

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410080352.9

C12N 5/22

C07K 16/18

G01N 33/534

G01N 33/574

A61K 39/395

A61P 35/00

[43] 公开日 2005 年 4 月 27 日

[11] 公开号 CN 1609203A

[22] 申请日 2004.9.30

[21] 申请号 200410080352.9

[71] 申请人 北京大学人民医院

地址 100044 北京市西城区西直门南大街 11 号

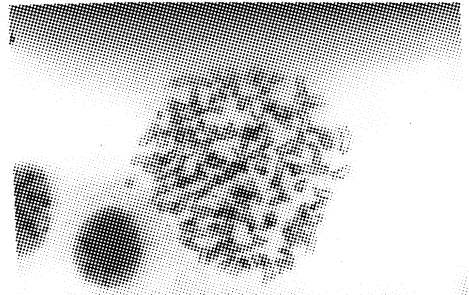
[72] 发明人 冯捷 钱和年 崔恒 付天云  
成夜霞 程洪艳 叶雪 李小平  
姚煜 昌晓红

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称 抗人卵巢癌单克隆抗体杂交瘤细胞系及其单克隆抗体和应用

[57] 摘要

本发明属于生物技术及细胞工程领域。涉及一种单克隆抗体杂交瘤细胞系的建立方法及所建立的细胞系，其主要技术特征为以人卵巢癌组织标本制备可溶性免疫原，免疫 BALB/c 小鼠，运用杂交瘤技术经融合、筛选、反复克隆化，获得能稳定分泌抗人卵巢癌单克隆抗体的杂交瘤细胞系。该杂交瘤细胞系命名为 BUPH: OVCAMab，由中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC) 保藏，保藏号为 CGMCC No. 1225。本发明也公开了用该细胞系制备单克隆抗体 OVCAMab 及抗体提纯方法。该抗体在放免显像中可应用于卵巢癌的早期诊断、体内定位、复发检测及转移灶的发现等。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种抗人卵巢癌单克隆抗体杂交瘤细胞系，其是通过杂交瘤技术以卵巢浆液性乳头状囊腺癌组织的新鲜标本经处理后的可溶性成分作为免疫原建立的杂交瘤细胞系，命名为 BUPH:OVCAMab，其保藏号为 CGMCC No.1225。
2. 如权利要求 1 所述细胞系分泌的单克隆抗体，所述抗体为 IgG1 亚类。
3. 用于诊断卵巢癌的放射免疫显像试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括如权利要求 2 所述的单克隆抗体 7。
4. 如权利要求 3 所述的试剂盒，其中还包括金属整合剂，稀释剂，缓冲液以及可用于放射免疫显像的放射性核素。
5. 如权利要求 4 所述的试剂盒，其中金属整合剂为环二乙基三胺五乙酸或 2-亚氨基吩盐酸盐。
6. 如权利要求 4 所述的试剂盒，其中放射性核素为  $^{99m}\text{Tc}$ 、 $^{131}\text{I}$  或  $^{111}\text{In}$ 。
7. 如权利要求 2 所述的单克隆抗体在制备卵巢癌的治疗性药物中的应用。

## 抗人卵巢癌单克隆抗体杂交瘤细胞系及其单克隆抗体和应用

### 技术领域

本发明属于生物技术及细胞工程领域，涉及分泌抗人卵巢癌单克隆抗体杂交瘤细胞系，及其分泌的单克隆抗体，以及所述单克隆抗体的应用，尤其是在放射免疫显像中的应用。

### 背景技术

卵巢癌发病率在我国占妇科恶性肿瘤第三位，死亡率却高居首位。由于其起病隐匿，就诊时多属晚期，即使治疗获得完全缓解也常复发。早期诊断、及时治疗；及早发现复发及复发部位，选择合适的再治疗时机，为改善预后的关键因素。单克隆抗体由于是针对一个抗原表位的抗体，具有很高特异性，可以特异性识别相应抗原，将单克隆抗体作为载体，连接放射性核素、毒素、化疗药物或效应细胞，在肿瘤的导向诊断或导向治疗中具有巨大潜力。为了提高卵巢癌的诊断和术后复发的诊断准确率，提高卵巢癌的治疗水平，改善卵巢癌的预后，世界各国的科学家们致力于卵巢癌单克隆抗体的研制，并取得了一定的成果。

