

[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 200610144981.2

[51] Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008年7月16日

[11] 公开号 CN 101220096A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/577 (2006.01)

[22] 申请日 2003.12.30

[21] 申请号 200610144981.2

分案原申请号 200310122187.4

[71] 申请人 龚小迪

地址 300270 天津市大港区胜利街前光里 46
栋 1 单元 301 号

[72] 发明人 龚疆红 李卓娅

[74] 专利代理机构 天津三元专利商标代理有限责任公司

代理人 胡婉明

权利要求书 2 页 说明书 28 页 附图 6 页

[54] 发明名称

人源抗破伤风毒素单克隆抗体的制备和应用

[57] 摘要

本发明提供一种人源抗破伤风毒素单克隆抗体，其为人源抗体，包括抗体可变区，该抗体包括或不包括抗体的恒定区，该抗体具有中和破伤风毒素的能力，抗体可变区的基因和蛋白质序列如序列表 1 所示；其具有不会诱发明显的过敏反应，有较高的效价且长效，产品无动物病毒污染，可以无限量地生产；本发明还提供了其生物功能、测定方法、生产制造方法及其应用。

1、一种人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B，其特征在于，其为人源抗体，包括抗体可变区，该抗体包括或不包括抗体的恒定区，该抗体具有中和破伤风毒素的能力，编码该抗体可变区的序列如序列表 1 的氨基酸序列 2 和 4 所示。

2、编码权利要求 1 所述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B 的可变区的氨基酸序列的核酸序列，其特征在于，该核酸序列如序列表 1 中的序列 6 和 8 所示。

3、根据权利要求 1 所述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B，其特征在于，抗体可变区的氨基酸序列包括所述序列或该序列的同系物或修饰物；其同系物为该抗体可变区的氨基酸序列其同系性达到所述氨基酸序列的 80%或以上，其所改变的产物仍旧保留中和破伤风毒素的能力。

4、根据权利要求 3 所述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B，其特征在于，所述同系物和修饰物还包括对该抗体蛋白质翻录合成后的修饰，使表达的抗体蛋白具有中和破伤风毒素的能力，修饰以达到增强治疗或预防效应、提高在体外的稳定性或对体内蛋白酶的抵御能力。

5、根据权利要求 1 所述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B，其特征在于对所述的氨基酸序列进行改变、缺失或添加一个或几个氨基酸，而仍保留其中和破伤风毒素的能力。

6、根据权利要求 1 所述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B，其特征在于，所述抗体的恒定区是人源免疫球蛋白重链或轻链的恒定区中的任何一种；该重链恒定区是人源 IgG、IgM、IgA、IgE 或 IgD 的恒定区，或包括有绞链区的重链恒定区或重链恒定区中的任何片段；所述轻链恒定区片段是人体免疫球蛋白轻链的 κ 或 λ 的恒定区。

7、一种如权利要求 1 所述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B 的制备方法，其特征在于，其包括利用基因重组技术的方法或化学合成的方法来制备和生产；其中，利用基因重组技术的方法来制备，包括：A、抗体基因的克隆与序列分析；B、抗体基因表达载体的构建；C、在一个合适的系统或宿主中，将抗体基因表达；D、大量培养和扩增抗体表达宿主；E、对表达的抗体分离纯化；F、对表达抗体的定性和定量分析。

8、根据权利要求6所述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体B的制备方法，其特征在于，所述抗体基因的表达载体是质粒载体或病毒载体、动物转基因的载体或者通用载体；所述抗体基因载体转入一个合适的系统或宿主中加以表达，其中合适的系统或宿主包括动物或植物的细胞，细胞株、细菌或酵母；该动物是转基因动物。

9、根据权利要求6所述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体B的制备方法，其特征在于，还包括检测抗体蛋白质或基因核酸的序列。

10、权利要求1所述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体B在制备预防破伤风细菌感染药品中的应用以及在制备破伤风细菌感染的诊断制剂中的应用。

人源抗破伤风毒素单克隆抗体的制备和应用

一、技术领域

本发明涉及一种人源的抗破伤风毒素单克隆抗体的制备和应用；是申请日为2003年12月30日，专利申请号为2003101221874的分案申请。

二、背景技术

俗称的破伤风是一种由破伤风杆菌感染所引起的常见而且死亡率很高的疾病。破伤风杆菌广泛地存在于土壤，灰尘，铁锈等处，很容易随着创伤，如一般性外伤，妇女生产婴儿时的创伤等等感染人体。当人被破伤风杆菌感染之后，在七天左右的潜伏期内，细菌在人体内大量繁殖并释放毒素。破伤风毒素通过破坏人体神经细胞而对人造成致命的伤害。死亡率高达90%以上。毒素一旦结合到神经细胞上，立即引发剧烈的神经症状，病人痛苦不堪，很快死去。当病人被确诊为感染破伤风杆菌后，由于此时体内已有大量细菌和毒素，使用抗菌素已来不及拯救病人生命，唯一有效的治疗方法是使用抗破伤风毒素的抗体。抗破伤风毒素的抗体通与毒素进行中和反应而使毒素失活，消除。虽然注射破伤风疫苗可以完全预防上述情况发生。但由于没有接种疫苗或免疫效应过期从而导致破伤风杆菌感染的情况依然非常普遍。

目前我国用于临床的抗破伤风毒素的抗体均为动物抗血清（主要为马的抗破伤风毒素抗血清）。动物的抗血清作为人体的异物抗原，经常会引起人体过敏反应。严重过敏者为患者总数的大约20%-30%。更为严重的是，越来越多的动物的病毒经过变异开始感染人类，象疯牛症那样的情况一旦发生在马身上，其后果不堪设想。因而这种产品亟待淘汰，而由人源的经过纯化的无病毒等杂质污染抗体来取代。利用基因重组技术制备人源的抗破伤风毒素单克隆抗体应是最理想的选择，因为这将从根本上克服市场现有抗血清的严重过敏反应的困扰以及可能的由病毒污染造成的危害。

