



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102993305 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 13

(21) 申请号 201210465918. 4

C12N 1/21(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 11. 16

C12N 5/10(2006. 01)

(73) 专利权人 上海赛伦生物技术有限公司

A61K 39/395(2006. 01)

地址 201707 上海市青浦区华青路 1288 号

A61P 35/00(2006. 01)

专利权人 中国人民解放军军事医学科学院
生物工程研究所

A61P 29/00(2006. 01)

A61P 37/02(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(72) 发明人 孙志伟 王双 孙久如 张畅

(56) 对比文件

曾大地 仇玮祎 常红艳 范志和
杨涛 范铁炯

CN 101619323 A, 2010. 01. 06,

EP 1641830 B1, 2010. 06. 09,

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

US 2011135636 A1, 2011. 06. 09,

代理人 王朋飞 张庆敏

盛唯瑾等. 抗表皮生长因子受体噬菌体抗体
库的构建筛选及单链抗体可溶性表达. 《药学报》. 2009, (第 06 期),

(51) Int. Cl.

审查员 马静

C07K 16/28(2006. 01)

C07K 19/00(2006. 01)

C12N 15/13(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 1/15(2006. 01)

C12N 1/19(2006. 01)

权利要求书2页 说明书16页

序列表9页 附图11页

(54) 发明名称

人源抗人表皮生长因子受体抗体及其编码基因与应用

(57) 摘要

本发明提供了一种人源抗人表皮生长因子受体(EGFR)抗体及其编码基因与应用。本发明通过基因工程手段和噬菌体表面展示技术,从全合成单链人抗体库中筛选出抗人 EGFR 的基因工程单链抗体,并获得其抗体的可变区基因序列,在此基础上构建全人单克隆抗体,进一步获得高纯度抗体蛋白。本发明的抗体与人 EGFR 结合的亲和力不大于 1nM,其突变体亲和力不大于 10nM;并完成了抗体蛋白 IgG 的免疫活性和生物活性鉴定,证实抗体具有良好的抑制 EGFR 高表达细胞 A431 荷瘤模型小鼠肿瘤生长的生物学活性,本发明为针对 EGFR 靶标的抗肿瘤及其他疾病如炎症及自身免疫性疾病的预防和治疗提供了特异性抗体药物。

1. 一种人源抗人 EGFR 抗体,其特征在於,其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变轻链第 13 位为 Ala;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变轻链第 26 位为 Gly 或 Asn 或 Lys;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变轻链第 32 位为 Ile 或 Val;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变轻链第 33 位为 Tyr;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变轻链第 51 位为 Gly;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变轻链第 55 位为 Pro;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变轻链第 88 位为 Gln、Gly、Tyr 或 Leu;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变轻链第 89 位为 Ser 或 Ala 或 Leu;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变轻链第 92 位为 Pro、Ala 或 Ser;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变重链第 53 位为 Ala;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变重链第 54 位为 Ser;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变重链第 56 位为 Ala;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变重链第 60 位为 Ala;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变重链第 66 位 His;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变重链第 100 位为 Ala;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变重链第 101 位为 Ala;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变重链第 104 位为 Ala;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变重链第 107 位为 Gly 或 Ser;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ

ID NO. 21 所示时,突变重链第 108 位为 Ala ;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变轻链第 26 位为 Gly 和第 89 位为 Ser ;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变轻链第 26 位为 Lys 和第 89 位为 Ser ;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变轻链第 26 位为 Gly 和第 89 位为 Ala ;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变轻链第 26 位为 Lys 和第 89 位为 Ala ;或

其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示时,突变轻链第 26 位为 Lys 和 89 位为 Ser,同时突变重链第 107 位为 Ser。

2. 如权利要求 1 所述的抗体,其特征在于,其为单链抗体、Fab、微型抗体、嵌合抗体或全抗体免疫球蛋白 IgG1、IgG2、IgA、IgE、IgM、IgG4、IgD。

3. 编码权利要求 1 ~ 2 任一项所述抗体的基因。

4. 含有权利要求 3 所述基因的表达载体。

5. 含有权利要求 4 所述表达载体的宿主细胞。

6. 含有权利要求 4 所述表达载体的表达盒。

7. 权利要求 1 ~ 2 任一所述抗体在制备以 EGFR 为靶标的疾病治疗药物中的应用。

8. 如权利要求 7 所述的应用,其特征在于,所述的药物为抗肿瘤药、抗炎药物或治疗自身免疫性疾病的药物。

9. 含有权利要求 1 ~ 2 任一项所述抗体的药物或检测试剂。

10. 一种免疫毒素,包含以各种形式连接于细胞毒性剂的权利要求 1 ~ 2 任一所述的抗体。

11. 如权利要求 10 所述的免疫毒素,其特征在于,所述的各种连接形式为抗体被标记、体外交联或分子偶联。

12. 如权利要求 10 所述的免疫毒素,其特征在于,所述的细胞毒性剂包括放射性同位素、毒素及其他对细胞具有杀伤或诱导细胞死亡特性的物质。

13. 一种抗体与其他蛋白或 \ 和多肽的融合蛋白,其特征在于,包含权利要求 1 ~ 2 任一所述抗体和具有某种功能的其他蛋白或多肽分子的复合物。

14. 如权利要求 13 所述的融合蛋白,其特征在于,将抗体基因与免疫毒素或细胞因子基因连接构建重组表达载体,通过哺乳动物细胞或其他表达系统获得重组融合蛋白分子。

人源抗人表皮生长因子受体抗体及其编码基因与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及治疗用人源基因工程抗体的制备及应用,主要是涉及特异性针对人表皮生长因子受体(epidemic growth factor receptor,EGFR)的抗体及其编码基因与应用。

背景技术

[0002] 表皮生长因子受体(EGFR)是表皮生长因子基因(erbB)家族的一员,在多种肿瘤如乳腺癌,结肠癌,头颈肿瘤,肾癌,肺癌,胰腺癌,前列腺癌的发展中均具有重要影响。国内外许多研究表明,针对EGFR的抗体可有效地在胞外通过阻断配体的结合来实现对EGFR信号转导途径的抑制,对多种由EGFR过度表达或/和突变所引起的人体肿瘤,尤其是头颈部鳞状细胞癌(80%~100%)、结直肠癌(25%~77%)、非小细胞型肺癌(40%~80%)等有较好的疗效。表皮生长因子受体是目前研究得较深入且倍受关注的肿瘤治疗靶点之一,应用基因工程手段研制抗EGFR的单克隆抗体,是目前肿瘤治疗的研究热点之一。

[0003] 目前已经有2株抗EGFR的治疗性抗体获得美国FDA的批准,分别是针对EGFR的鼠-人嵌合抗体西妥昔单抗(cetuximab,商品名为爱必妥)和全人抗体帕尼单抗(panitumumab),用于结直肠癌和头颈部肿瘤治疗。2005年,抗EGFR的人源化抗体尼莫珠单抗(nimotuzumab,商品名为泰欣生)获得了我国药监局(SFDA)批准的1类新药证书。针对该靶标的在研抗体包括人源化单抗pertuzumab、人源抗体zalutumumab和Necitumumab等。其结合的抗原表位不尽相同,但均能够发挥抑制EGFR介导的生物学功能。

[0004] 人抗体是治疗性抗体发展的最终方向,临床上应用人抗体可最大限度减少抗体的免疫原性、延长抗体在体内的半衰期并可借助人免疫球蛋白Fc段介导免疫调理、ADCC及CDC效应,进而增强抗体的生物学效应。人抗体的主要研制手段包括抗体库技术和转基因小鼠技术。目前,大容量抗体库技术已经非常成熟,尤其是噬菌体展示抗体库技术已经成功实现了多株全人抗体的成功上市。在已构建的大容量抗体库中,CAT公司的半合成抗体库和Marphosys AG公司的全合成抗体库是最具代表性和最为成功的代表。尤其是通过Marphosys AG公司的HuCAL GOLD技术已经获得了数十株具有开发价值的候选抗体,目前进入临床阶段的有17个项目。该技术的最大优势在于可以通过合理设计对抗体库进行优化,同时,其抗体框架基因为可替换的盒式结构,便于后期的抗体优化和改造,基于这一优势,HuCAL库目前已经将其抗体库更新至第三代,库容量达到 4.5×10^{10} ,从抗体库中可筛选到亲和力达到pM水平的高亲和力抗体。因此,目前在技术上利用抗体库技术获得治疗性人抗体已经非常成熟,被认为是目前最成功的开发治疗性抗体的技术手段之一。申请人通过技术优化和探索,发明了一种高效的DNA连接和转化的方法,并将其用于大容量噬菌体抗体库的构建,构建了库容量达到 1.35×10^{10} 的大容量全合成噬菌体单链人抗体资源库(ZL.200910091261.8),并利用该抗体库筛选获得了多个针对不同靶标的特异性抗体。本发明所获得的抗体Ame55即为从抗体库中筛选获得。

发明内容

[0005] 本发明提供了用于治疗 and 预防与 EGFR 表达相关的疾病,特别是表达 EGFR 的肿瘤和自身免疫性疾病的抗体治疗。

[0006] 本发明的第一个目的在于提供一种人源抗 EGFR 抗体及其活性片段的氨基酸序列。

[0007] 本发明的第二个目的在于提供编码上述抗体或其活性片段的基因。

[0008] 本发明的第三个目的在于提供上述抗体及其活性片段在制备治疗高表达 / 过度表达 EGFR 的恶性肿瘤和自身免疫性药物中的应用。

[0009] 本发明运用噬菌体表面展示技术,从大容量全合成人源单链抗体库中,通过多轮的生物淘洗(bio-panning),筛选获得特异性抗人 EGFR 的单链基因工程抗体(single chain variable fragment, scFv)。在本发明实施例中,将上述抗体轻重链可变区分别导入全抗体哺乳动物细胞瞬时表达载体 pABL 和 pABG1 中,通过共转染 HEK 293T 细胞进行瞬时分泌表达,得到全抗体 Ame55。

[0010] 本发明提供的抗体可变区氨基酸序列模式为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。在此,FR1 ~ 4 代表 4 个框架区域,CDR1 ~ 3 代表 3 个高变区。FR1 ~ 4 可以从恒定区序列分离而来(比如人免疫球蛋白轻重链类、亚类或亚家族最常用的氨基酸),也可以是从个人抗体框架区分离而来或从不同的框架区基因组合而来。例如 Kabat 等库中收录的众多人抗体框架区序列。

[0011] 其中,重链可变区为人免疫球蛋白亚群人重链 VH V 家族,轻链可变区为 Lambda III 家族。关于轻重链的 CDR 区,通过丙氨酸扫描及其他同类氨基酸突变,获得大量突变体,对轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的突变体评价结果表明 CDRL1 序列为 :SGDX1LGDKYX2X3 (SEQ ID NO 1) 在此,X1 可以是 Ala、Gly、Asn、Lys,优选为 Lys 和 Gly ;X2 可以是 Ala、Val 和 Ile,优选为 Ala ;X3 可为 Ser 和 Tyr,优选为 Ser。CDRL2 序列为 :EDX1KRPS (SEQ ID NO 2),在此,X1 可以是 Ser、Thr、Ala 和 Gly,优选为 Ser。CDRL3 序列可以是 :X1X2WDX3DWX4MP (SEQ ID NO 3),在此,X1 为 Ser、Ala、Gly、Leu、Asn、Tyr 和 Gln,优选为 Ser ;X2 可以是 Val、Ser、Ala 和 Leu,优选为 Ser 或 Ala ;X3 可以是 Gly、Ala 和 Pro,优选为 Gly ;X4 可以是 Gly 和 Ser,优选为 Gly。对重链 CDR2 和 CDR3 的突变体评价结果表明 :CDRH2 序列为 X1IIYPX2DSDTRYSPSFQ (SEQ ID NO 5),在此,X1 可以是 Gly 和 Ser,优选为 Gly ;X2 可以是 Gly 和 Ser,优选为 Gly。CDR3H 序列为 GIIYPSNVX1V (SEQ ID NO 6),在此,X1 可以是 Ala、Ser 和 Gly,优选为 Ser 或 Ala。对该抗体的轻重链 CDR 区进行丙氨酸扫描,结果表明,轻重链 CDR3 及轻链 CDR1 和重链 CDR2 对抗体与 EGFR 的结合至关重要。仅单个氨基酸的变化可引起亲和力几倍至几十倍的变化,具体见实施例 5。

[0012] 本发明提供的人源抗人 EGFR 抗体,其轻链可变区含有如 SEQ ID NO 3 所示的氨基酸序列。

[0013] 进一步地,其轻链可变区含有如 SEQ ID NO 1 和 SEQ ID NO 2 所示的氨基酸序列。

[0014] 更进一步地,其轻链可变区含有如 SEQ ID NO 7 所示的氨基酸序列。

[0015] 进一步地,本发明提供的人源抗人 EGFR 抗体,其重链可变区含有如 SEQ ID NO 5 和 SEQ ID NO 6 所示的氨基酸序列。

[0016] 进一步地,其重链可变区还含有如 SEQ ID NO 4 所示的氨基酸序列。

[0017] 更进一步地,其重链可变区含有如 SEQ ID NO 8 所示的氨基酸序列。

[0018] 本发明提供的人源抗人 EGFR 抗体,其为单链抗体、Fab、微型抗体、嵌合抗体或全抗体免疫球蛋白 IgG1、IgG2、IgA、IgE、IgM、IgG4、IgD。

[0019] 本发明提供的人源抗人 EGFR 抗体 Ame55,其重链可变区来自 V_{H5} ,其轻链可变区来自 V_{L3} ,其抗体亚型为 IgG1。

[0020] 本发明提供的人源抗人 EGFR 抗体,其轻链可变区含有如 SEQ ID NO 3 所示的氨基酸序列,其重链可变区含有如 SEQ ID NO 6 所示的氨基酸序列。

