

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/11

C12N 7/01 C07K 16/18

C07K 16/30 G01N 33/53



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410025055.4

[43] 公开日 2005年2月23日

[11] 公开号 CN 1584028A

[22] 申请日 2004.6.10

[21] 申请号 200410025055.4

[71] 申请人 上海富纯中南生物技术有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园区哈雷路899号B座207室

[72] 发明人 韩焕兴 倪健 杨子义 何玮

[74] 专利代理机构 上海光华专利事务所

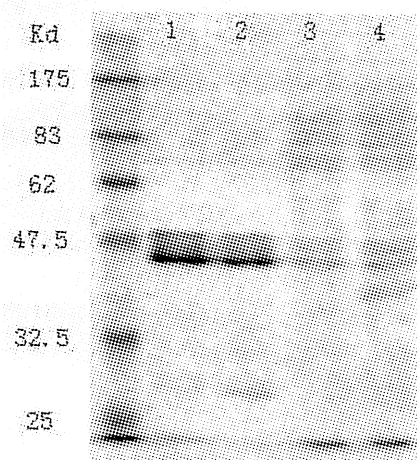
代理人 余明伟

权利要求书4页 说明书11页 附图2页

[54] 发明名称 用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆及其制备方法和用途

[57] 摘要

本发明涉及用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆及其制备方法和用途。选择合适的自身免疫病患者，提取高表达自身抗体的B淋巴细胞和浆细胞，提取RNA，扩增与克隆抗体基因，应用Helper噬菌体构建表面展示文库，多轮重复筛选该文库，酶切去除gpIII基因片段，重新连接后转化感受态菌进行可溶性表达，选取单克隆抗体进行增菌表达，挑选出阳性克隆；该克隆能够用于筛选肿瘤坏死靶向抗体。本发明所选的供体合适，其自身抗体效价高，获得阳性克隆的几率高，且能同时获取多个克隆；还能进一步得到一种新的人源性抗体，该抗体无需人源化处理，使该抗体的生产成本大幅度降低，是一种操作简单易用、能快速产业化的实用方法。



ISSN 1008-4274

1. 一种用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，该克隆是用以下方法制备得到的，该方法包括以下两个主要步骤：

①构建人源自身抗体噬菌体表面呈现文库；

A. 选择供体与提取 RNA；

B. 扩增与克隆抗体基因；

C. 应用 Helper 噬菌体，构建完成表面展示文库；

②从该文库中筛选阳性克隆；

A. 应用固相包被抗原，对文库进行多轮重复筛选；

B. 纯化噬粒载体酶切去除 gpIII 基因片段，重新连接后转化感受态菌进行可溶性表达；

C. 选取单克隆抗体进行增菌表达，再从中挑选阳性克隆。

2. 根据权利要求 1 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，所述的选择的供体是自身免疫病患者，且其自身抗体的效价在 1: 1,000 以上。

3. 根据权利要求 2 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，所述的选择的供体是患有多种自身免疫病的患者。

4. 根据权利要求 2 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，所述的选择的供体数量是 2~10 个自身免疫病患者。

5. 根据权利要求 4 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，所述的选择的供体数量是 3~6 个自身免疫病患者。

6. 根据权利要求 5 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，所述的选择的供体数量是 5 个自身免疫病患者。

7. 根据权利要求 2~6 任一项所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，所述的患者自身抗体的效价在 1: 10,000 以上。

8. 根据权利要求 1 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，所述的提取 RNA 的方法是先提取高表达自身抗体的 B 淋巴细胞和浆细胞，再从中提取 RNA。

9. 根据权利要求 8 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，所述的提取 B 淋巴细胞的方法是包括梯密度离心法中的一种。

10. 根据权利要求 8 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，所述的提取 B 淋巴细胞的方法是在梯密度离心法的基础上，进一步采用分选方法提取 B 淋巴细胞。

11. 根据权利要求 10 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，所述的分选方法是包括通过抗原包被载体法或免疫磁珠分离细胞法中的一种。

12. 根据权利要求 11 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，所述的

分选方法是免疫磁珠分离细胞法。

13. 根据权利要求 1~6、8~12 任一项所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，所述的扩增与克隆抗体基因的方法是设计相应引物，分别扩增编码抗体的重链 Fv 和 C₁ 基因以及轻链基因，分步克隆到 pComb3 载体系统。

14. 根据权利要求 7 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，所述的扩增与克隆抗体基因的方法是设计相应引物，分别扩增编码抗体的重链 Fv 和 C₁ 基因以及轻链基因，分步克隆到 pComb3 载体系统。

15. 根据权利要求 1~6、8~12 任一项所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，所述的重复筛选是 3~6 轮。

16. 根据权利要求 7 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，所述的重复筛选是 3~6 轮。

17. 根据权利要求 15 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，重复筛选是 4 轮。

18. 根据权利要求 16 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，重复筛选是 4 轮。

19. 根据权利要求 1~6、8~12 任一项所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，所述的挑选阳性克隆的常规方法是包括酶联免疫吸附分析法中的一种。

20. 根据权利要求 7 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆，其特征在于，所述的挑选阳性克隆的常规方法是包括酶联免疫吸附分析法中的一种。