利用传统的细胞融合技术制作人源抗体非常困难，因为常用的杂交瘤技术在人-人杂交瘤技术尚无重大突破。其原因一方面是因为找不到理想的作为融合用的人肿瘤细胞，现有的人-人杂交瘤也很不稳定，产生的抗体甚至不够做检测用。另一方面人的细胞内有很多被抑制的致病病毒，一旦被激活这些病毒可以重新活跃而复制，从而对抗体产品产生污染，使用很不安全。如果碰到很稀少的抗体，分离到这些抗体的浆细胞的机率就很小，因为能形成稳

定杂交瘤的只是占有生产抗体浆细胞的很少一部分，丢失很严重。这些因素适得能用杂交瘤技术找到抗体的细胞株很难实现。

另外一种制作抗体的方法是利用基因工程技术。基因工程抗体又称重组抗体，它是在充分认识抗体 IgG 基因结构与功能的基础上，应用 DNA 重组技术在基因水平上对抗体分子进行拼接组装成的抗体。基因工程抗体既保留了天然抗体的特异性和生物学活性，更可以通过工业化生产技术达到无限量纯化的产品，具有广泛的应用价值。

迄今世界上已成功构建多种基因工程抗体，包括几种基本类型，即人鼠嵌合抗体 (chimeric antibody，即将人 IgG 区与鼠的抗体可变区相连接，从而在同一抗体分子中含有不同种属来源的抗体片段)，改型抗体 (reshaping antibody) 亦称为人源化抗体 (humanized antibody，即为进一步减少融合抗体中鼠源抗体引起的免疫反应，将融合抗体中鼠源可变区结构进一步改造)；人源抗体 (human antibody，即人类自身产生的抗体) 等。其中人源抗体由于是 100% 来自人的基因，不含有任何外来基因，因而给人应用不会造成过敏反应，最适合于临床应用。

抗体可变区其中只有部分序列具有抗体可变区的抗原结合特征，而其中的大部分氨基酸序列不具有抗原结合特征。抗体可变区序列内分为骨架区 (framework region, FR) 和互补决定区 (complementary determining region, CDR, 轻链氨基酸序列第 24-34, 50-56, 89-97, 重链第 31-37, 50-65, 95-102)。其中只有 CDR 区与抗原结合。其余的为支架结构，该部分的氨基酸序列的改变仍可保留抗体与原有抗原的结合能力。根据这一原理人们构建人-鼠嵌合抗体或 CDR 移植抗体 (CDR-grafted Ab)。该技术就是将鼠源抗体的 CDR 序列部分移植并取代人源抗体相应的 CDR 序列，由此改造出的抗体尽管其氨基酸序列大量变更，但仍旧保留与原有抗原相互作用的功能。

利用基因工程技术生产人鼠融合抗体和人源化抗体 (humanized antibody) 的技术成熟，产品已市场化。迄今用于临床的多为鼠源性单克隆抗体，但其可能对人引起的超敏反应严重地限制了它在临床的应用。利用基因工程制备和生产完全的人源抗体 (亦即全部为人基因) 是世界上一项新兴技术和产业。技术的关键在于如何获得能表达抗体肽链的基因片段。目前获得能表达抗体肽链的基因片段使用的一种办法是从人体血液中将生产所需抗体的 B 淋巴细胞挑选出来，代表技术如抗体库法 (phage antibody library)。该法是将人的体细胞基因中的全部抗体基因克隆在噬菌体外壳蛋白基因的上游，使抗体蛋白片段与外壳蛋白的融合产物同时表达在噬菌体颗粒的表面。因而，

只需利用固定化的抗原，就可以从抗体库中筛选出表面带有特异抗体片段的呈示噬菌体克隆。但此法最大的缺点是其筛选的抗体对抗原的亲合力不高，直接应用的临床价值不大。这是因为从人的体细胞的抗体基因库选出的抗体都是初始的抗体，未曾经过与抗原接触而引发的基因突变，与抗原结合竞争等自然筛选淘汰过程。另一种获得人源抗体基因片段的方法是改造小鼠的基因，使其产生人源的抗体。还有人将人外周血白细胞与探针标记的抗原混合，从而将其中生产抗体的浆细胞挑选出来，再从中获得抗体基因。

抗体工程的最终目的是在一个合适的系统中，使外源基因高效表达。它包括外源基因的克隆，转录，转译，加工，及表达产物的分离纯化等过程。基因工程的表达系统可以分为原核和真核表达系统。完整抗体蛋白因是糖基化蛋白质，只能用真核表达系统进行表达。真核表达系统包括酵母，植物，昆虫和哺乳动物系统，其中哺乳动物系统表达系统最适合人源抗体的表达，因为该系统保证表达的蛋白质的糖基化与人的完全一致。这点对抗体的临床应用很重要，因为不正确糖基化的抗体缺乏一些应有的生物功能（如补体激活，体内半衰期），并可造成过敏反应。最近，一些新技术陆续出台，希望能通过酵母基因改造使其进行哺乳动物般糖基化。如果只表达抗体的可变区部分，还可用原核系统，比如细菌来表达。

利用哺乳动物系统表达可以在细胞水平进行，比如用人的骨髓瘤细胞，亦可通过转基因动物进行。后者将抗体基因转入动物的卵细胞，使克隆出的动物能够自动地表达克隆的抗体，并从奶或其它分泌物中大量地分泌出来。该法避免了大规模培养细胞的工业化投资，具有很大的经济前景。

