



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116063523 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 05

(21) 申请号 202211408138.6

A61K 39/395 (2006.01)

(22) 申请日 2022.11.10

A61P 35/02 (2006.01)

(71) 申请人 博生吉安科细胞技术有限公司

地址 230000 安徽省合肥市高新区孔雀台路99号国家健康大数据产业园B2栋

(72) 发明人 杨林 夏善伟 汪敏 游风涛 夏金鑫

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司 11332

专利代理师 陈小龙

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

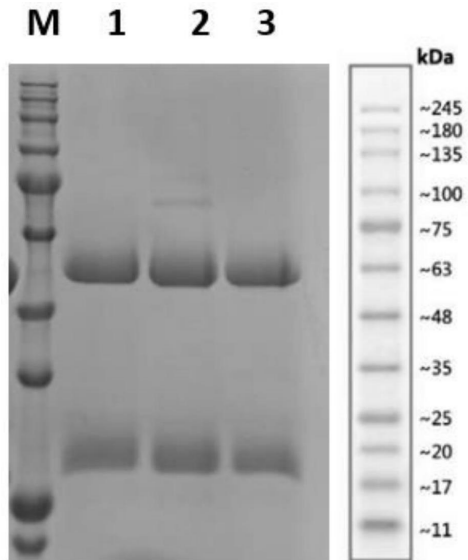
权利要求书1页 说明书9页  
序列表(电子公布) 附图9页

(54) 发明名称

一种识别CD7-CAR分子的单克隆抗体及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种识别CD7-CAR分子的单克隆抗体及其应用,所述单克隆抗体的重链CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:35所示;所述单克隆抗体的轻链CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:42所示,本发明所述识别CD7-CAR分子的单克隆抗体能够特异性识别CD7-CAR-T细胞上CD7-CAR分子,与其他分子无交叉反应;所述识别CD7-CAR分子的单克隆抗体与CD7-CAR分子的结合活性高,且对CD7-CAR-T细胞CAR转染阳性率检测的流式分析方法进行开发和全面方法学验证,能准确、特异、灵敏地检测CD7-CAR分子转染效率。



1. 一种识别CD7-CAR分子的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体的重链CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:35所示;

所述单克隆抗体的轻链CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:28或SEQ IDNO:42所示。

2. 根据权利要求1所述的识别CD7-CAR分子的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体的重链CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:33所示;

优选地,所述单克隆抗体的重链CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:34所示。

3. 根据权利要求1或2所述的识别CD7-CAR分子的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体的轻链CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:40所示;

优选地,所述单克隆抗体的轻链CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:41所示。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的识别CD7-CAR分子的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:29所示。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的识别CD7-CAR分子的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体的轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:36所示。

6. 一种核酸分子,其特征在于,所述核酸分子编码权利要求1-5中任一项所述的识别CD7-CAR分子的单克隆抗体。

7. 权利要求1-5中任一项所述的识别CD7-CAR分子的单克隆抗体在检测CD7-CAR-T细胞的CAR分子中的用途。

8. 一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包括权利要求1-5中任一项所述的识别CD7-CAR分子的单克隆抗体;

所述药物组合物还包括药学上可接受的载体和/或稀释剂。

9. 一种用于检测样品中CD7-CAR分子的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括权利要求1-5中任一项所述的识别CD7-CAR分子的单克隆抗体。

10. 权利要求9所述的用于检测样品中CD7-CAR分子的试剂盒在抗药抗体水平的测定中的应用。

## 一种识别CD7-CAR分子的单克隆抗体及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种识别CD7-CAR分子的单克隆抗体及其应用。

### 背景技术

[0002] T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)是一种高度异质性的血液系统恶性肿瘤,大约占成人急性淋巴细胞白血病病例的25%和儿童急性淋巴细胞白血病病例的15%左右。人CD7分子是一个分子量约40kDa细胞表面糖蛋白,CD7分子属于免疫球蛋白超家族中的一员。CD7分子在大多数的T细胞血液肿瘤细胞上是高表达的。因此,CD7分子可能是一个针对T细胞血液肿瘤的非常合适的治疗靶点。

[0003] CN113933513A公开了一种检测靶向治疗后急性T淋巴细胞白血病的试剂组合物及其应用,具体为一种用于流式细胞术检测靶向治疗后急性T淋巴细胞白血病的试剂组合物,包括第一组抗体、第二组抗体和第三组抗体,第一组抗体包括抗CD99抗体、抗CD1a抗体、抗CD34抗体、抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD5抗体、抗CD8抗体、抗CD7抗体、抗CD45抗体、抗CD2抗体;第二组抗体包括抗CD3抗体、抗CD7抗体、抗CD16抗体、抗CD56抗体、抗CD45抗体;第三组抗体包括抗胞核TdT抗体、抗胞浆CD3抗体。所述的试剂组合物可用于流式细胞术检测靶向治疗后急性T淋巴细胞白血病,降低漏诊概率,还可同时进行免疫评价。

[0004] 本领域技术人员开发了CD7-CAR-T细胞靶向治疗T细胞急性淋巴细胞白血病的方法,但是,目前已公开的抗CD7抗体只能识别特定的CD7抗体,无法准确检测CAR转染效率,因此,提供一种能够准确检测CAR转染效率的单克隆抗体,在靶向治疗T细胞急性淋巴细胞白血病中具有重要的意义。

### 发明内容

[0005] 针对现有技术存在的不足,本发明的目的在于提供一种识别CD7-CAR分子的单克隆抗体及其应用。本发明所述识别CD7-CAR分子的单克隆抗体能够特异性识别CD7-CAR-T细胞上CD7-CAR分子,与其他分子无交叉反应;所述识别CD7-CAR分子的单克隆抗体与CD7-CAR分子的结合活性高,能准确检测CAR转染效率。

[0006] 为达到此发明目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 第一方面,本发明提供一种识别CD7-CAR分子的单克隆抗体,所述单克隆抗体的重链CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:35所示;

[0008] 所述单克隆抗体的轻链CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:42所示。

[0009] 优选地,所述单克隆抗体的重链CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:33所示。

[0010] 优选地,所述单克隆抗体的重链CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:34所示。

[0011] 优选地,所述单克隆抗体的轻链CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:40所示。

[0012] 优选地,所述单克隆抗体的轻链CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:41所示。

[0013] 优选地,所述单克隆抗体的重链FR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:30所示。

[0014] 优选地,所述单克隆抗体的重链FR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:31所示。

[0015] 优选地,所述单克隆抗体的重链FR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:32所示。

[0016] 优选地,所述单克隆抗体的轻链FR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:37所示。

[0017] 优选地,所述单克隆抗体的轻链FR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:38所示。

[0018] 优选地,所述单克隆抗体的轻链FR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:39所示。

[0019] 优选地,所述单克隆抗体的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:29所示。

[0020] 优选地,所述单克隆抗体的轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:36所示。

[0021] 本发明中,所述识别CD7-CAR分子的单克隆抗体是针对CD7-CAR分子表位的抗体,本发明中提供了三个单克隆抗体,分别为10-B5-E7-B4、10-B8-E7-F11和6-H2-D6-D9。其中,10-B5-E7-B4对应的单克隆抗体的重链可变区的氨基酸和轻链可变区的氨基酸的序列为:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:8;10-B8-E7-F11对应的单克隆抗体的重链可变区的氨基酸和轻链可变区的氨基酸的序列为:SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:22;6-H2-D6-D9对应的单克隆抗体的重链可变区的氨基酸和轻链可变区的氨基酸的序列为:SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:36。

[0022] 本发明首先用CHO-K1-GeneD重组细胞株免疫小鼠,取小鼠外周血进行免疫效价检测。选取免疫效价最好的小鼠,使用纯化的GeneD重组蛋白进行冲击免疫,免疫三天后分离小鼠脾脏进行杂交瘤融合,生成杂交瘤细胞,再筛选合适的杂交瘤细胞,进行相应的克隆。

