTTTGGACTATTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0101] SEQ ID N02：

[0102] QVQLNQSGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTTYGVHWIRQPPGKGLEWLGIWSSGSTDYDTTFISRLSIKSDSSKSVFFKINSLQADDTAMYYCARNTYYGNLYALDYWGQGTSTVTVSS

[0103] SEQ ID N03：

[0104] ACCTATGGTGTACAC

[0105] SEQ ID N04：

[0106] TYGVH

[0107] SEQ ID N05：

[0108] GTGATATGGAGTGGTGAAGCACAGACTATGACACTACTTTCATATCC

[0109] SEQ ID N06：

[0110] VIWSSGSTDYDTTFIS

[0111] SEQ ID N07：

[0112] AATACCTACTATGGTAACCTTTATGCTTTGGACTAT

[0113] SEQ ID N08：

[0114] NTTYGNLYALDY

[0115] SEQ ID N09：

[0116] GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGTTGTATCTCTGGGGCAGGGGCCACCATCTCTTGC AAGGCCAGCGAAAGTGTGAGTGCATCTGGCTATAGTTTTATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAA ACTCCTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGAACTCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT TCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGTTTCCGCTC ACGTTCGGTGCAGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0117] SEQ ID N010：

[0118] DIVLTQSPASLVVSLGQGATISCKASESVSASGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGS

GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPLTFGAGTKLELK

[0119] SEQ ID N011:

[0120] AAGGCCAGCGAAAGTGTCAGTGCATCTGGCTATAGTTTTATGCAC

[0121] SEQ ID N012:

[0122] KASESVSASGYSFMH

[0123] SEQ ID N013:

[0124] CTTGCATCCAACCTAGAATCT

[0125] SEQ ID N014:

[0126] LASNLES

[0127] SEQ ID N015:

[0128] CAGCACAGTAGGGAGTTTCCGCTCAGG

[0129] SEQ ID N016:

[0130] QHSREFPLT

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 浙江蓝盾药业有限公司
- [0003] <120> 杂交瘤细胞株6F9、抗体及其应用
- [0004] <160> 16
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 351
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] cagatccagt tggatgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
- [0012] tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca gactattcaa tgcactgggt gaagcaggct 120
- [0013] ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacactg agactggtga gccaacatat 180
- [0014] gcagatgact tcaagggacg gtttgccctc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat 240
- [0015] ttgcagatca acaacctcaa aatgaggac acggctacat atttctgtgc tatagacccc 300
- [0016] ataaggtact tcgatgtctg gggcgcaggg accacgggtca cegtctcctc a 351
- [0017] <210> 2
- [0018] <211> 117
- [0019] <212> PRT
- [0020] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0021] <400> 2
- [0022] Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
- [0023] 1                    5                    10                    15
- [0024] Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
- [0025]                    20                    25                    30
- [0026] Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
- [0027]                    35                    40                    45
- [0028] Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
- [0029]                    50                    55                    60
- [0030] Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
- [0031] 65                    70                    75                    80
- [0032] Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
- [0033]                    85                    90                    95
- [0034] Ala Ile Asp Pro Ile Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
- [0035]                    100                    105                    110
- [0036] Val Thr Val Ser Ser
- [0037]                    115
- [0038] <210> 3

[0039] <211> 15  
 [0040] <212> DNA  
 [0041] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0042] <400> 3  
 [0043] gactattcaa tgcac 15  
 [0044] <210> 4  
 [0045] <211> 5  
 [0046] <212> PRT  
 [0047] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0048] <400> 4  
 [0049] Asp Tyr Ser Met His  
 [0050] 1 5  
 [0051] <210> 5  
 [0052] <211> 51  
 [0053] <212> DNA  
 [0054] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0055] <400> 5  
 [0056] tggataaaca ctgagactgg tgagccaaca tatgcagatg acttcaaggg a 51  
 [0057] <210> 6  
 [0058] <211> 17  
 [0059] <212> PRT  
 [0060] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0061] <400> 6  
 [0062] Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys  
 [0063] 1 5 10 15  
 [0064] Gly  
 [0065] <210> 7  
 [0066] <211> 24  
 [0067] <212> DNA  
 [0068] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0069] <400> 7  
 [0070] gaccccataa ggtacttcca tgtc 24  
 [0071] <210> 8  
 [0072] <211> 8  
 [0073] <212> PRT  
 [0074] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0075] <400> 8  
 [0076] Asp Pro Ile Arg Tyr Phe Asp Val  
 [0077] 1 5

