

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610030168.2

[51] Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

[43] 公开日 2008年2月20日

[11] 公开号 CN 101125888A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2006.8.17

[21] 申请号 200610030168.2

[71] 申请人 苏州思坦维生物技术有限责任公司

地址 215021 江苏省苏州工业园区星湖街218号生物纳米园A3号A105室

[72] 发明人 周群敏 陶飞龙 胡红群 马玲莎
徐一清

权利要求书1页 说明书19页 附图5页

[54] 发明名称

可特异识别血管内皮细胞生长因子的重组免疫球蛋白的表达生产及其应用

[57] 摘要

以抑制血管内皮细胞生长因子 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) 及其受体的抗肿瘤血管增生疗法已发展成为当今肿瘤治疗的一种主要手段。本发明选取血管内皮细胞生长因子及其受体为靶点, 采用基因工程及细胞工程手段体外大量表达生产出一种可特异识别与结合人血管内皮细胞生长因子的人源化的重组免疫球蛋白。该重组免疫球蛋白是一潜在的拮抗血管增生的肿瘤治疗药物。

1. 一种可特异识别与结合血管内皮细胞生长因子的人源化的重组免疫球蛋白 S2345。其特征在于 a) 该重组免疫球蛋白具有如基因序列表 1 所示的氨基酸序列；b) 该重组免疫球蛋白保持有与 VEGF 特异相结合的活性, 并可抑制 VEGF 介导的促血管内皮细胞增生作用；c) 该重组免疫球蛋白为重组基因工程与细胞培养的方法生产出抗体蛋白。
2. 一种制备权利要求 1 的重组免疫球蛋白 S2345 的方法；其步骤包括：a) 以多聚酶链式反应 (PCR) 及重组基因工程方法构建含有重组免疫球蛋白 S2345 基因的表达载体；该表达载体的特征在于其具有如基因序列表 2 所示的重组基因核苷酸序列；b) 表达载体转染入哺乳动物细胞及鉴定、检测重组免疫球蛋白 S2345 在转染细胞中的分泌性表达；c) 重组免疫球蛋白 S2345 表达阳性细胞的筛选、扩增培养及上清液的收集；d) 以免疫亲和层析柱法从收集的细胞培养上清液中分离提取重组免疫球蛋白 S2345。
3. 用权利要求 1 的重组免疫球蛋白 S2345 为试剂盒成分进行体内或体外检测 VEGF 表达水平的方法；其特征在于被检测的 VEGF 是以流离降级的可溶性物质形式存在于体液（如血清、血浆、唾液等）与细胞培养上清液中或以膜蛋白形式表达于细胞/组织中。
4. 用权利要求 1 所述的重组免疫球蛋白 S2345 为吸附剂，体外分离或清除 VEGF 及 VEGF 表达阳性细胞或组织的方法。
5. 用权利要求 1 所述的重组免疫球蛋白 S2345 作为 VEGF 的中和吸附剂在体外拮抗抑制 VEGF 介导的促血管内皮细胞增生。
6. 用权利要求 1 所述的重组免疫球蛋白 S2345 作为体内 VEGF 的中和吸附剂以拮抗抑制肿瘤区域的血管增生。

可特异识别血管内皮细胞生长因子的重组免疫球蛋白的表达生产及其应用

技术领域

本发明属于生物技术-重组基因工程领域。更具体地说,本发明涉及用重组基因工程与细胞培养的方法生产出一种可特异识别与结合人血管内皮细胞生长因子的人源化的重组免疫球蛋白。本发明的重组免疫球蛋白保持有与 VEGF 高度特异结合的活性。该重组蛋白在血管增生的研究及肿瘤的临床诊断及治疗上具有广泛的用途。

背景技术

血管增生或新生 (angiogenesis) 在生物学上,是指体内的已存在的血管(如毛细血管和小静脉)通过出芽或分裂的方式而产生新的血管的过程。血管增生在维持机体的许多正常的生理过程如妊与胚胎组织发育,外伤伤口的愈合与修复是有益的和必需的。但近来的研究发现血管的新生在肿瘤的发生、发展与转移过程中也起着重要作用。如在早期的微小实体瘤及其在 2 mm 以下的转移病灶中,肿瘤可仅依赖于周围组织的弥散作用提供的营养与氧气而生长,此期一般无需血管新生。但当肿瘤进一步增长扩大时,肿瘤则需要靠通过新生的血管来建立其自身的血液循环系统,以获取其生长必需的营养;此期的肿瘤增长快速并具浸润与转移能力,且往往造成肿瘤患者死亡(综述详见 Folkman J. Nat Med, 1995, 1: 27; Carmeliet P. Nat Med, 2003, 9:653; Ferrara N. Endocrine Reviews, 2004, 25:581; 翟鑫,王玉亚,宫平:中国药物化学杂志 2006, 16:60)。由于血管新生在肿瘤的发生、发展与转移过程中起着如此重要的作用,故目前以抑制肿瘤血管新生为目的的“抗血管增生疗法”已发成为继传统的手术,放疗及化疗之后的最前沿的抗肿瘤治疗手段之一。抗肿瘤血管增生疗法得以实现的关键则是需研制出可特异地抑制肿瘤血管增生的高效、低毒的新型药物制剂。而要成功开发研制出该类抗肿瘤药物,则需对血管新生的分子细胞生物学基础与原理有一深刻的理解。

在生物学上,体内的血管能够不断地新生与增长的关键是其内衬的血管内皮细胞具有不断分裂增生及定向迁移置入已有的血管管壁的能力。血管内皮细胞的增生受体内正(即刺激

血管增生)、负(即抑制血管增生)两大方面因子的调控(Liotta LA. 等 Cell, 1989, 64:327; Nyberg P, Xie L and Kalluri R. Endogenous Inhibitors of Angiogenesis, Cancer Research, 2005, 65: 3967)。正面调控血管内皮细胞增生的因子有:血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)及血管生成素(angiotensin Ang1,2)等。而负面调控血管内皮细胞增生的因子有血管抑制素(angiotatin)、内抑素(endostatin)及血小板因子-4等。而在这些调控血管内皮细胞增生的因子中,以血管内皮细胞生长因子(即 VEGF)的作用最为重要(Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. Endocrine Reviews, 2004, 25: 581)。事实上,VEGF 是目前已知的最强烈的刺激血管内皮细胞分裂增生的因子。VEGF 在血管增生中的重要性也已在 VEGF 基因剔除小鼠的研究中被证实:如只要当 VEGF 基因中的一份被敲除后,胚胎中的血管即无法正常形成进而导致胚胎在 11 至 12 天时死亡(Carmeliet P 等 Nature 1996, 380: 435; Ferrara N 等 Nature 1996, 380: 439)。