[0021] 本发明提供的人源抗人 EGFR 抗体,其轻链可变区含有如 SEQ ID NO 3 所示的氨基酸序列,其重链可变区含有如 SEQ ID NO 5 和 SEQ ID NO 6 所示的氨基酸序列。

[0022] 优选地,本发明提供的人源抗人 EGFR 抗体,其轻链可变区含有如 SEQ ID NO 7 所示的氨基酸序列,其重链可变区含有如 SEQ ID NO 8 所示的氨基酸序列。

[0023] 本发明提供的人源抗人 EGFR 抗体以至少约 $10^{-8}M$ 的亲合力结合于人 EGFR。该抗体抑制 EGFR 配体结合人 EGFR。该抗体结合于表达 EGFR 的细胞,但不诱导补体介导的细胞裂解;所述的细胞是人皮肤癌细胞、人肝癌细胞、人结肠癌细胞、人宫颈癌细胞、卵巢癌细胞、人肺癌细胞、膀胱癌细胞、乳腺癌细胞、肾癌细胞、前列腺癌细胞、头颈部肿瘤鳞状细胞、滑膜成纤维细胞或角质形成细胞。

[0024] 本发明提供了编码上述抗体的基因。

[0025] 其中,编码轻链可变区的基因其核苷酸序列为:

[0026] 1) 如 SEQ ID NO 9 所示的 DNA 序列;

[0027] 2) 在严格条件下与 1) 限定的 DNA 序列杂交且编码所述轻链可变区的核苷酸序列;

[0028] 3) 与 1) 限定的 DNA 序列具有 70% 以上的同源性且编码所述轻链可变区的核苷酸序列。

[0029] 在本发明中,“严格条件”是指:(1) 在较低的离子强度和较高温度下的杂交和洗脱,如 $0.2 \times SSC$, $0.1\% SDS$, $60^{\circ}C$; 或(2) 杂交时加有变性剂,如 50% (V/V) 甲酰胺, 0.1% 小牛血清 / $0.1 Fico11$, $42^{\circ}C$ 等; 或(3) 仅在两条序列之间的相同性至少在 70% 以上,更佳地至少 80% 以上,更佳地 90% 以上,更好是 95% 以上时才发生杂交。

[0030] 其中,编码重链可变区的基因其核苷酸序列为:

[0031] 1) 如 SEQ ID NO 10 所示的 DNA 序列;

[0032] 2) 在严格条件下与 1) 限定的 DNA 序列杂交且编码所述重链可变区的核苷酸序列;

[0033] 3) 与 1) 限定的 DNA 序列具有 70% 以上的同源性且编码所述重链可变区的核苷酸序列。

[0034] 此外,考虑到密码子的简并性,编码本发明所述抗体的基因可以但不局限于 SEQ ID NO 9 和 10,例如可在其编码区,在不改变氨基酸序列的条件下,对编码上述抗体的基因序列进行修改,获得编码相同抗体的基因。本领域技术人员可以根据表达抗体宿主的密码子偏爱性,人工合成改造基因,以提高抗体的表达效率。

[0035] 本发明还提供了含有上述基因的表达载体。

[0036] 本发明提供了含有上述表达载体的宿主菌、宿主细胞或表达盒。

[0037] 本发明提供了制备上述抗体的方法,包括利用噬菌体展示抗体库技术筛选抗 EGFR 特异性单链抗体,获得抗体轻链、重链可变区基因,并将其克隆入全抗体表达载体,通过哺乳动物表达系统或其他表达系统对其进行全抗体表达,获得其全抗体蛋白。

- [0038] 提供了上述抗体在制备以 EGFR 为靶标的疾病治疗药物中的应用。
- [0039] 所述的药物为抗肿瘤药、抗炎药物或治疗自身免疫性疾病的药物。
- [0040] 含有上述抗体的药物或检测试剂也属于本发明的保护范围。
- [0041] 本发明还提供一种免疫毒素,包含以各种形式连接于细胞毒性剂的上述人源抗人 EGFR 抗体。
- [0042] 所述的各种连接形式为抗体被标记、体外交联或分子偶联。
- [0043] 所述的细胞毒性剂包括化学分子、放射性同位素、多肽、毒素及其他对细胞具有杀伤或诱导细胞死亡特性的物质。
- [0044] 本发明提供的抗体为全抗体或各种其他形式的基因工程抗体。如,抗 EGFR 抗体可以是全抗体或抗体片段。抗体分子本身可用于治疗和诊断。抗体可以被标记、交联或偶联及与其他蛋白或多肽分子融合表达形成复合物(如细胞毒性物质、放射性毒素和 \ 或化学分子等)用于诊断和治疗。
- [0045] 本发明更进一步提供:编码抗体的独立基因,表达载体,载体转染宿主细胞相关控制技术及宿主细胞,抗体表达流程及在细胞培养上清中回收抗体。本发明同样提供含有抗体的组分和药理学上可接受的递送分子或溶液。本治疗用组分为无菌,可低温冻干。
- [0046] 本发明提供一种抗 EGFR 的抗体,该抗体可以抑制 EGFR 所诱导的一种或多种生物学活性。本抗体通过阻碍 EGFR 与其配体结合发挥作用,也可以通过杀伤 EGFR 高表达的细胞发挥作用,或者通过与 EGFR 结合后复合物被内化从而消耗细胞表面的 EGFR 而发挥作用。EGFR 拮抗剂所具有的所有干扰功能均应平等地视为本发明的目的。
- [0047] 此处所公开和要求保护的 SEQ ID NO. 1 ~ 8 所示序列包括“保守序列修饰”,即不明显影响和改变所述抗体或含有所述氨基酸序列抗体的结合特征的核苷酸和氨基酸序列修饰。所述保守序列修饰包括核苷酸或氨基酸替换、添加或缺失。可以通过本领域的标准技术,如定点诱变和 PCR 介导的诱变等将修饰导入 SEQ ID NO. 1 ~ 8 中,如本发明实施例中通过对抗体 CDR 区进行丙氨酸扫描和对部分位点进行氨基酸突变,即为保守序列修饰的实例。保守氨基酸替换包括氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基或其他氨基酸残基代替。本领域中,已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(如赖氨酸、精氨酸、组氨酸),具有酸性侧链的氨基酸(如天冬氨酸、谷氨酸),具有不带电的极性侧链的氨基酸(如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸),具有非极性侧链的氨基酸(如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸),具有 β 分支侧链的氨基酸(如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香侧链的氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,优选来自于同一侧链家族的另一种氨基酸残基代替人抗 EGFR 抗体中的非必须氨基酸残基。
- [0048] 因此,此处公开的核苷酸序列编码的抗体或 \ 和含有此处公开的氨基酸序列的抗体包括基本上由经保守序列修饰的相似序列编码的,或含有经保守序列修饰的相似序列的抗体,均应视为本发明的范畴。
- [0049] 本发明提供一种双特异性或多特异性分子,包含本发明提供的上述抗体或抗体的抗原结合部位的分子。
- [0050] 本发明提供一种抗体与其他蛋白或 \ 和多肽的融合蛋白,包含本发明提供的上述抗体和具有某种功能的其他蛋白或多肽分子的复合物。

[0051] 进一步地,所述的融合蛋白为将抗体基因与免疫毒素或细胞因子基因连接构建重组表达载体,通过哺乳动物细胞或其他表达系统获得重组融合蛋白分子。

[0052] 本发明描述的抗体 Ame55 具有良好的治疗应用前景,主要表现为与重组人 EGFR 具有特异性结合活性,且与 A431 细胞表面的天然 EGFR 特异性结合。该抗体经 ELISA 和免疫组化实验证实特异性良好;Western Blot 结果证实,其仅特异性结合非还原态 EGFR,与还原态 EGFR 不结合。

[0053] 采用 Biacore 系统对该抗体与不同形式的 EGFR 结合能力进行检测,结果表明,该抗体与重组的 EGFR 胞外区 -Fc 融合蛋白的亲和力 K_D 为 0.23nM (Biacore3000)。流式细胞分析该抗体与 A431 细胞表面的 EGFR 结合的相对亲和力高于上市抗体泰欣生,与上市抗体爱必妥相当。本发明实施例显示本发明的 EGFR 抗体与人 EGFR 结合的亲和力不大于 1nM,其突变体亲和力不大于 10nM。

[0054] 该抗体在体外能够抑制爱必妥与 EGFR 的结合,反之,爱必妥也可以抑制该抗体与 EGFR 的结合。提示该抗体可能与爱必妥表位在空间结构上有重叠。该抗体能够竞争抑制 EGF 与 EGFR 的结合。

[0055] 该抗体可以明显抑制 A431 细胞的迁移活性。细胞划痕愈合实验结果提示,抗体在 5-50 μ g/ml 浓度下能够显著抑制 A431 细胞的划痕愈合。同时该抗体对 A431 细胞生长具有明显的抑制作用。

[0056] 该抗体对 A431 移植瘤肿瘤生长具有明显的抑制作用,当给予每只小鼠 1mg/3d 的剂量时,肿瘤的抑制率可以达到 90% 以上,给予每只 0.2mg/3d 剂量时,抑瘤率达 60% 以上。

[0057] 对该抗体进行定向定点突变,获得了亲和力提高 5 倍以上的多株突变体抗体,突变体抗体的体内抑瘤活性进一步改善,部分抗体如 AmeA2、AmeA2C3、AmeA2C3-HI2、AmeA2C1、AmeA1C1 在 0.2mg/3d 剂量时,抑瘤活性大于 80%。

[0058] 本发明通过大容量全合成抗体库技术筛选获得 1 株抗 EGFR 的全人源抗体和一系列亲和力保持不变或提高的突变体抗体,并证实所发明抗体均特异性与 EGFR 结合,并抑制其生物学功能。利用上述获得的全人源抗 EGFR 基因工程抗体可变区基因以及抗体基因特征下的全抗体基因,可以在原核细胞、酵母细胞、真核细胞及任何重组系统中表达和生产此抗体,或以此为基础的改建后的含有此抗体基因的任何其它基因,获得具有抑制 EGFR 生物学活性的抗体产物,或利用体外标记或交联的方法获得的复合物,制成临床上用于治疗过度表达或突变表达 EGFR 的恶性肿瘤和 \ 或自身免疫性疾病的特异性抗体药物。

附图说明

[0059] 图 1 为 Ame55 噬菌体抗体特异性分析。

[0060] 图 2 为 Ame55 经 Protein A 柱一步纯化后 SDS-PAGE 电泳图,其中 1:PrMarker; 2:Erbitux (爱比妥);3:Ame55;4:Nimotuzumab (泰欣生)。

[0061] 图 3 为 Western Blot 鉴定 Ame55 与 EGFR 结合,1:非变性 EGFR-爱必妥;2:变性 EGFR-爱必妥;3:非变性 EGFR-Ame55;4:变性 EGFR-Ame55;5:非变性 EGFR-泰欣生;6:变性 EGFR-泰欣生。

[0062] 图 4 为 Ame55 与 A431 细胞结合间接免疫荧光检测图,A:阿伐斯汀-A431;B:Ame55-A431;C:爱必妥-A431;D:泰欣生-A431。

[0063] 图 5 为流式细胞分析 Ame55 与 A431 细胞表面 EGFR 结合情况图,图 5A: 抗体浓度 : $3 \mu\text{g/ml}$;图 5B: 抗体浓度 : $0.3 \mu\text{g/ml}$;图 5C: 抗体浓度 : $0.03 \mu\text{g/ml}$,1 为抗体泰欣生;2 为抗体 Ame55,3 为抗体爱必妥。

[0064] 图 6 为 Biacore 测定 Ame55 与 EGFR-Fc 亲和力结果图。

[0065] 图 7 为 :Ame55 与 Erbitux 的相互竞争抑制作用,其中图 7A:1 :EGFR-Fc 结合;2 :PBST 洗涤;3 :Ame55- 结合;4 :PBST 洗涤;图 7B:1 :EGFR-Fc 结合;2 :PBST 洗涤;3 :爱必妥- 结合;4 :PBST 洗涤;图 7C:1 :EGFR-Fc 结合;2 :PBST 洗涤;3 :爱必妥- 结合;4 :PBST 洗涤;图 7D:1 :EGFR-Fc 结合;2 :PBST 洗涤;3 :Ame55- 结合;4 :PBST 洗涤;图 7A 和图 7B 固定相为 Ame55,图 7C 和图 7D 固定相为爱必妥。

[0066] 图 8 为 Ame55 对 EGF 与 EGFR 结合的竞争抑制作用图。1 :空白对照;2 :Ame55 与 EGFR 摩尔比 3:1;3 :Ame55 与 EGFR 摩尔比 2:1;4 :Ame55 与 EGFR 摩尔比为 1:1;5 :Ame55;6 :EGFR;7 :爱必妥与 EGFR 摩尔比 3:1;8 :爱必妥与 EGFR 摩尔比为 2:1;9 :爱必妥与 EGFR 摩尔比为 1:1;10 :爱必妥;11 :无关抗体对照与 EGFR 摩尔比为 3:1;12 :无关抗体与 EGFR 摩尔比为 2:1;13 :无关抗体与 EGFR 摩尔比为 1:1;14 :无关抗体对照。

[0067] 图 9 为 Ame55 和爱必妥、泰欣生、阿达木单抗、空白对照对 A431 细胞迁移能力的抑制作用图。

[0068] 图 10 为 Ame55 和爱必妥、泰欣生、PBS 对照对 A431 细胞生长抑制作用图。

[0069] 图 11 为 Ame55 对 A431 荷瘤小鼠肿瘤生长抑制作用图。

[0070] 图 12 为 Ame55 对 A431 荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用图。

[0071] 图 13 为 Ame55 对 A431 荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用图。

[0072] 图 14 为 Ame55 及其突变体抗体何瘤小鼠肿瘤生长抑制活性比较图,A: 瘤体积的动态观察;B: 瘤重测量统计结果。1 :Ame55;2 :AmeA1C1;3 :AmeA1C3;4 :AmeA1C3-HI2;5 :AmeA2;6 :AmeA2C1;7 :AmeA2C3;8 :AmeA2C3-HI2;9 :爱必妥;10 :IgG 对照。