1969年 Levi MM 等 (Antigenicity of a papillary cystadenocarcinoma tissue homogenate and its fractions. Am J Obstet Gynecol 1969, 105:856) 首先报道了卵巢上皮性癌肿瘤相关抗原后，免疫血清学检测引起了人们的重视。1982年 Bast (Lancet, 1982, 第8卷第1期, 第999页) 首先制备出了卵巢癌单抗 OC125, OC125 的特异性较好，应用最广泛，多应用于血清学检测。美国 FDA 于 1992 年批准上市的用于卵巢癌放免显像的药盒有  $^{111}\text{In}$ -B72.3, Labetuzu-mab (CEA-Cide) 正在进行放免显像 II 期临床试验，尚有一些单抗放免显像处于研究阶段。其中  $^{111}\text{In}$ -OC<sub>125</sub> 研究得较多，其敏感性为 86%-89%，特异性为 75% ~ 89%。国内山东大学齐鲁医院用抗 CEA 单抗进行卵巢癌患者放免显像的研究，取得较好结果。国内尚无卵巢癌放免显像药盒。

## 发明内容

本发明的目的是提供一种分泌抗卵巢癌单克隆抗体的新的杂交瘤细胞系，该细胞系命名为 BUPH:OVCAMab，已经由中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC）保藏，保藏号为 CGMCC No.1225。

本发明的另一目的是提供上述细胞系分泌的抗卵巢癌单克隆抗体 OVCAMab 及其酶切片段 OVCAMabF(ab')<sub>2</sub>，所述 OVCAMab 为 IgG1 亚类，对卵巢癌抗原有较强的亲和力和特异性。

本发明的另一目的是提供上述抗体及其片段的放射免疫显像试剂盒，其中所述抗体及其片段用 <sup>131</sup>I、<sup>99m</sup>Tc、<sup>111</sup>In 标记后，可以用于卵巢癌的放射免疫显像，对卵巢癌进行术前诊断、肿瘤定位及检测复发。所述试剂盒中还可以含有其它试剂，例如稀释剂、缓冲液等。

根据第一目的，通过杂交瘤技术以卵巢浆液性乳头状囊腺癌组织的新鲜标本处理后的可溶性成分作为免疫原建立保藏号为 CGMCC No.1225 的杂交瘤细胞系。其特征为：系免疫后的 BALB/c 雌鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞杂交形成的鼠鼠杂交瘤细胞，有 93 条染色体；能在体外长期生长和稳定传代；能稳定分泌与卵巢癌相关抗原结合的抗体；经检测流行性出血热病毒、呼肠孤病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒、仙台病毒、鼠痘病毒、鼠腺病毒、鼠肺炎病毒、鼠白血病等 8 种鼠源病毒及支原体均阴性。杂交瘤细胞的染色体核型见以下附图 1。

根据第二目的，用上述细胞系制备抗卵巢癌单克隆抗体 OVCAMab，其中第一种方法为小鼠腹水法制备抗卵巢癌单克隆抗体 OVCAMab，并酶切制备相应酶切片段 OVCAMabF(ab')<sub>2</sub>，OVCAMab 为 IgG1 亚类，效价  $2 \times 10^5$ ，相对亲和常数为  $1.90 \pm 0.53 \times 10^8$ ，经 33%饱和硫酸铵粗提及阴离子交换柱提纯活性保留，酶切片段 F(ab')<sub>2</sub> 活性保留。第二种方法为体外无血清培养法制备 OVCAMab，培养上清抗体效价  $1 \times 10^3$ ，经 rProtein A 及阴离子交换柱提纯活性保留。经酶切制备相应酶切片段 OVCAMab F(ab')<sub>2</sub>，活性保留。

根据第三目的，用化学反应将上述 OVCAMab 或酶切片段 OVCAMab F(ab')<sub>2</sub> 与金属螯合剂结合后，通过间接标记法及预定位方法标记 <sup>99m</sup>Tc、<sup>131</sup>I、<sup>111</sup>In 等及其它放射性核素，结合稀释剂、缓冲液等试剂，组成放射免疫显像试剂盒。所述金属螯合剂可以是环二乙基三胺五乙酸或 2-亚氨基吩盐酸盐。