近年来陆续已有几篇有关发明和制备人源抗破伤风毒素单克隆抗体的报道。但这些抗体有的虽能与破伤风毒素结合，但不能中和毒素的毒性；有的可以中和毒素的毒性，但效价不高。因而至今都没有真正具备商业开发价值的人源抗破伤风毒素单克隆抗体。能够找到并能进行大规模生产的高效中和破伤风毒素人源抗单克隆抗体仍是人们追求的方向。抗体中和毒素的效价越高，其临床应用的价值越大。只有高效并能中和毒素的抗体才具有市场开发的價值。抗体中和毒素的能力显然是由其化学结构决定的。遗憾的是至今人们都不清楚什么样的结构可赋予抗体高效价。因而寻找高效抗体依然是可遇而不可求的随机过程，其结果是不可预见的。

高效抗体的筛选有赖于能否获得大量有关的资源。目前报道过的所有筛

选抗破伤风毒素抗体的方法都只能获取生产抗体浆细胞的其中一部分，甚至一小部分，因而筛选出高效价抗体克隆的几率很小。必须找到更好的方法，以获得全部的生产抗体的浆细胞，从而提高筛选出高效价抗体克隆的几率。

三、发明内容

本发明的主要目的在于克服现有产品存在的上述缺点，而提供一种人源的抗破伤风毒素单克隆抗体的制备和应用，其基于目前我国所使用的用于临床的抗破伤风毒素的抗体均为动物抗血清（主要为马抗破伤风毒素抗血清），动物的抗血清作为人体的异物抗原，经常会引起人体过敏反应，更为严重的是，越来越多的动物的病毒经过变异开始感染人类，因而这种产品亟待淘汰，而由人源的经过纯化的无病毒等杂质污染抗体来取代。

本发明的目的是由以下技术方案实现的。

本发明人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B，其特征在于，其为人源抗体，包括抗体可变区，该抗体包括或不包括抗体的恒定区，该抗体具有中和破伤风毒素的能力，编码该抗体可变区的序列如序列表 1 的氨基酸序列 2 和 4 所示。

本发明编码权利要求 1 所述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B 的可变区的氨基酸序列的核酸序列，其特征在于，该核酸序列如序列表 1 中的序列 6 和 8 所示。

前述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B，其特征在于，抗体可变区的氨基酸序列包括所述序列或该序列的同系物或修饰物；其同系物为该抗体可变区的氨基酸序列其同系性达到所述氨基酸序列的 80%或以上，其所改变的产物仍旧保留中和破伤风毒素的能力。

前述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B，其特征在于，所述同系物和修饰物还包括对该抗体蛋白质翻录合成后的修饰，使表达的抗体蛋白具有中和破伤风毒素的能力，修饰以达到增强治疗或预防效应、提高在体外的稳定性或对体内蛋白酶的抵御能力。

前述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B，其特征在于对所述的氨基酸序列进行改变、缺失或添加一个或几个氨基酸，而仍保留其中和破伤风毒素的能力。

前述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B，其特征在于，所述抗体的恒定区是人源免疫球蛋白重链或轻链的恒定区中的任何一种；该重链恒定区是人源 IgG、IgM、IgA、IgE 或 IgD 的恒定区，或包括有绞链区的重链恒定区或重

链恒定区中的任何片段；所述轻链恒定区片段是人体免疫球蛋白轻链的 κ 或 λ 的恒定区。

本发明人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B 的制备方法，其特征在于，其包括利用基因重组技术的方法或化学合成的方法来制备和生产；其中，利用基因重组技术的方法来制备，包括：A、抗体基因的克隆与序列分析；B、抗体基因表达载体的构建；C、在一个合适的系统或宿主中，将抗体基因表达；D、大量培养和扩增抗体表达宿主；E、对表达的抗体分离纯化；F、对表达抗体的定性和定量分析。

前述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B 的制备方法，其特征在于，所述抗体基因的表达载体是质粒载体或病毒载体、动物转基因的载体或者通用载体；所述抗体基因载体转入一个合适的系统或宿主中加以表达，其中合适的系统或宿主包括动物或植物的细胞，细胞株、细菌或酵母；该动物是转基因动物。

前述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B 的制备方法，其特征在于，还包括检测抗体蛋白质或基因核酸的序列。

本发明人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B 在制备预防破伤风细菌感染药品中的应用以及在制备破伤风细菌感染的诊断制剂中的应用。

本发明的技术内容包括以下方面：

本发明人源抗破伤风毒素单克隆抗体，其特征在于，其为人源抗体，包括抗体可变区，该抗体包括或不包括抗体的恒定区，该抗体具有中和破伤风毒素的能力，抗体可变区的基因和蛋白质序列如序列表 1 所示。

前述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体，其特征在于，所述抗体可变区的基因和蛋白质序列包括序列表 1 所示的同系物或修饰物；同系物为抗体可变区的蛋白序列其同系性达到上述序列的 60%或以上、70%或以上、80%或以上；修饰物为对人源抗体氨基酸或它们的核酸序列通过取代、增加或截短进行改变的产物仍旧保留人源抗体表达抗体蛋白具有中和破伤风毒素的能力。

前述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体，其特征在于，所述同系物和修饰物还包括对抗体蛋白质翻录合成后的修饰，使表达的抗体蛋白仍具有中和破伤风毒素的能力，以达到增强治疗或预防效应、提高在体外的稳定性或对体内蛋白酶的抵御能力。