21. 根据权利要求 1~6、8~12 任一项所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用。

22. 根据权利要求 7 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用。

23. 根据权利要求 21 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用，其特征在于，该肿瘤坏死靶向抗体是用以下方法制备得到的，该方法包括以下两个主要步骤：

- ①表达阳性克隆，得到表达产物；
- ②纯化表达产物。

24. 根据权利要求 22 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用，其特征在于，该肿瘤坏死靶向抗体是用以下方法制备得到的，该方法包括以下两个主要步骤：

- ①表达阳性克隆，得到表达产物；

②纯化表达产物。

25. 根据权利要求 23 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 所述的表达阳性克隆的方法是包括摇瓶或发酵方法中的一种。

26. 根据权利要求 24 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 所述的表达阳性克隆的方法是包括摇瓶或发酵方法中的一种。

27. 根据权利要求 23 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 所述的纯化表达产物的方法是包括离子交换法、分子筛或亲和纯化法中的一种。

28. 根据权利要求 24 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 所述的纯化表达产物的方法是包括离子交换法、分子筛或亲和纯化法中的一种。

29. 根据权利要求 27 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 所述的纯化表达产物的方法是亲和纯化法。

30. 根据权利要求 28 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 所述的纯化表达产物的方法是亲和纯化法。

31. 根据权利要求 21 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 该肿瘤坏死靶向抗体是用以下方法制备得到的, 该方法包括以下两个主要步骤:

①载体转换阳性克隆;

②表达与纯化抗体。

32. 根据权利要求 22 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 该肿瘤坏死靶向抗体是用以下方法制备得到的, 该方法包括以下两个主要步骤:

①载体转换阳性克隆;

②表达与纯化抗体。

33. 根据权利要求 31 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 所述的载体转换阳性克隆的载体是包括 pComb3 载体系统或 pBAD/dpp 系统中的一种。

34. 根据权利要求 32 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 所述的载体转换阳性克隆的载体是包括 pComb3 载体系统或 pBAD/dpp 系统中的一种。

35. 根据权利要求 33 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 所述的载体转换阳性克隆的载体是 pBAD/dpp 系统。

36. 根据权利要求 34 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 所述的载体转换阳性克隆的载体是 pBAD/dpp 系统。

37. 根据权利要求 31 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 所述的表达与纯化抗体的方法是 pBAD/dpp 系统载有 his-tag, 阳性株在诱导表达后应用 Qiagen 的 his-tag 纯化系统进行亲和纯化。

38. 根据权利要求 32 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 所述的表达与纯化抗体的方法是 pBAD/dpp 系统载有 his-tag, 阳性株在诱导表达后应用 Qiagen 的 his-tag 纯化系统进行亲和纯化。

39. 根据权利要求 21 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 该肿瘤坏死靶向抗体采用全面鉴定与标记方法进行抗体质量的验证。

40. 根据权利要求 22 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 该肿瘤坏死靶向抗体采用全面鉴定与标记方法进行抗体质量的验证。

41. 根据权利要求 39 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 该肿瘤坏死靶向抗体的全面鉴定与标记方法是包括生物活性、抗原亲合力、基本结构与序列方面的全面鉴定, 用 ^{125}I 标记纯化抗体进行细胞内核抗原结合活性测定与组织内代谢动力学测定。

42. 根据权利要求 40 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 该肿瘤坏死靶向抗体的全面鉴定与标记方法是包括生物活性、抗原亲合力、基本结构与序列方面的全面鉴定, 用 ^{125}I 标记纯化抗体进行细胞内核抗原结合活性测定与组织内代谢动力学测定。

43. 根据权利要求 41 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 该肿瘤坏死靶向抗体的生物活性是通过制备实体瘤荷瘤动物模型进行测定的。

44. 根据权利要求 42 所述的用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆在制备肿瘤坏死靶向抗体中的应用, 其特征在于, 该肿瘤坏死靶向抗体的生物活性是通过制备实体瘤荷瘤动物模型进行测定的。

用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆及其制备方法和用途

技术领域

本发明涉及生物医药技术领域，具体地说涉及用于筛选单克隆抗体的克隆及其制备方法及其用途，更具体地说涉及用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆及其制备方法及其用途。

背景技术

肿瘤的分子靶向治疗是近年来最具活力、倍受关注的领域，是根本意义上的肿瘤特异性治疗手段，其技术核心是靶向分子，人们可以选择任一种杀瘤物质与靶向分子结合。理想的靶向分子应具有以下特点：①高特异的靶抗原结合性；②在适当的分子量范围，以便于靶向分子在瘤组织内通透；③与靶分子结合时，呈高亲合力；④分子的化学结构有利于稳定，减少清除；⑤与治疗对象有生物同源性，能最大限度地避免宿主的异种蛋白反应等。从目前的研究情况看，抗体是最佳靶向分子，抗肿瘤抗体的有效性取决于靶抗原的特异性与表达状态，而肿瘤特异性抗原、高表达膜抗原在肿瘤中却甚为少见，寻找新的瘤细胞特异的表面分子作为靶点是非常困难的，也是非常有限的，这恰恰是分子靶向治疗的瓶颈所在。此外，作为临床治疗用抗体，人源抗体自然是最佳选择，鼠源抗体的人源化还是一项比较繁杂的技术，但全人源抗体的制备相对于鼠源抗体而言有更大的难度和更高的技术要求。