[0078] <210> 9  
 [0079] <211> 321  
 [0080] <212> DNA  
 [0081] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0082] <400> 9  
 [0083] gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60  
 [0084] atcacatgtc gagcaagtgg gaatattcac aattatntag catggtatca gcagaaacag 120  
 [0085] ggaaaatctc ctcagctcct ggtctataat gcaaaaacct tagcagatgg tgtgccatca 180  
 [0086] aggttcagtg gcagtgatc aggaacacaa tattctctca agatcaacag cctgcagcct 240  
 [0087] gaagatdddg ggagttatta ctgtcaacat tdddggagta ctccattcac gttcggctcg 300  
 [0088] gggacaaagt tggaaataaa a 321  
 [0089] <210> 10  
 [0090] <211> 107  
 [0091] <212> PRT  
 [0092] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0093] <400> 10  
 [0094] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0095] 1 5 10 15  
 [0096] Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
 [0097] 20 25 30  
 [0098] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val  
 [0099] 35 40 45  
 [0100] Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [0101] 50 55 60  
 [0102] Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro  
 [0103] 65 70 75 80  
 [0104] Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Phe  
 [0105] 85 90 95  
 [0106] Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0107] 100 105  
 [0108] <210> 11  
 [0109] <211> 33  
 [0110] <212> DNA  
 [0111] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0112] <400> 11  
 [0113] cgagcaagtg ggaatattca caattattta gca 33  
 [0114] <210> 12  
 [0115] <211> 11  
 [0116] <212> PRT