人的 VEGF 的基因全长为 14 kb,由 8 个外显子,7 个内含子组成。其中由于其 mRNA 不同的剪接,体内至少存在有 6 种不同形式的 VEGF 蛋白:即 VEGF121、VEGF145、VEGF165、VEGF183、VEGF189 及 VEGF206 (Tischer E 等 J Biol Chem 1991, 266: 11947)。这些不同形式的 VEGF 均主要以可溶性同源二聚体糖蛋白形式存在于细胞外间质。VEGF 通过与表达在血管内皮细胞膜上的 VEGF 受体的高度结合而介导出刺激血管内皮细胞有丝分裂及促进血管增生的活性(Leung DW 等 Science 1989, 246:1306;Keck PJ 等 Science, 1989, 246:1309)。血管内皮细胞生长因子受体目前已知的主要有三种:即 VEGFR1 (fms-like tyrosine kinase, FLT-1) (Shibuya M 等 Oncogene, 1990, 5:519; De Vries 等 Science 1992, 255: 989);VEGFR2 (Kinase-insert Domain Receptor, KDR;在小鼠中称为 Flk-1)(Terman BI 等 Biochem Biophys Res Commun 1992, 187: 1579-1586)和 VEGFR3 (FLT-4)。这三种受体在结构上很相似,均为 I 型跨细胞膜糖蛋白,由一含 7 个免疫球蛋白样结构的胞外区,一膜穿透区及一含酪氨酸激酶的膜内区组成。在这三种受体中,以 VEGFR2/KDR/ Flk-1 在介导 VEGF 的生物效应中的作用最为重要与特殊。如在基因剔除小鼠的研究中发现:当 KDR/Flk-1 基因被敲除后,小鼠胚胎中的血管内皮细胞无法增生,从而导致血管岛及血管的无法形成及小鼠胚胎在发育到 8.5 至 9 天时即死亡(Shalaby F 等 Nature, 1995, 376: 62)。而在 FLT-1 基因被敲除的小鼠胚胎中,其血管内皮细胞还可增生,只是新增生的血管内皮细胞在其后的排列形成

血管管腔的过程受到了抑制 (Fong GH 等 Nature 1995, 376: 66)。

VEGF 及其受体在肿瘤组织的血管新生中也起着很重要的作用。已有报道在多种实体瘤组织中 (如胃癌、肝癌、结、直肠癌、卵巢癌、乳腺癌等) 可以检测到 VEGF 及其受体 KDR 的基因表达, 而且其基因表达水平高低与肿瘤的生长与转移复发成高度正相关 (Folkman J. Nat Med, 1995, 1: 27; Carmeliet P. Nat Med, 2003, 9:653; Ferrara N. Endocrine Reviews 2004, 25: 581)。目前以血管内皮生长因子及其受体为靶点的抗肿瘤血管生成的抑制剂的研究已成为当今国际肿瘤药物研究领域的重点, 仅在美国目前就已有十多种在研发的药物已通过动物实验正进入临床 I-III 期试验阶段。在抗肿瘤血管增生抑制剂的药物研发领域, 主要存在两大手段: 即 1) 寻找可直接抑制 VEGF 受体中内在的酪氨酸蛋白激酶活性的物质, 从而达到阻止由 VEGF 受体在介导促血管内皮细胞分裂增生中的作用, 该研发的药物主要是各种小分子物抑制剂如 PTK787/ZK 222584 (Wood JM 等 Cancer Res 2000, 60: 2178); 2) 通过抑制 VEGF 与其受体的结合, 从而达到阻止 VEGF 及其受体在介导促血管内皮细胞分裂增生的作用制血管增生的作用, 该研发的药物包括抗 VEGF 或抗 VEGF 受体的各种单克隆抗体, 反义寡核苷酸及小分子抑制剂等 (Kim KJ 等 Nature 1993, 362: 841; Presta LG 等 Cancer Res, 1997, 57:4593; Posey J A 等 Clinical Cancer Research, 2003, 9:1323)。其种由美国 Genentech 公司研发、生产并于 2004 上市销售的 Bevacizumab (商品名 Avastin) 就是一种可识别与结合 VEGF 的人源化的单克隆抗体。Avastin 通过中和或清除体内 VEGF 而达到抑制肿瘤血管生长, 进而遏制肿瘤的生长和转移的作用 (Presta LG 等 Cancer Res, 1997, 57: 4593; Hurwitz H 等 N Engl J Med, 2004;350:2335)。

除了上述表达在细胞膜上的 I 型跨细胞膜糖蛋白受体之外, 体内还存在有另一种以可溶性糖蛋白形式流离于细胞外间质的 VEGF 受体。该类可溶性 VEGF 受体保留有与 VEGF 高度结合的生物活性, 但由于不含酪氨酸蛋白激酶区, 故在与 VEGF 结合后, 不会介导出刺激血管内皮细胞分裂及血管新生的活性 (Kendall RL and Thomas KA Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 10705)。与表达在细胞膜上的受体一样, 在流离的 VEGF 受体中, 参与结合 VEGF 配体的关键部位也是存在在其胞膜外免疫球蛋白样结构区中 (Davis-Smyth T 等 EMBO J, 1996, 15: 4919; Fuh G 等 J Biol Chem, 1998, 273, 11197)。但由于体内流离的 VEGF 受体基因表达水平低, 故很难提取与分离足够量的蛋白质以作进一步研究。本发明则选取 VEGF 受体

的胞膜外区基因为构建靶点,采用基因工程与细胞培养的方法生产出一种可与 VEGF 特异结合的重组免疫球蛋白。与内源性的流离 VEGF 受体一样,本发明的重组免疫球蛋白可通过竞争性抑制 VEGF 与细胞膜上 VEGF 受体的结合而可达到抑制血管内皮细胞增生的效果。该重组蛋白在血管增生的研究及肿瘤的临床治疗上具有广泛的用途。

发明内容

本发明是以基因工程/细胞工程为手段开发生产出一种可与 VEGF 特异结合的重组免疫球蛋白。该重组免疫球蛋白(代号 S2345)含有 VEGF 受体的胞膜外数个免疫球蛋白样结构区。与内源性的流离 VEGF 受体一样,本发明的重组免疫球蛋白通过竞争性抑制 VEGF 与细胞膜上 VEGF 受体的结合而可达到抑制血管内皮细胞增生的效果。本发明的重组蛋白作为抗体样制剂在血管增生的研究及肿瘤的临床诊断及治疗上具有广泛的用途:如 1)可作为研究试剂用于体内外检测 VEGF 的表达水平;2)作为中和吸附剂用于体内外分离吸附 VEGF 分子及 VEGF 分泌表达阳性的细胞与组织;3)作为血管靶向治疗药物用于干预 VEGF 介导的血管新生以及肿瘤增生与转移等。

本发明的具体内容如下:

1. 含有能与 VEGF 特异结合的重组免疫球蛋白基因(代号 S2345)的表达载体构建。

构建含有能与 VEGF 特异结合的重组免疫球蛋白基因的表达载体的具体技术与操作方法可参见《分子克隆》等书。鉴于重组免疫球蛋白具有分子量大,含二硫键(S-S)及糖基,其表达生产策略以真核细胞分泌性表达最为理想。真核细胞分泌性表达的另一大优点是合成的免疫球蛋白可集聚于细胞培养液中,便于回收分离。

保证重组免疫球蛋白 S2345 在真核细胞分泌性表达的一大关键因素是需要一段信号肽(signal peptide)以引导新合成的蛋白质可穿透过 E.R,并最终分泌到细胞外间质。信号肽的编码来源可来自免疫球蛋白基因本身,或其他外源基因如 IL-2 等基因。本发明具体实施中则采用人 CD24 基因编码的信号肽(即 CD24SP)以引导融合蛋白的分泌性表达。本发明的免疫球蛋白基因恒定区段可以来自于 IgG, IgM, IgA 或 IgD 任一型。本发明在具体实施中其恒定区段来自于 IgG1 的重链。IgG1 及其恒定区段融合蛋白具有如在血清中的半衰期长(14

天), 便于检测、分离与纯化等特征。

本发明的重组免疫球蛋白基因表达载体的构建可分为两部分: 1) 克隆出人免疫球蛋白基因重链恒定区段, 并将其定向插入到真核细胞表达载体, 获得含人免疫球蛋白基因重链恒定区段基因的载体, 2) 克隆出 VEGF 受体上的免疫球蛋白样结构区基因, 并将其与人免疫球蛋白基因重链恒定区段基因相连, 从而获得可与 VEGF 特异结合的免疫球蛋白 S2345 的重组基因表达载体。