肿瘤坏死靶向(Tumor Necrosis Targeting, 简称 TNT)治疗是分子靶向治疗的重要方法之一，其技术核心是靶向分子—核抗原特异性抗体。

TNT 的基本原理：早在 50 多年前，人们就发现相对于正常细胞，肿瘤细胞呈现极高的增殖特征，并伴有异常分化和中心部位的坏死；同时，肿瘤组织内的微血管也因快速增长和瘤细胞某些分泌成分的作用，呈现结构和功能上存在的渗漏缺陷(Leaky)，这种缺陷原本是有利于瘤组织的血流和营养灌输的，但这一“Leaky”特征也为靶向分子的通透与靶点结合提供了条件(Dvorak HF, Nagy JA, Dvorak JT, et al: Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. Am J Pathol 1988, 133: 95-109)。利用肿瘤组织的微血管和细胞膜的“Leaky”特点，应用能与细胞内核抗原成份结合的靶向分子携带杀瘤物质，滞留或定位于肿瘤组织内，造成肿瘤的特异性杀伤。这些靶向分子主要是抗细胞核内某些组份的抗体，杀瘤物质为核素、生物酶、前体药物或某些抗瘤细胞因子等。瘤细胞被杀伤后释出的靶向分子又可进入相邻的瘤组织造成进

一步的杀伤，如此使杀瘤范围不断扩大，直至正常组织细胞。鉴于 TNT 靶向分子在正常组织中的高清除、低滞留，因而在达到较好杀瘤效果的同时，对周围正常组织的损伤却很小。

因此，TNT 虽然属分子靶向治疗，但与其他分子靶向治疗有根本的不同，基点是其针对的靶点是细胞核的成分，这些成分本身是无肿瘤特异性，但由于其在细胞内，非靶向分子常规可及之处。而瘤组织的毛细血管和瘤细胞膜具有较高的通透特性(Sharifi J, Khawli LA, Hu P, King S, Epstein AL. Characterization of a phage display-derived human monoclonal antibody (NHS76) counterpart to chimeric TNT-1 directed against necrotic regions of solid tumors. *Hybrid Hybridomics*. 2001; 20(5-6): 305-12)，对肿瘤细胞而言，核内成分抗原就成了瘤细胞的特异性靶分子。从理论上讲，TNT 靶向分子可适用于包括实体瘤在内的各种肿瘤，临床实验结果也表明，TNT 制剂确有治疗上的广谱性，为肿瘤的特异治疗提供了一条可行、有效的新思路、新途径。

靶向分子是 TNT 技术的关键所在。目前已有众多报道充分肯定了 TNT 的治疗效果(Mizokami MM, Hu P, Khawli LA, Li J, Epstein AL. Chimeric TNT-3 antibody/murine interferon-gamma fusion protein for the immunotherapy of solid malignancies. *Hybrid Hybridomics*. 2003; 22(4): 197-207 和 Li J, Hu P, Khawli LA, Epstein AL. Complete regression of experimental solid tumors by combination LEC/chTNT-3 immunotherapy and CD25(+) T-cell depletion. *Cancer Res*. 2003 Dec 1; 63(23): 8384-92)，Peregrine 制备的 chTNT-3 已与多种杀瘤物质复合，在肺癌、结肠癌、等做到了 I、II 期临床并取得了极佳效果(Jack Gaddy. Innovative administration of radiolabeled TNT successfully treats inoperative lung cancer. 2002, 6 19. 49th Annual Meeting of Nuclear Medicine. <http://www.peregrineinc.com/prelease.asp?id=6190271436> 和 Jack Gaddy. CHINESE REPORT SUCCESS IN TREATING 8 BRAIN CANCERS WITH TNT. *BIOWORLD Today*, By David N. Leff, Science Editor 5/20/1997)。而且，该公司正与 Oakwood 和 Biopharm 等诸家公司合作，将 TNT 治疗向更广泛的领域推进。

但是，迄今为止，尚未见新的用于筛选 TNT 抗体的克隆及其制备方法方面的报道。

发明内容

本发明的目的之一在于提供用于筛选 TNT 抗体的克隆，目的之二在于提供该克隆的制备方法，目的之三在于提供该克隆的用途即用该克隆筛选出新的 TNT 抗体，目的之四在于提供 TNT 抗体的制备方法。

本发明的技术构思如下：

1. 本发明采用噬菌体表面展示文库(Phage Surface Display)技术构建人源自身抗体噬菌体表面呈现文库。构建噬菌体抗体文库已是一项成熟的技术，已有大量应用该技术成功制备针对不同抗原的抗体或片段抗体的报道(Sharifi J, Khawli LA, Hu P, King S, Epstein AL.