## 附图说明

图 1 为 BUPH:OVCAMab 杂交瘤细胞染色体核型的照片。

## 具体实施方式

### 一、实施例 1—建立细胞系

#### 1. 抗原制备

手术室无菌留取卵巢浆液性乳头状囊腺癌之新鲜组织标本，超净台内无菌盐水清洗，去除血性物，称取 22 克，剪碎，置于 50 ml 无菌塑料离心管中，加入 30 ml 无菌生理盐水， $-20^{\circ}\text{C}$  冻存。反复冻融 3 次后，匀浆器 1,000 转/分钟，匀浆 1 分钟；超声破碎 (A20) 10 分钟； $4^{\circ}\text{C}$  10,000 g，离心 60 分钟；取上清， $-20^{\circ}\text{C}$  冻存。将此卵巢癌粗提抗原称为 OVCA 抗原。该抗原与抗 CEA 抗体 ELISA 反应阴性(北京生物制品研究所试剂盒)，与抗 aFP 抗体(长春生物制品研究所)免疫双扩散反应阴性。

#### 2. 抗原免疫

6~8 周 BALB/c 小雌鼠 (医科院动物所) 数只，每只皮下注射上述 OVCA 抗原 200  $\mu\text{g}$  加完全福氏佐剂，进行基础免疫。3 周后，脾内注射上述 OVCA 抗原 73  $\mu\text{g}$ ，进行第二次免疫。之后 2 天及 5 天，分别腹腔注射上述 OVCA 抗原 730  $\mu\text{g}$ ，进行第三、四次免疫。

#### 3. 杂交瘤细胞的制备

##### 1) 饲养细胞的制备

以 BALB/c 老雌鼠腹腔巨噬细胞作饲养细胞。在融合前 1 天，BALB/c 老雌鼠拉颈处死，75% 酒精全身浸泡，超净台内，无菌操作下用剪刀剪开腹部皮肤，暴露腹膜，用注射器腹腔注入 RPMI 1640 培养液 6~8ml，反复冲洗，回收冲洗液，1,000 转/分，离心 5 分钟，留沉淀，用含 20% 小牛血清或胎牛血清的 RPMI 1640 培养液重悬，调整细胞浓度  $1 \times 10^5$  个/ml，加入 96 孔板，100  $\mu\text{l}$ /孔， $37^{\circ}\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$  培养过夜。

##### 2) 免疫脾细胞的制备

小鼠末次免疫后三天，在无菌条件下取出脾脏，置于平皿中，RPMI 1640 培养液洗 1 次，注射器针芯研磨后，过不锈钢筛网，制成细胞悬液后计数，取  $1.8 \times 10^8$  个，RPMI 1640 培养液洗涤 2 次，用于细胞融合。

##### 3) 骨髓瘤细胞

小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0(NS-1) (医科院基础所) 经 8-氮杂鸟嘌呤筛选后, 培养至对数生长期, 1,000 转/分钟, 离心 5 分钟, 弃上清, 用 RPMI 1640 培养液重悬细胞后计数, 取  $1.8 \times 10^7$  个 (活细胞 >95%), 用 RPMI 1640 培养液洗涤 2 次, 用于细胞融合。

#### 4) 细胞融合及 HAT 选择杂交瘤

将骨髓瘤细胞与免疫脾细胞按 1:10 比例混合, 在 50 ml 塑料离心管内用 RPMI 1640 培养液洗 1 次, 1,200 转/分钟, 离心 8 分钟。弃上清, 用滴管吸出残留液体, 轻轻弹击离心管底, 使细胞沉淀略加松动。在室温下, 30 秒内加入预热的 1 ml 含 5% 二甲基亚砷的 50% 聚乙二醇 (Merck, 分子量 4000), 边加边搅拌, 作用 90 秒, 每隔 2 分钟加入 1ml、2ml、3ml、4ml、5ml 和 10ml 预热的 RPMI 1640 培养液, 终止聚乙二醇作用。