[0023] 此外,本领域技术人员还可很方便地获知本发明的抗体的结构(比如抗体的重链可变区和轻链可变区),然后可通过重组方法来制备本发明的单克隆抗体。本发明中的抗体能够特异性识别CD7-CAR-T细胞上CD7-CAR分子,这种特异性的抗体可以被拿来用于检测CD7-CAR-T细胞的转染效率。

[0024] 第二方面,本发明提供一种核酸分子,所述核酸分子编码第一方面所述的识别CD7-CAR分子的单克隆抗体。

[0025] 优选地,编码单克隆抗体10-B5-E7-B4的重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:43所示;编码单克隆抗体10-B5-E7-B4的轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:44所示。

[0026] 优选地,编码单克隆抗体10-B8-E7-F11的重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:

45所示;编码单克隆抗体10-B8-E7-F11的轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:46所示。

[0027] 优选地,编码单克隆抗体6-H2-D6-D9的重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:47所示;编码单克隆抗体6-H2-D6-D9的轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:48所示。

[0028] 第三方面,本发明提供第一方面所述的识别CD7-CAR分子的单克隆抗体在检测CD7-CAR-T细胞的CAR分子中的用途。

[0029] 第四方面,本发明提供一种药物组合物,所述药物组合物包括第一方面所述的识别CD7-CAR分子的单克隆抗体;

[0030] 优选地,所述药物组合物还包括药学上可接受的载体和/或稀释剂。

[0031] 第五方面,本发明提供一种用于检测样品中CD7-CAR分子的试剂盒,所述试剂盒包括第一方面所述的识别CD7-CAR分子的单克隆抗体。

[0032] 第六方面,本发明提供第五方面所述的用于检测样品中CD7-CAR分子的试剂盒在抗药抗体水平的测定中的应用。

[0033] 本发明中涉及的氨基酸序列如表1所示:

[0034] 表1

抗体	重链/轻链可变区序列 (SEQ ID NO:)		FR1 (SEQ ID NO:)	CDR1 (SEQ ID NO:)	FR2 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	FR3 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
	10-B5-E7-B4	重链	1	2	5	3	6	4
轻链		8	9	12	10	13	11	14
10-B8-E7-F11	重链	15	16	19	17	20	18	21
	轻链	22	23	26	24	27	25	28
6-H2-D6-D9	重链	29	30	33	31	34	32	35
	轻链	36	37	40	38	41	39	42

[0036] 以下氨基酸序列中下划线的序列表示CDR区;

[0037] (1) GeneD(10-B5-E7-B4)

[0038] 重链可变区氨基酸序列:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,如SEQ ID NO:1所示:

[0039] QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSTYWIEWIKQRPGHGLEWIGEILHGSATNYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGAYPYAMDYWGQGTSTVTVSS。

[0040] SEQ ID NO:2(重链FR1)

[0041] QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFS。

[0042] SEQ ID NO:3(重链FR2)

[0043] WIKRPHGLEWIG。

[0044] SEQ ID NO:4(重链FR3)

[0045] KATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR。

[0046] SEQ ID NO:5(重链CDR1)

[0047] TYWIE。

[0048] SEQ ID NO:6(重链CDR2)

[0049] EILHGSATNYNEKFKG。

[0050] SEQ ID NO:7(重链CDR3)

- [0051] GAYPYAMDY。
- [0052] 轻链可变区氨基酸序列:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,如SEQ ID NO:8所示:
- [0053] DIVMTQSTSSLSASLGDRVTISCRSSQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLRTFGGGTKLEIK。
- [0054] SEQ ID NO:9(轻链FR1)
- [0055] DIVMTQSTSSLSASLGDRVTISC。
- [0056] SEQ ID NO:10(轻链FR2)
- [0057] WYQQKPDGTVKLLIY。
- [0058] SEQ ID NO:11(轻链FR3)
- [0059] GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC。
- [0060] SEQ ID NO:12(轻链CDR1)
- [0061] RSSQDINNYLN。
- [0062] SEQ ID NO:13(轻链CDR2)
- [0063] YTSRLHS。
- [0064] SEQ ID NO:14(轻链CDR3)
- [0065] QQGNTLRT。
- [0066] (2) GeneD(10-B8-E7-F11)
- [0067] 重链可变区氨基酸序列:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,如SEQ ID NO:15所示:
- [0068] EVLLQQSGPELIKHGAPVKITCKASGYTFTDYNMDWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTIYNQKFKGKVTLTVDKFSSTAYMELRSLTAEDTAVYFCARSGYYRYAMDYWGQGTSVTVSS。
- [0069] SEQ ID NO:16(重链FR1)
- [0070] EVLLQQSGPELIKHGAPVKITCKASGYTFT。
- [0071] SEQ ID NO:17(重链FR2)
- [0072] WVKQSHGKSLEWIG。
- [0073] SEQ ID NO:18(重链FR3)
- [0074] KVTLTVDKFSSTAYMELRSLTAEDTAVYFCAR。
- [0075] SEQ ID NO:19(重链CDR1)
- [0076] DYNMD。
- [0077] SEQ ID NO:20(重链CDR2)
- [0078] DINPNNGGTIYNQKFKG。
- [0079] SEQ ID NO:21(重链CDR3)
- [0080] SGYYRYAMDY。
- [0081] 轻链可变区氨基酸序列:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,如SEQ ID NO:22所示:
- [0082] DIQMTQSPSSLSASLGQVVTITCKASQDINKYVAWYQHKGPKGLRRLIHYSSTLQPGIIPSRFSGSGSGRDYFSSIRNLEPEDIATYYCLQYDNFLRTFGGGTKLEIK。
- [0083] SEQ ID NO:23(轻链FR1)

- [0084] DIQMTQSPSSLSASLGGNVTITC。
- [0085] SEQ ID NO:24(轻链FR2)
- [0086] WYQHKPGKGLRRLIH。
- [0087] SEQ ID NO:25(轻链FR3)
- [0088] GIPSRFSGSGSGRDYSFSIRNLEPEDIATYYC。
- [0089] SEQ ID NO:26(轻链CDR1)
- [0090] KASQDINKYVA。
- [0091] SEQ ID NO:27(轻链CDR2)
- [0092] YSSTLQP。
- [0093] SEQ ID NO:28(轻链CDR3)
- [0094] LQYDNFLRT。
- [0095] (3) GeneD (6-H2-D6-D9)
- [0096] 重链可变区氨基酸序列:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,如SEQ ID NO:29所示:
- [0097] EVLLQQSGPELIKHGAPVKITCKASGYTFTDYNMDWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTIYNQKFKGKV  
TLTVDKFSSTAYMELRSLTAEDTAVYFCARSGYYRYAMDYWGQGTSVTVSS。
- [0098] SEQ ID NO:30(重链FR1)
- [0099] EVLLQQSGPELIKHGAPVKITCKASGYTFT。
- [0100] SEQ ID NO:31(重链FR2)
- [0101] WVKQSHGKSLEWIG。
- [0102] SEQ ID NO:32(重链FR3)
- [0103] KVTLTVDKFSSTAYMELRSLTAEDTAVYFCAR。
- [0104] SEQ ID NO:33(重链CDR1)
- [0105] DYNMD。
- [0106] SEQ ID NO:34(重链CDR2)
- [0107] DINPNNGGTIYNQKFKG。
- [0108] SEQ ID NO:35(重链CDR3)
- [0109] SGYYRYAMDY。
- [0110] 轻链可变区氨基酸序列:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,如SEQ ID NO:36所示:
- [0111] DIVMTQSPSSLSASLGGNVTITCKASQDINKYVAWYQHKPGKGLRRLIHYSSTLQPGIPSRFSGSGSG  
RDYSFSVRNLEPEDIATYYCLQYDNFLRTFGGGTKLELK。
- [0112] SEQ ID NO:37(轻链FR1)
- [0113] DIVMTQSPSSLSASLGGNVTITC。
- [0114] SEQ ID NO:38(轻链FR2)
- [0115] WYQHKPGKGLRRLIH。
- [0116] SEQ ID NO:39(轻链FR3)
- [0117] GIPSRFSGSGSGRDYSFSVRNLEPEDIATYYC。
- [0118] SEQ ID NO:40(轻链CDR1)