[0073] 图 15 为 Ame55 轻链与另一无关重链组合突变体 Ame-9B 的亲和力测定图。其中 1 :Ame55;2 :Ame-9B。

[0074] 图 16 为真核瞬时表达质粒 pABL 和 pABG1 的载体示意图。

具体实施方式

[0075] 以下实施实施例进一步说明本发明的内容,但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的范围。

[0076] 若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0077] 实施例 1 大容量噬菌体抗体库的特异性抗体筛选

[0078] 一、材料与amp;方法:

[0079] 1. 材料:大容量全合成噬菌体单链抗体库由中国人民解放军军事医学科学院构建(ZL200910091261.8),库容量 1.35×10^{10} 。筛选抗体库的抗原为构建的哺乳动物细胞表达纯化的 EGFR-Fc 融合蛋白(浓度为 1mg/ml),菌株为 XL1-Blue(美国 Stratagene);所用噬菌体为 M13K07(美国 Invitrogene 公司)。真核表达载体 pABG1 和 pABL 为本室保存,载体

结构信息见图 16,哺乳动物细胞 HEK293T 细胞购自 invitrogene 公司。

[0080] 2. 方法

[0081] 2.1EGFR-Fc 融合蛋白表达与纯化：

[0082] 选取 EGFR【购自北京义翘神州生物公司 (NCBI 序列 :NM 005228.3)】胞外区全长为对象,设计上、下游引物 EGFRF 和 EGFRR 如 SEQ ID NO 11 和 SEQ ID NO 12 所示,PCR 扩增获得胞外区全长基因,通过限制性内切酶位点 EcoR I 和 Nhe I 克隆入 pABG1 真核表达载体中,构建的重组质粒经测序鉴定正确后提取质粒,转染 HEK293T 细胞进行瞬时表达,经 ProteinA 亲和层析柱对表达上清进行纯化,并对纯化产物通过 Bradford 法进行蛋白定量。

[0083] 2.2EGFR-his 表达与纯化

[0084] 在方法 2.1 的基础上完成。设计引物 EGFRR1 (SEQ ID NO 13),利用引物 EGFRF 和 EGFRR1 扩增 EGFR 胞外区全长基因,通过限制性内切酶位点 EcoR I 和 BamH I 克隆入 pABG1 真核表达载体中,构建的重组质粒经测序鉴定正确后提取质粒,转染 HEK293T 细胞进行瞬时表达,经 Ni²⁺ 亲和层析柱对表达上清进行纯化,并对纯化产物通过 Bradford 法进行蛋白定量。2.3 噬菌体抗体库的呈现,参照 Pharmacia 公司的重组噬菌体筛选用户手册 (Cat. NO. XY-040-00-05) 进行,但稍作修改,具体如下：

[0085] 取冻存的抗体库,在 200ml 2×YTCG (葡萄糖浓度为 0.5%) 培养基中 37℃ 培养至 OD₆₀₀=0.5,按 MOI=20 : 1 的比例加入辅助噬菌体 M13K07,室温静置 20min。37℃,150rpm 缓慢摇床培养 1h,加入卡那霉素至终浓度为 50 μg/ml,并加 IPTG 至终浓度为 0.1mmol/L,于 30℃,220rpm 摇床培养 10~12h。次日,离心收取培养上清加入 1/5 体积的 PEG8000buffer (20%PEG+2.5mol/L NaCl),混匀后于冰上放置 45min,沉淀噬菌体。4℃,10000g 离心 20min,弃上清,沉淀重悬于 5ml 含 2%BSA 和 15% 甘油的 PBS 缓冲液中,-70℃ 冻存备用。

[0086] 2.4 噬菌体滴度的测定

[0087] 挑取宿主菌 (XL1-Blue) 单克隆接种于 LB 培养基,37℃,摇床培养至对数生长期 (OD₆₀₀=0.5)。取 50 μl 制备好的噬菌体悬液,用 LB 培养基进行系列 10 倍梯度稀释。向稀释到一定倍数的悬液中加入对数生长期的宿主菌,37℃,150~180rpm 摇床培养 1h。取培养后的菌液 100 或 200 μl 涂布在 LB 平板上,37℃ 培养过夜,次日,计数菌落数,并计算滴度。2.3 抗 EGFR 特异性抗体的淘选,参照 Pharmacia 公司的重组噬菌体筛选用户手册 (Cat. NO. XY-040-00-05) 稍作改动,具体如下：

[0088] 将重组蛋白抗原 EGFR-Fc 用包被液稀释为 20 μg/ml 包被免疫管,1ml/管,4℃ 包被过夜。次日,免疫管用 PBS 洗涤 2 遍,2min/遍,然后用 2%BSA37℃ 封闭 2h。将制备好的噬菌体抗体库用封闭液 (2%BSA,0.1% 吐温 20) 37℃ 封闭 30min。将预封闭后的噬菌体抗体库加入封闭后的免疫管中,4℃ 作用过夜。弃免疫管中溶液,进行洗涤。第一轮 PBST 洗 10 次,5min/次,PBS 洗 5 次,5min/次;第二轮 PBST 洗 15 次,5min/次,PBS 洗 10 次,5min/次;第三轮 PBST 洗 15 次,5min/次,PBS+NaCl 洗 15 次,5min/次。加入 1ml 0.2mol/L 的甘氨酸-盐酸 (pH2.2) 洗脱,室温作用 10min,立即用 1mol/LTris 中和至 pH7.4。在第三轮筛选中,首先加入 1ml 0.2mol/L 的甘氨酸-盐酸 (pH4.5) 洗脱,室温作用 10min,弃去洗脱液,用 PBS 洗涤 2 次,3min/次。然后再按照常规洗脱。吸出中和后的洗脱液,向其中加入 9ml 对数生长期的大肠杆菌 XL1-Blue,37℃ 缓慢摇床培养 1h;同时,将免疫管用 PBS 洗涤一次后,用 1ml 对数生长期的大肠杆菌 XL1-Blue 直接感染,37℃,150rpm 摇床培养 1h,然后将

从洗脱后的感染菌液和直接感染的菌液中各取 1% 涂 2×YTCTG 平板上, 37℃ 培养至形成清晰的菌落, 对克隆数进行统计, 并计算投入产出比。同时将剩余菌液涂 2×YTCTG 平板, 37℃ 培养过夜。用液体 2×YTCTG 培养基将菌落刮取下来, 取适量菌液投入 100ml 2×YTCTG 液体培养基中, 37℃ 摇床培养至 $OD_{600}=0.5$ 时, 按 MOI=20 : 1 加入辅助噬菌体 M13K07, 室温静置 20min, 30℃, 150rpm 摇床培养 1h, 加入等体积的 2×YTCT 培养基, 并加入卡那霉素至终浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$, IPTG 至终浓度 0.15mM, 继续在 30℃、200rpm 摇床培养 10h, 离心收取培养上清加入 1/5 体积的 PEG8000 缓冲液 (20%PEG+2.5mol/L NaCl), 混匀后于冰上放置 45min, 沉淀噬菌体。4℃, 10000g 离心 20min, 弃上清, 沉淀重悬于 5ml 含 2%BSA 的 PBS 缓冲液中, -70℃ 冻存储用。将三份噬菌体测定滴度, 按比例合并, 投入下一轮筛选。

[0089] 2.5 噬菌体 ELISA 鉴定阳性克隆

[0090] 挑取经筛选后的克隆于 96 孔深孔板中, 每孔 250 μl 2×YTCTG 培养基, 37℃ 摇床培养至 $OD_{600}=0.5$, 加入 1×10^8 cfu 的辅助噬菌体, 室温静置 15min, 37℃, 150rpm 摇床培养 1h, 加入等体积 2×YTCTKI (卡那霉素 50 $\mu\text{g/ml}$, IPTG 0.2mmol/L), 30℃ 摇床培养过夜。次日, 离心收取上清, 加入 BSA 至终浓度 2%, 加入吐温 -20 至终浓度 0.1%, 37℃ 静置 15min, 备用。抗原 (EGFR) 用包被液稀释至 1 $\mu\text{g/ml}$, 加入 96 孔酶联板, 50 μl /孔, 4℃ 包被过夜。次日, 弃包被液, 酶联板用 PBST 洗 2 次, PBS 洗一次, 每次 3min, 用 2%BSA+0.1% 吐温 -20 封闭, 200 μl /孔, 37℃, 2h。弃去封闭液, 加入经封闭后的单克隆噬菌体抗体, 50 μl /孔, 37℃, 静置 1h。弃去液体, 用 PBST 洗 2 次, PBS 洗一次, 200 μl /孔, 每次 5min。将 HRP 标记的鼠抗 M13 抗体用 PBST 稀释, 稀释比例为 1 : 5000, 同时加入终浓度 2% 的 BSA, 37℃ 预封闭 15min。将预封闭后的鼠抗 M13 抗体加入酶联板, 50 μl /孔, 37℃ 静置 30min。弃去液体, 酶联板用 PBST 洗 2 次, PBS 洗一次, 200 μl /孔, 每次 5min。弃去洗涤液, 加入 OPD 底物显色液, 50 μl /孔, 室温静置显色。用 2N H_2SO_4 终止显色。酶标仪测定光吸收值。

[0091] 包被缓冲液 (pH 9.6) : Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g, 双蒸水加至 1L ;

[0092] 封闭液 : 1×PBS + 2%BSA + 0.1% 吐温 20 ; 洗涤液 : 1×PBS + 0.1% 吐温 20 ;

[0093] OPD 底物液稀释液 : 0.2M Na_2HPO_4 (28.4g/L) 25.7ml, 0.1M 柠檬酸 (19.2g/L) 24.3ml, 蒸馏水, 50ml。

[0094] 2.6 噬菌体单链抗体转换为全抗体 :

[0095] 载体 pABG1 和 pABL 分别用于克隆抗体重链 (如 SEQ ID NO 10) 和轻链 (如 SEQ ID NO 9) 可变区基因, 分别采用引物 H5F (SEQ ID NO 14) 和 HR (SEQ ID NO 15) 扩增 VH5 可变区基因 ; L3F (SEQ ID NO 16) 和 LR (SEQ ID NO 17) 扩增 V λ 3 可变区基因。V λ 3 可变区基因利用酶切位点 Bsr GI 和 HindIII 克隆入载体 PABL, VH5 可变区基因利用酶切位点 AfI II 和 NheI 克隆入载体 pABG1。重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α , 通过对重组质粒进行菌液 PCR 及测序鉴定, 获得构建正确的全抗体轻、重链表达载体。大提质粒后将抗体轻重链以摩尔比 1 : 1 转染 HEK293T 细胞, 进行全抗体的瞬时表达, 经 ProteinA 亲和层析柱对表达上清进行纯化, 并对纯化后的全抗体进行电泳分析、亲和力和 特异性测定等。

[0096] 二、结果

[0097] 1. Ame55 噬菌体抗体的筛选鉴定

[0098] 对第三轮筛选获得的单克隆进行鉴定, 获得特异性噬菌体抗体, Ame55 单链抗体的核苷酸和氨基酸序列如 SEQ ID NO 18 和 SEQ ID NO 19 所示。Ame55 单链抗体的轻链可变

区、重链可变区核苷酸序列分别如 SEQ ID NO 9 和 SEQ ID NO 10 所示。Ame55 单链抗体的轻链可变区、重链可变区氨基酸序列分别如 SEQ ID NO 20 和 SEQ ID NO 21 所示。

[0099] 在噬菌体水平上对 Ame55 的特异性进行分析,以 EGFR-Fc 为阳性抗原,CD4-D2、AHC、TNF、VEGF、TTC、PBS 为对照抗原,4°C 过夜包被酶联板,加入噬菌体上清,以 HRP 标记抗 M13 抗体为二抗进行 ELISA 检测 Ame55 噬菌体上清的特异结合活性。结果表明,Ame55 仅特异性结合 EGFR-Fc。(图 1)

[0100] 2. 全抗体的表达纯化

[0101] 将噬菌体抗体 Ame55 的轻重链可变区基因分别克隆入全抗体瞬时表达载体 pABL 和 pABG1 中,构建其全抗体重组表达载体,并通过 HEK293T 细胞瞬时表达系统实现了哺乳动物细胞瞬时分泌表达。经 Protein A 柱纯化后获得全抗体蛋白样品,分子量约为 150KD。(图 2)。

[0102] 实施例 2Ame55 结合活性的检测

[0103] 一、材料与方法:

[0104] 1. 材料:人表皮鳞状癌细胞 A431 购自中国科学院上海细胞库,爱必妥(Ct)为德国默克制药公司产品;泰欣生(Hr-3)为北京百泰生物制药公司上市的抗 EGFR 人源化抗体;阿伐斯汀(Avastin, bevacizumab, rhuMAb-VEGF)购自德国罗氏公司;CM5 芯片为 GE 公司产品,抗人免疫球蛋白 Fc 捕获传感器和链亲和素传感器均购自艾瑞生物技术(上海)有限公司。重组人表皮生长因子(EGF)购自上海欣百诺生物公司。FreeStyle™293-F 细胞株、表达培养基及转染试剂均购自 invitrogen 公司。

[0105] 2. 方法

[0106] 2.1 抗体与 A431 细胞表面 EGFR 结合活性的免疫荧光检测

[0107] (1)A431 细胞以每孔 10^4 种于 96 孔板。

[0108] (2) 隔夜培养后,弃去培养基,PBS 洗 2 遍。

[0109] (3)5% 脱脂奶粉(PBS 配置)37°C 封闭 1h 后转入 4°C 放置。

[0110] (4) 将待测一抗用 5% 脱脂奶粉(PBST 配置)稀释至 $1 \mu\text{g/ml}$,37°C 预封闭 30min 后转入 4°C 放置。以上市药物艾比妥(Ct)和泰欣生(Hr-3)为阳性抗体对照,以阿伐斯汀(Avs)为阴性抗体对照。