1,000 转/分钟, 离心 6 分钟。弃上清, 先用 5 ml 含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液轻轻混悬, 继加至 30 ml。加入含有饲养细胞的 96 孔板,  $100 \mu\text{l}$ /孔,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养。共用 2 块板: N 板和 O 板, 每板设 6 孔 Sp2/0(NS-1) 细胞对照。

24 小时后, 以 HAT 选择培养液 1/2 换液, 48 小时后完全换液, 每 2~3 天换液 1 次, 维持培养 2 周后, 改用 HT 培养液, 再维持培养 2 周, 改用 RPMI 1640 培养液。

#### 4. 抗体的检测

于融合后 15 天在杂交瘤细胞占据孔底 1/3 面积时, 即开始用 ELISA 法检测特异性抗体, 每 2~3 天检测一次。 $4^\circ\text{C}$ , 过夜包被 OVCA 抗原  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ , 阴性对照包被相同方法制备的正常卵巢组织可溶性抗原  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。次日加培养上清  $100 \mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$ , 1 小时, 加辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (1: 300),  $37^\circ\text{C}$ , 1 小时, 每次加样前 PBS 洗板 3 次, 显色, 读  $A_{490}$  值。

第 3 次检测后 N 板及 O 板分别筛出 2 孔和 5 孔阳性孔, 其  $A_{490}$  值均在 0.4 以上, 逐渐扩大培养由 96 孔板移至 24 孔板, 长满后再移至培养瓶中。

#### 5. 杂交瘤的克隆化和冻存

##### 1) 克隆化方案为有限稀释法

于克隆化前一天制备饲养细胞 (方法同前述), 细胞浓度  $1 \times 10^5$  个/ml, 加入 96 孔板,  $100 \mu\text{l}$ /孔,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养过夜。

克隆化过程为: 将培养的阳性孔细胞调细胞浓度为  $1 \times 10^3$  /ml, 取 0.1 ml 与

9.9 ml RPMI 1640 培养液混匀，加入饲养细胞孔，100  $\mu$ l/孔，37 $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub> 培养。4~5 天后，在倒置显微镜上可见到小的细胞克隆，补加培养液至 200  $\mu$ l/孔。第 8~9 天时，肉眼可见细胞克隆，及时进行抗体检测。同法共进行 3 次克隆化，筛出 A<sub>490</sub> 值在 0.4 以上的单克隆孔，第三次共筛出 6 孔，A<sub>490</sub> 值均在 1.118~1.257。

## 2) 杂交瘤细胞的冻存

细胞冻存液：50%小牛血清 + 40%RPMI 1640 培养液 + 10%二甲亚砜

细胞冻存方法：1 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞悬于 1 ml 含 20%小牛血清 的 RPMI 1640 培养液中，加入等量细胞冻存液，转移入冻存管，用棉垫包好放入 -80 $^{\circ}$ C 低温冰箱，次日转入液氮中。第一次克隆化后即进行冻存及扩大培养后冻存共 6 支作为原始细胞；第三次克隆化后冻存 10 支；此后每 1~2 年复苏一次并进行有限稀释法克隆化，检测细胞的活性和 ELISA 法检测抗体效价，筛出 A<sub>490</sub> 值高的孔扩大培养并冻存 10 支作为种子细胞。另培养并冻存 10 余支用于扩大培养制备抗体及其它研究。目前已进行克隆化 10 余次，能稳定分泌抗人卵巢癌单克隆抗体 OVCAMab。

## 6. 杂交瘤细胞的检定

经中国生物制品检定所检定，该杂交瘤细胞无支原体，无流行性出血热病毒、呼肠孤病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒、仙台病毒、鼠痘病毒、鼠腺病毒、鼠肺炎病毒、鼠白血病病毒等 8 种鼠源病毒。该细胞系命名为 BUPH:OVCAMab，已经由中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC) 保藏，保藏号为 CGMCC No.1225。附图 1 显示了所述杂交瘤细胞的核型，其有 93 条染色体。