[0119] KASQDINKYVA。

[0120] SEQ ID NO:41 (轻链CDR2)

[0121] YSSTLQP。

[0122] SEQ ID NO:42 (轻链CDR3)

[0123] LQYDNFLRT。

[0124] 本发明中涉及的核苷酸序列如下所示：

[0125] (1) GeneD(10-B5-E7-B4)

[0126] 编码单克隆抗体10-B5-E7-B4的重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:43所示；  
编码单克隆抗体10-B5-E7-B4的轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:44所示；

[0127] SEQ ID NO:43：

[0128] caggttcagctgcagcagctctggagctgagctgatgaagcctggggcctcagtgaagatatcctgcaaggctactggctacacattcagtacactactggatagagtgataaagcagagcctggacatggccttgagtggattggagagattttacatggaagtgtactaactacaatgaaaagttcaagggcaagccacattcactgcagatacattcctccaacacagcctacatgcaactcagcagcctgacatctgaggactctgccgtctattattgtgcaagaggggctaccctatgccatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctca。

[0129] SEQ ID NO:44：

[0130] gatattgtgatgacgcagctctacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatcagttgcaggtcaagtcaggacattaacaattatataactgggtatcagcagaaaccagatggaactgttaactcctgatctactacacatcaagattacactcaggagtcccctcaaggttcagtggcagtggtctggaacagattattctctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttccaacagggtaatagccttcggacgttcggtggaggacaaaagttggaataaaa。

[0131] (2) GeneD(10-B8-E7-F11)

[0132] 编码单克隆抗体10-B8-E7-F11的重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:45所示；  
编码单克隆抗体10-B8-E7-F11的轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:46所示；

[0133] SEQ ID NO:45：

[0134] gaggtcctgctgcaacagctctggacctgagctaataaagcatggggctccagtgaagataacctgcaaggcctctggatacacattcactgactacaacatggactgggtgaagcagagccatggaaagacccttgagtggattggagatattaatcctaacaatgggtggaactatctacaaccagaagttcaagggaaggtcacattgactgtagacaatttctccagcacagcctacatggagctccgcagcctgacagctgaggacactgcagctctatttctgtgcaagatcaggctactataggtatgctatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctca。

[0135] SEQ ID NO:46：

[0136] gatattcagatgactcagctctccatectcactgtctgcattctctgggaggcaatgtcaccatcacttccaaggcaagccaagacattaacaatatgtagcttggtaccaacacaagcctggaaaaggtcttaggcggctcattactcatctacattacagccaggcatccatcaaggttcagtggaagtgggtctgggagagattattccttcagcatcaggaacctggagcctgaagatattgcaacgtattattgtctacagtatgataatttctacggacgttcggtggagggacaaaagttggaataaaa。

[0137] (3) GeneD(6-H2-D6-D9)

[0138] 编码单克隆抗体6-H2-D6-D9的重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:47所示；  
编码单克隆抗体6-H2-D6-D9的轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:48所示；



[0139] SEQ ID NO:47:

[0140] gaggtcctgctgcaacagtctggacctgagctaataaagcatggggctccagtgaagataacctgcaaggcctctggatacacattcactgactacaacatggactgggtgaagcagagccatggaaagagccttgagtggattggagatattaatcctaacaatggtggaactatctacaaccagaagttcaagggcaaggtcacattgactgtagacaatttctccagcacagcctacatggagctccgcagcctgacagctgaggacactgcagtctatttctgtgcaagatcaggctactataggtatgctatggactactggggctcaaggaacctcagtcaccgtctcctca。

[0141] SEQ ID NO:48:

[0142] gatattgtgatgaccagctctccatcctcactgtctgcatctctgggaggcaatgtcaccatcacttgcaaggcaagccaagacattaacaaatgttagcttggtaccaacacaagcctggaaaaggtcttaggcggctcatacattactcatctacattacagccaggcatcccatcaaggttcagtggaagtgggtctgggagagattattccttca gcgtcaggaacctggagcctgaagatattgcaacgtattattgtctacagtatgataattttctacggacgttcggtggagggaccaagctggagctgaaa。

[0143] 相对于现有技术,本发明具有以下有益效果:

[0144] 本发明所述识别CD7-CAR分子的单克隆抗体能够特异性识别CD7-CAR-T细胞上CD7-CAR分子;所述识别CD7-CAR分子的单克隆抗体与CD7-CAR分子的结合活性高,所述识别CD7-CAR分子的单克隆抗体可以被拿来用于检测CD7-CAR-T细胞的转染效率。

## 附图说明

[0145] 图1是实施例1中SDS-PAGE电泳检测结果图;

[0146] 图2是实施例1中纯化后3株单克隆抗体流式检测图;

[0147] 图3A是实施例2中单克隆抗体10-B5-E7-B4(批次1)、10-B8-E7-F11、10-B8-E7-B4(批次2)在LZ细胞上第一次筛选流式检测图;

[0148] 图3B是实施例2中单克隆抗体6-H2-D6-D9、10-B8-E7-F11在LZ细胞上第一次筛选流式检测图;

[0149] 图4A是实施例2中单克隆抗体10-B5-E7-B4(批次1)、10-B8-E7-F11、10-B5-E7-B4(批次2)在MXY细胞上第一次筛选流式检测图;

[0150] 图4B是实施例2中单克隆抗体6-H2-D6-D9、10-B8-E7-F11在MXY细胞上第一次筛选流式检测图;

[0151] 图5A是实施例3中单克隆10-B5-E7-B4第二次筛选流式检测图;

[0152] 图5B是实施例3中单克隆6-H2-D6-D9第二次筛选流式检测图;

[0153] 图6是实施例3中商业化Fc-APC抗体流式检测图。

[0154] 图7A是实施例4中单克隆抗体6-H2-D6-D9专属性验证流式图。

[0155] 图7B是实施例4中单克隆抗体6-H2-D6-D9灵敏度验证流式图。

## 具体实施方式

[0156] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0157] 实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件,或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可通过正规渠道商购

获得的常规产品。

#### [0158] 实施例1

##### [0159] 步骤一:杂交瘤细胞筛选

[0160] 用CHO-K1-GeneD重组细胞株(爱康得筛选,项目编号:MH1807121;CHO-K1空细胞,来源中国科学院细胞库,目录号:SCSP-507)免疫Balb/c小鼠,采集外周血,通过免疫效价检测,选取出免疫效价最好的小鼠,再用纯化的GeneD重组蛋白进行冲击免疫。免疫三天后提取小鼠的脾脏细胞,与骨髓瘤细胞融合,形成杂交瘤细胞;将杂交瘤细胞在HAT培养基(Sigma,CAT#H0262)中培养,10天后改为HT培养基(博奥龙,CAT#BF08002);取上清检测特异性抗体,通过ELISA鉴定,选择OD值较高的孔进行亚克隆。

[0161] 经过2次亚克隆,根据流式检测结果可知,筛选得到三株(记为A3、A8和B3克隆)与K562-GeneD结合强度较强的杂交瘤细胞,可用于制备腹水纯化抗体。其中A3、A8和B3克隆分别对应单克隆10-B5-E7-B4、10-B8-E7-F11、6-H2-D6-D9。