[0111] (5) 倒掉封闭液,加入封闭好的抗体 4°C 孵育 1h。

[0112] (6)PBST 洗 3 遍,240rpm,3min/次。

[0113] (7) 弃上清,加入 5% 脱脂奶粉预封闭的 FITC 标记的山羊抗人 IgG 二抗,4°C 结合 30min。

[0114] (8)PBST 洗 3 遍,240rpm,3min/次。

[0115] (9) 于荧光显微镜下观察

[0116] 2.2 Western Blotting

[0117] (1) 将 EGFR-his 抗原进行还原与非还原 SDS-PAGE 凝胶电泳,分离胶浓度分别为 10%;

[0118] (2) 半干转移法将蛋白质从凝胶转移至硝酸纤维素膜。电泳结束后,将电泳胶用半干电转法,200mA,转印 2h。转膜后,5% 脱脂牛奶 37°C 封闭 2h;

[0119] (3) 封闭后将膜剪开分别加入 $10 \mu\text{g/ml}$ 的 Ct、hR-3、Ame55,4°C 结合过夜;

[0120] (4) TBST 洗涤 4 次, 每次 10min ;

[0121] (5) 加入 1:5000 稀释于 5% 脱脂奶粉的 HRP 标记的羊抗人 IgG (预先在 37℃ 预封闭 30min), 37℃ 孵育 40min ;

[0122] (6) 二抗孵育后 TBST 洗涤 3 次, 每次 10min ;

[0123] (7) 显色 : 加入 ECL 发光液, 送暗室进行显影曝光。

[0124] 2.3 Biacore 3000 系统测定抗体亲和力

[0125] 配置 pH4.0、pH4.5、pH5.0、pH5.5 的 10mM NaAC, 按适当倍数稀释待测抗体, 在 CM5 芯片上作预浓缩, 选择最适 pH 值的 NaAC 作为包被稀释液, 同时分析最适合包被的抗体稀释浓度。

[0126] 包被 : 用最适 pH 值的 NaAC 稀释待测抗体, 选择最适稀释度并选择 CM5 芯片上的一个通道用于耦联, 耦联抗体目标值为 2000RU, 并选择另外一个通道作为对照。试验条件为 25℃, 流速 20 μ L/min, 缓冲液为 HBS-EP (pH7.4, Bia-Certified)。芯片耦联抗体达到目标值后封闭芯片表面。

[0127] 再生条件分析 : 100nM 的 EGFR-Fc 流经芯片表面, 使之和芯片表面的抗体结合, 稳定后 pH3.5、pH2.5、pH2.0、pH1.5 的 10mM 甘氨酸 - 盐酸和 pH8.5 的硼酸盐缓冲液依次流经芯片表面, 直到获得最佳的再生效果, 以确定最佳的再生条件。

[0128] 抗体与抗原结合的动力学分析 : Broford 法测定抗原 EGFR-Fc 的浓度, 进而用 HBS-EP 缓冲液稀释抗原样品, 取不同浓度 (0~100nM 中取 5 个不同浓度) EGFR-Fc 流过待测抗体通道和对照抗体通道, 流速 20 μ L/min, 结合时间 3min, 稳定时间 1min, 解离时间 15min, 每一个循环再生条件为 10mM 甘氨酸 - 盐酸 pH1.5 和 pH8.5 的硼酸盐缓冲液, 流速 20 μ L/min, 每种溶液再生 30s。

[0129] 亲和常数计算 : 所得传感图用 Bia-evaluation 分析软件 4 进行 1:1 Langmuir 结合模式拟合, 计算抗原抗体结合的动力学常数。

[0130] 2.4 流式细胞分析

[0131] 1) 含 EDTA 胰酶消化生长状态良好的 A431 细胞, 将其重悬于预冷的 PBS 中, 洗涤后计数, 将其配制为浓度 6×10^6 个 /ml。1.5ml 离心管分装, 100 μ L/管, 放于冰上。

[0132] 2) 将待测抗体用预冷的 PBS 稀释至 150ug/ml、15ug/ml、1.5ug/ml、0.15ug/ml, 分别取 100 μ L 与预冷的细胞混合。冰上孵育 40min ;

[0133] 3) 预冷的 4℃ 离心机中 4000rpm \times 8min 离心, 轻轻吸去上清 ; 加 1ml 预冷的 PBS 溶液, 洗涤 3 次 ;

[0134] 4) 每管加入 1:100 稀释的预封闭的 FITC- 兔抗人 IgG 二抗, 冰上孵育 30min ;

[0135] 5) 重复 3 步骤洗涤 3 次 ;

[0136] 6) 每管细胞加入 500 μ L 预冷的 PBS 溶液, 轻轻吹打混匀, 样品置冰上, 在流式细胞仪上进行荧光分析。以不加待测抗体的样品为对照。

[0137] 二、结果

[0138] 1. 抗体 Ame55 特异性结合非变性 EGFR

[0139] 将 EGFR-his 进行还原与非还原 SDS-PAGE 凝胶电泳, 分别以 10 μ g/ml 的 Ame55、爱必妥和泰欣生为一抗, 以 HRP 标记的羊抗人 IgG 为二抗, 进行 Western blot 检测, 结果如图 3 所示。Amet55 仅与非还原的 EGFR 特异性结合。

[0140] 2. Ame55 特异性结合 A431 细胞表面的 EGFR

[0141] 以高表达 EGFR 的 A431 细胞为抗原,分别以 Amet55、无关抗体阿伐斯汀、对照抗体爱必妥及泰欣生为一抗,以 FITC 标记的羊抗人 IgG 为二抗,进行细胞免疫荧光检测,结果见图 4。结果表明,Ame55 (图 4 的 B 图)以及阳性对照抗体爱必妥(图 4 的 C 图)和泰欣生(图 4 的 D 图)可特异性结合 A431 细胞表面的 EGFR,而阴性对照抗体阿伐斯汀(图 4 的 A 图)与之无结合。进一步采用流式细胞分析其与 A431 细胞的结合,结果表明,该抗体在一定的浓度范围内与 A431 细胞呈剂量依赖的结合。在浓度小于 $1 \mu\text{g/ml}$ 的情况下,其荧光强度介于对照抗体爱必妥与泰欣生之间(图 5A、图 5B、图 5C)。

[0142] 3. Biacore 3000 测定 Ame55 与 EGFR-Fc 亲和力

[0143] 将 Ame55 包被在 CM5 芯片表面,以不同浓度 EGFR-Fc 为流动相,采用 Biacore 3000 系统测定该抗体与 EGFR-Fc 的亲和力,结果如图 6 所示,拟合后其亲和力 KD 为 0.231nM ,其中 $K_a=4.21 \times 10^5$, $K_d=9.73 \times 10^{-5}$ 。

[0144] 实施例 3Ame55 体外活性及表位分析

[0145] 一、方法

[0146] 1. 抗体竞争结合抑制实验

[0147] 以 Ame55 为固定相包被于 CM5 芯片上,包被和再生条件见实施例 2 的方法,以 50nM 的 EGFR-Fc 为第一流动相流经样品通道,时间 3min ,经 PBS-T 洗涤 3min 后,以 1000nM 的爱必妥为第二流动相流经样品通道,时间为 3min ,之后经 PBST 洗涤 3min 。另外,同样以 1000nM 的 Ame55 为第二流动相进行上述实验,作为自身竞争抑制对照。同样,以爱必妥为固定相重复上述实验。2. EGF 与 EGFR 结合竞争抑制实验

[0148] EGF 以 $1 \mu\text{g/孔}$ 包被于 96 孔板, 4°C 包被过夜。将 Ame55 和阳性对照抗体爱必妥及无关对照抗体(本发明筛选的抗 IL-6R 的抗体)分别以摩尔比 3:1、2:1 和 1:1 与 $2.5 \mu\text{g/孔}$ 的 EGFR-Fc 混合, 37°C 预封闭 30min 后,加至封闭后的包被了 EGF 的 ELISA 板中, 37°C 结合 1h , PBST 洗涤 3 遍, PBS 洗涤 1 遍, 5min/次 ,以预封闭的 HRP 标记的山羊抗人 IgG 为二抗, 37°C 作用 30min , PBST 及 PBS 洗涤后,加入 OPD 底物显色液进行显色, $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ 终止反应后,测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 处的光吸收值。

[0149] 3. A431 细胞划痕愈合实验

[0150] 将 6 孔板预先于底部划直线等分标记,每孔五等分。A431 细胞种于标记好的 6 孔板, $10^5/\text{孔}$ 细胞。待细胞长至对数生长期时,使用 $200 \mu\text{L}$ 移液枪头垂直于直线标记,于细胞面上划线。划线后 PBS 冲洗两遍,每孔加入待测抗体 Ame55、阳性对照抗体爱必妥、阴性对照抗体阿达木单抗(为美国 Abbott 公司产品)至终浓度 $25 \mu\text{g/ml}$,另设一空白孔为空白对照。分别取 0h 、 12h 、 24h 为观察时间点,以直线标记固定位置并动态过程拍照。

[0151] 4. A431 细胞生长抑制实验

[0152] 1) 接种细胞:胰酶消化 A431 细胞,充分吹散后计数;用含 0.5% 新生牛血清的 1640 培养基调至 5000个/ml 的细胞浓度,加入 6 块 96 孔板,每孔 $200 \mu\text{L}$ (最终每孔 $800\text{--}1000$ 个细胞均匀分布), 37°C $5\%\text{CO}_2$ 孵育 24h 至细胞完全伸展贴壁;

[0153] 2) 加入待测抗体后培养:96 孔板弃上清, PBS 洗一遍;配置爱必妥(CT)、泰欣生(hR3)、Ame55 各 200nM , PBS 作为对照,以每孔 $200 \mu\text{L}$ 加入 96 孔板中,每种浓度 3 个复孔,5 块 96 孔板平行加入, 37°C $5\%\text{CO}_2$ 进行培养;分别在第 3 天和第 5 天分别换液。在第 0、3、4、

5、6、7 天各随机取 1 块板进行染色。

[0154] 3) 结晶紫染色: 除去 96 孔板中的培养基, PBS 洗涤 1 次; 每孔加入 100 μ L 的 4% 多聚甲醛, 室温静置固定 15min; 弃去甲醛, 加入 PBS 稀释的 0.5% 结晶紫溶液(用无水乙醇配置的 5% 结晶紫母液稀释 10 倍), 100 μ L/孔, 室温静置染色 15min; 弃去结晶紫溶液, 用自来水浸没并冲洗数次; 蒸馏水室温浸没, 在 560 转/min 的水平摇床洗涤 15min; 控干水分, 空气中干燥过夜。

[0155] 4) 细胞密度检测: 收集第 0 天至第 7 天的 6 块 96 孔板, 同批次进行脱色和 OD 值检测; 每孔加入 200 μ L soreson's 溶液, 400 转/min 水平摇床 30min 脱色; 每孔取 100 μ L 至新的 96 孔板, 测定 590nm 的光吸收值, 以 630nm 的光吸收值作为内参。绘制细胞生长曲线。

[0156] 附 soreson's 溶液配置方法: A 液: 8.967 克枸橼酸钠溶于 305ml 超纯水中; B 液: 195ml 0.1N HCl (1.6ml 38%HCl 加入 193.4ml 超纯水中, “酸入水”); C 液: 500ml 95% 乙醇 (475ml 无水乙醇中加入 25ml 超纯水); A+B+C 混合至总体积 1 升。

[0157] 二、结果

[0158] 1. Ame55 和爱必妥与 EGFR 结合的相互竞争抑制作用

[0159] 以 Ame55 为固定相, 以 EGFR 为第一流动相(1), 经 PBST 洗涤一段时间(2), 以 Ame55(A) 和爱必妥(B) 为第二流动相(3), 之后再用 PBST 洗涤(4); 反之, 以爱必妥为固定相, 以 EGFR 为第一流动相(1), 经 PBST 洗涤一段时间(2), 以 Ame55(D) 和爱必妥(C) 为第二流动相(3), 之后再用 PBST 洗涤(4), 对两抗体的表位进行初步分析, 结果表明(见图 7A、图 7B、图 7C 和图 7D), 与 Ame55 结合的 EGFR 不能进一步结合爱必妥(图 7B, 图 7A 为 Ame55 自身抑制对照), 即 Ame55 可以抑制 EGFR 与爱必妥的结合, 反之, EGFR 与爱必妥结合后, 也无法再与 Ame55 结合(图 7D, 图 7C 为爱必妥自身抑制对照), 即爱必妥也可以抑制 EGFR 与 Ame55 的结合。该结果提示两抗体间可能存在抗原表位的相互竞争抑制作用, 很可能两者抗原表位结构上极为接近或相同。

[0160] 2. Ame55 对 EGF 与 EGFR 结合的竞争抑制作用

[0161] 采用竞争 ELISA 方法分析 Ame55 对 EGF 与 EGFR 结合的竞争抑制作用。结果表明, 在 EGFR 与抗体的摩尔比为 1:1、1:2 和 1:3 的条件下 Ame55 明显抑制 EGFR 与 EGF 的结合, 而阴性对照抗体没有抑制作用。Ame55 抑制活性低于同浓度对照抗体爱必妥。(见图 8)

[0162] 3. Ame55 对 A431 细胞迁移的抑制作用

[0163] 按本实施例方法 3 所述, 对 25ug/ML 实验抗体组的细胞划痕愈合情况进行 24h 固定定位点的动态观察(图 9), 在抑制 A431 细胞迁移活性方面, Ame55 表现出了与爱必妥同样的抑制活性。而另一阴性对照抗体阿达木单抗则对其迁移无抑制活性, 阿达木单抗为上市的针对 TNF α 的抗体药物。该结果提示, Ame55 的确具有抑制 EGFR 生物学活性的功能, 提示其在临床转移瘤的治疗应用中可能具有较好的作用。