Characterization of a phage display-derived human monoclonal antibody (NHS76) counterpart to chimeric TNT-1 directed against necrotic regions of solid tumors. Hybrid Hybridomics. 2001; 20(5-6): 305-12)。该项技术的优势为：一是从人的抗体基因的克隆开始，得到的完全是人源性抗体，无需进行人源化处理；二是在供体选择恰当的情况下，获得阳性克隆的几率高，而且可以同时获取多个克隆；三是在阳性株选定后，由阳性克隆到表达、修饰的过程简单，便于产品的开发。

2. 本发明采用自身免疫病患者的 B 淋巴细胞的抗体基因构建噬菌体表面呈现文库。多种自身免疫病患者的 B 淋巴细胞和浆细胞高表达自身抗体，其中以抗 DNA、抗组蛋白、抗核膜抗体等为多见，而且有些患者自身抗体呈高效价(>1:10,000)、高亲和力特征，为在该类患者的抗体文库中筛检出理想抗体提供了极佳条件。

本发明对以上的构思进行了逐一验证，研究结果均证明本构思的正确性。

本发明应用噬菌体表面展示文库技术制备用于筛选 TNT 抗体的克隆，该克隆是用以下方法制备得到的，该方法包括以下两个主要步骤：

①构建人源自身抗体噬菌体表面呈现文库；

A. 选择供体与提取 RNA：选择的供体是自身免疫病患者，且其自身抗体的效价在 1:1,000 以上；提取高表达自身抗体的 B 淋巴细胞和浆细胞，再按常规方法提取 RNA；

所述的患者一般是指患有有一种自身免疫病的患者，优选患有多种自身免疫病的患者；

所述的患者数量一般选择 2~10 个自身免疫病患者，优选 3~6 个自身免疫病患者，进一步优选 5 个自身免疫病患者；

所述患者的自身抗体的效价优选在 1:10,000 以上；

提取 B 淋巴细胞和浆细胞有多种途径与方法，常规方法如常用的梯密度离心法，具体操作是从外周血中、骨髓液中或淋巴组织中直接提取单个核细胞(主要包括单核细胞、淋巴细胞和少量的其它细胞等)；

为得到较特异的抗原特异 B 淋巴细胞，还能够在常规方法的基础上，进一步采用分选方法，如通过抗原包被载体法或免疫磁珠分离细胞法等，优选免疫磁珠分离细胞法；

多个自身免疫病患者骨髓的 B 淋巴细胞和浆细胞高表达自身抗体中，以抗 DNA、抗组蛋白、抗核膜抗体等为多见，而且有些患者自身抗体的呈高效价(>1:10,000)、高亲和力特征，这是实验的极佳条件，在该类患者的抗体文库中容易筛检出理想的 TNT 抗体；

B. 扩增与克隆抗体基因：按常规方法设计相应引物，分别扩增编码抗体的重链 Fv 和 C₁ 基因以及轻链基因(见图 1)，分步克隆到 pComb3 载体系统(见图 2)；

一般根据自身抗体的常见形式(如 IgG1、IgG3)设计相应引物，分别扩增编码抗体的重链 Fv 和 C₁ 基因以及轻链基因，分步克隆到 pComb3 载体系统；

C. 应用 Helper 噬菌体(M13OK7)，构建完成表面展示文库；

②从该文库中筛选阳性克隆；

A. 应用固相包被抗原，对文库进行多轮重复筛选(Bio-panning)；

所述的抗原如 dsDNA、ssDNA 和 histone 等；

所述的多轮重复筛选一般进行 3~6 轮，优选 4 轮；

B. 纯化噬粒载体酶切去除 gpIII 基因片段，重新连接后转化感受态菌进行可溶性表达；

噬菌体表面展示是抗原特异性富集的手段，而后续抗体片段的鉴定则需要个体细胞株的可溶性表达；

C. 选取单克隆抗体进行增菌表达，按常规方法挑选阳性克隆。

一般选用酶联免疫吸附分析法(enzyme linked immunosorbent assay, 简称 ELISA)挑选阳性克隆。

本发明采用噬菌体表面展示文库技术构建人源自身抗体噬菌体表面呈现文库，能够得到一种新的人源性抗体，无需进行人源化处理；所选择供体合适，其自身抗体效价高，为筛选出理想的 TNT 抗体提供了极佳条件，获得阳性克隆的几率高，并能够同时获取多个克隆，使产品 TNT 抗体的生产成本大幅度降低；在选定阳性株后，由阳性克隆到表达、修饰的过程简单，便于产品的开发；因此，本发明所述的制备技术操作简单易用，能够快速实现产业化。