1a. 免疫球蛋白恒定区段基因的克隆扩增及其表达载体的构建

人类免疫球蛋白重链恒定区段基因可以是 cDNA 或基因组形。含免疫球蛋白重链恒定区段的 cDNA 可采用 RT-PCR 方法从健康人外周血单核细胞(PBMCs)中克隆扩增获得。用于 PCR 的上、下游引物可参照已报道的 cDNA 核苷序列体外合成。以 RT-PCR 克隆获得的重链恒定区段 cDNA 可包含有免疫球蛋白的铰链区(hinge), CH1 区, CH2 区及 CH3 区等。克隆获得的恒定区 cDNA 经限制性内切酶酶切处理, 再用 T4 连接酶将其与经相应的酶切处理的表达载体相连, 经转化入感受细菌, 再经筛选, 扩增, 提取质粒 DNA 及酶切鉴定, 即获得含免疫球蛋白重链恒定区段基因的表达载体。可用于真核细胞表达恒定区基因的载体包括如 pcDNA3.1 (Invitrogen), 逆转录病毒载体 pLXSN (Clontech) 载体, 腺病毒(双链 DNA) 载体等。该类表达载体的特征是包括真核细胞表达启动子/增强子 hCMV 启动子、5' LTR 及 polyA 等序列在内。

1b. VEGF 受体上的免疫球蛋白样结构区基因的克隆扩增

同样, 采用 RT-PCR 方法从健康人外周血单核细胞(PBMCs)中克隆扩增获得含能识别与结合人 VEGF 的 VEGFR 上的免疫球蛋白样结构区基因的 cDNA。用于 PCR 的上、下游引物可参照已报道的 VEGFR cDNA 序列体外合成。克隆获得 cDNA 基因经限制性内切酶酶切处理, 再用 T4 连接酶将其定向插入到上述的含免疫球蛋白恒定区基因段的表达载体中, 从而获得带 S2345 重组基因的载体。重组的 S2345 基因保持有唯一开放读框(open-reading frame, ORF)。该 ORF 的编码起始于 CD24S SP 的信号肽, 终止于免疫球蛋白重链 CH3 区。

2. 重组免疫球蛋白 S2345 在哺乳动物细胞中的表达生产

重组免疫球蛋白 S2345 的表达生产以在哺乳动物细胞中为理想。常用的哺乳动物细胞有 CHO, COS-7, HeLa, HEK-293 等。保证重组免疫球蛋白在哺乳动物细胞中的高效稳定表达的关键因素是 1) 高效地将表达载体转染入细胞内; 2) 筛选与扩增出高表达细胞株。

将表达载体转染入哺乳动物细胞(如 CHO 细胞)有两种主要方式:即瞬时转染与稳定转染。稳定转染的细胞因可进一步用于筛选与扩增高表达细胞株,在本发明实施中为优选。稳定转染常用的方法包磷酸钙法;阳离子脂质体法;病毒介导法及电穿孔法等。

重组免疫球蛋白 S2345 基因在转染细胞里的表达可以用免疫组化方法进行检测;也可以通过免疫印迹试验及 ELISA 方法定量检测细胞培养液中的重组免疫球蛋白。经检测确认转染细胞表达该重组免疫球蛋白后,转染的细胞则转入含筛选药物如 G418 的培养液中进行筛选。筛选出的表达细胞株再扩增培养,并收集其培养上清液。收集的培养液用于分离提取重组免疫球蛋白 S2345。

3. 重组免疫球蛋白 S2345 的分离提取及其理化与生物活性鉴定

重组免疫球蛋白 S2345 可以用免疫亲和层析柱法从收集的转染细胞培养液中分离提取。用于分离提取重组免疫球蛋白 S2345 的常用免疫亲和层析柱有 protein-A 或 protein-G 亲和层析柱。如以 Protein-G 免疫亲和层析柱分离提取重组免疫球蛋白 S2345,其操作步骤如下:取收集的细胞培养上清液,经离心及以 0.45 μm 滤膜过滤后,将滤液上样置 Protein G-亲和层析柱,重组免疫球蛋白 S2345 依其重链 Fc 段与 protein-G 的非共价的耦联而被特异吸附于亲和层析柱中。层析柱先以 PBS 洗脱去除杂蛋白,再以低 pH 液(如 pH 2.7, 0.1M 甘氨酸)洗脱被吸附的蛋白。再经调节 pH 至 7.0 及对 PBS 透析后即获得纯化的重组免疫球蛋白 S2345。

分离提取的重组免疫球蛋白 S2345 可以用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE),结合考马斯亮蓝染色或免疫印迹试验及 ELISA 等方法加以鉴定。

本发明的重组免疫球蛋白 S2345 的一大特征是保持有与 VEGF 相特异结合的生物活性。一种鉴定重组免疫球蛋白 S2345 与 VEGF 特异结合的方法如下:先以含 VEGF 基因的表达载体转染入哺乳动物细胞如 CHO 细胞,24-48 h 后,转染的 CHO 细胞经 1x PBS 液漂洗及以固定后,分别加入含重组免疫球蛋白 S2345 或对照免疫球蛋白,25° C 孵育 1-2 h,以 PBS 液洗脱,

再加入酶标记的抗人 IgG-Fc 抗体, 25° C 孵育 1-2 h, 再以 PBS 液洗脱, 然后加入显色液, 室温至显色, 于显微镜下观察显色结果。如加入重组免疫球蛋白 S2345 的孔有显色阳性的细胞, 而加入对照免疫球蛋白的孔里细胞应无显色, 证明重组免疫球蛋白 S2345 保持有与 VEGF 相特异结合的生物活性。

4. 重组免疫球蛋白 S2345 的应用

本发明内容的另一大部分为重组免疫球蛋白 S2345 的应用。

本发明的重组免疫球蛋白 S2345 因具有与 VEGF 特异结合的活性, 故可广泛用于如体内外检测 VEGF 的表达水平; 用于体内外分离吸附 VEGF 分子及 VEGF 分泌表达阳性的细胞与组织; 用于体内干预 VEGF 介导的血管新生及肿瘤增长等。其具体的应用说明如下:

4a. 重组免疫球蛋白 S2345 作为试剂用于体内外检测 VEGF 的表达水平

本发明的重组免疫球蛋白 S2345 可作为试剂用于体内外检测 VEGF 的表达水平。被检测的 VEGF 分子包括存在于体液 (如血清、血浆、唾液等)、细胞培养上清液中流离的可溶性分子及表达于细胞/组织膜上的蛋白。

作为检测试剂, 重组免疫球蛋白 S2345 可有标记处理的及未标记处理的两种主要形式存在。常用于标记重组免疫球蛋白的标记物包括酶 (如辣根过氧化物酶, 碱性磷酸酶, 葡萄糖氧化酶, 微过氧化物酶); 荧光素 (异硫氰酸荧光素, FITC); 生物素-抗生物素及胶体金等。经标记的重组免疫球蛋白 S2345, 可作为试剂直接用于免疫酶组化、免疫荧光或免疫印迹等试验来体内外检测 VEGF 分子的表达水平。

未标记处理的重组免疫球蛋白 S2345 蛋白也可与其他已标记的试剂合并作为试剂盒成分, 用于体外检测 VEGF 分子的表达。其他标记的试剂可以是酶标或荧光标记的抗免疫球蛋白 Fc 段抗体, 酶标或荧光标记的 protein-A/protein-G 蛋白, 酶标或荧光标记的抗人 VEGF 抗体等。如以未标记的重组免疫球蛋白 S2345 融合蛋白与酶标记的鼠抗人 VEGF 单克隆抗体合并组成试剂盒, 用夹心 ELISA 法来检测体液 (如血清、细胞悬液、细胞培养上清液) 中的 VEGF 的表达水平为例, 其检测步骤如下: 先用重组免疫球蛋白 S2345 包被 ELISA 板, 4° C 过夜, 经 1x PBS 液漂洗及 2% BSA 液室温封闭 1~2h 后, 分别加入待检的样品如血清, 37° C 孵育 1-2 h, 经