前述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体，其特征在于，所述抗体的恒定区

是人源免疫球蛋白重链或轻链的恒定区中的任何一种；该重链恒定区是人源IgG, IgM, IgA, IgE, IgD的恒定区，以及包括有绞链区（hinge region）的重链恒定区或重链恒定区中的任何片段；所述轻链恒定区片段是人体免疫球蛋白轻链的 κ 或 λ 的恒定区。

本发明人源抗破伤风毒素单克隆抗体的制备方法，其特征在于，其包括利用基因重组技术的方法和化学合成的方法来制备和生产；其中，利用基因重组技术的方法来制备，包括：A、抗体基因的克隆与序列分析；B、抗体基因表达载体的构建；C、在一个合适的系统或宿主中，将抗体基因表达；D、大量培养和扩增抗体表达宿主；E、对表达的抗体分离纯化；F、对表达抗体的定性和定量分析。

前述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体的制备方法，其特征在于，所述抗体基因的表达载体是质粒载体、病毒载体、动物转基因的载体或者通用载体。

前述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体的制备方法，其特征在于，所述抗体基因载体可转入一个合适的系统或宿主中加以表达，适合的表达体系包括动物和植物的细胞，细胞株、细菌或酵母；该动物也可以是转基因动物。

前述的人源抗破伤风毒素单克隆抗体的方法，其特征在于，还包括：A、检测抗体蛋白质或基因核酸的序列；B、检测抗体在试验动物体内对注射的破伤风毒素具有抑制其毒性的功能。

本发明的人源抗破伤风毒素单克隆抗体在制备预防破伤风细菌感染药品中的应用。

本发明的人源抗破伤风毒素单克隆抗体在制备破伤风细菌感染的诊断制剂中的应用。

本发明的有益效果是：

本发明提供了几种新的利用基因重组技术制造出的人源抗破伤风毒素单克隆抗体，其基因和蛋白质序列与现有报道的不相同，该抗体的特点是具有很高的中和破伤风毒素的能力。通过小白鼠试验证明，上述抗体可保护动物抵御破伤风毒素的攻击。此外，抗体作为药物与国内现有的抗体比较，还具有以下优点：

1、不会诱发明显的过敏反应：目前国内使用的是马血清抗体，容易诱发严重过敏反应。而此抗体是利用基因重组技术制造的人源抗体（百分之百的人基因），因而从理论上讲不会诱发明显过敏反应。

2、有很高的效价：这些抗体具有远比过去报道高得多的中和毒素的能力。用小白鼠体内试验证明本发明的抗体可完全保护小鼠抵御致死剂量的破伤风毒素的攻击。

3、可以无限量地生产。

4、长效：确保体内维持有效的药物浓度。

5、可以做到产品无动物病毒污染：此抗体的生产过程可以采用世界上最先进的无血清细胞培养技术生产，其生产流程中可以采取不使用任何动物制剂，因而产品避免了动物或人的病毒的污染。震惊世界的疯牛病，SARS 等动物传染性疾疾病肆虐欧洲及世界各地的事实，使人们清醒地看到，使用动物血清的生物制剂存在着巨大的污染隐患，甚至严重威胁人类的健康，而本产品在此方面具有优势。

四、附图和附表说明

表 1 为本发明筛选分泌抗破伤风毒素抗体的人源浆细胞的部分总结。

表 2 为本发明碘¹²⁵标记的抗破伤风毒素抗体和人源免疫球蛋白 IgG1 在兔子体内的半寿期。

表 3 为本发明基因重组抗破伤风毒素抗体对动物体内保护试验结果。

图 1 为本发明克隆若干人源抗破伤风毒素抗体可变区 cDNA 片段凝胶电泳图。

图 2 为本发明构建的人源抗破伤风毒素抗体轻链的表达载体示意图。

图 3 为本发明构建的人源抗破伤风毒素抗体重链的表达载体示意图。

图 4 为本发明基因重组人源抗破伤风毒素抗体重链和轻链 cDNA 片段凝胶电泳图。

图 5 为 CHO 细胞上清中所表达分泌的基因重组抗破伤风毒素抗体测定实验结果。

图 6 为本发明单一及混合抗体对动物的保护作用图。

五、具体实施方式

本发明涉及几种新的人源抗破伤风毒素单克隆抗体，包括由这些新抗体的基因和蛋白序列、生物功能、测定方法、生产制造这些抗体的方法，以及利用这些抗体制备治疗破伤风杆菌感染的药物和用于制备诊断破伤风细菌感染的制剂。

本发明中应用的一些用语的确切定义：

1、抗原：能引起动物体内产生特异免疫反应的物质。

2、人源抗体：人体合成出的抗体。人源抗体共分为 IgG, IgA, IgM, IgD, IgE 5 大类。其中 IgG 又分为 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 亚类，它们的重链被相应地命名为 IgG 1, IgG 2, IgG 3, IgG 4。轻链则有 κ 或 λ 两个型。各种不同类型的抗体的基因和蛋白质序列是不同的（详见下）。

3、抗体的基本结构：（一）四肽链结构：各类抗体的基本结构都是四条肽链的对称结构，包括二条相同的重链和二条相同的轻链。两条重链之间和两条轻链之间及重链和轻链间，分别借二硫键连接。抗体的重链由 400 多个氨基酸组成。根据重链抗原性的不同可将其分为 5 类，由它们组成的抗体分别称为 IgM, IgG, IgD, IgA, IgE。抗体的轻链各含有 200 多个氨基酸，轻链有 κ 或 λ 两个型。（二）恒定区和可变区：在抗体轻链和重链肽链的 N 端（含有大约 107-130 个氨基酸残基）为抗体的可变区，分别称为重链的可变区和轻链的可变区。这个区的氨基酸排列顺序随抗体特异性不同而有所变化，故称可变区（即 V 区）。在多肽的 C 端，这个区的氨基酸数量和排列顺序等都比较稳定，故称为恒定区（即 C 区）。所以，不同抗体的恒定区序列和结构彼此之间区别不大，但其可变区的序列和结构区别很大。抗体的可变区是决定抗体特异性的部位。（三）抗体的绞链区：抗体的重链的一个可转动的区域（即 hinge 区域）。