附图表说明

图 1 是本发明抗体片段基因的 PCR 扩增的琼脂电泳图；

其中，Fd 表示重链片段的 PCR 扩增的琼脂电泳结果；

Lc 表示轻链片段的 PCR 扩增的琼脂电泳结果；

M 表示标准分子量标志；

bp 表示碱基对；

图 2 是本发明抗体基因克隆载体结构模式图；

其中，Lacz 表示乳糖启动子；

pelBleader 表示引导序列；

H 表示重链；

gpIII stop 表示胞膜蛋白 III 与终止序列；

L 表示轻链；

stop 表示终止序列；

图 3 是本发明载体转变后的结构模式图；

其中，pBAD 表示阿拉伯糖启动子；

ATG 表示翻译起点；

geneIII SS 表示先导序列；
H 表示重链；
stop 表示终止密码子；
L 表示轻链；
6His 表示多聚组氨酸序列；

图 4 是本发明 Fab 纯化前、后的 PAGE 结果图；

其中，1、2 为纯化后的 PAGE 结果；

3、4 为纯化前的 PAGE 结果；

Kd 表示分子量的单位：千道尔顿；

Fab 表示抗体片段；

PAGE 表示聚丙烯酰胺凝胶电泳。

具体实施方式

本发明公开的是用于筛选有临床应用价值的 TNT 抗体的克隆及其制备方法，以及用该克隆筛选出新的 TNT 抗体及该抗体的制备方法，以满足人们疾病治疗、科学研究、药物开发等方面的需要。

使用该克隆制备新的 TNT 抗体的方法：

本发明应用噬菌体表面展示文库技术制备出用于筛选 TNT 靶向抗体的克隆，使用该克隆制备新的 TNT 抗体的方法，主要包括以下二个步骤：

①对阳性克隆进行表达，采用的方法是摇瓶或发酵等常规方法，得到表达产物；

②对表达产物进行纯化，可以使用现有的各种公知方法，如果离子交换法、分子筛、亲和纯化法等方法，优选亲和纯化法；

对表达的抗体片段以亲和纯化法作初步纯化后，就能够进行生物活性与亲和力等指标的全面测定。

以上所述的使用该克隆制备新的 TNT 抗体的方法是常规的方法，所得产品的效率不够高，在工业化生产上不够经济，因此，本发明对此进一步进行了改进，该方法主要包括采用以下二个步骤：

①对阳性克隆进行载体转换(见图 3)

所述的载体包括常见的 pComb3 载体系统、自建的 pBAD/dpp 系统(已申请专利《人源片段抗体的 pBAD 表达系统》。申请日：2003 年 4 月 8 日，申请号：03116231.2，公开日：2003 年 9 月 17 日)等，优选自建的 pBAD/dpp 系统；

②抗体的表达与纯化：pBAD/dpp 系统载有 his-tag，阳性株在诱导表达后应用 Qiagen 的 his-tag 纯化系统进行亲和纯化(见图 4)；

TNT 抗体采用全面鉴定与标记方法进行抗体质量验证，以确保产品质量的稳定可靠。

使用该克隆制备得到的 TNT 抗体的全面鉴定与标记方法如下：

按常规方法，对 TNT 抗体作生物活性、抗原亲和力、基本结构与序列方面的全面鉴定；用 ^{125}I 标记纯化抗体，能够进行细胞内核抗原结合活性测定与组织内代谢动力学测定。

TNT 抗体的全面鉴定与标记，需要通过制备实体瘤荷瘤动物模型，然后再测定抗体生物活性，完成初步药物动力学的研究，以确证产品，并保证产品质量的稳定与可靠。下面，以两种实体瘤荷瘤动物模型的具体制备方法及其在抗体生物活性与初步药物动力学研究的应用为例，进行详细阐述。

①制备两种实体瘤荷瘤动物模型

实体瘤荷瘤动物模型之一：

A. 材料：

BALB/c 小鼠，6~8 周龄；

MM45T.Li 细胞；

B. 肿瘤模型的建立：

对数生长期的肿瘤细胞用生理盐水重新混悬，制成单细胞悬液，台盼兰染色，计数活细胞数 $>95\%$ ，在 BALB/c 小鼠背部皮下接种 $2 \times 10^6/0.2\text{ml}/\text{只}$ 。小鼠接种肿瘤细胞后，检查肿瘤接种点，3 次/周，触摸有无结节形成。在接种肿瘤细胞的小鼠生长肿瘤后第 12 天可触及接种位点有肿瘤结节生长，成瘤后，测量肿瘤直径，3 次/周，计算肿瘤体积(按标准球形计算)： $V=4 \pi \times R^3/3$ (直径 6~7mm 肿瘤体积大约 100mm^3)；

对照组小鼠不作疫苗接种，仅在背部皮下注射 RPMI-1640 培养基 0.2ml/只。

实体瘤荷瘤动物模型之二：

A. 材料：

裸鼠 12 只，由第二军医大学动物实验中心提供，20 克，4~5 周龄；

Raji 细胞 $1 \times 10^8/\text{ml}$ ，源自上海细胞生物所；

B. 实肿瘤模型的建立：

12 只裸鼠分别于右臀接种 Raji 细胞($1 \times 10^8/\text{ml}$)100ul，观察 2~3 周。肿瘤生长至 $0.4 \times 0.4\text{cm}$ 大小后，每日记录肿瘤变化。各组情况同时以数据与照片记录。

②抗体生物活性与初步药物动力学研究

应用已建荷瘤动物模型，通过核素标记抗体片段的瘤内注射、静脉注射、肌肉注射方式等目前已公开的常规方法，检测抗体的抗原结合、血液中的半衰期、组织廓清、细胞内滞留、杀瘤活性等。