##### [0162] 步骤二:抗体的制备和纯化

[0163] 准备亚克隆效价检测所用的杂交瘤细胞,在无菌条件下,将约 $1 \times 10^6$ 个杂交瘤细胞加入1.5mL离心管中,250g/min,4℃离心10min,去上清。用 $1 \times$  PBS清洗3次,使用500 $\mu$ L  $1 \times$  PBS重悬杂交瘤细胞,1mL注射器将细胞注入小鼠腹部,等待7-10天收集腹水,使用硫酸铵沉淀,ProteinG亲和层析纯化抗体。

[0164] 将纯化的抗体进行SDS-PAGE检测,SDS-PAGE电泳检测结果图如图1所示,得到3株识别CD7-CAR分子的单克隆抗体,图1中,泳道M为Protein Marker;泳道1为6-H2-D6-D9 GeneD单克隆抗体;泳道2为10-B5-E7-B4 GeneD单克隆抗体;泳道3为10-B8-E7-F11 GeneD单克隆抗体。将抗体进行FITC偶联,在K562-GeneD以及对照K562-CD8a细胞上进行流式实验鉴定抗体的特异性。流式检测结果如图2所示,从图2中可以看出所获的抗体特异性较好,能够识别K562-GeneD细胞。

#### [0165] 实施例2

[0166] 识别CD7-CAR分子的单克隆抗体第一次筛选,对纯化获得的3株单克隆抗体在生产CD7-CAR-T细胞、T细胞和CD7阴性表达T(CD7-T)细胞上进行流式细胞分析,具体信息如下所示:

[0167] 实验步骤如下:将细胞分为若干份,每份细胞的数量为 $5 \times 10^5$ 个细胞,各加入1mL  $1 \times$  PBS,3500rpm离心3min。弃上清,加入100 $\mu$ L PBS重悬细胞,加入5 $\mu$ L CD3-PE抗体(BD,CAT#555333)和2 $\mu$ L识别CD7-CAR分子的单克隆抗体(爱康得,CAT#MH1807121),室温避光孵育12min。分别加入1mL  $1 \times$  PBS清洗细胞,3500rpm离心3min。弃上清,分别加入200 $\mu$ L的 $1 \times$  PBS重悬细胞,再加入2 $\mu$ L 7-AAD(BD,CAT#559925),流式上机检测。图3A-B是3株单克隆抗体在LZ细胞(博生吉安科,LOT#LZ012019082701)上第一次筛选流式检测图,图3A是单克隆抗体10-B5-E7-B4(批次1)、10-B8-E7-F11、10-B8-E7-B4(批次2)在LZ细胞上第一次筛选流式检测图;图3B是单克隆抗体6-H2-D6-D9、10-B8-E7-F11在LZ细胞上第一次筛选流式检测图;图4A-B是3株单克隆抗体在MXY细胞(博生吉安科,LOT#MXY12019082601)上第一次筛选流式检测图,图4A是单克隆抗体10-B5-E7-B4(批次1)、10-B8-E7-F11、10-B5-E7-B4(批次2)在MXY细胞上第一次筛选流式检测图;图4B是单克隆抗体6-H2-D6-D9、10-B8-E7-F11在MXY细胞上第一次筛选流式检测图。综合非特异性结合和转染效率因素,6-H2-D6-D9和10-B5-E7-

B4两株识别CD7-CAR分子的单克隆抗体效果较好。

[0168] 实施例3

[0169] 识别CD7-CAR分子的单克隆抗体第二次筛选,对单克隆抗体6-H2-D6-D9和10-B5-E7-B4进行进一步筛选,在生产的CD7-CAR-T细胞、T细胞和CD7阴性表达T(CD7-T)细胞上进行流式细胞分析,并用商业化Fc-APC抗体作为对比。

[0170] 实验步骤如下:将细胞分为若干份,每份细胞的数量为 $5 \times 10^5$ 个细胞,各加入1mL  $1 \times$  PBS,3500rpm离心3min。弃上清,Fc-APC抗体(Jackson Immuno Research,CAT#109-605-008)用PBS按1:2000稀释得到Fc-APC抗体稀释液,实验组加入100 $\mu$ L/管抗体稀释液重悬细胞后加入5 $\mu$ L CD3-PE抗体;其他组各加入100 $\mu$ L PBS重悬细胞,加入5 $\mu$ L CD3-PE抗体、2 $\mu$ L或1 $\mu$ L识别CD7-CAR分子的单克隆抗体,室温避光孵育12min。分别加入1mL  $1 \times$  PBS清洗细胞,3500rpm离心3min。弃上清,分别加入200 $\mu$ L的 $1 \times$  PBS重悬细胞,再加入2 $\mu$ L 7-AAD,流式上机检测。

[0171] 流式检测结果如图5A、图5B和图6所示,图5A是单克隆10-B5-E7-B4第二次筛选流式检测图,图5B是单克隆6-H2-D6-D9第二次筛选流式检测图,图6是商业化Fc-APC抗体流式检测图。结果表明两株识别CD7-CAR分子的单克隆抗体检测CD7-CAR-T细胞转染效率稍高于Fc-APC抗体,且前者较后者染色的细胞分群更加明显;单克隆6-H2-D6-D9和10-B5-E7-B4的转染效率基本相当,但6-H2-D6-D9的非特异性稍低于10-B5-E7-B4,最终选择克隆号为6-H2-D6-D9的单克隆抗体作为检测CD7-CAR-T细胞CAR分子的抗体。

[0172] 实施例4

[0173] 选择克隆号为6-H2-D6-D9的单克隆抗体作为检测CAR转染阳性率的抗体,对CD7-CAR-T细胞CAR转染阳性率检测的流式分析方法进行开发和全面方法学验证,实验步骤参考实施例3。

[0174] 图7A是单克隆6-H2-D6-D9专属性验证流式图,图7B是灵敏度验证流式图。专属性验证结果表明:该抗体能特异性识别CD7-CAR,阴性对照低于灵敏度,该方法具有特异性。灵敏度验证结果表明:该方法灵敏度为1.03%(为两次检测值0.93%和1.13%的均值)。

[0175] 综上,本发明首先用CHO-K1-GeneD重组细胞株免疫小鼠,取小鼠外周血进行免疫效价检测。选取免疫效价最好的小鼠,使用纯化的GeneD重组蛋白进行冲击免疫,免疫三天后分离小鼠脾脏进行杂交瘤融合,生成杂交瘤细胞,再筛选合适的杂交瘤细胞,进行相应的克隆,得到识别CD7-CAR分子的单克隆抗体。所述单克隆抗体能够特异性识别CD7-CAR-T细胞上CD7-CAR分子,这种特异性的抗体可以被拿来用于检测CD7-CAR-T细胞的转染效率。

[0176] 申请人声明,以上所述仅为本发明的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,所属技术领域的技术人员应该明了,任何属于本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到的变化或替换,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