5、同源抗体：源于同一种属动物的抗体，比如应用于人的抗体如若是由其它人产生的抗体称为同源抗体。人对同源抗体不产生明显的免疫反应。如果用于人的抗体是由不同种属动物产生的则称为不同源或异源抗体。由于不同种属动物产生的抗体其抗原特征很不相同，因而人对异源抗体会产生明显的免疫反应。

6、抗体的特异性：一种抗原与其所诱发产生的抗体之间的关系犹如钥匙与锁的关系，是相互针对的，特异的。

7、抗体与抗原结合的亲和力：抗原与抗体抗原与抗体之间的亲合力是指特异抗体与其所针对的抗原结合的紧密程度，亲合力越大表示结合的越紧密。

8、抗体和破伤风毒素的中和反应：破伤风毒素的不同部位都可诱发产生抗体。只有那些针对毒素的特殊重要部位产生的抗体，才可以通过与该部位的结合而消除（亦即中和掉）毒素的功能。中和效价是指能中和固定量的毒素所需抗体的数量。所需的抗体量越少，该抗体中和效价越高。抗体中和毒

素的效价取决于抗体与毒素结合的紧密程度，是由抗体的化学结构决定的。

9、浆细胞：浆细胞是激活的 B 细胞，能生产分泌抗体。每个浆细胞只能生产针对一种抗原的抗体。

10、破伤风毒素：破伤风毒素是破伤风杆菌释放的毒素，是一种分子量为 150,000 Da 大小的蛋白质，其病理作用是破坏人体神经细胞而对人造成致命的伤害。

11、蛋白融合：将两个不同蛋白质的基因片断相连接，其表达产物是一条由两个不同蛋白质彼此之间以肽键相连接的单链蛋白质。

12、免疫排斥反应：动物对输入体内的其它不同种属动物的组织，器官或物质产生的免疫反应，甚至导致该组织器官或物质坏死。

本发明提供了几种新的人源抗破伤风毒素单克隆抗体，其特征在于，这些抗体是 100%的人源抗体，它们的可变区的基因和蛋白质序列是新的，其结构包括抗体的可变区，（包括或不包括恒定区），该抗体具有中和破伤风毒素的能力，其中，可变区的基因和蛋白质序列如序列表 1 以及序列表 1 的同系物和修饰物组成，其中恒定区是人源免疫球蛋白重链或轻链的恒定区中任何一种。

本发明还提供了获取绝大部分生产抗体的浆细胞资源的方法，从而提高筛选出高效价抗体克隆的几率，该方法的特征是利用浆细胞表面受体进行分离获取。

本发明还提供了制备和生产这几种人源抗破伤风毒素单克隆抗体的方法，其中包括利用基因重组技术生产制造的方法。利用基因重组技术生产制造的方法主要技术包括（1）抗体基因的克隆与序列分析；（2）抗体基因表达载体的构建。（3）在一个合适的系统或宿主中，将抗体基因表达；（4）大量扩增表达抗体的宿主系统；（5）对表达的抗体分离纯化；（6）对表达抗体的定性和定量分析。

上述利用基因重组技术的方法来制备和生产人源抗破伤风毒素单克隆抗体的方法，其中抗体基因的表达载体可利用质粒载体、病毒载体或其它通用的载体，也可是动物转基因的载体。

上述利用基因重组技术的方法来制备和生产人源抗破伤风毒素单克隆抗体的方法，其中抗体基因载体可转入一个合适的系统中加以表达，其中适合的表达体系包括动物和植物的细胞、细胞株或酵母、细菌，表达体系也可以

是转基因动物。

本发明提供了对上述人源抗破伤风毒素单克隆抗体的测试方法为，1、检测抗体蛋白质或基因核酸的序列；2、同时检测抗体在动物体内对破伤风毒素具有保护作用。

本发明提供了上述这些人源抗破伤风毒素单克隆抗体在制备用于治疗破伤风细菌感染的药物的应用，该抗体可用于制备预防破伤风细菌感染药物，上述抗体可被单独或与其它成分一起制备各种剂型药物，或其它药物一起制备成混合药物或混合治疗制剂。

本发明提供了上述这些人源抗破伤风毒素单克隆抗体在制备诊断破伤风细菌感染的制剂的应用。

本发明技术方案的简述：本发明是由下述主要技术步骤实现的：（1）筛选出人的能生产分泌效价很高的抗破伤风毒素抗体的浆细胞；（2）从这些细胞完整调出该抗体的可变区序列；（3）构建抗体基因适当的表达载体；（4）将抗体基因载体放到适当的系统或宿主内表达出来，并选出稳定表达抗体的克隆；（5）收集并纯化抗体；（6）通过体外和体内实验进一步筛选出那些能高效中和破伤风毒素的抗体克隆；（7）大量扩增表达抗体的宿主；（8）纯化制备抗体；（9）利用生产出的抗体制备用于治疗破伤风杆菌感染的药物和制剂；（10）抗体用于体内证明其对动物对于破伤风毒素的保护作用。

有关本发明的详细说明：

本发明提供了几种人源抗破伤风毒素单克隆抗体，其特征在于这些抗体是人源抗体，其结构包括抗体的可变区和恒定区，其可变区的基因和蛋白质序列与现有报道的不相同，该抗体具有中和破伤风毒素的能力。