本发明不但能够得到了高效、低毒、突变的 TNT 抗体，并且不增加机体的异源反应，

具有广泛的医用前景。

下面通过实施例来进一步具体说明本发明的内容，所述的实施例是为了更好地阐述本发明，并不是用来限制本发明的范围。

实施例 1、一种选择供体与提取 RNA

1、筛选患者

①在住院的自身免疫病患者中，筛选 6 个自身抗体强阳性的患者，标准是自身抗体效价大于 1:1,000；

②行骨穿术，分别抽取骨髓液 3ml，磷酸盐缓冲液(简称 PBS)倍比稀释；

2、淋巴细胞分离液分离法常规分离单个核细胞

①取淋巴细胞分离液(上海化学试剂厂，分析纯)5ml，置无菌离心管；

②用吸管将稀释的骨髓液轻铺于分离液面之上；

③水平离心机离心，2,000rpm(转/分钟)，20 分钟；

④吸取血清下细胞层细胞，PBS 洗 3 次；

⑤调整细胞浓度待用；

3、RNA 的抽提与 cDNA 合成

①应用 RNA 抽提试剂盒(Qiagen)按说明制备 RNA；

②用洗脱液混悬，OD260 测定所获产品的纯度和含量；

③将 3 人的全部 RNA 合并；

④以 RT 试剂(TaKaRa)反转录 RNA 为 cDNA(使用抗体片段特异引物)。

实施例 2、另一种选择供体与提取 RNA

1、筛选患者

①在住院的自身免疫病患者中，筛选 3 个均患有多种自身免疫病、自身抗体强阳性的患者，标准是自身抗体效价大于 1: 10,000；

②行骨穿术，分别抽取骨髓液 3ml，磷酸盐缓冲液(简称 PBS)倍比稀释；

2、免疫磁珠分离细胞法分离单个核细胞

①充分混悬免疫磁珠液(无磁场状态)；

②取 Tosyl，活化的磁珠 0.1ml(M-450, Dynal 公司)；

③置磁场下静放 4 分钟；

④B 取出试管，去上清，B 缓冲液洗 2 次；

⑤以 B 缓冲液稀释抗原(核蛋白组分)至 0.1ml(约 30 微克/ml)；

⑥充分混悬磁珠并与抗原液混合，震悬 1 分钟；

- ⑦将试管置室温旋转 10'，加 BSA 到 0.5%；
 - ⑧将试管斜置 37°C 旋转 24 小时；
 - ⑨置试管于磁场 4 分钟，去上清；
 - ⑩洗磁珠 4 次，分别为缓冲液 C 2 次 4°C 5 分钟，缓冲液 D 1 次 37°C 4 小时，缓冲液 C 1 次 4°C 5 分钟；
 - (11)将 Ficoll 分离的单个核细胞与磁珠混悬，4°C 2~6 小时；
 - (12)置磁场分离靶细胞，PBS 洗 3 次；
 - (13)收集细胞待用；
- 3、RNA 的抽提与 cDNA 合成
- ①应用 RNA 抽提试剂盒(Qiagen)按说明制备 RNA；
 - ②用洗脱液混悬，OD260 测定所获产品的纯度和含量；
 - ③将 3 人的全部 RNA 合并；
 - ④以 RT 试剂(TaKaRa)反转录 RNA 为 cDNA(使用抗体片段特异引物)。

实施例 3、扩增与克隆 TNT 抗体基因

1、抗体基因扩增引物的设计与合成

过去的有关文献报道，自身抗体中 IgG1 和 IgG3 的比例最高，因而可以参照常规的实验手册等文献设计引物如下：

VH+CH1(IgG1)的特异性引物序列为：

5'端正向引物：5'-CAG GTG CAG CTG CTC GAG TCG GG

3'端反向引物：5'-GCA TGT ACT AGT TTT GTC ACA AGA TTT GGG

VH+CH1(IgG3) 的特异性引物序列为：

5'端正向引物：5'-CAG GTG CAG CTG CTC GAG TCG GG

3'端反向引物：5'-TGT GTG ACT AGT GTC ACC AAG TGG GGT TTT

VL+CL(κ)的特异性引物序列为：

5'端正向引物：5'-GAA ATT GAG CTC ACG CAG TCT CCA

3'端反向引物：5'-GCG CCG TCT AGA ATT AAC ACT CTC CCC TGT TGA

VL+CL(λ)的特异性引物序列为：

5'端正向引物：5'-TCT GAA GAG CTC CAG GAC CCT GTT GTG TCT GTG

3'端反向引物：5'-CG CCG TCT AGA ACT ATG AAC ATT CTG TAG G

划线处为设计的与克隆载体相应的酶切位点。

2、TNT 抗体编码基因的 PCR 扩增

以上述制备的 cDNA 为模版,在试管中分别加入 IgG₁、IgG₃ 引物,VL+CL(κ)和 VL+CL(λ) 的引物用 PCR 试剂(Qiagen)扩增, 1.0%的琼脂糖胶纯化扩增产物;