[0164] 4. Ame55 对 A431 细胞生长的抑制作用

[0165] A431 等高表达 EGFR 的细胞通过自分泌的 EGF 作用于其 EGFR 受体, 进而激活下游通路, 导致去受体磷酸化, 促进其细胞生长和迁移等。因此, 进一步采用 A431 细胞增殖实验评价了 Ame55 对高表达 EGFR 的细胞生长的影响, 连续观察细胞的生长趋势。按本实施例方法 4 所述进行实验, 结果表明(图 10), Ame55 具有抑制 A431 细胞生长的作用, 但抑制强度弱

于对照抗体爱必妥,与另一株对照抗体泰欣生(Nimotuzumab)相当。

[0166] 实施例 4Ame55 体内抑瘤活性测定

[0167] 雌性裸鼠,20g 左右,47 只,背部皮下接种 100 μ L 浓度为 5×10^7 的 A431 细胞。待肿瘤长至 50~150mm³时,称小鼠体重并量瘤后进行分组。共包括 4 组,分别为生理盐水组、爱必妥组、阿达木单抗组和 Ame55 组。其中爱必妥为上市抗 EGFR 单克隆抗体,设为阳性对照组,阿达木单抗为上市的针对 TNF α 的抗体药物,设为阴性对照,生理盐水设为荷瘤对照,抗体给药均为 1mg/只,3 天给药一次,每次给药前称量体重与测量肿瘤大小。肿瘤计算方法为: $\pi/6 * \text{长径} * \text{短径}^2$ 。36 天后杀鼠取瘤,称量瘤重,并进行统计学分析。

[0168] 以 A431 细胞移植瘤为研究对象,评价 Ame55 对何瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用。实验结果表明:Ame55 在 1mg/只的剂量下对 A431 移植瘤的生长具有明显的抑制作用(图 11),连续给药 6 次,停药观察 4 周后的瘤重结果表明,对照组平均瘤重 3.65g,Ame55 组平均瘤重 0.32g,其抑瘤率在 90% 以上(图 12、13)。

[0169] 实施例 5Ame55 轻重链可变区突变体评价方法

[0170] 1. 丙氨酸扫描

[0171] 分别设计定点突变引物对 CDRL1、CDRL3、CDRH2 和 CDRH3 进行丙氨酸扫描,如果其在该位置是丙氨酸,则将其分别突变为 Gly 和 Ser。方法采用质粒定点突变的方法进行,参照文献 [王荣浩,陈瑞川,刘润忠。快速点突变的优化方法。厦门大学学报(自然科学版),2008,Vol 47, sup 2, 282-285]。

[0172] 2. ForteBio QKe 测定抗体亲和力

[0173] 将 EGFR-Fc 融合蛋白利用生物素试剂盒进行生物素化,将生物素化的 EGFR-Fc 以 PBS 稀释至 100nM 的浓度,包被于链亲和素传感器表面,时间为 20min,使用 HEPES EP 对传感器清洗 5min,将待测突变体抗体和亲本抗体 Ame55 均以 20nM 的浓度放于检测孔中,并使其与清洗后的链亲和素传感器表面的 EGFR-Fc 结合,结合时间为 10min,待结合达到平衡态后将复合物在 HEPES EP 中进行解离,解离时间为 20min。采用 ForteBio 软件包进行亲和力分析。

[0174] 3. 突变体与亲本抗体抑瘤活性比较

[0175] 实验方法同实施例 4,组别和剂量设置为:生理盐水对照、爱必妥对照、Ame55 亲本抗体对照及 Ame55 的各突变体抗体(Ametumumabs)AmeA1C1、AmeA1C3、AmeA1C3-HI2、AmeA2、AmeA2C1、AmeA2C3、AmeA2C3-HI2,共 10 组,每组 8 只,给药剂量为 0.2mg/只,3d/次,共给药 6 次,停药 6 天后杀瘤称重。

[0176] 二、结果

[0177] 1. 突变体亲和力分析

[0178] 在 Ame55 氨基酸序列基础上进行轻、重链可变区及框架区部分氨基酸的突变。采用丙氨酸扫描和定向突变的方法进行突变体设计。使用 ForteBio QK[®]蛋白分子相互作用系统对突变体进行亲和力的进一步筛选评价。结果表明(表 1),与亲本抗体 Ame55 相比,轻链 CDR1、CDR3、重链 CDR2 和 CDR3 区多个氨基酸位点均对抗体维持与 EGFR 结合能力至关重要,其原因可能是该位点的氨基酸直接参与相互作用,也可能是该位点的氨基酸对于维持抗体的正确的整体空间结构至关重要。在这些氨基酸改造的位点中,最值得注意的是轻链第 26 位和 89 位氨基酸,重链第 54 位和 107 位氨基酸。在首先通过单点氨基酸的替换后,本发明

发现将轻链的 89 位氨基酸由 Val 改造为 Ala 或 Ser 后,亲和力提高 4 倍以上,将其进一步组合轻链第 26 位的 Gly 或 Lys 后,亲和力进一步提高,较亲本抗体亲和力提高 5 倍以上;或者将重链的 54 位,107 位氨基酸分别替换为 Ser 后,与轻链 89A/S 组合表达后,抗体的亲和力在 89A/S 的基础上均得到了不同程度的提高。为进一步证实亲和力的提高对抗体生物学活性的影响,进一步对其中的 7 株突变体抗体 AmeA1C1 (突变轻链第 26 位为 Gly 和第 89 位为 Ser)、AmeA1C3 (突变轻链第 26 位为 Lys 和第 89 位为 Ser)、AmeA1C3-HI2 (突变轻链第 26 位为 Lys 和 89 位为 Ser,同时突变重链第 107 位为 Ser)、AmeA2 (突变轻链第 89 位为 Ala)、AmeA2C1 (突变轻链第 26 位为 Gly 和第 89 位为 Ala)、AmeA2C3 (突变轻链第 26 位为 Lys 和第 89 位为 Ala)、AmeA2C3-HI2 (突变轻链第 26 位为 Lys 和第 89 位为 Ala,同时突变重链第 107 位为 Ser) 进行了进一步的体内活性评价。

[0179] 2. 突变体与 Ame55 抑瘤活性比较

[0180] 为进一步评价突变体与亲本抗体活性的差别,将给药剂量降至 0.2 μ g/ 只的较低剂量下,对几株亲和力不同程度提高的突变体与亲本抗体在移植瘤小鼠上进行抑瘤活性比较。结果表明:对照抗体组平均瘤重为 1.854g,在 0.2 μ g/ 只的给药剂量下,亲本抗体 Ame55 组(平均瘤重 0.71g)的抑瘤活性降至约 60%,而突变体抗体抑瘤活性明显好于亲本抗体,其抑瘤率达分别为 67%~93% 不等,部分抗体与商业化抗体爱必妥(抑瘤率 91%)活性相当。该结果提示突变体亲和力的提高的确有益于其体内生物学活性的改善。不同组别肿瘤生长情况和瘤重统计分析见图 14。

[0181] 表 1Ame55 突变体亲和力变化情况统计表

[0182]

轻链		重链	
突变位点	亲和力变化	突变位点	亲和力变化
13A	1	50A	不结合
26G(C1)	0.5	50R	不结合
26N(C2)	1	51A	>10
26K(C3)	0.3	52A	不结合
G28P	>100	52D	>10
29E	>100	53A	5
32I	1	54A	>10
32V	2	54S	0.5
33Y	2	55A	>100
51G	1	56A	1
55P	2	57A	不结合
88Q	2	57Y	不结合
88A	>10	58A	>10
88Y	5	59A	>10
88L	5	59N	>10
88G	3	60A	5
88N	>10	66H	1
89S (A1)	0.5	99A	>10
89A(A2)	0.25	99S	>10
89L	5	100A	5
90A	>10	101A	4
91A	>10	102A	不结合
92A	2	103A	不结合
92S	4	104A	3
92P	1	105A	>10
93A	>10	106A	>10
94A	>10	107G	1.5

[0183]

95A	>10	107S	0.2
95S	>10	108A	5
96A	>10		
97A	>10		
26G+89S	<0.3		
26K+89S	<0.2		
26G +89A	<0.2		
26K +89A	<0.1		

[0184] 注：突变体抗体与亲本抗体比较，亲本抗体亲和力为设为 1，计算亲和力下降倍数。

[0185] 实施例 6Ame55 轻链对 EGFR 的特异性结合能力检测

[0186] 为验证单独 Ame55 轻链对 EGFR 是否具有特异性结合能力，本发明将 Ame55 单独的轻链 (SEQ ID NO. 20 所述的氨基酸序列) 与一条来自 VH3 胚系基因家族的抗体重链 (序列如 SEQ ID NO. 22 所示) 进行组合，并在 HEK293 瞬时表达系统中进行了瞬时表达，通过 Protein A 柱纯化获得了另一株含有 Ame55 轻链的新抗体 Ame-9B。对 Ame-9B 与 EGFR 的结合能力通过 Fortebio 蛋白相互作用系统进行检测，具体方法参照实施例 5。结果表明，尽管亲和力有所下降 (约降低了 6 倍)，Ame-9B 仍然保持了与 EGFR 的结合能力，见图 15。

[0001]

序列表

<110> 上海赛伦生物技术有限公司，中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所

<120> 人源抗人表皮生长因子受体抗体及其编码基因与应用

<130> KHP11114624.0

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> EGFR 的 CDRL1

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> Xaa=Ala 或 Gly 或 Asn 或 Lys

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> Xaa=Ala 或 Val 或 Ile

<220>

<221> VARIANT

<222> (11)..(11)

<223> Xaa=Ser 或 Tyr

<400> 1

Ser Gly Asp Xaa Leu Gly Asp Lys Tyr Xaa Xaa

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> EGFR 的 CDRL2

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> Xaa=Ser 或 Thr 或 Ala 或 Gly

<400> 2

Glu Asp Xaa Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> EGFR 的 CDRL3

[0002]

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1).. (1)
 <223> Xaa=Ser 或 Asn 或 Ala 或 Gly 或 Leu 或 Tyr 或 Gln
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (2).. (2)
 <223> Xaa=Ser 或 Val 或 Ala 或 Leu
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (5).. (5)
 <223> Xaa=Gly 或 Ala 或 Pro
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8).. (8)
 <223> Xaa=Gly 或 Ser
 <400> 3
 Xaa Xaa Trp Asp Xaa Asp Trp Xaa Met Pro
 1 5 10

 <210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> EGFR 的 CDRH1
 <400> 4
 Ser Tyr Trp Ile Gly
 1 5

 <210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> EGFR 的 CDRH2
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (1).. (1)
 <223> Xaa=Gly 或 Ser
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (6).. (6)
 <223> Xaa=Gly 或 Ser
 <400> 5
 Xaa Ile Ile Tyr Pro Xaa Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 1 5 10 15
 Gln

[0003]

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (95)..(95)
 <223> Xaa=Gly 或 Ser
 <400> 7
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 I 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Xaa Leu Gly Asp Lys Tyr Xaa
 20 25 30
 Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Glu Asp Xaa Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Trp Asp Xaa Asp Trp Xaa Met
 85 90 95
 Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 8
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> EGFR 的重链可变区氨基酸序列
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (49)..(49)
 <223> Xaa=Gly 或 Ser
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (54)..(54)
 <223> Xaa=Gly 或 Ser
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (107)..(107)
 <223> Xaa=Ala 或 Ser 或 Gly
 <400> 8

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 I 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Xaa Ile Ile Tyr Pro Xaa Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe

[0005]

<213> 人工序列	
<400> 12	
gaatagctag ctecattegt tggacagcct tcaagacctg	40
<210> 13	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 13	
gaaggatcct taatggtgat gatggtgatg gctccattcg ttggaca	47
<210> 14	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 14	
gcgccccita agggcgtgca gtgcgaagtt caactggttc aaagc	45
<210> 15	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 15	
cggtgctagc gctcgacacg gtcaccagag t	31
<210> 16	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 16	
caagtgtaca ggatcatggg caagctacga actgaccag ccgc	44
<210> 17	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 17	
cgtaagctt ggtgccaccg ccaaacac	28
<210> 18	
<211> 249	
<212> PRT	
<213> Ame55 单链抗体氨基酸序列	
<400> 18	

[0007]

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Val Trp Asp Gly Asp Trp Gly Met
 85 90 95
 Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Gly Gly
 100 105 110
 Ser Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr Lys Leu Ser Ser Ser
 115 120 125
 Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 130 135 140
 Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
 145 150 155 160
 Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 165 170 175
 Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro
 180 185 190
 Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr
 195 200 205
 Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Ala Arg Gly Ile Ile Tyr Pro Ser Asn Val Ala Val Trp Gly
 225 230 235 240
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 19

<211> 747

<212> DNA

<213> Ame55 单链抗体核苷酸序列

<400> 19

```

agctacgaac tgaccagacc gccgagcgtg tcggtggegc cgggtcagac egcgctatc      60
acctgetcgg gcgatgcgct gggcgataaa tacgcgagct ggtatcagca gaaaccgggt      120
caggcaccgg tgetggtgat ttacgaagat tctaaacgcc cgtctggcat cccggaacgc      180
tttagcggct egaattcggg caacaccgcg accctgacca ttagcggcae ccaggcggag      240
gatgaggcgg actattactg ctcggtgtgg gatggcgact ggggatgcc tgtgtttggc      300
  
```

[0008]

```

ggtggcacca aactgaccgt gctgggcagc ggccgctcga ccataacttc gtataatgta      360
tactatacga agttatcgag ctegggcagc gaagttcaac tggttcaaag tgggtcggaa      420
gtgaagaaac cgggcgaaaag tctgaaaatt agttgcaaag gctctgggta ttcttttaag      480
tcttattgga tggctgggt tegtcagatg cggggtaaag gctctggaatg gatgggtatt      540
atttatecgg gtgatagtga tacgcgttat tctceagatt ttcagggtca ggttactatt      600
agtgcagata aaagcatcag caccgcgat ctgcagtgga gttctctgaa agcagatgal      660
accgcgatgt attattgcgc acgtgggtatt atttatcctt ctaatgtcgc tgtctgggggt      720
cagggcactc tggtgaccgt gtcgagc                                          747