上述的几种新的人源抗破伤风毒素单克隆抗体，其抗体可变区的基因和蛋白质序列是由序列表 1 以及序列表 1 的同系物和修饰物组成；同系物指抗体可变区的蛋白序列，其同系性达到上述序列的 60%或以上、70%或以上、80%或以上；修饰物指这种修饰包括对序列表 1 的氨基酸或它们的核酸序列通过取代，增加或截短加以改变，但改变的产物仍旧保留该抗体的主要特征，即表达的抗体蛋白具有中和破伤风毒素的能力。此外，同系物和修饰物还指那些对抗体序列改变和修饰的目的是为了达到增强治疗或预防效应；或是为了提高产品在体外的稳定性或对体内蛋白酶的抵御能力；或对专利抗体蛋白质在翻录合成后所做的修饰，由这些变化衍生出的产物只要保留有本发明抗体

的主要特征，也即表达的抗体蛋白仍具有中和破伤风毒素的能力，应属本发明的范围。

上述的几种新的人源抗破伤风毒素单克隆抗体，其结构包括抗体的可变区或抗体的恒定区，这些抗体可变区的基因和蛋白质序列是由序列表 1 以及序列表 1 的同系物和修饰物组成，而这些抗体的恒定区可以是人源免疫球蛋白重链或轻链的恒定区中任何一种，即可变区片段可与不同的人体免疫球蛋白重链恒定区或轻链的恒定区融合。这里重链恒定区所指的是人源 IgG, IgM, IgA, IgE, IgD; 这其中的 IgG 包括 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4; 其中轻链的恒定区片段包括人体免疫球蛋白轻链的 κ 或 λ 的恒定区。这里重链恒定区所指的是包含有绞链区 (hinge region) 以及 CH1, CH2 和 CH3 区域或其中的任何片段。

对本发明人源抗破伤风毒素单克隆抗体的改变和修饰，如下的各种改变和修饰应当包括在本发明之内。

基本上说，如果对上述抗体的改变和修饰是为了达到增强治疗或预防效应；或是为了提高产品在体外的稳定性（对体内蛋白酶的抵御能力）；或对本发明人源抗破伤风毒素单克隆抗体的蛋白质在翻录合成后所做的修饰，如改变糖化或磷酸化成分，由这些变化衍生出的产物只要保留有本人源抗破伤风毒素单克隆抗体的主要特征，亦即表达的抗体蛋白具有中和破伤风毒素的能力，既应当包括在本发明之内。

这种修饰包括对本发明人源抗破伤风毒素单克隆抗体的氨基酸或它们的核酸序列通过取代，增加或截短来加以改变，但改变的产物仍旧保留本发明人源抗破伤风毒素单克隆抗体的主要特征，比如亮氨酸可被异亮氨酸或缬氨酸取代，酸性氨基酸之间（或碱性氨基酸之间，中性氨基酸之间，极性氨基酸之间或非极性氨基酸之间，芳香性氨基酸之间）等等可相互取代。一般认为，只要改变后的产物与本发明的各种抗体的序列，尤其是可变区序列有 80% 或以上相同，同时具有中和破伤风毒素的能力，就应属于本发明范围之内。

另外，本发明人源抗破伤风毒素单克隆抗体蛋白质或它们的核酸序列亦可在其侧链化学基团上加上其它化合物而保留本发明人源抗破伤风毒素单克隆抗体的主要特征，如盐基，从而增加其可溶性；或同位素，如钴 60，碘 125，硫 35 等等，或荧光物，或它们的核酸序列嵌合杂交，如毒素片段，以达到杀伤靶细胞的作用。这些都是普遍运用的保留本发明人源抗破伤风毒素单克隆

抗体主要特征的方法。

本发明的上述人源抗破伤风毒素抗体的另外特征是它们可以在体内中和破伤风毒素，这种中和破伤风毒素的能力远比过去报道的性能高得多，其可在体内和体外高效地中和破伤风毒素。本发明实施案例提供了有关的试验结果：用小白鼠试验证明，上述抗体可保护动物抵御破伤风毒素的攻击，具有很高的效价。如果将两种不同的抗体混合使用，其中中和破伤风毒素的剂量比单独使用一种抗体会进一步明显减少，治疗效果显著提高。

本发明的人源抗破伤风毒素抗体是通过下述几个主要技术步骤实现的：

(1) 筛选出人源生产分泌抗破伤风毒素抗体的浆细胞；(2) 从这些细胞完整调出该抗体的可变区序列；(3) 构建抗体基因适当的表达载体；(4) 将抗体基因载体放到适当的宿主内表达出来，并选出稳定表达抗体的克隆；(5) 通过体外和体内实验进一步筛选出那些能高效中和破伤风毒素的抗体克隆。(6) 测定这些抗体的核酸或蛋白序列。

首先，本发明筛选获得产生并分泌抗破伤风毒素的 B 淋巴浆细胞是通过下述独创方法而实现的：首先从一新近用破伤风疫苗免疫的健康捐血者获得外周血。经常规的方法分离出外周血中的主要 B-淋巴细胞组份，比如通过密度离心方法。分泌抗体的浆细胞由于表面带有某些特有的蛋白质，利用与这些蛋白特异结合的方法可将这些浆细胞分离出来。比如浆细胞表面带有趋化因子受体 CXCR3。利用与 CXCR3 特异结合的配体 IP-10 通过细胞诱导移动实验方法将浆细胞分离出。将浆细胞稀释并放到 96 孔板（平均每孔 1-2 个细胞）对每个细胞扩增培养。浆细胞培养过程需要加入一些特殊的生长因子，比如经同位素射线照射过的 EL-4-B5 细胞作为营养细胞，淋巴介素 IL-2 等。经过若干天的培养，收集细胞的上清液。通过检测（比方用酶联免疫方法检测）上清中是否有与破伤风毒素的特异结合的抗体，筛选出一些能分泌抗破伤风毒素抗体的浆细胞克隆。本发明使用的通过浆细胞表面受体获取产生抗体细胞的方法相比过去曾经报道过的所有方法具有明显的长处，因为，理论上本发明的方法可使我们获得几乎全部的生产抗体的浆细胞，从而使筛选出高效价抗体克隆的几率大大提高；而其他的方法，比如细胞融合法，都只能获取生产抗体的浆细胞的其中一部分，甚至一小部分，所以这些方法使筛选出高效价抗体克隆的几率明显减少。