PCR(Polymerasa Chain Reaction), 即聚合酶链反应, 通常又称之为体外基因扩增技术。

3、PCR 纯化产物与 pMD18-T Vector 的连接

①连接反应体系:

pMD18-T Vector	1
Insert DNA	1
dH ₂ O	3
Solution I	5
<hr/>	
Total	10 μ l

②16°C连接 30min;

③全量转化至 JM109 感受态细胞中;

④在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的琼脂平板培养基上培养, 形成单菌落;

⑤挑选白色菌落于含 50ng/ml Amp 的 10ml LB 培养液中培养过夜, 以待提取重组质粒;

4、重组质粒 DNA 的抽提

按华舜生物技术有限公司的质粒抽提试剂盒抽提上述重组质粒 DNA, 并于 BACKMAN UV600 上测定质粒的含量与纯度; 具体操作如下:

①在细菌沉淀中加入 250 μ l P1 液, 振荡至彻底悬浮;

②加入 250 μ l P2 液, 立即温和颠倒离心管 5~10 次以混匀; 室温静置 4 分钟;

③加入 350 μ l P3 液, 立即温和颠倒离心管 5~10 次以混匀;

④12000rpm 离心 10 分钟。将上清液小心移入吸附柱, 离心 15 秒; 倒掉收集管中的液体;

⑤在吸附柱中加入 500 μ l 洗涤液, 离心 15 秒。倒掉收集管中的液体;

⑥在吸附柱中加入 500 μ l 洗涤液, 静置 1 分钟后, 离心 15 秒; 倒掉收集管中的液体;

⑦离心 1 分钟;

⑧将吸附柱放入一个干净的 1.5ml 离心管中, 在吸附膜中央加入 50 μ l 洗脱液, 室温静置 1 分钟后, 离心 1 分钟。将 DNA 溶液于 -20°C 保存;

5、重组质粒的特异性酶切并胶回收

①重链(IgG)酶切反应体系:

重组质粒	speI	xhoI	10×Buffer	ddH ₂ O	Total
3 μ g	51U	210U	10 μ l	适量	100 μ l

轻链(κ , λ)酶切反应体系:

重组质粒	SacI	xbaI	10×Buffer	ddH ₂ O	Total
3μg	105U	210U	10μl	适量	100μl

②37℃酶切 3 小时；

③胶回收 660bp 的酶切片段；

6、pCombHSS 载体的制备

于含 15ng/ml Tet 的 10ml LB 培养液中加入 10μl pCombHSS/XL-1 Blue 甘油菌，37 °C 摇床 225rpm 增菌过夜；按华舜生物技术有限公司的质粒抽提试剂盒纯化 pCombHSS 质粒，并于 BACKMAN UV600 上测定质粒的含量与纯度；

7、pCombHSS 质粒的双酶切和胶回收

①酶切反应体系：

pCombHSS 产物	speI	xhoI	10×Buffer	ddH ₂ O	Total
30μg	90U	300U	20μl	适量	200μl

②37℃酶切 3 小时；

③胶回收 3500bp 的酶切片段；

8、pCombHSS 与 IgG(VH+CH1)的连接

①连接反应体系：

pCombHSS	IgG	T4 连接酶	10×Buffer	ddH ₂ O	Total
2μg	0.7μg	5μl	10μl	适量	200μl

②16℃连接过夜；

9、制备 XL-1 Blue 感受态细胞

取 XL-1 Blue 甘油菌 2μl 接种于 2ml LB 培养基(tet)中，37℃，225rpm 增菌过夜。取 XL-1 Blue 过夜菌 2 ml 加到 200 ml LB 中，37℃，225rpm 增菌至 OD600=0.8~1.0，冰浴 15 分钟，4℃，4000rpm 离心 20 分钟，弃尽培养基。将细胞悬浮于 100ml 预冷的 10%甘油溶液中，4℃ × 4000rpm 离心 20 分钟，弃尽上清。将细胞悬浮于 10 ml 预冷的 10%甘油溶液中，4℃ × 4000rpm 离心 20 分钟，弃尽上清。用 2ml 10%甘油溶液悬浮细胞，300μl/管分装，-70℃贮存备用；

10、连接产物的转化和扩增

100μl 连接产物电穿孔转化到 300μl 感受态细胞中，加入 3ml Soc 培养基，37℃增菌 1 小时，转种于 100ml LB(Amp 20μg/ml, Tet 10μg/ml)增菌过夜。

11、重复步骤 4~10 完成抗体轻链基因的克隆；

12、应用 Help 噬菌体(M13K07)完成表面展示文库的构建；

13、应用固相包被抗原(如 dsDNA、Nmantigen 和 histone 等)，对文库进行 4 轮的重复

筛选;

14、可溶性表达的转换: 纯化载体切去 gpIII 基因片段, 重新连接后转化细胞;

15、选取单克隆进行增菌表达, ELISA 挑选阳性克隆;

16、对阳性克隆进行载体转换(自建的 pBAD/dpp 系统, 已申请专利《人源片段抗体的 pBAD 表达系统》。申请日: 2003 年 4 月 8 日, 申请号: 03116231.2, 公开日: 2003 年 9 月 17 日);

17、抗体的表达与纯化: pBAD/dpp 系统载有 his-tag, 在表达后进行亲和纯化;