```

<210> 20

<211> 109

<212> PRT

<213> Ams55 单链抗体的轻链可变区氨基酸序列

<400> 20

```

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln      1
1           5           10           15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
           20           25           30
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
           35           40           45
Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
           50           55           60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
65           70           75           80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Val Trp Asp Gly Asp Trp Gly Met
           85           90           95
Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
           100           105

```

<210> 21

<211> 119

<212> PRT

<213> Ams55 单链抗体的重链可变区氨基酸序列

<400> 21

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu      1
1           5           10           15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
           20           25           30
Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
           35           40           45
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
           50           55           60

```

[0009]

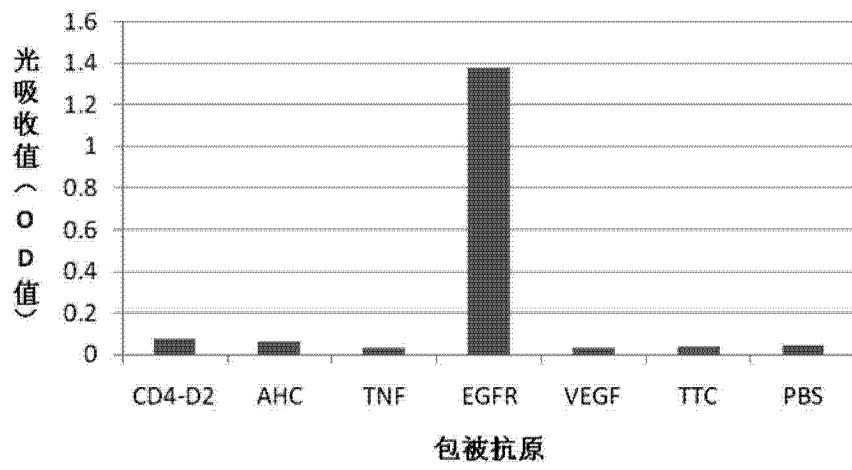


图 1

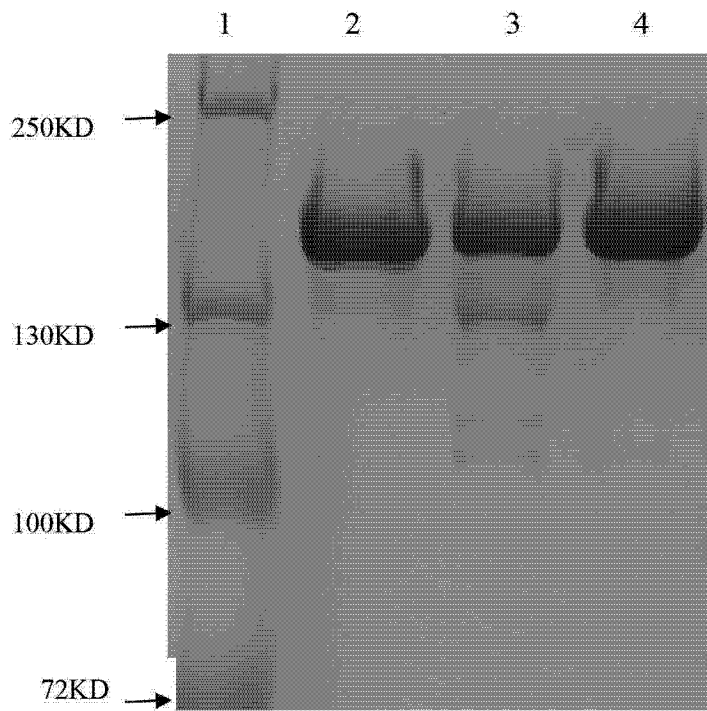