将抗破伤风毒素抗体的基因从这些浆细胞克隆复制出来可以利用多种不

同的方法。比方本实施案例 1 中描述的方法，或其它灵敏的方法，将上述筛选出的浆细胞的信使 RNA 提取出来，经逆转录生化反应将全部信使 RNA 转变成 cDNA；利用设计的特殊引物（比如实施例 2 所述）将各个样本中抗体的重链或轻链的可变区经灵敏的 PCR 方法（比方雀巢式 PCR）分别克隆出来。当然，也可将整个抗体的轻链和重链，亦即包括可变区和恒定区的整个基因片段克隆出来，测定克隆的基因序列。

本发明提供了如何制备上述人源抗破伤风毒素抗体的办法，包括化学合成方法和基因重组方法。其中，化学合成方法可以是将抗体蛋白质先分作几个片段分别进行合成，然后，再按其序列前后将这些片段相互连接起来。其中蛋白质合成可以用固相或液相合成两种主要技术方法，这两种技术的具体方法与一般目前通用技术方法相同，在此不再描述。利用基因重组技术生产制造上述抗体的方法主要技术包括（1）抗体基因表达载体的构建；（2）在一个合适的系统或宿主中，将抗体基因表达；（3）对表达系统或宿主的大规模扩增；（4）对表达抗体的纯化分离；（5）对表达抗体的定性和定量分析。

本发明构建上述抗破伤风毒素抗体基因的表达载体具体是通过下述方法实现的：首先选择适合表达人源抗体的表达载体。由于抗体是糖基化蛋白质，真核细胞表达载体应是比较合适的，比如哺乳动物表达载体和酵母细胞表达载体都很合适。表达抗破伤风毒素抗体基因的载体可用质粒载体，如实施例 3 所示的抗体重链 hCg1 载体和抗体轻链 hCK 载体，它们都是哺乳动物细胞表达的质粒载体，分别表达人源抗体重链的和轻链的恒定区。也可是病毒载体，植物表达载体，酵母表达载体或其它通用的载体，或是转基因动物所用的载体。载体中可带有各种调控基因片段，比如启动子（如 CMV 启动子），和增强子（如 EU 增强子）等等。为了筛选方便，载体还可装进针对不同抗菌素的阻抗基因，如此抗 Neomycin 和抗 Puromycin 的基因。载体中还可加入其它的基因片段，只要这些基因所达到的目的是有关本发明人源抗破伤风毒素单克隆抗体的基因的表达，都应属于本发明的范畴。将克隆的抗体重链和轻链的可变区基因用特定的限制性内切酶切下，并将重链和轻链的可变区基因分别接到表达载体中，与抗体的恒定区片段连接。如果克隆的是整个抗体的基因片段（包括可变区和恒定区的整个基因片段），则将这整个基因片段克隆到一个适当的表达载体中。

本发明还提供了为表达上述抗破伤风毒素抗体基因所必需的系统或宿

主。上述构建好的表达载体通过电击法或其它方法被导入合适的宿主中进行表达。抗体是糖基化蛋白质，故最好采用真核表达系统进行表达。比如，哺乳动物表达系统就很适合人源抗体的表达，因为该系统保证表达的蛋白质的糖基化与人的完全一致。另外通过基因改造的酵母系统（该酵母系统进行哺乳动物般糖基化）也很合适进行表达。利用哺乳动物系统表达可以在细胞水平进行，比如常用的有 CHO 细胞，HEK293 细胞，COS 细胞，NS/O 或 HELA 细胞，还可是昆虫细胞，如 Rf9 细胞，或者是酵母细胞，尤其是经基因改造后能进行哺乳动物相同的糖基化的酵母等等。亦可通过转基因动物进行。后者将抗体基因专入动物的卵细胞，使克隆出的动物能够自动地表达克隆的抗体，并从奶或其它分泌物中大量地分泌出来。该法避免了大规模培养细胞的工业化投资，具有很大的经济前景。比方本发明实施例 4 中采用的 CHO 细胞作为表达上述抗破伤风毒素抗体基因所必需的宿主。它的长处是：利用 CHO 表达生产蛋白制剂是目前世界上最成熟和受欢迎的办法。大工业化生产工艺已成熟；CHO 细胞可在无血清培养液中生长传代。这使得整个生产过程无需使用任何动物制剂，从而避免了病毒污染；用 CHO 细胞生产蛋白质工艺已得到国际认可。若干种用此方法生产出的蛋白制剂已完全达到临床合格标准。选出能稳定表达分泌抗体，而且这些抗体能中和破伤风毒素的宿主细胞。经过初步筛选后，进一步可通过检测载体的抗菌素阻抗基因的表达，或检测分泌抗体的能力。具体方法见本文，举例如本发明实施案例 4。