18、抗体的全面鉴定与标记: 对抗体作生物活性、抗原亲合力、基本结构与序列方面的鉴定;

19、实体瘤动物模型的制备与抗体的初步药理学、药物动力学研究: 应用核素标记抗体作瘤内注射、静脉注射、肌肉注射, 检测抗体的抗原结合, 组织廓清, 细胞内滞留, 杀瘤活性等;

这里所述的全部的数名自身免疫病患者的抗体编码基因文库, 包括正常与异常的 IgG1 和 IgG3 与轻链(κ , λ)随机组合的若干种抗体中的数种抗细胞核组分的抗体。

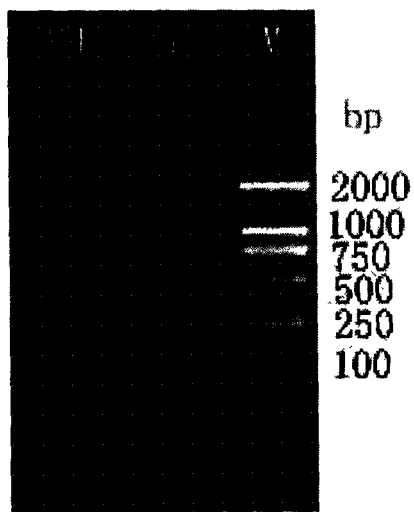


图 1

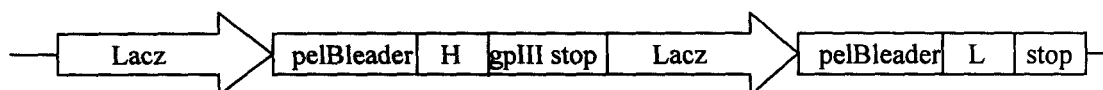


图 2

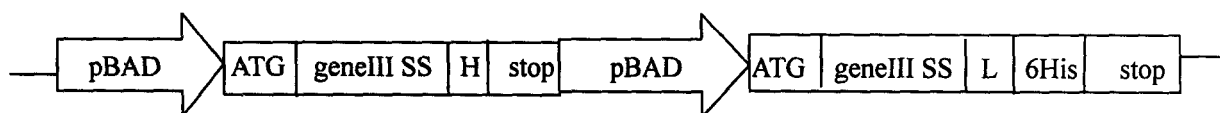


图 3

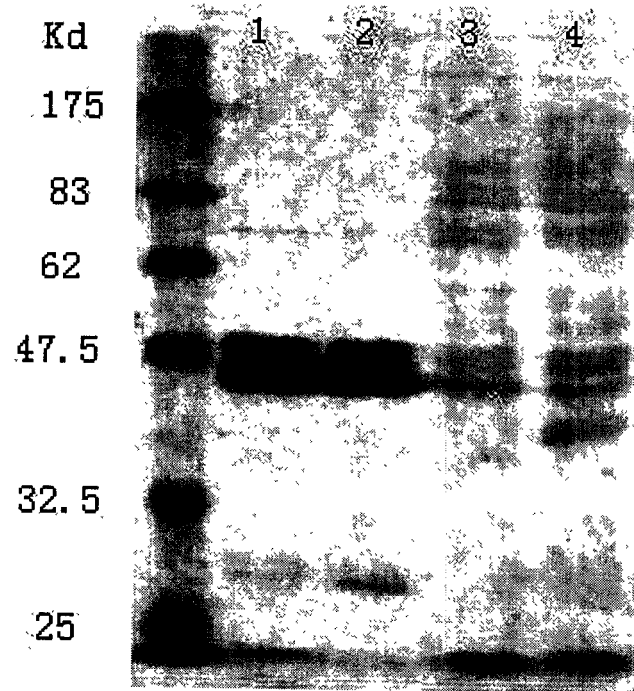


图 4

专利名称(译)	用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN1584028A	公开(公告)日	2005-02-23
申请号	CN200410025055.4	申请日	2004-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	上海富纯中南生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海富纯中南生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海富纯中南生物技术有限公司		
[标]发明人	韩焕兴 倪健 杨子义 何玮		
发明人	韩焕兴 倪健 杨子义 何玮		
IPC分类号	C07K16/18 C07K16/30 C12N7/01 C12N15/13 G01N33/53 C12N15/11		
代理人(译)	余明伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于筛选肿瘤坏死靶向抗体的克隆及其制备方法和用途。选择合适的自身免疫病患者，提取高表达自身抗体的B淋巴细胞和浆细胞，提取RNA，扩增与克隆抗体基因，应用Helper噬菌体构建表面展示文库，多轮重复筛选该文库，酶切去除gpIII基因片段，重新连接后转化感受态菌进行可溶性表达，选取单克隆抗体进行增菌表达，挑选出阳性克隆；该克隆能够用于筛选肿瘤坏死靶向抗体。本发明所选的供体合适，其自身抗体效价高，获得阳性克隆的几率高，且能同时获取多个克隆；还能进一步得到一种新的人源性抗体，该抗体无需人源化处理，使该抗体的生产成本大幅度降低，是一种操作简单易用、能快速产业化的实用方法。