图 2

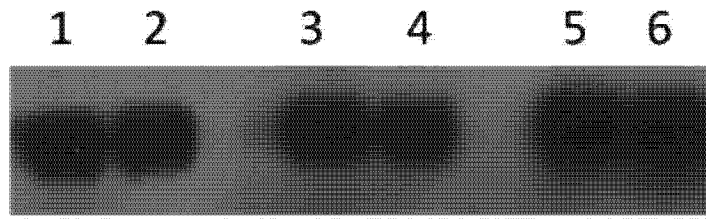


图 3

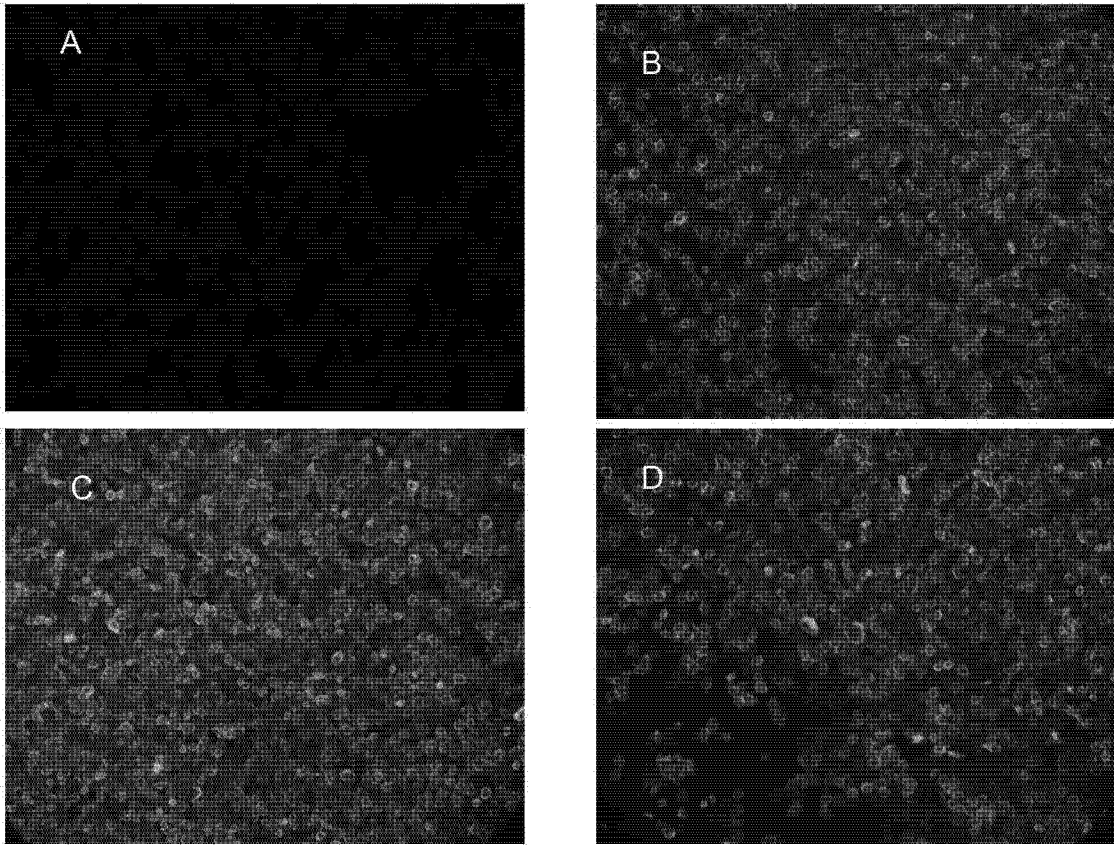


图 4

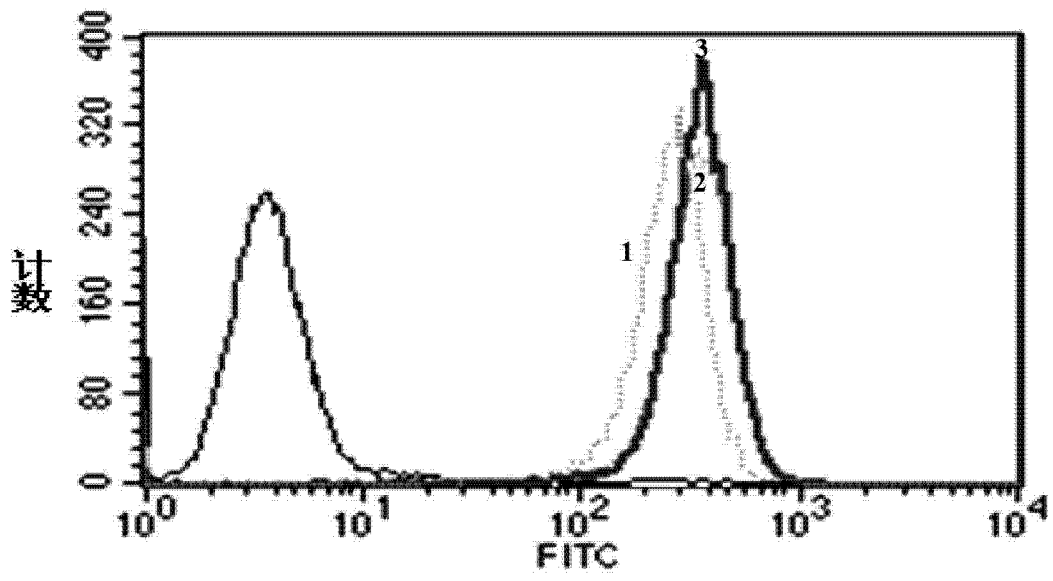


图 5A

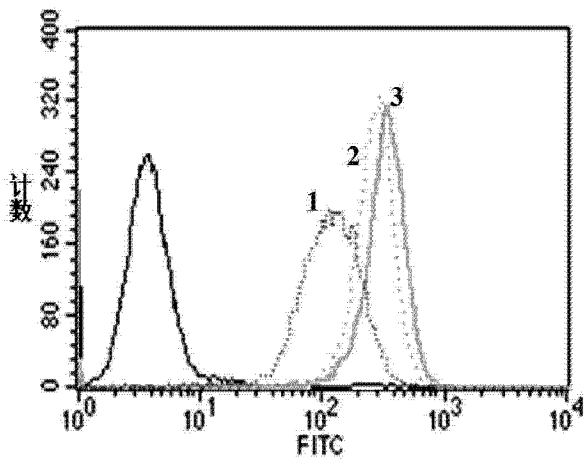


图 5B

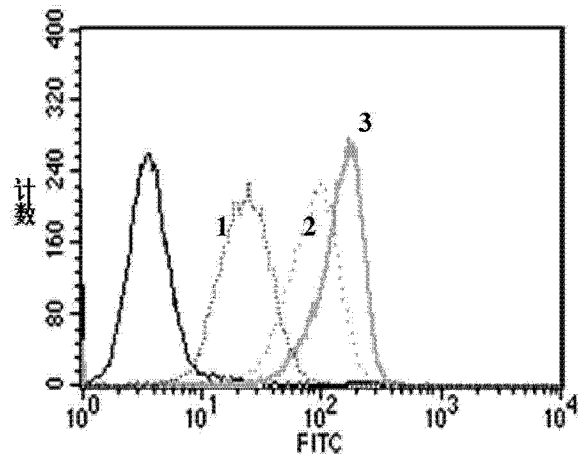


图 5C

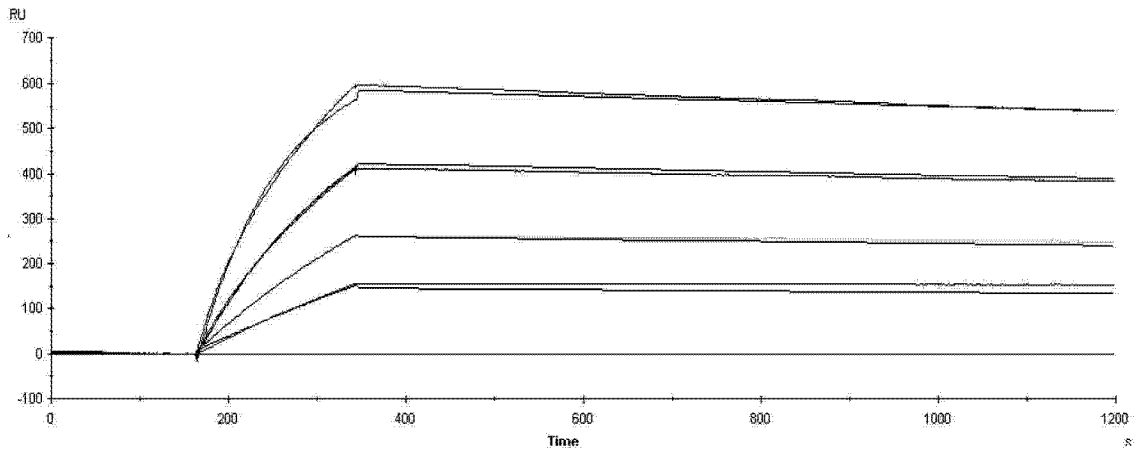


图 6

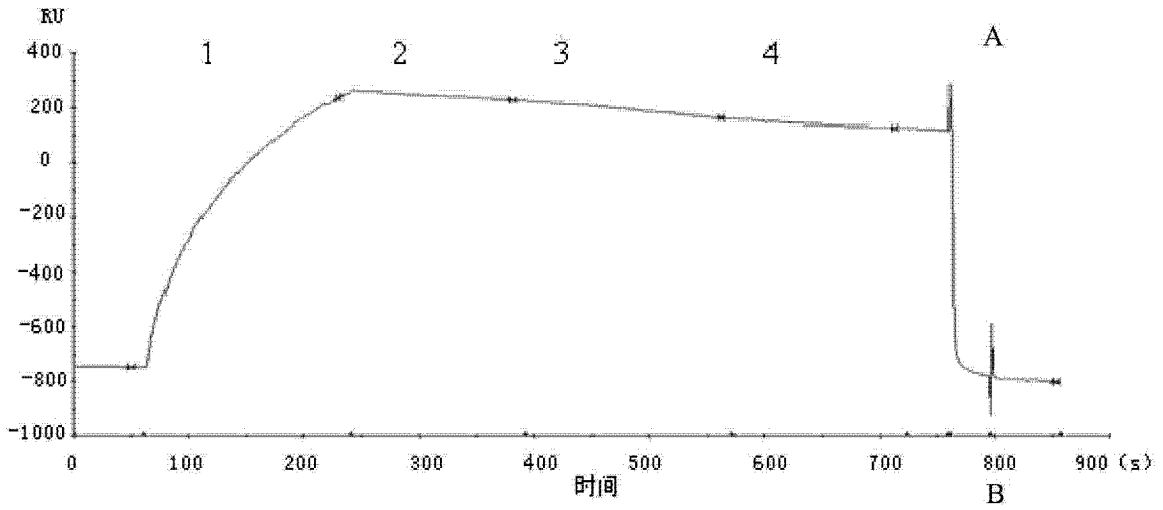


图 7A

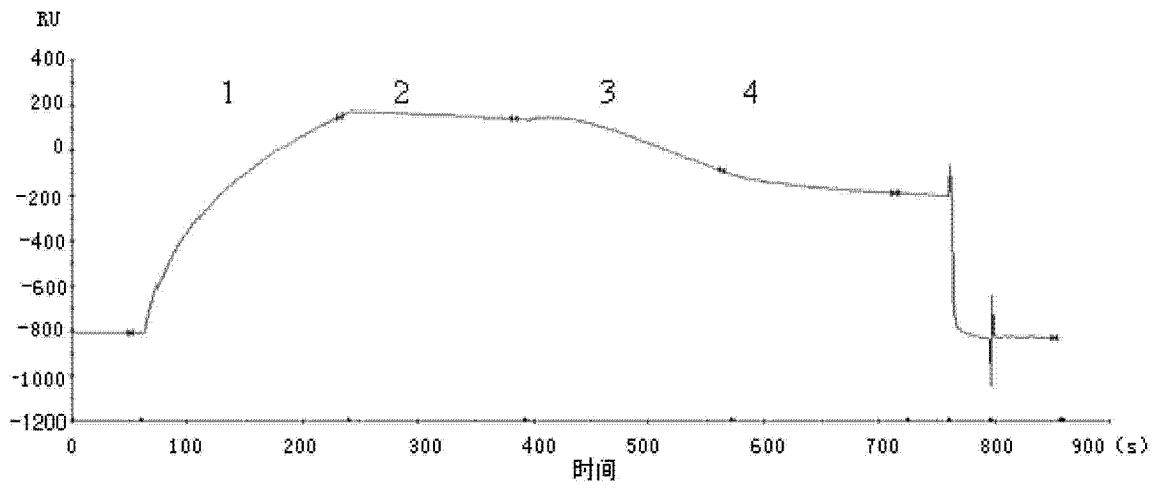


图 7B

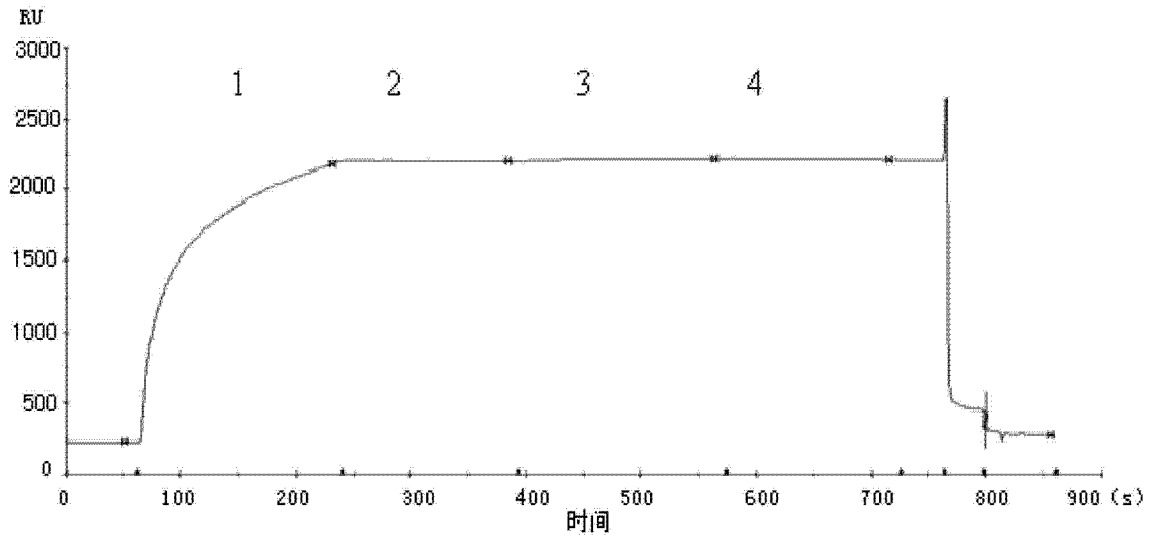


图 7C

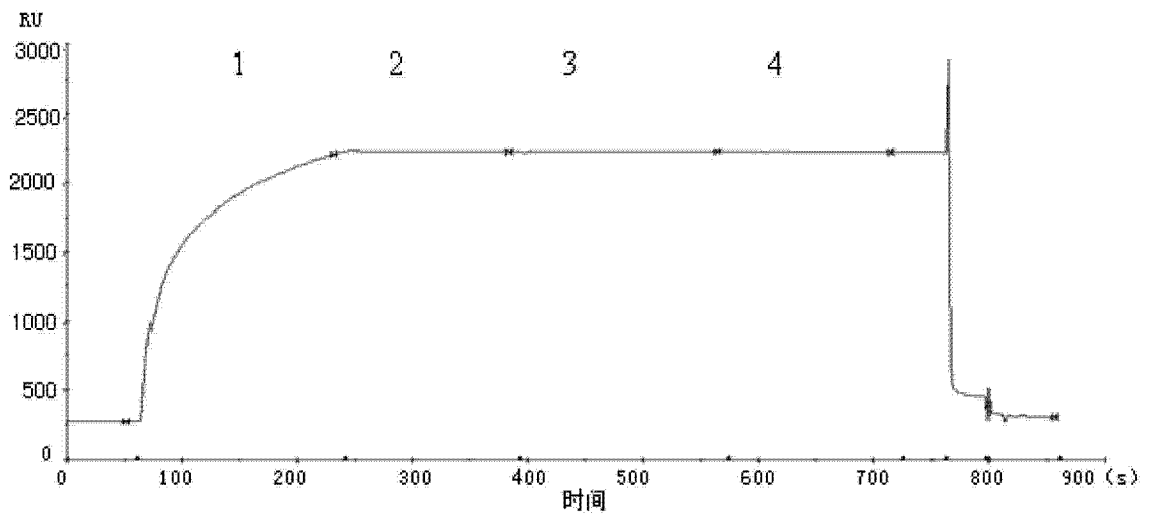


图 7D

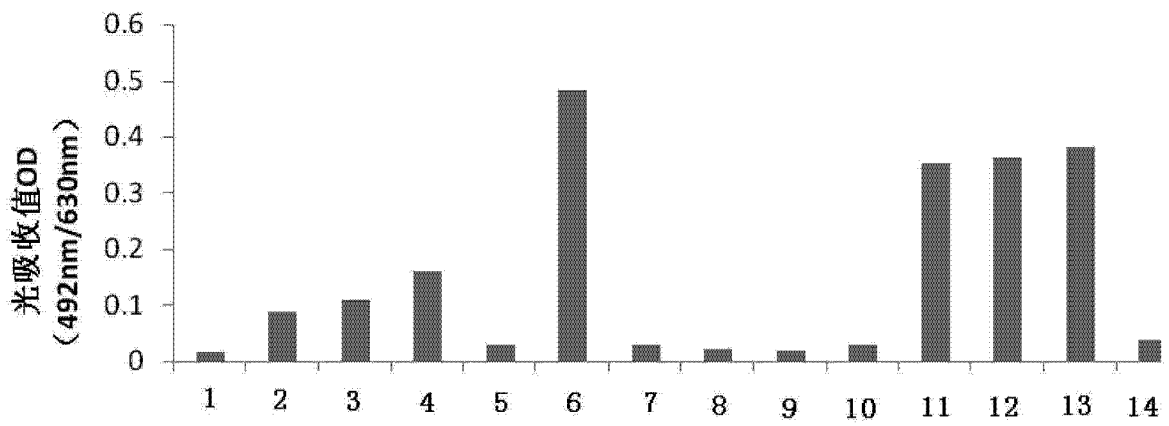


图 8

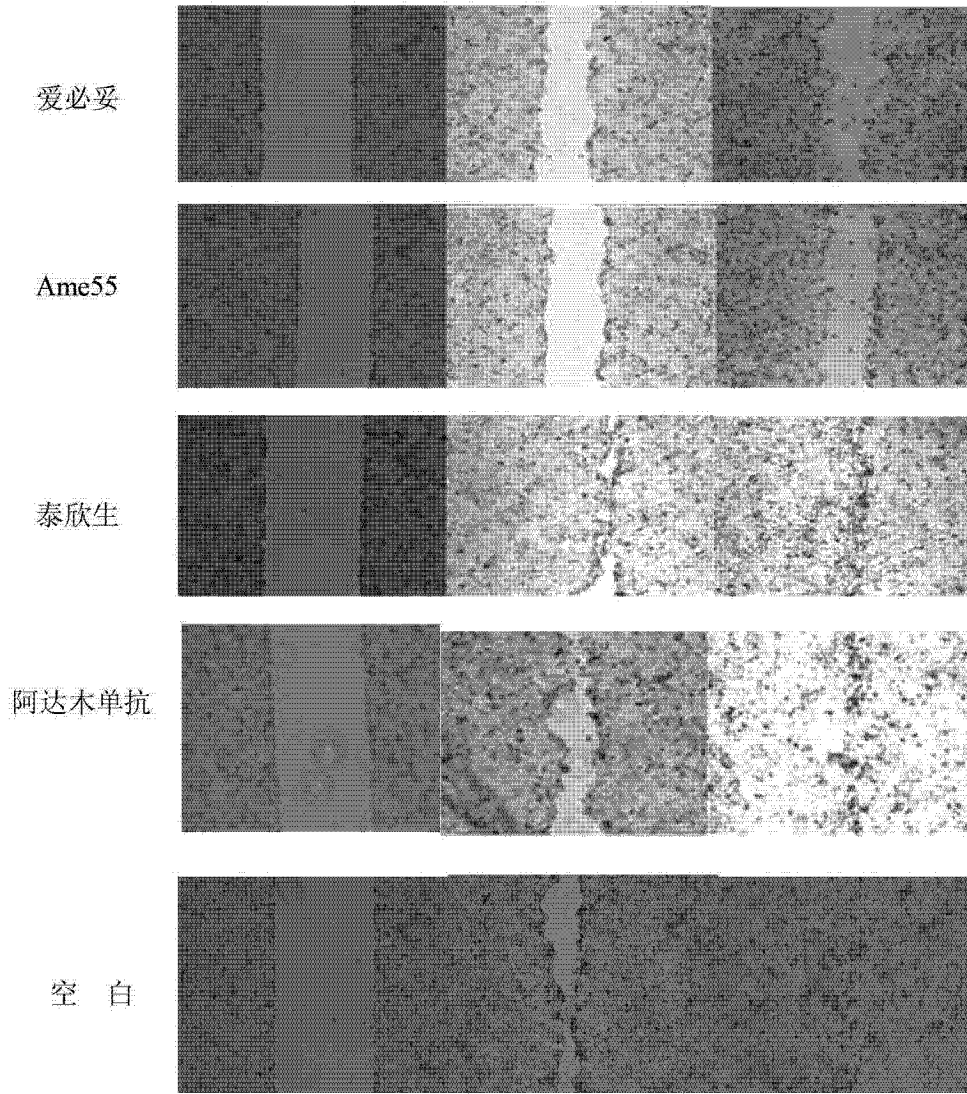


图 9

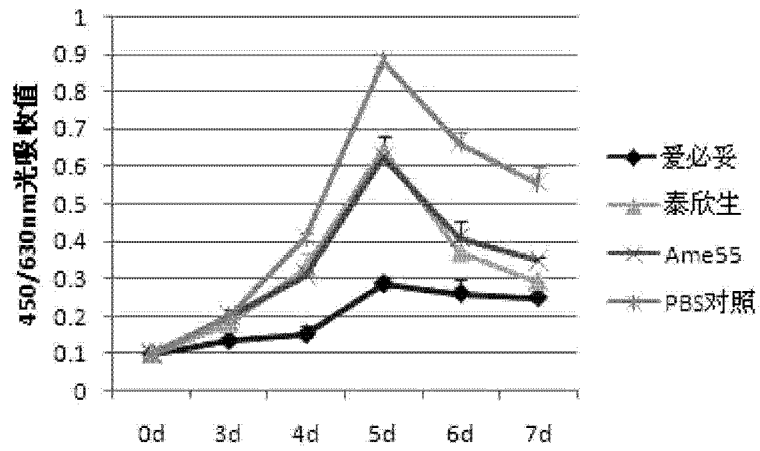


图 10

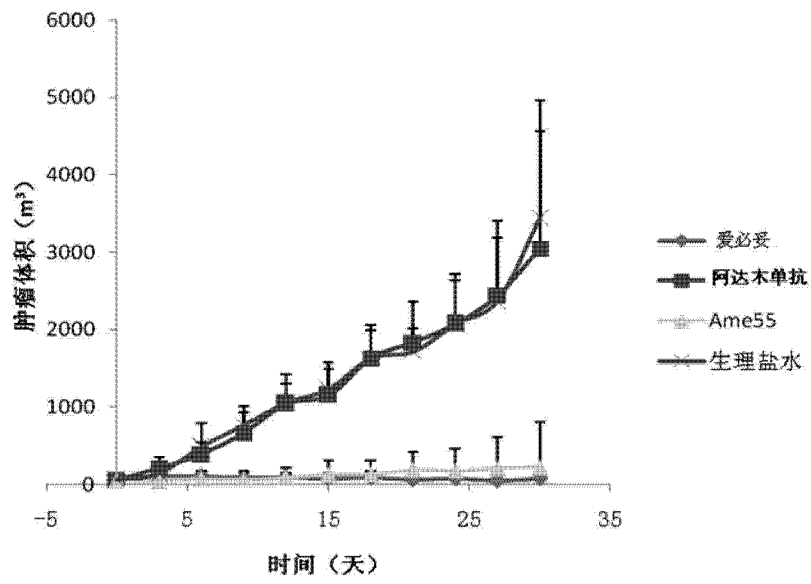


图 11

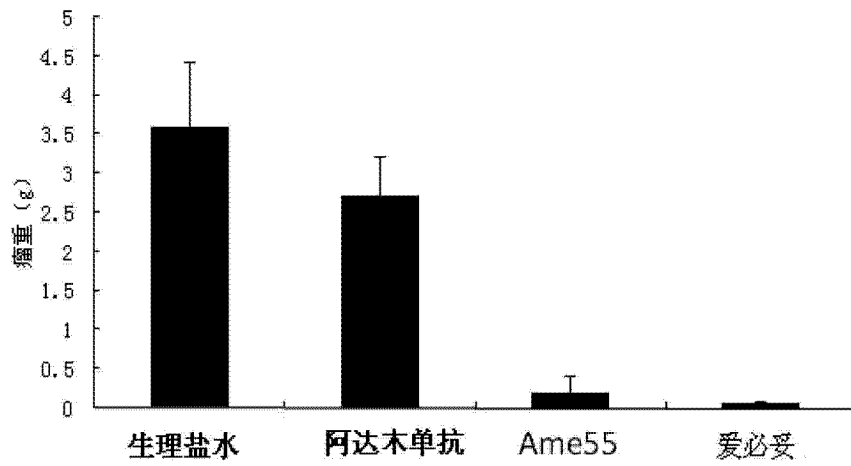


图 12

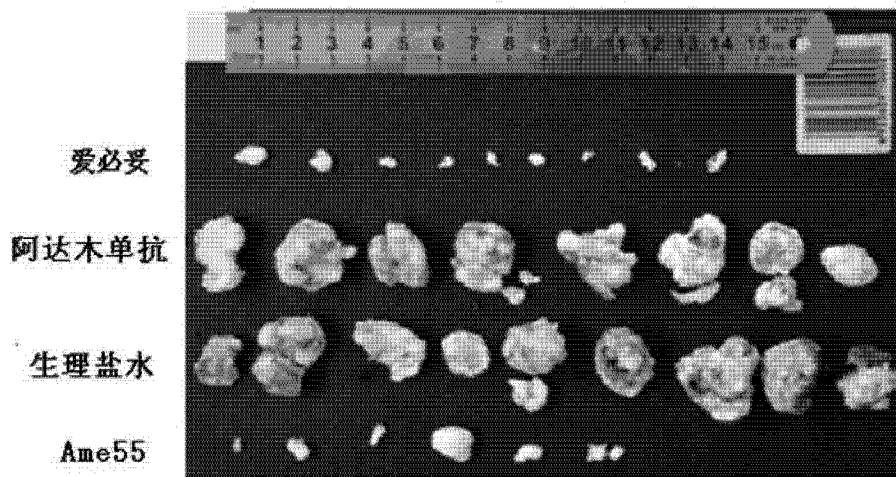


图 13

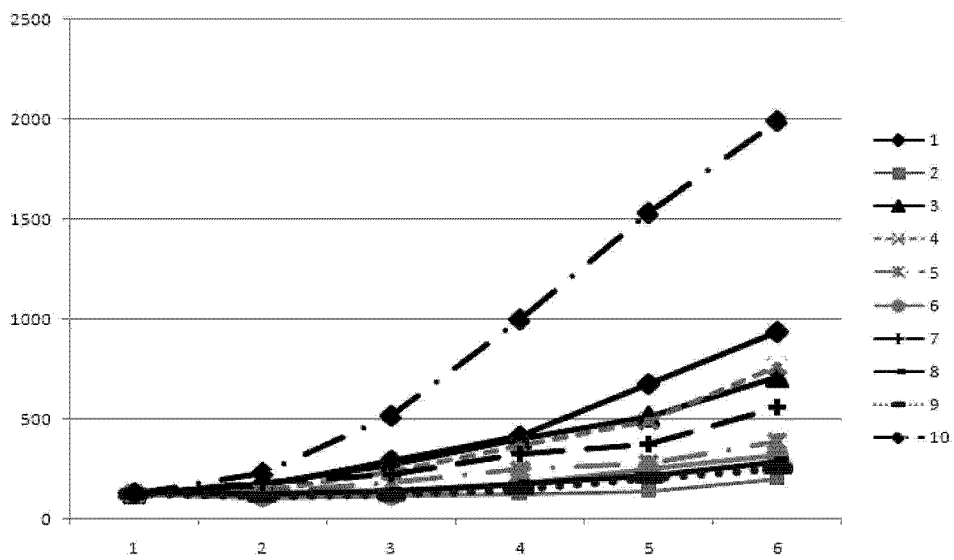


图 14A

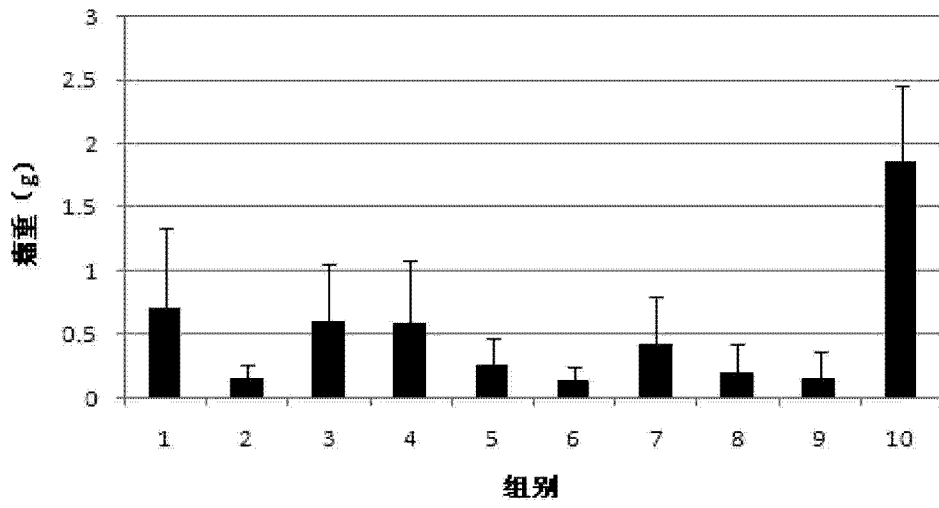


图 14B

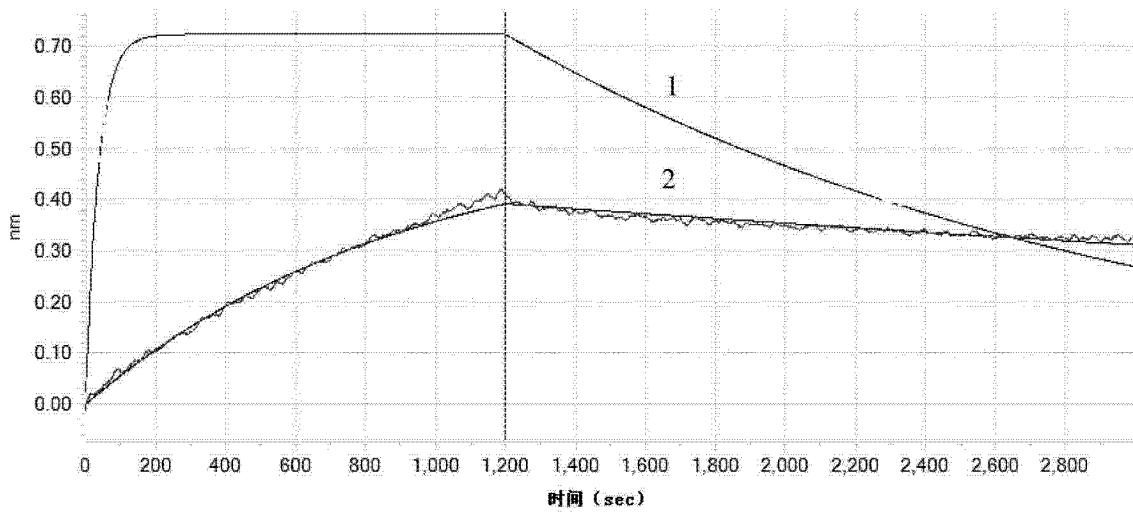


图 15

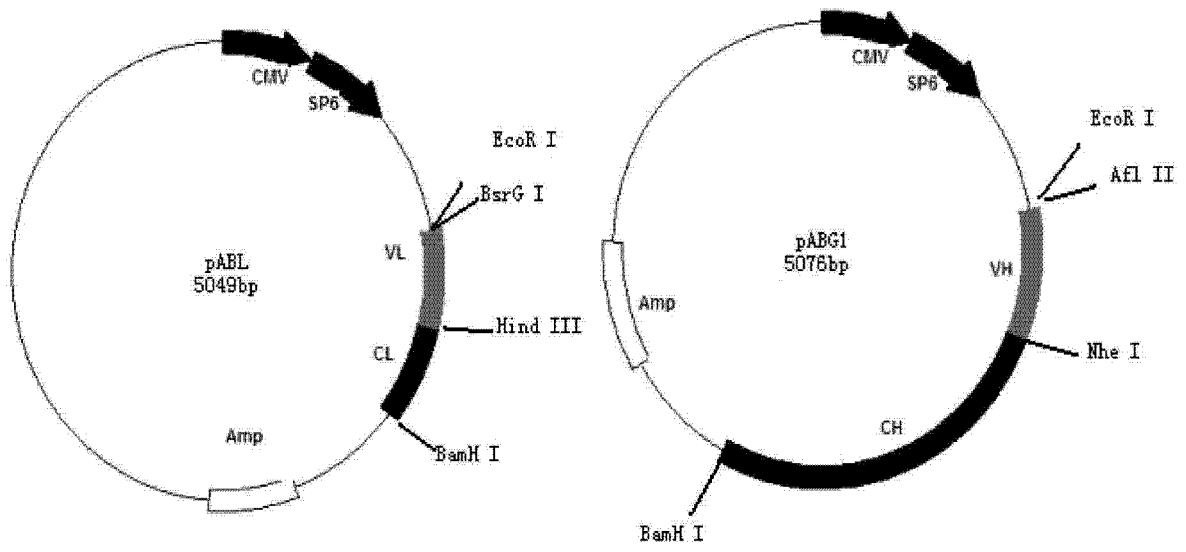


图 16

专利名称(译)	人源抗人表皮生长因子受体抗体及其编码基因与应用		
公开(公告)号	CN102993305B	公开(公告)日	2015-05-13
申请号	CN201210465918.4	申请日	2012-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	上海赛伦生物技术有限公司 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所		
申请(专利权)人(译)	上海赛伦生物技术有限公司 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所		