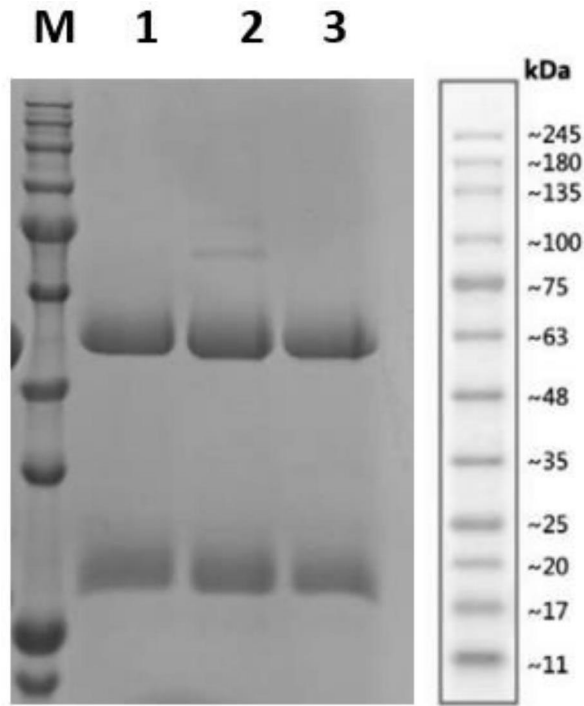


图1

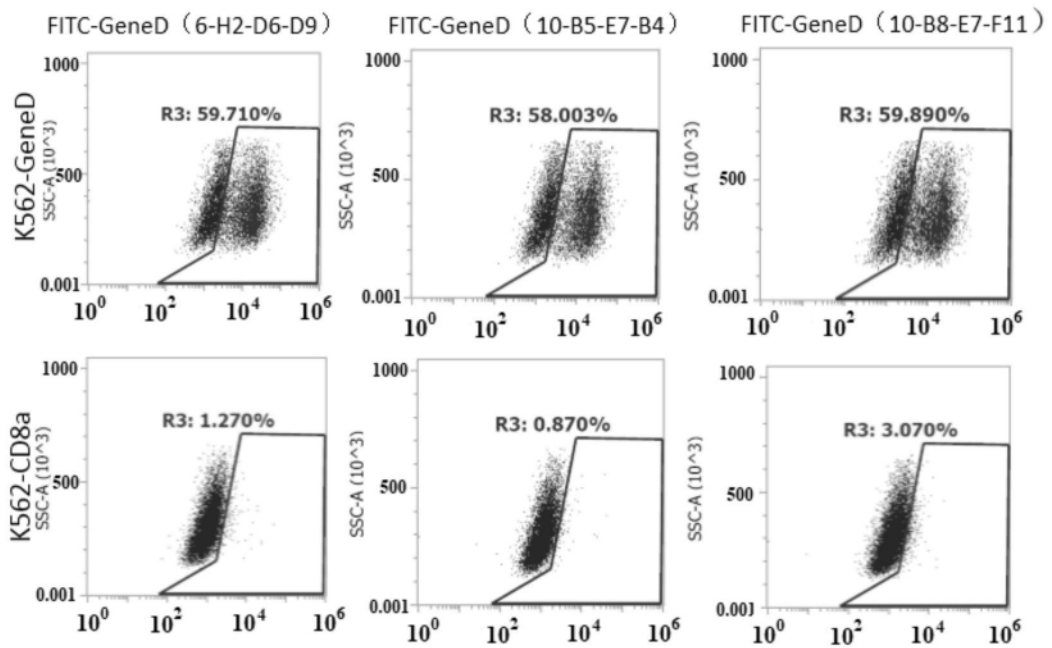


图2

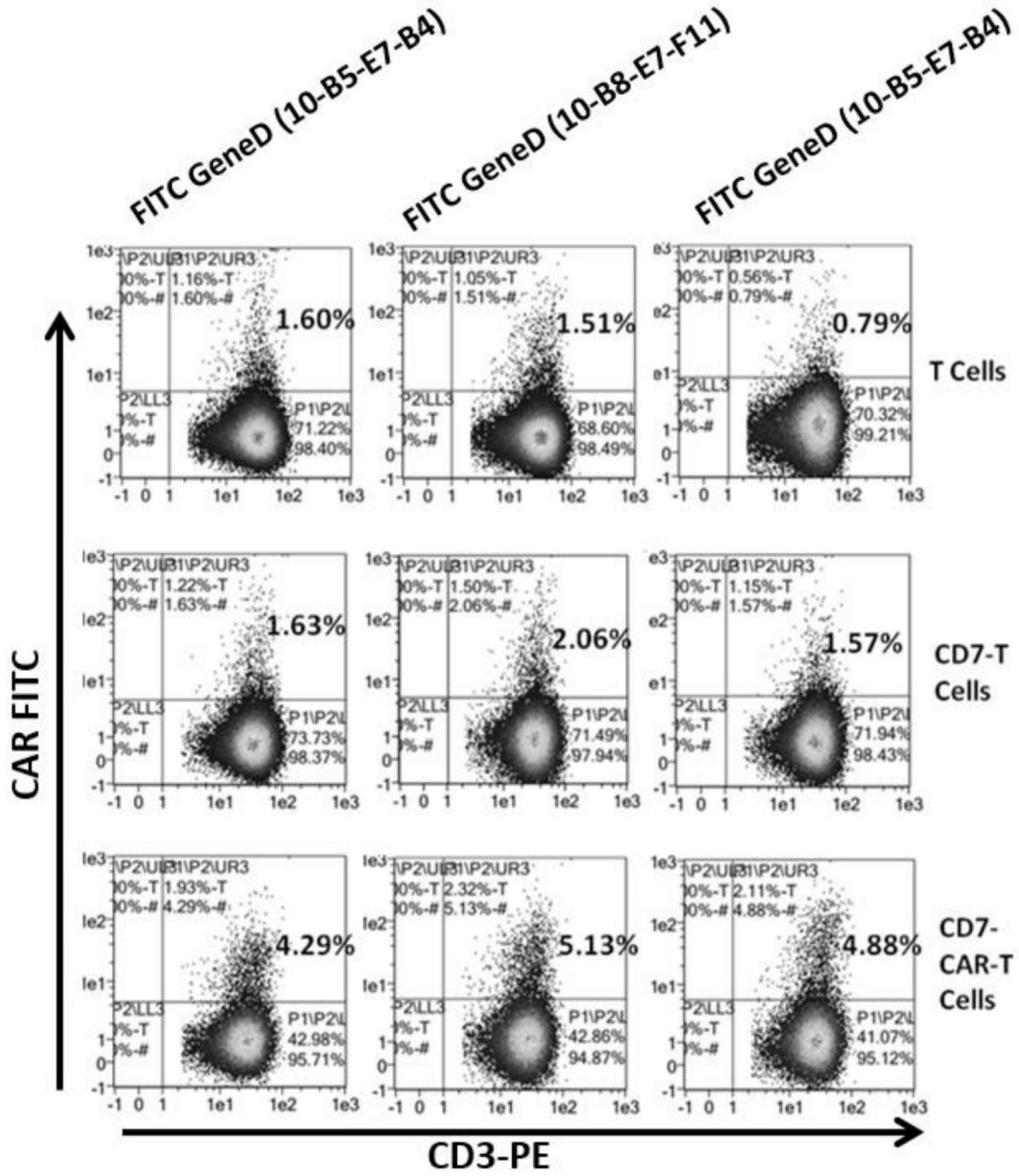