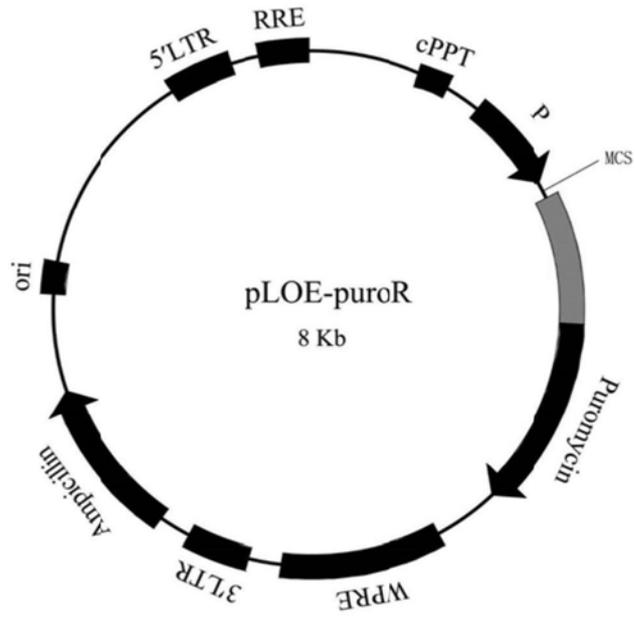


图1

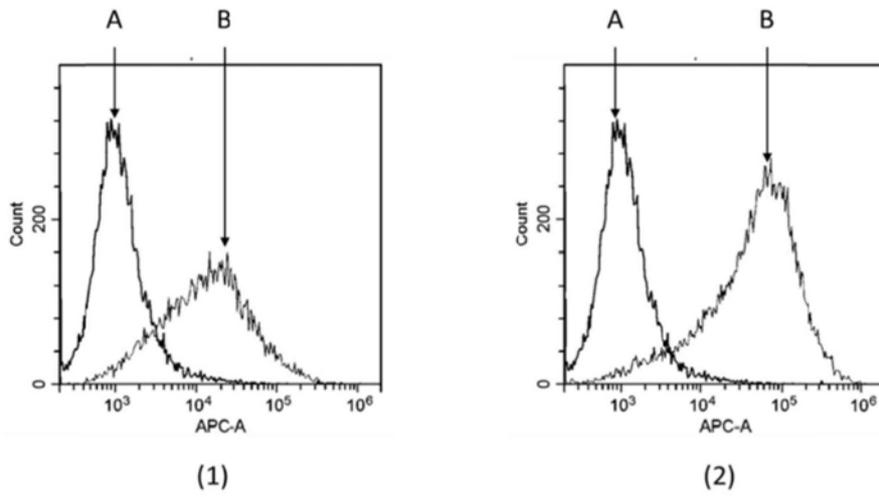


图2

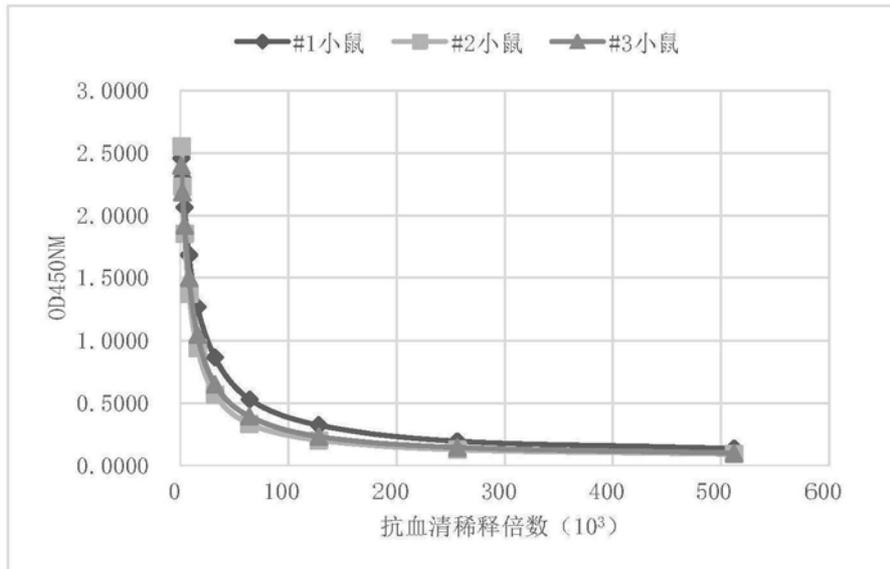


图3

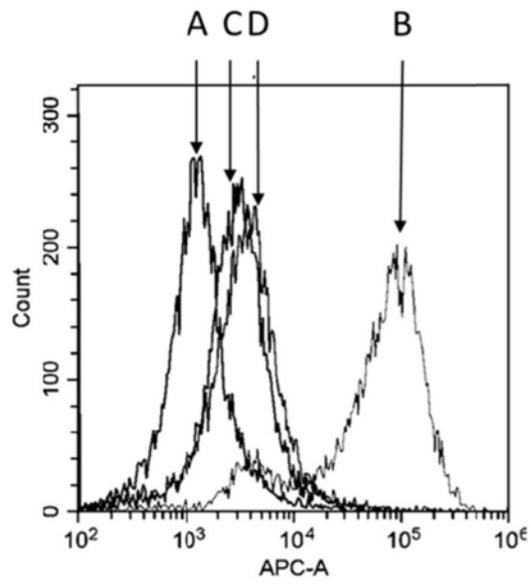


图4

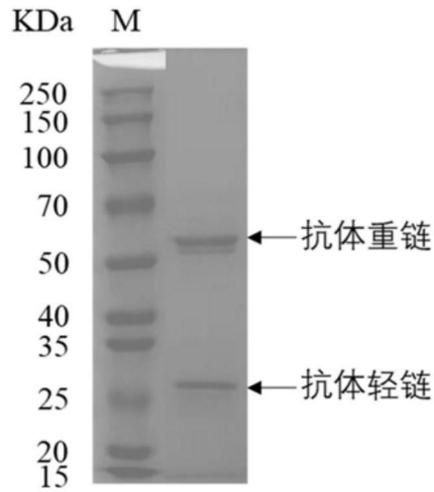


图5

抗体亚型	OD450nm
<b>IgG1</b>	<b>1.5074</b>
<b>IgG2a</b>	<b>0.0739</b>
<b>IgG2b</b>	<b>0.0531</b>
<b>IgG2c</b>	<b>0.0515</b>
<b>IgG3</b>	<b>0.0495</b>
<b>IgM</b>	<b>0.0546</b>
<b>Kappa</b>	<b>0.7239</b>
<b>Lambda</b>	<b>0.0617</b>

图6

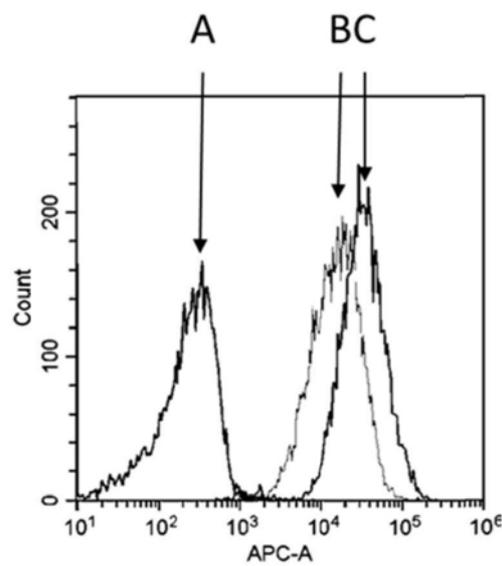


图7