## 二、实施例 2—单克隆抗体制备及鉴定

### 1. 采用小鼠腹水法生产单克隆抗体

BALB/c 小鼠腹腔注射降植烷 0.5 ml，2 周后腹腔注射 2~3 $\times$ 10<sup>6</sup> 上述杂交瘤细胞，密切观察动物的健康状况与腹水征象，7~10 天后见腹水产生，待腹水尽可能多而小鼠濒于死亡时，处死小鼠，75%酒精消毒腹部皮肤，切开皮肤，暴露腹膜，并用无菌剪剪开腹膜约 0.5cm，用无菌滴管将腹水吸出，室温静置 30 分钟，1,000 转/分，离心 10 分钟，收集上清。一般 1 只小鼠可获 2~5 ml 腹水。

### 2. 采用体外无血清培养法生产单克隆抗体

将在含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中稳定生长的 OVCAMab 杂交瘤细胞接种到杂交瘤细胞无血清培养基(H-SFM, Invitrogen)中, 接种密度  $1\sim 10\times 10^5$  个/ml, 3~4 天传代一次(离心换液)至细胞稳定生长。将细胞转接至加有 H-SFM 的 1 升 Supper-spinner 搅拌瓶中, 接种密度  $1\times 10^5$  个/ml,  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养, 气泵供气速度 1vvm, 搅拌转速 10 转/分。4~7 天收获上清 500~800 ml。追加培养基, 继续培养重复收获。

### 3. 单克隆抗体的鉴定

#### 1) 单克隆抗体特异性的鉴定

各种组织的石蜡切片, 采用常规免疫组织化学染色程序进行免疫染色, 一抗为上述产生的腹水单抗, 二抗为羊抗鼠 IgG, 再加辣根过氧化物酶标记的鼠 PAP 复合物(北京生物制品研究所), DAB 显色, 光镜下观察。卵巢上皮癌 43 例中 31 例阳性, 阳性率 75.6%, 卵巢良性肿物 8 例中 1 例阳性, 阳性率为 12.5%, 正常卵巢 10 例均阴性。

#### 2) 单克隆抗体效价测定及相对亲和力测定

以间接 ELISA 法检测, 腹水抗体效价  $2\times 10^5$ , 相对亲和常数  $1.90\pm 0.53\times 10^8$ 。无血清培养上清抗体效价  $1\times 10^3$ 。

#### 3) 单克隆抗体 Ig 类与亚类的鉴定

取浓缩 25 倍的杂交瘤细胞无血清培养上清, 与羊抗鼠 IgG1、IgG2 $\alpha$ 、IgG2 $\beta$ 、IgG3、IgM 抗血清亚类抗体(中国医学科学院基础研究所)行免疫双扩散, 证实该单克隆抗体为 IgG1 亚类。

### 4. 单克隆抗体的纯化

①腹水法制备 OVCAMab 经 33%饱和硫酸铵粗提及阴离子交换柱提纯, 活性保留, 相应酶切片段 OVCAMab F(ab')<sub>2</sub> 活性保留。

②体外无血清培养法制备 OVCAMab 经 Streamline rProtein A 亲和层析进行抗体捕获, Q-Sepharose Fast Flow 精细纯化, 浓缩至 8 mg/ml, 活性保留, 相应酶切片段 OVCAMab F(ab')<sub>2</sub> 活性保留。

## 三、实施例 3—单克隆抗体放射免疫显像

### 1. <sup>131</sup>I 标记 OVCAMab 进行患者放免显像

采用改良氯胺 T 法对 OVCAMab 进行 <sup>131</sup>I 标记, 过 Sephadex G50, 收集标记抗体峰。纸层析法测定放化纯度及标记率, 细胞结合分析法测定标记后抗体

活性。

腹腔给药： $^{131}\text{I}$ -OVCAMab 2 mg 溶于 500 ml 生理盐水中，经腹腔导管于 20 分钟内滴入腹腔。于注药后 24、48、72 及 96 小时用  $\gamma$  照相机高能准直器显像。同时用计算机定量记录各重要脏器、盆腔肿块及肿块旁组织的放射强度，用于计算肿瘤与非肿瘤组织放射强度的比值 (T/NT)。用  $^{131}\text{I}$  放射免疫显像试剂对卵巢癌患者显像，患者放免显像敏感性 94.7%，特异性 87.9%。