图3A

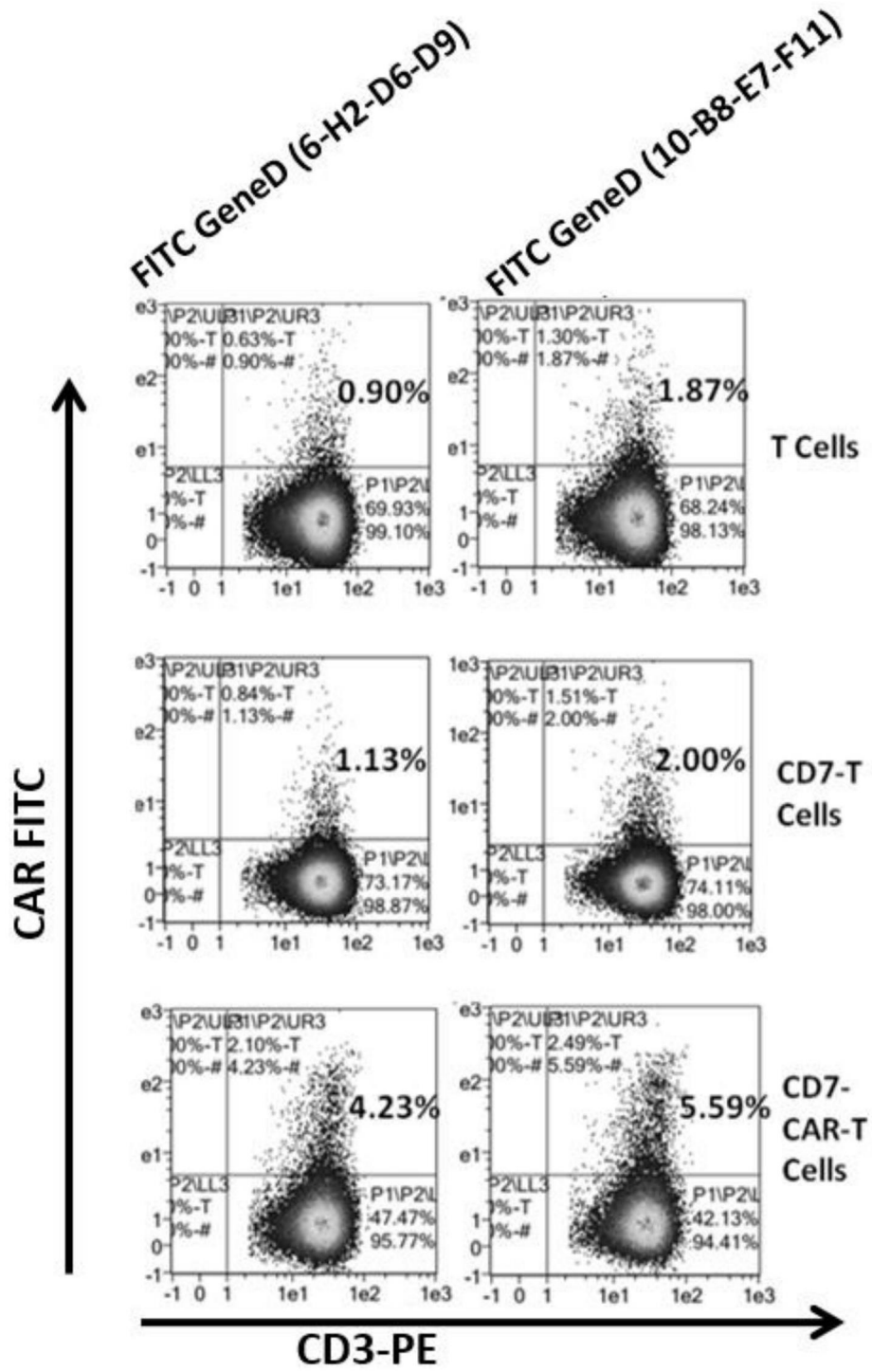


图3B

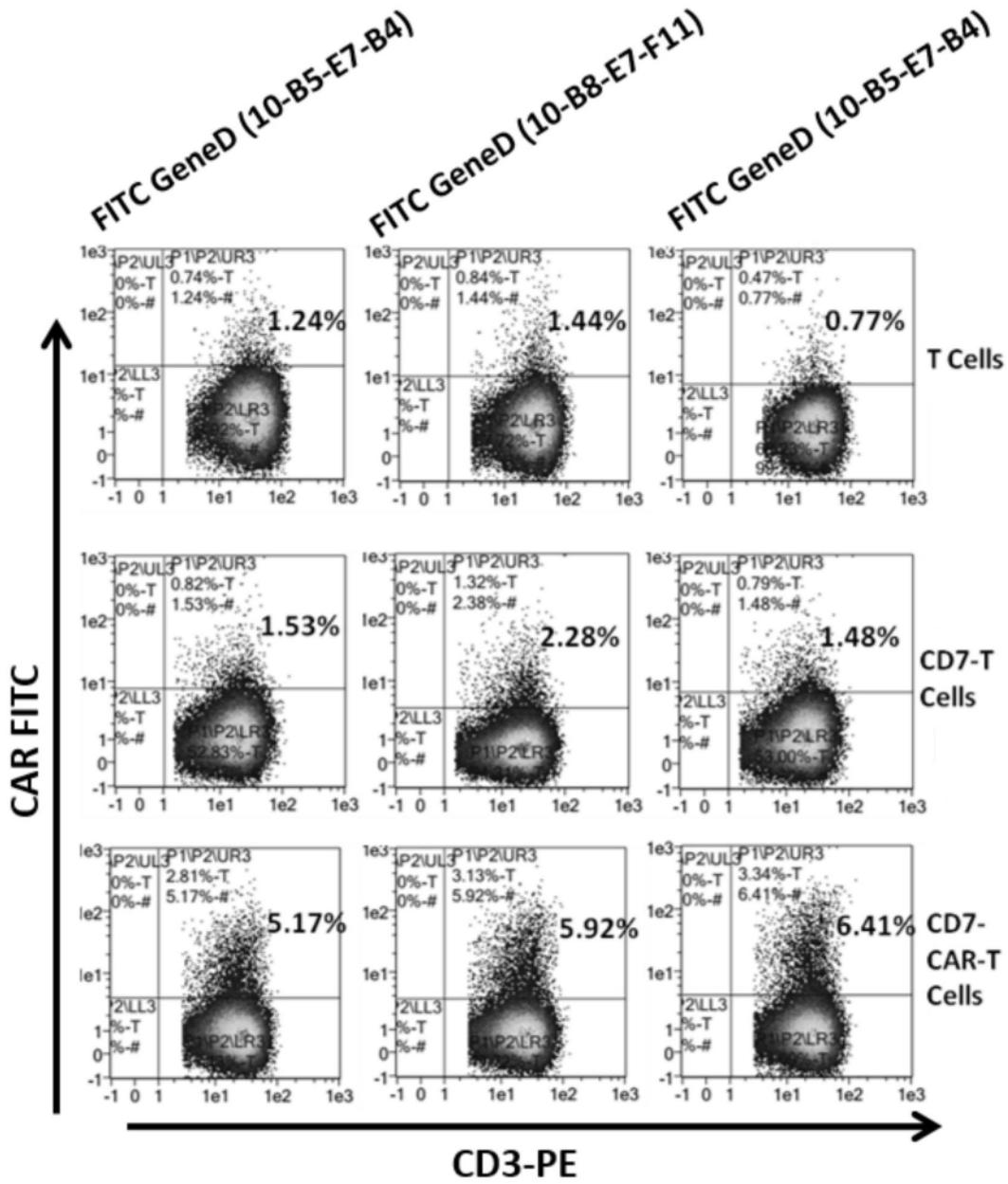


图4A

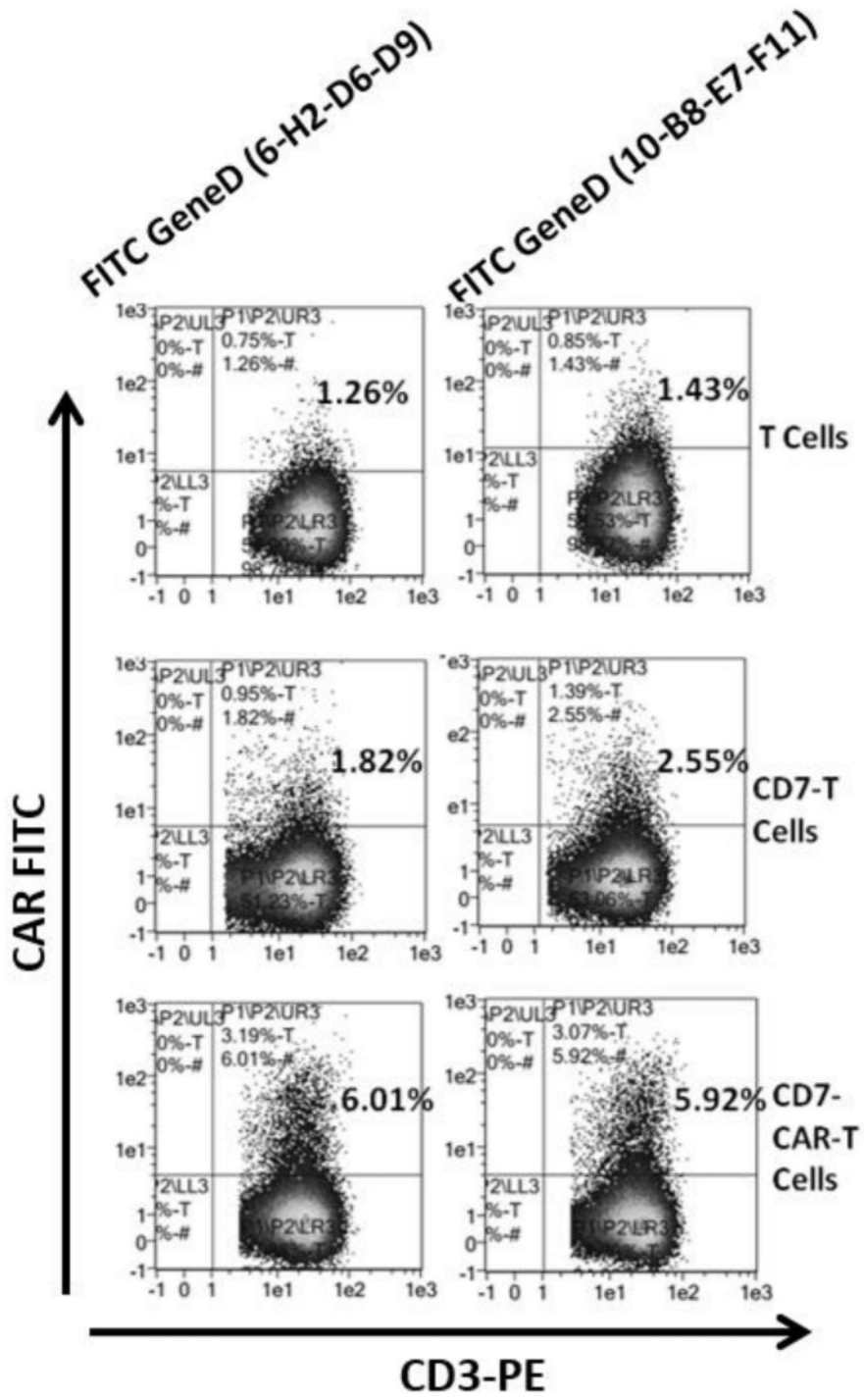