PBS 液洗脱后，再加入酶标记的鼠抗人 VEGF 抗体，37° C 孵育 1-2 h，PBS 液洗脱后，加入显色液，室温至显色，再以酶联免疫仪测定特定波长处各孔的吸光值。根据 OD 值并与 VEGF 正常参照物相比较，可估测待检的样品中的 VEGF 水平。

4b. 重组免疫球蛋白 S2345 用于体内外吸附及分离 VEGF 表达阳性细胞与组织

重组免疫球蛋白 S2345 可用于体内外吸附与分离 VEGF 表达阳性的细胞与组织。如用 S2345 蛋白体外吸附分离 VEGF 表达阳性的细胞与组织为例，可先将重组免疫球蛋白 S2345 吸附在适当的固相载体上（固相载体包括如细胞培养板，细胞培养皿，硝酸纤维素膜等），再加入含 VEGF 表达阳性的细胞或组织，4° C 孵育 1-2 h，再以 1x PBS 液洗脱，即达到吸附与分离 VEGF 表达阳性细胞或组织成分的目的。

4c. 重组免疫球蛋白 S2345 用于拮抗 VEGF 介导的血管皮细胞增殖作用

从健康人外周血单核细胞 (PBMCs) 中提取血管内皮细胞或人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)，置于含有人 VEGF 的细胞培养皿中培养，再将重组免疫球蛋白 S2345 按不同剂量（高、中、低剂量）分别加入到血管内皮细胞或 HUVEC 培养中，以加入正常的免疫球蛋白做为对照组，37° C 孵育 2-3 天。应用流式细胞仪观察血管皮细胞增殖与凋亡的情况。将结果与对照组相比，可判断重组免疫球蛋白 S2345 拮抗 VEGF 介导的血管皮细胞增殖分裂能力。该类拮抗试验结果可为免疫球蛋白 S2345 在体内治疗血管增殖性病变（如抗肿瘤区域内的血管增生）提供体外实验依据。

4d. 体外测定重组免疫球蛋白 S2345 与 VEGF 的结合活性

重组免疫球蛋白 S2345 与 VEGF 的结合活性可通过与 ¹²⁵I 标记的 VEGF 或 biotin 标记的 VEGF 结合实验而测定。如以 biotin 标记的 VEGF 为例：先用重组免疫球蛋白 S2345 包被 96 孔 ELISA 板，4° C 过夜，经 1x PBS 液漂洗及 2% BSA 液室温封闭 1~2h 后，分别加入同浓度 biotin-VEGF 4° C 孵育 1-2 h，经 PBS 液洗脱后，再加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 Avidin，4° C 孵育 1-2 h，PBS 液洗脱后，加入显色液，室温至显色，再以酶联免疫仪测定特定波长处各孔的吸光值。根据 OD 值可测定被 96 孔板上重组免疫球蛋白吸附的 VEGF 量。

重组免疫球蛋白 S2345 与 VEGF 对 biotin 标记的 VEGF 的竞争结合：可以固定浓度的 biotin

标记的 VEGF 及不同浓度的游离的重组免疫球蛋白 S2345 与固定在 96 孔板上的重组免疫球蛋白 S2345 竞争结合,测定包被蛋白与 biotin-VEGF 结合量的变化,获得游离 S2345/包被 S2345 竞争结合 biotin-VEGF 曲线。从该曲线可推测出重组免疫球蛋白 S2345 与 VEGF 体外结合的活性强度。

附图说明

图 1 为含重组免疫球蛋白 S2345 基因的表达载体

图 2 为含重组免疫球蛋白 S2345 基因的表达载体的酶切结果

图 3 为以 ELISA 检测转染的 CHO 细胞上清中的重组免疫球蛋白 S2345 的含量

图 4 为以免疫印迹试验分析重组免疫球蛋白 S2345

图 5 免疫组化方法检测重组免疫球蛋白 S2345 与 VEGF 蛋白的结合

本发明具体实施方式

实施例一：重组免疫球蛋白 S2345 表达载体的构建

1. 人类免疫球蛋白恒定区基因片段的克隆。

人类免疫球蛋白恒定区基因段可采用多聚酶链式反应(RT-PCR)方法从健康人外周血单核细胞(PBMCs)中克隆获得。其具体实施如下:取健康人外周血分理出单核细胞(PBMCs),以 Trizol 按常规方法从分理出的单核细胞中提取总 RNA。再取 1 μ g 总 RNA,加入到逆转录酶的反应液里(总体积为 20 μ ,包口 5 \times buffer 4 μ L、Oligo(dT)引物 2 μ L 及 10mmol/L dNTP 8 μ L, RNasin 1 μ L, 反转录酶 5U~10U),经 70 $^{\circ}$ C 变性 10 分钟, 42 $^{\circ}$ C 1 小时, 42 $^{\circ}$ C 30 分钟, 70 $^{\circ}$ C 15 分钟, 逆转录反应终止, 合成得到 cDNA。

PCR 扩增反应: PCR 扩增用的 Taq 酶购自大连 TAKARA 生物公司。PCR 的反应总体积为 50 μ l (上述逆转录反应终产物 cDNA 2 μ L, 10 \times Taq 酶 buffer 5 μ L、上、下游引物各 2 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, RNasin 1 μ L, Taq 酶 5 U, 去离子水 37 μ l)。PCR 的反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 35 个循环, 末次循环 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

PCR 产物纯化及酶切: 取 PCR 产物用 BamH I 和 Bgl II 酶切, 反应完毕后, 经 1%琼脂糖

电泳后，切下酶切扩增片段，再经回收纯化，用 20 μ l 去离子水溶解后，置-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

DNA 重组连接及转化感受宿主菌： 采用以 T4 DNA 连接酶的方法将上述酶切后的 DNA 与经同样酶切处理的表达载体 pcDNA3.1 (Invitrogen) DNA 体外相连。连接反应体系总体积为 20 μ l，在 16 $^{\circ}$ C 条件下连接 16 h，之后，取 2 μ l 连接反应物在 4 $^{\circ}$ C 条件下转化感受态细菌宿主菌 DH5a (50 μ l/管) 30 分钟。转化结束后，将感受细菌接种于 LB/agar 培养板 (含 100 μ g/ml Amp)，37 $^{\circ}$ C 孵育过夜，再提取重组质粒 DNA 及酶切鉴定。

2. 重组免疫球蛋白 S2345 表达载体的构建：

长度为 1.7kb 的人类 VEGFR 胞外的部分免疫球蛋白样结构区基因也采用 RT-PCR 技术从人健康人外周血单核细胞 (PBMCs) cDNA 基因库中克隆出。用于 PCR 扩增的上下游引物序列如下：

1. 上游引物：F-R1(27mer) gcg gga tcc tct gtg ggt ttg cct agt
2. 下游引物：R-R6n(27mer) gcg ctc gag ctc tag gac tgt gag ctg

PCR 扩增反应：反应总体积为 50 μ L (上述逆转录反应终产物 cDNA 2 μ L，10 \times Taq 酶 buffer 5 μ L、上、下游引物各 2 μ L，10 mmol/L dNTP 1 μ L，RNasin 1 μ L，Taq 酶 5 U，去离子水 37 μ L)。PCR 的反应条件为：94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后，然后 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s，55 $^{\circ}$ C 退火 40 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s，35 个循环，末次循环 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