## 2. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -OVCAMab 荷瘤裸鼠放射免疫显像，

采用改进预氯化亚锡法对 OVCAMab 进行  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  标记。对荷瘤裸鼠经腹腔注射 0.15 mg  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -OVCAMab，18 小时后， $\gamma$  照相机进行显像。同时用计算机定量记录各重要脏器、盆腔肿块及肿块旁组织的放射强度，用于计算 T/NT。结果荷卵巢癌裸鼠显像清晰，小至 0.5 cm 的微小病灶即可检出，显像位置与病灶位置对应关系好。

## 3. 预定位显像

将环二乙基三胺五乙酸(cyclic diethylenetriamine pentaacetic acid, cDTPA) 与卵巢癌单抗 OVCAMab 进行偶联, Sephadex 分离纯化。将偶联物 cDTPA-OVCAMab 经腹腔注入荷人卵巢癌裸鼠腹水瘤模型体内，48 小时后，经腹腔注入还原  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ，6 小时后显像。显像后，体外称重并测量瘤及其他正常组织放射性活性，计算 T/NT。结果肿瘤组织对肌肉组织的 T/NT 值为  $19.3 \pm 1.2$ 。

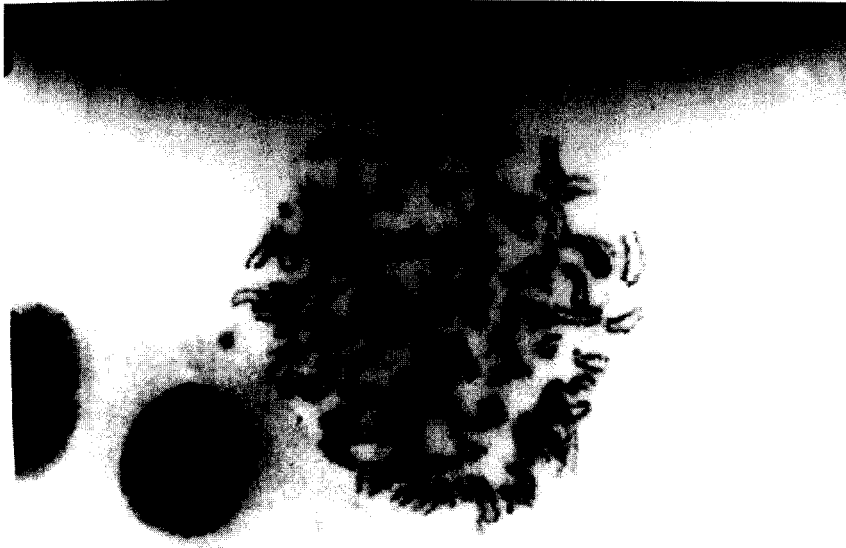


图 1

专利名称(译)	抗人卵巢癌单克隆抗体杂交瘤细胞系及其单克隆抗体和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN1609203A</a>	公开(公告)日	2005-04-27
申请号	CN200410080352.9	申请日	2004-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院		
申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院		
当前申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院		
[标]发明人	冯捷 钱和年 崔恒 付天云 成夜霞 程洪艳 叶雪 李小平 姚煜 昌晓红		
发明人	冯捷 钱和年 崔恒 付天云 成夜霞 程洪艳 叶雪 李小平 姚煜 昌晓红		
IPC分类号	A61K39/395 A61P35/00 C07K16/18 C12N5/22 G01N33/534 G01N33/574		
其他公开文献	CN1313603C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于生物技术及细胞工程领域。涉及一种单克隆抗体杂交瘤细胞系的建立方法及所建立的细胞系，其主要技术特征为以人卵巢癌组织标本制备可溶性免疫原，免疫BALB/c小鼠，运用杂交瘤技术经融合、筛选、反复克隆化，获得能稳定分泌抗人卵巢癌单克隆抗体的杂交瘤细胞系。该杂交瘤细胞系命名为BUPH：OVCAMab，由中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)保藏，保藏号为CGMCC No. 1225。本发明也公开了用该细胞系制备单克隆抗体OVCAMab及抗体提纯方法。该抗体在放免显像中可应用于卵巢癌的早期诊断、体内定位、复发检测及转移灶的发现等。