当前申请(专利权)人(译)	上海赛伦生物技术有限公司 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所		
[标]发明人	孙志伟 王双 孙久如 张畅 曾大地 仇玮祎 常红艳 范志和 杨涛 范铁炯		
发明人	孙志伟 王双 孙久如 张畅 曾大地 仇玮祎 常红艳 范志和 杨涛 范铁炯		
IPC分类号	C07K16/28 C07K19/00 C12N15/13 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61P35/00 A61P29/00 A61P37/02 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P29/00 A61K47/6849 A61K47/6851 C07K1/22 C07K16/2863 C07K2317/24 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2319/55 C12N15/1037 A61K39/39558 C07K16/30 C07K2317/21 C07K2317/31		
代理人(译)	王朋飞 张庆敏		
审查员(译)	马静		
其他公开文献	CN102993305A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种人源抗人表皮生长因子受体 (EGFR) 抗体及其编码基因与应用。本发明通过基因工程手段和噬菌体表面展示技术, 从全合成单链人抗体库中筛选出抗人EGFR的基因工程单链抗体, 并获得其抗体的可变区基因序列, 在此基础上构建全人单克隆抗体, 进一步获得高纯度抗体蛋白。本发明的抗体与人EGFR结合的亲和力不大于1nM, 其突变体亲和力不大于10nM; 并完成了

抗体蛋白IgG的免疫活性和生物活性鉴定，证实抗体具有良好的抑制EGFR高表达细胞A431荷瘤模型小鼠肿瘤生长的生物学活性，本发明为针对EGFR靶标的抗肿瘤及其他疾病如炎症及自身免疫性疾病的预防和治疗提供了特异性抗体药物。

轻链		重链	
突变位点	亲和力变化	突变位点	亲和力变化
13A	1	50A	不结合
26G(C1)	0.5	50R	不结合
26N(C2)	1	51A	>10
26K(C3)	0.3	52A	不结合
G28P	>100	52D	>10
29E	>100	53A	5
32I	1	54A	>10
32V	2	54S	0.5
33Y	2	55A	>100
51G	1	56A	1
55P	2	57A	不结合
88Q	2	57Y	不结合
88A	>10	58A	>10
88Y	5	59A	>10
88L	5	59N	>10
88G	3	60A	5
88N	>10	66H	1
89S (A1)	0.5	99A	>10
89A(A2)	0.25	99S	>10
89L	5	100A	5
90A	>10	101A	4
91A	>10	102A	不结合
92A	2	103A	不结合
92S	4	104A	3
92P	1	105A	>10
93A	>10	106A	>10
94A	>10	107G	1.5