PCR 产物纯化及酶切：取 10 μ l PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳分离后，切下扩增片段，再经回收纯化及 BamHI/XhoI 双酶切后，用 20 μ l 去离子水溶解后，置-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

DNA 重组连接及转化感受宿主菌：采用以 T4 DNA 连接酶的方法将上述酶切后的 VEGFR 胞外免疫球蛋白样结构区基因与经同样双酶切 (BamHI/XhoI) 处理的含人类免疫球蛋白恒定区基因段的表达载体相连。在 16 $^{\circ}$ C 条件下连接 16 h 后，取 2 μ l 连接反应物转化感受态细菌宿主菌 DH5a。转化结束后，将感受细菌接种于 LB/agar 培养板 (含 100 μ g/ml Amp)，37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

重组质粒 DNA 的提取及酶切鉴定： 从含 Amp 筛选平板上挑取菌落，接种于 3ml LB 培养基中 (含 100 μ g/ml Amp)，37 $^{\circ}$ C 振荡过夜。第 2 天，经离心收集细菌，采用碱裂解法小量提取质粒 DNA。提取的质粒 DNA 经 Xho I 酶切，或经 Hind III 和 Not I 双内切酶酶切后，再进行电泳鉴定。 其中的 Hind III 和 Not I 双内切酶酶切结果如图 2 所示：样品 1 及样品 2 为含 S2345Ig 重组基因的质粒。该酶切结果与图 1 的 pQY-S2345Ig 质粒图谱酶切位点相符合。对酶切证明含 S2345Ig 重组基因的质粒再经测序鉴定，结果表明重组质粒含有方向及序列均正确的 pQY-S2345Ig 重组基因。 所含的 S2345Ig 重组基因的核苷酸序列见所附的基因序列 2；

其编码的蛋白质氨基酸序列见所附基因序列 3。

实施例二：以 ELISA 检测 pQY-S2345Ig 转染的细胞上清中的重组免疫球蛋白 S2345

鉴于重组免疫球蛋白 S2345 具有分子量大，含二硫键 S₂S₂ 及糖基，其表达以在哺乳动物细胞为好。预实验证实 CHO 细胞不含有内源性 VEGF 基因表达，如可用于体外转染及表达重组免疫球蛋白 S2345。体外转染 CHO 细胞可采用 fugen6 介导的方法：取对数生长期的 CHO 细胞，胰酶/5mM EDTA 常规消化后，以 1×10^5 细胞/孔接种 6-孔塑料培养板，37° C，5% CO₂ 培养过夜。第 2 天，在 100 μ L 无血清、无抗生素的 DMEM 加入 6 μ L fugen6 与不同量的 pQY-S2345Ig 重组质粒及阴性对照空载体 DNA (1-2 μ g) 混匀，制备成 fugen6-DNA 混合液，室温放置 15 min 后，缓慢滴加至 CHO 细胞中，于 37° C、5%CO₂ 条件下培养培养 4-6 h 后，加入 3 ml DMEM-5% fcs/孔，转染 24 h 后，换无血清 DMEM 培养基，48h~72h 后，收集培养细胞上清液。

收集的细胞培养上清液用 ELISA 方法测定重组免疫球蛋白 S2345。其操作步骤如下：用羊抗人 IgG-Fc 单抗 (2 μ g/ml, 50 μ L /孔) 包被 96-well ELISA 板，4° C 过夜，经 1x PBS 液漂洗及 2% BSA (in PBS-0.1% tween 20 液) 室温封闭 1~2h 后，分别加入含免疫球蛋白 S2345 基因的质粒或空载体转染的 CHO 细胞上清液，37° C 2 h，PBS-0.1% tween 20 洗板 \times 3，再加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗人 IgG-Fc 多克隆抗体 (1:1000 稀释)，37° C 孵育 1 h；以 PBS-0.1% tween 20 洗板 \times 3，然后加入显色液 (邻苯二胺)-3% H₂O₂，室温 10 min，1 mol/L HCL 终止反应，以酶联免疫仪测定以酶标仪 (Microplate reader 550, Bio-Rad) 测定 490 nm 波长处各孔的吸光值 (OD₄₉₀)。如图 3 示 (图 3: 以 ELISA 检测转染的 CHO 细胞上清中的重组免疫球蛋白 S2345 的含量)，pQY-S2345Ig 质粒转染的 CHO 细胞培养上清液 (样品 1 及样品 2) 能检测到 VS2345Ig 蛋白；而空载体转染样品 (样品 3) 的培养上清液结果未见阳性反应。与正常的免疫球蛋白参照物 (样品 4: 免疫球蛋白浓度为 20 μ g/ml) 相比，pQY-S2345Ig 质粒转染的细胞上清液中免疫球蛋白的浓度在 2-5 μ g/ml 间。

实施例三：重组免疫球蛋白 S2345 的纯化分离与鉴定

1. 重组免疫球蛋白 S2345 的分离提纯

重组免疫球蛋白 S2345 以 protein-G 免疫亲和层析柱法从收集的转染细胞培养液中分离提取。其操作步骤如下：取收集的含重组免疫球蛋白 S2345 细胞培养上清液 100 ml，经离心

及以 0.45 μm 滤膜过滤后, 将滤液上样于 Protein G-亲和层析柱上。上样结束后, 先以 10 倍于层析柱体积的 PBS 液洗脱层析柱, 共 2 次, 再以 2 ml 0.1M 的甘氨酸 (pH 2.7) 液洗脱被吸附的蛋白; 再经调节 pH 至 7.0 及对 PBS 透析后即获得纯化的重组免疫球蛋白 S2345。

2. 重组免疫球蛋白 S2345 的理化与生物活性鉴定

分离提纯的重组免疫球蛋白 S2345 蛋白可以用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE), 结合免疫印迹试验方法加以鉴定。其操作步骤如下: 纯化的重组免疫球蛋白 S2345 蛋白上样于 10% SDS-PAGE 凝胶, 进行电泳分离。SDS-PAGE 电泳结束后, 取下凝胶, 将蛋白质转印至 PVDF 膜 (30 V, 4 $^{\circ}$ C, 16 h), 再以 1% BSA 封闭, 室温 1~2h 后, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记-山羊抗人 IgG 多克隆抗体 (抗体购自 Sigma, 1:1000 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。膜经充分漂洗后, 加入显色液 (邻苯二胺, 3% H₂O₂), 至显色条带出现后, 蒸馏水漂洗终止反应。免疫印迹试验结果如图 4 示: 在非变性样品中, 含重组免疫球蛋白 S2345 蛋白的样品带呈阳性反应, 泳带在分子质量为 140kd 左右的位置, 这与预期的双倍体重组免疫球蛋白 S2345 的分子量大小相符。免疫印迹试验结果表明分离提纯的重组免疫球蛋白 S2345 保持有免疫球蛋白活性, 可被抗人 IgG 抗体识别。