图4B



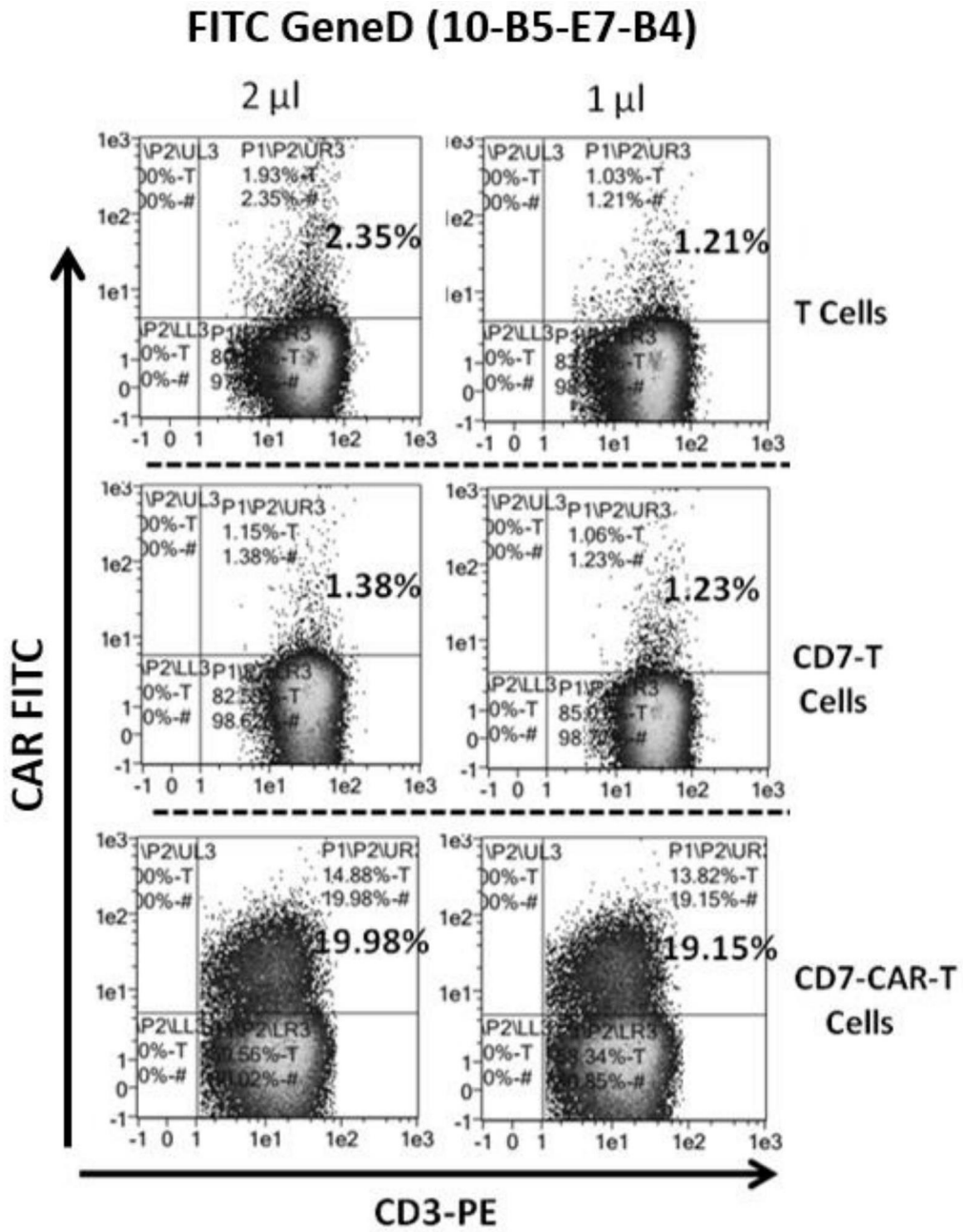


图5A

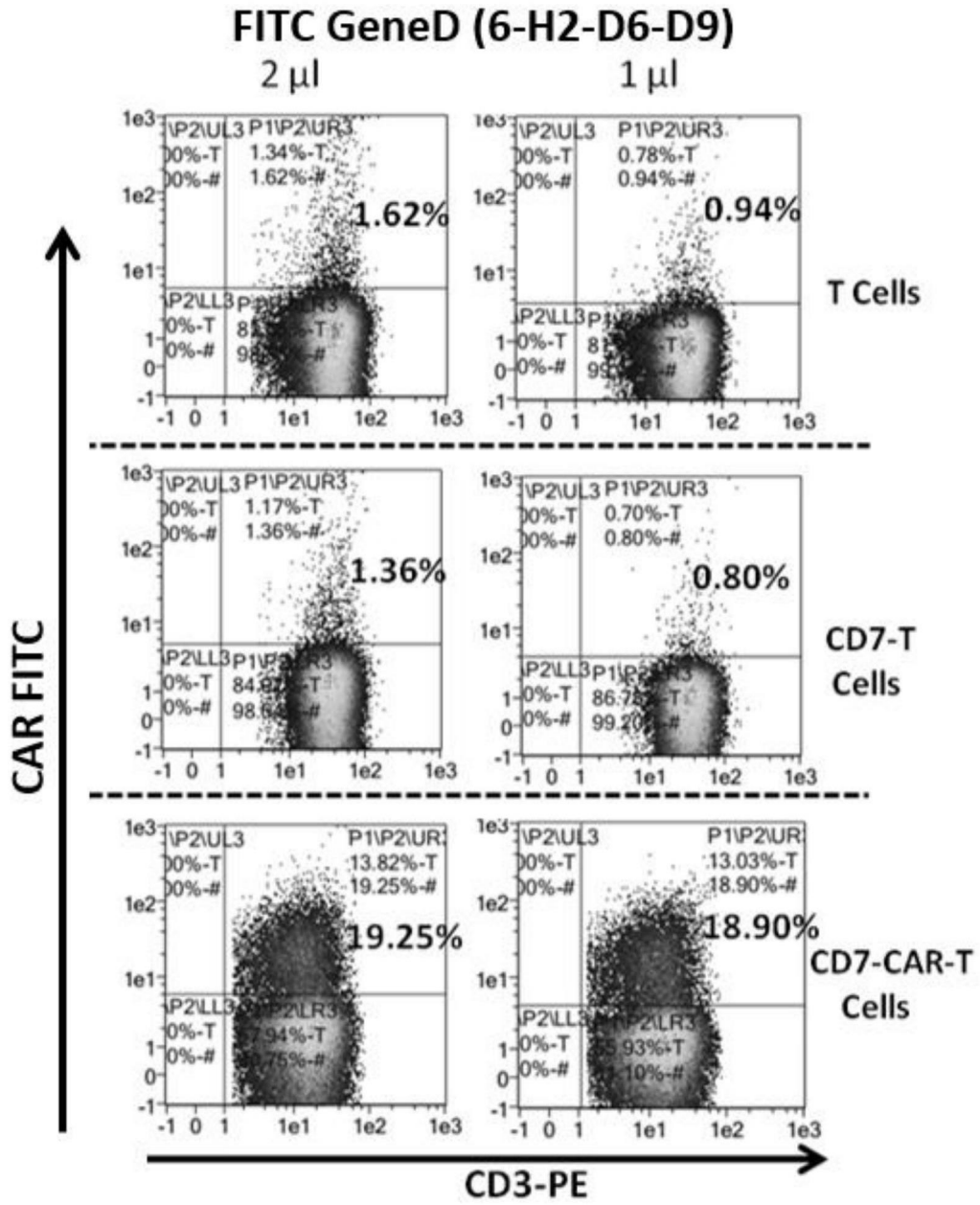


图5B