实施例四: 重组免疫球蛋白 S2345 作为试剂用于检测细胞/组织中的 VEGF 的表达水平

本发明的重组免疫球蛋白 S2345 因具有与 VEGF 特异结合的活性, 故可作为抗体样试剂用于体内外检测 VEGF 的表达。在本发明的实施例中, 以重组免疫球蛋白 S2345 为第 1 抗体, 以辣根过氧化物酶标的山羊抗人 IgG 多克隆抗体为第 2 抗体, 两者合并使用以检测细胞/组织中的 VEGF 的表达。其步骤如下: 取对数生长期的 CHO 细胞, 胰酶/5mM EDTA 常规消化后, 以 2×10^4 细胞/孔接种 24-孔塑料培养板, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养过夜。第 2 天, 在 100 μL 无血清的 DMEM 加入 2 μL Fugen6 与不同量的含 VEGF165 质粒及对照质粒 DNA (1 μg) 混匀, 制备成 Fugen6-DNA 混合液, 室温放置 15 min 后, 缓慢滴加至 CHO 细胞中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 4-6 h 后, 加入 3 ml DMEM-5% 胎牛血清/孔 继速培养。在转染 48h 后, 以 1x PBS 液漂洗及 90% 甲醇 4 $^{\circ}$ C 下固定 CHO 细胞 20 min, 再加入重组免疫球蛋白 S2345 (1:100 稀释, 300 μl /孔), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后, 以 PBS 液洗脱 3 次, 再加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗人 IgG 多克隆抗体 (Sigma, 1:200 稀释, 300 μl /孔), 37 $^{\circ}$ C 再孵育 1 h 后, 以 PBS 液洗脱 3 次, 然后加入显色液 (邻苯二胺-3% H₂O₂), 室温 5-10 min 至显色反应出现, 于显微镜下观察显色结果。如图 5 示: 在加入含重组免疫球蛋白 S2345 蛋白及酶标记的山羊抗人

IgG 抗体后, VEGF165 质粒转染的细胞培养孔有 10%的细胞显色反应呈阳性(图 5a), 而对照质粒转染的细胞培养孔无显色阳性细胞(图 5b)。此结果说明本发明中的重组免疫球蛋白 S2345 保持有与 VEGF 特异结合的生物活性, 可作为试剂用于定性或定量检测细胞内的 VEGF 或流离于细胞外间质组织中的 VEGF 的表达。

同理, 重组免疫球蛋白 S2345 还作为 VEGF 的中和吸附剂用于分离吸附 VEGF 分子及 VEGF 分泌表达阳性的细胞与组织; 及用于拮抗抑制 VEGF 介导的肿瘤区域血管的新生等。

参考文献

1. Folkman J. (Review). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1995, 1:27-31.
2. Carmeliet P. (Review). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 2003, 9:653-660.
3. Ferrara N. (Review). Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews*, 2004, 25: 581-611.
4. 翟鑫, 王玉亚, 宫平 (综述): 以血管内皮生长因子及其受体为靶点的肿瘤血管生成抑制剂的研究进展. *中国药物化学杂志*, 2006, 16:60-64.
5. Liotta LA, Steeg PS, Stetle-Stevenson WJ, et al. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, 1989, 64:327-336.
6. Nyberg P, Xie L, and Kalluri R (Review). Endogenous Inhibitors of Angiogenesis *Cancer Research*, 2005, 65:3967-3979.
7. Carmeliet, P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, and Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996, 380: 435-439.
8. Ferrara, N, Carver Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell Braxton L, Hillan KJ, and Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996, 380:439-442.

9. Tischer, E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, and Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991, 266:11947-11954.
10. Leung, DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, and Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 1989, 246:1306-1309.
11. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*, 1989, 246: 1309-1311.
12. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*, 1990, 5:519.
13. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, and Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992, 255:989-991.
14. Terman, BI, Dougher Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, and Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 187:1579-1586.
15. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi T P. Failure of blood island and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature*, 1995, 376: 62~66.
16. Feng GH, Rossant J, Gertsenstein M. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 1995, 376: 66~68.
17. Yves A. Muller, Bing Li, Hans W. Christinger, James A. Wells, Brian C. Cunningham, and Abraham M. de Vos: Vascular endothelial growth factor: Crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94:7192-7197.
18. Wood, JM, Bold G, Buchdunger E, et al. PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral

- administration. *Cancer Res*, 2000 60:2178-2189.
19. Kim, KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, and Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature*, 1993, 362:841-844.
20. Presta, LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, and Ferrara N. Humanization of an anti-VEGF monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res*, 1997, 57:4593-4599.
21. Posey J A , Ng T C, Yang B, . Khazaeli MB, Carpenter MD, Fox F, , Needle M, Waksal H and LoBuglio AF. A phase I study of anti-kinase insert domain-containing receptor antibody, IMC-1C11, in patients with liver metastases from colorectal carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2003, 9:1323-1332.
22. Hurwitz H ; Fehrenbacher L ; Novotny W ; Cartwright T ; Hainsworth J ; Heim W ; Berlin J ; Baron A ; Griffing S ; Holmgren E ; Ferrara N ; Fyfe G ; Rogers B ; Ross R ; Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2004;350:2335-42.
23. Kendall, RL, and Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 10705-10709.
24. Davis-Smyth, T, Chen H, Park J, Presta LG, and Ferrara N. The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. *EMBO J* 1996, 15: 4919-4927.
25. Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, and Wells J. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 1998, 273, 11197-11204.

附：序列表

<110> 上海思坦维生物技术有限公司
 <120> 可特异识别血管内皮细胞生长因子的重组免疫球蛋白的表达生产及其应用
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 743
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <400> 1

```

Met gly arg ala met val ala arg leu gly leu gly leu leu leu leu
1           5           10           15
ala leu leu leu pro thr gln ile tyr ser ser glu thr thr thr gly
           20           25           30
thr ser ser asn ser ser gln ser thr ser asn ser gly leu ala pro
           35           40           45
asn pro thr asn ala thr thr lys gly ser pro phe ile ala ser val
           50           55           60
ser asp gln his gly val val tyr ile thr glu asn lys asn lys thr
65           70           75           80
val val ile pro cys leu gly ser ile ser asn leu asn val ser ser
           85           90           95
leu cys ala arg tyr pro glu lys arg phe val pro asp gly asn arg
           100          105          110
ile ser trp asp ser lys lys gly phe thr ile pro ser tyr met ile
           115          120          125
ser tyr ala gly met val phe cys glu ala lys ile asn asp glu ser
           130          135          140
tyr gln ser ile met tyr ile val val val val gly tyr arg ile tyr
145          150          155          160
asp val val leu ser pro ser his gly ile glu leu ser val gly glu
           165          170          175
lys leu val leu asn cys thr ala arg thr glu leu asn val gly ile
           180          185          190
asp phe asn trp glu tyr pro ser ser lys his gln his lys lys leu
           195          200          205

```

val asn arg asp leu lys thr gln ser gly ser glu met lys lys phe
 210 215 220
 leu ser thr leu thr ile asp gly val thr arg ser asp gln gly leu
 225 230 235 240
 tyr thr cys ala ala ser ser gly leu met thr lys lys asn ser thr
 245 250 255
 phe val arg val his glu lys pro phe val ala phe gly ser gly met
 260 265 270
 glu ser leu val glu ala thr val gly glu arg val arg ile pro ala
 275 280 285
 lys tyr leu gly tyr pro pro pro glu ile lys trp tyr lys asn gly
 290 295 300
 ile pro leu glu ser asn his thr ile lys ala gly his val leu thr
 305 310 315 320
 ile met glu val ser glu arg asp thr gly asn tyr thr val ile leu
 325 330 335
 thr asn pro ile ser lys glu lys gln ser his val val ser leu val
 340 345 350
 val tyr val pro pro gln ile gly glu lys ser leu ile ser pro val
 355 360 365
 asp ser tyr gln tyr gly thr thr gln thr leu thr cys thr val tyr
 370 375 380
 ala ile pro pro pro his his ile his trp tyr trp gln leu glu glu
 385 390 395 400
 glu cys ala asn glu pro ser gln ala val ser val thr asn pro tyr
 405 410 415
 pro cys glu glu trp arg ser val glu asp phe gln gly gly asn lys
 420 425 430
 ile glu val asn lys asn gln phe ala leu ile glu gly lys asn lys
 435 440 445
 thr val ser thr leu val ile gln ala ala asn val ser ala leu tyr
 450 455 460
 lys cys glu ala val asn lys val gly arg gly glu arg val ile ser
 465 470 475 480
 phe his val thr arg gly pro glu ile thr leu gln pro asp met gln
 485 490 495
 pro thr glu gln glu ser val ser leu trp cys thr ala asp arg ser
 500 505 510

pro lys ser cys asp lys thr his thr cys pro pro cys pro ala pro
 515 520 525
 glu leu leu gly gly pro ser val phe leu phe pro pro lys pro lys
 530 535 540
 asp thr leu met ile ser arg thr pro glu val thr cys val val val
 545 550 555 560
 asp val ser his glu asp pro glu val lys phe asn trp tyr val asp
 565 570 575
 gly val glu val his asn ala lys thr lys pro arg glu glu gln tyr
 580 585 590
 asn ser thr tyr arg val val ser val leu thr val leu his gln asp
 595 600 605
 trp leu asn gly lys glu tyr lys cys lys val ser asn lys ala leu
 610 615 620
 pro ala pro ile glu lys thr ile ser lys ala lys gly gln pro arg
 625 630 635 640
 glu pro gln val tyr thr leu pro pro ser arg asp glu leu thr lys
 645 650 655
 asn gln val ser leu thr cys leu val lys gly phe tyr pro ser asp
 660 665 670
 ile ala val glu trp glu ser asn gly gln pro glu asn asn tyr lys
 675 680 685
 thr thr pro pro val leu asp ser asp gly ser phe phe leu tyr ser
 690 695 700
 lys leu thr val asp lys ser arg trp gln gln gly asn val phe ser
 705 710 715 720
 cys ser val met his glu ala leu his asn his tyr thr gln lys ser
 725 730 735
 leu ser leu ser pro gly lys.
 740

<210> 2

<211> 2157

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

atgggcagag caatggtggc caggctgggg ctggggctgc tgctgctggc actgctccta

60

cccacgcaga tttattccag tgaacaaca actggaactt caagtaactc ctcccagagt	120
acttccaact ctgggttggc cccaaatcca actaatgcca ccaccaaggg atctccattt	180
attgcttctg ttagtgacca acatggagtc gtgtacatta ctgagaaca aaacaaaact	240
gtggtgatte catgtctcgg gtccatttca aatctcaacg tgtcatctct ttgtgcaaga	300
taccagaaa agagatttgt tcttgatggt aacagaattt cctgggacag caagaagggc	360
tttactattc ccagctacat gatcagctat gctggcatgg tcttctgtga agcaaaaatt	420
aatgatgaaa gttaccagtc tattatgtac atagttgtcg ttgtagggta taggatttat	480
gatgtggttc tgagtcctgc tcatggaatt gaactatctg ttggagaaaa gcttgtctta	540
aattgtacag caagaactga actaaatgtg gggattgact tcaactggga atacccttct	600
tcgaagcadc agcataagaa acttgtaaac cgagacctaa aaacceagtc tgggagtggag	660
atgaagaaat ttttgagcac cttaactata gatggtgtaa cccggagtga ccaaggattg	720
tacacctgtg cagcatccag tgggctgatg accaagaaga acagcacatt tgtcagggtc	780
catgaaaaac cttttgttgc ttttggaggt ggcatggaat ctctggtgga agccacggtg	840
ggggagcgtg tcagaatccc tgcgaagtac cttggttacc cacccccaga aataaaatgg	900
tataaaatg gaataccctt tgagtccaat cacacaatta aagcggggca tgtactgacg	960
attatggaag tgagtgaag agacacagga aattacactg tcatecttac caatccatt	1020
tcaaaggaga agcagagcca tgtggtctct ctggttgtgt atgtcccacc ccagattggt	1080
gagaaatctc taatctctcc tgtggattec taccagtacg gcaccactca aacgtgaca	1140
tgtacggtct atgccattcc tccccgcat cacatccact ggtattggca gttggaggaa	1200
gagtgcgcca acgagcccag ccaagetgtc tcagtgacaa acccataccc ttgtgaagaa	1260
tggagaagtg tggaggactt ccagggagga aataaaatg aagttaataa aatcaattt	1320
gctctaattg aaggaaaaa caaaactgta agtacccttg ttatccaagc ggcaaatgtg	1380
tcagctttgt acaaatgtga agcggtaac aaagtcggga gaggagagag ggtgatctcc	1440
ttcacaacc tcgagagatc ccccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc	1500
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac	1560
accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tggaggacgt gagccacgaa	1620
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	1680
aagccgctgg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg	1740
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaaca agcctccca	1800
gccccatcg agaaaacct ctccaaagcc aaaggcagc cccgagaacc acaggtgtac	1860
accctgccc catccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgctggtc	1920
aaaggcttct atcccagca catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac	1980
aactacaaga ccagcctcc cgtgctggac tccagcgtt ccttcttct ctatagcaag	2040
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaaactct tctcatgctc cgtgatgcat	2100
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga	2157

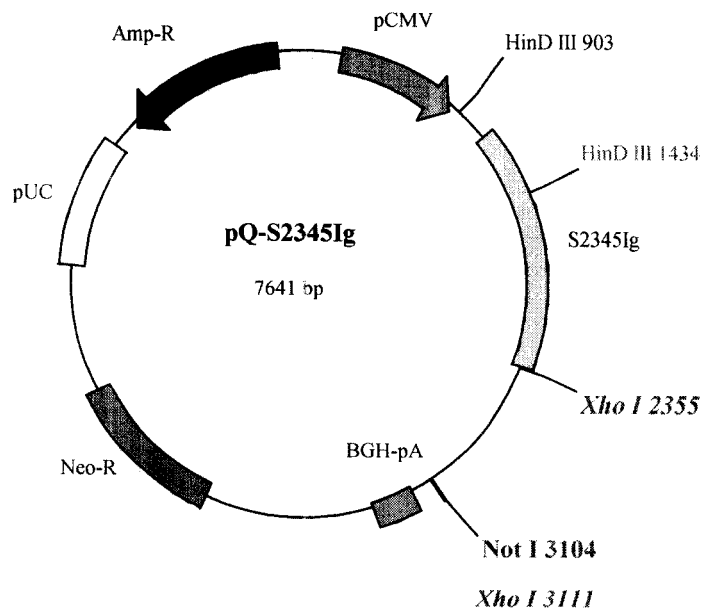
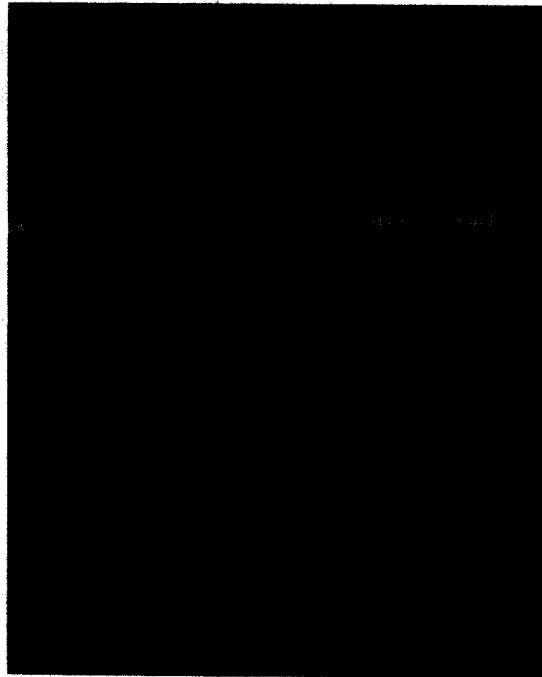