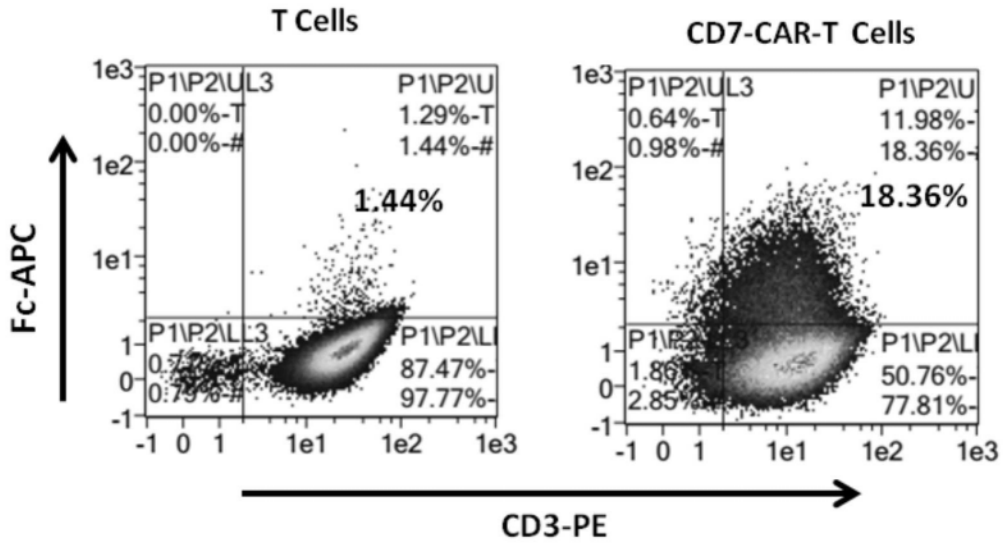


图6

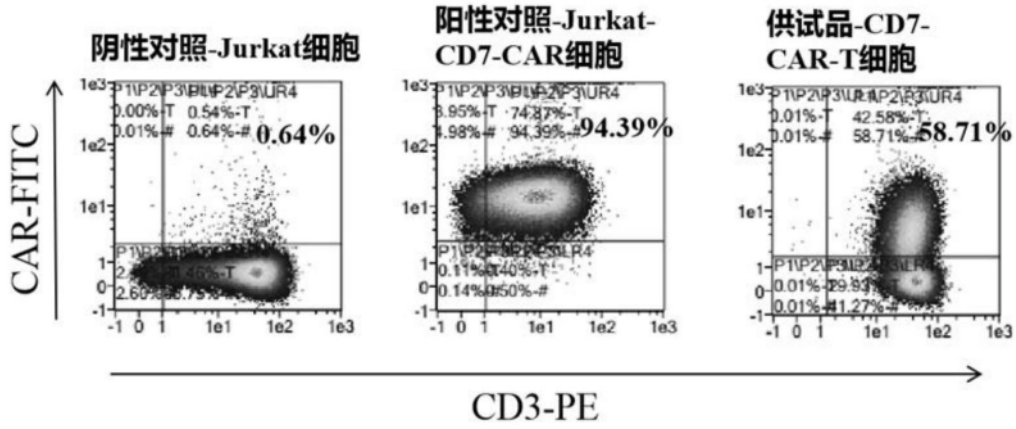


图7A

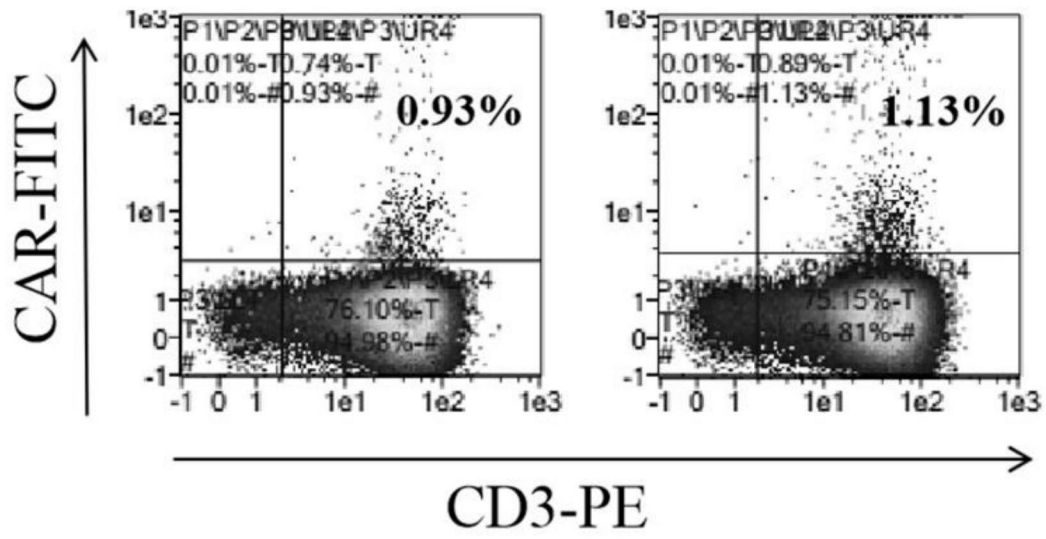


图7B