图 1

M 1 2 3 4 5



lane M: DNA ladder

lane 1: pQY-S2345Ig, HinD III/Not I 酶切

lane 2: pQY-S2345Ig, HinD III/Not I 酶切

lane 3: pQY-Ig, HinD III/Not I 酶切

lane 4: pQY-Ig, HinD III/Not I 酶切

lane 5: pQY-Ig, HinD III/Not I 酶切

图 2

ELISA assay of S2345Ig

OD492

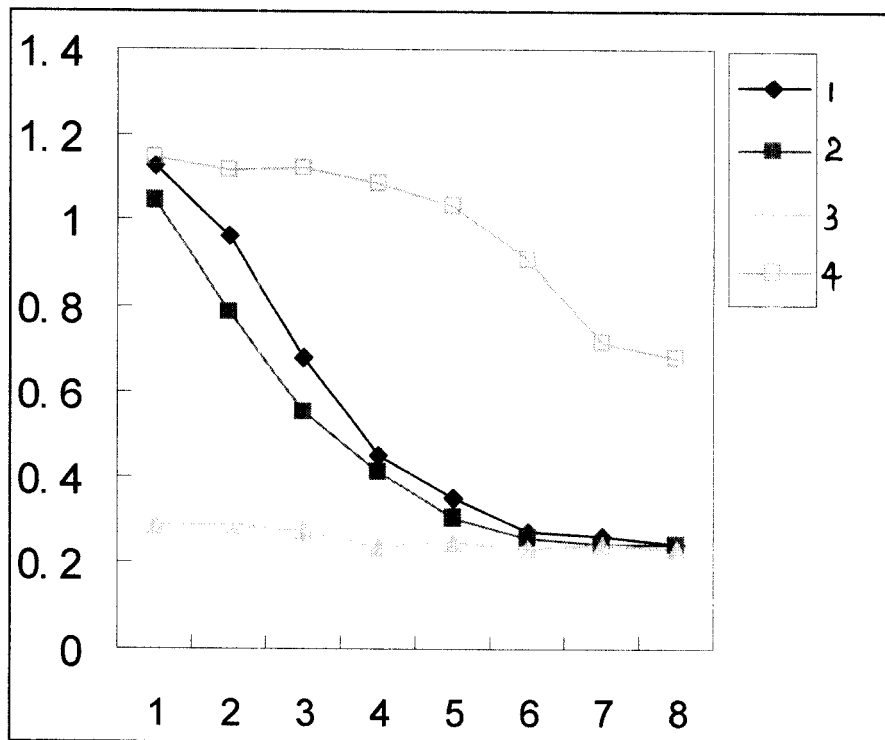
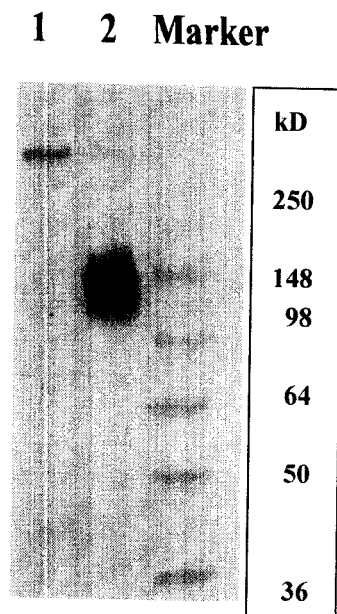


图 3

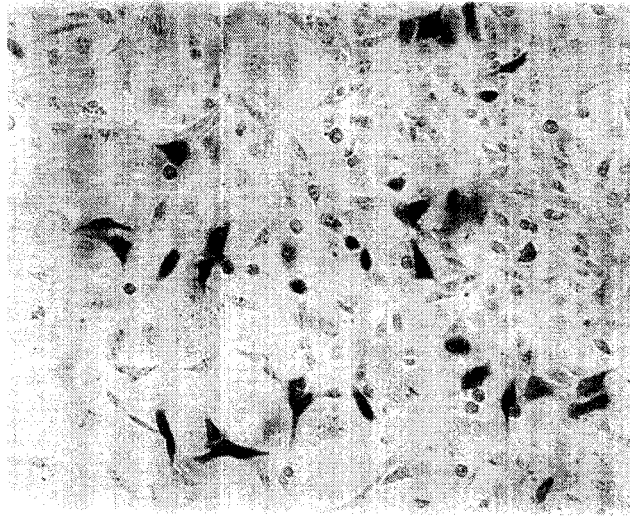


lane 1: CHO cells, untransfected

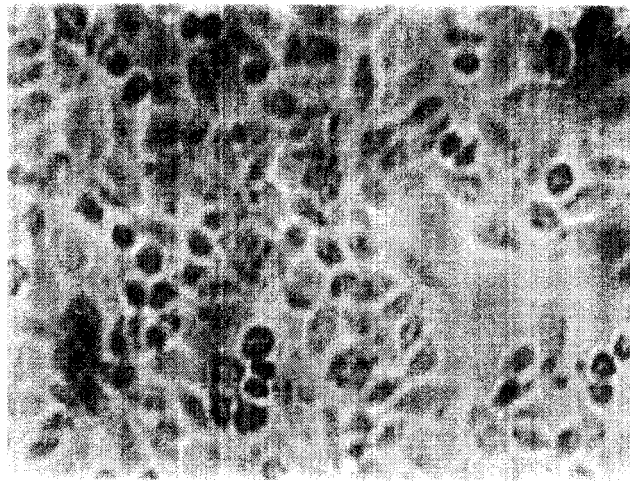
lane 2: CHO cells transfected with pQY-S2345Ig

Marker: protein markers

图 4



A



B



专利名称(译)	可特异识别血管内皮细胞生长因子的重组免疫球蛋白的表达生产及其应用		
公开(公告)号	CN101125888A	公开(公告)日	2008-02-20
申请号	CN200610030168.2	申请日	2006-08-17
[标]申请(专利权)人(译)	苏州思坦维生物技术有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	苏州思坦维生物技术有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州思坦维生物技术有限责任公司		
[标]发明人	周群敏 陶飞龙 胡红群 马玲莎 徐一清		
发明人	周群敏 陶飞龙 胡红群 马玲莎 徐一清		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/09 C12N15/85 G01N33/53 G01N33/68 A61K39/395 A61P35/00		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

以抑制血管内皮细胞生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)及其受体的抗肿瘤血管增生疗法已发展成为当今肿瘤治疗的一种主要手段。本发明选取血管内皮细胞生长因子及其受体为靶点,采用基因工程及细胞工程手段体外大量表达生产出一种可特异识别与结合人血管内皮细胞生长因子的人源化的重组免疫球蛋白。该重组免疫球蛋白是一潜在的拮抗血管增生的肿瘤治疗药物。

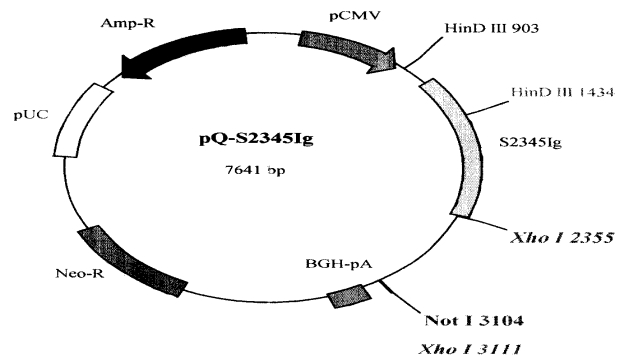


图 1