本发明提供了如何将前述的抗破伤风毒素抗体基因以分泌蛋白形式生产表达的方法，比如在蛋白基因的氨基末端加上先导序列，使表达的产物分泌到培养细胞以外的上清液中。先导序列在蛋白质分泌过程中被截掉。序列表 1 给出了一些先导序列的例子。如果是利用转基因动物来表达，则载体构建可将抗体以分泌蛋白方式分泌到动物的排泄物，如乳汁中。

本发明进一步提供了如何生产上述人源抗破伤风毒素抗体的方法，包括了以基因重组，发酵技术为生产手段生产抗破伤风毒素单克隆抗体的方法。该方法是通过下述技术实现的：原则上，上述制备人源抗破伤风毒素抗体的方法，如利用哺乳动物细胞表达系统如 CHO 细胞，酵母宿主或表达系统，都可通过大规模来培养这些宿主达到批量生产抗体的目的。比方利用哺乳动物细胞来生产抗体，可以利用滚筒式培养瓶，或纤维管式培养瓶，或发酵罐式增加细胞培养规模。每项技术都有成熟工艺，也有成功产品为例，具体所用

的设备及发酵工艺如一般通用方法，在此不做进一步说明。具体方法举例如本发明实施案例 6。

本发明还提供了如何提高抗体产品产量的办法。目前有若干种不同的提高基因表达水平的方法。举例如下：如本发明实施例中使用的将 Dhfr (dihydrofolate reductase) 基因转入宿主细胞，利用提高 Dhfr 酶底物 MTX (methotrexate) 的办法筛选出高表达细胞株，以供生产使用。本发明列举的实施例显示生产分泌出的抗体产量可达 3 毫克/10⁹ 细胞每天分泌到 1 升培养上清。通过进一步的筛选还可使产量提高更多。

本发明的抗体基因还可通过转基因技术利用动物来表达生产。转基因动物可以达到很高的表达水平，生产成本低。

本发明进一步提供了如何将生产分泌的人源抗破伤风毒素单克隆抗体产物分离纯化的方法，具体是通过下述方法实现的：许多种方法都可将抗体产品分离纯化。比如实施例 7 所采用的亲和层析分离方法。亲和层析可利用各种不同的能与表达抗体特异结合的物质，比如实施例 7 中使用蛋白质 A，将其偶连到载体支撑物上。蛋白质 A 通过与抗体特异结合，达到理想的分离纯化结果。除了蛋白质 A 还有其它一些能与抗体特异结合的蛋白质或模拟化合物作亲和层析。除了亲和层析分离方法还有其它种方法可用来分离抗体产品，比如灌注层析技术等等，在此不加详述，具体方法可参考有关资料。

本发明还提供了分泌人源抗破伤风毒素单克隆抗体的鉴定和筛选方法，通过体外和体内实验进一步筛选出那些能中和破伤风毒素，并能在体内对破伤风毒素起保护作用的抗体及其表达宿主克隆。该项技术可通过下述方法实现：抗破伤风毒素抗体可根据其化学结构特征和生物功能特征来利用各种方法进行鉴定。比方用酶联反应 (ELISA) 方法和同位素标记抗体竞争实验方法 (RIA) 可以检测抗体本身的化学特征。利用与破伤风毒素的免疫中和反应 (抗原抗体中和反应) 实验，或对注射破伤风毒素的动物保护实验等等方法可以检定抗体的功能特征，以及中和毒素能力的大小。具体举例说，将转入抗体基因表达载体的细胞培养并收集培养上清液。通过上述方法中来分析鉴定转基因的细胞是否合成并分泌抗体。挑选出那些能够分泌抗体，而且该抗体可以中和破伤风毒素的细胞株。这些细胞株很可能发生具有医用价值。这些鉴定方法还可用来对生产的抗体质量和效价进行检定。上述许多方法，如 ELISA, RIA, 抗原抗体中和反应实验都是常规应用的实验方法，在此无须详述，具体操作

可参考如免疫学方法类书刊杂志或本发明的实施案例 4 和 9。破伤风毒素动物体内保护实验具体方法举例如本发明的实施例 9。

本发明的人源抗破伤风毒素抗体的应用：该人源抗破伤风毒素抗体由于能够高效中和破伤风毒素，可应用于制作治疗破伤风杆菌感染的各类药物和药物组合物，以及用于制备诊断破伤风杆菌感染的各种制剂或制剂组合物，具体见实施例 9 所述。其中用于制备治疗破伤风杆菌感染的各类药物和药物组合物：本发明的人源抗破伤风毒素抗体，由于能够高效地中和破伤风毒素，可用来制备药物和药物组合物来治疗破伤风杆菌感染所造成的致命伤害。具体举例见本发明的实施例 9。本发明包括上述人源抗破伤风毒素抗体可被制备成不同的药物剂型，单独或与其它成分一起。比如（但不限于）作为药品的剂型可以是注射药品，口服药品或局部用药（包括直肠给药，或喷雾给药的剂型如鼻部喷雾或口吸喷雾等）的各种剂型。比方实施案例 9 是作为溶液静脉给药的例子。本发明还包括上述的人源抗破伤风毒素抗体被制备成与其它药物或方法一起的联合治疗制剂或技术。比方（但不限于）本发明的抗体可与其它治疗感染药物一起使用，达到不仅抑制破伤风毒素，还杀死感染病源的效果。

本发明的人源抗破伤风毒素抗体作为药物有很多优势，其中包括：1、由于该抗体是人源抗体，不会引起明显的过敏反应；2、由于该抗体在体内的半寿期很长，能够很好地维持药品有效浓度；3、由于其具有很高的中和破伤风毒素的能力，因而用量少，治疗效果显著；4、可以通过采用无动物源污染的生产工艺，从而大大减低由病毒污染造成的危害。以上优点显然大大地提高了本发明的人源抗破伤风毒素抗体作为药物的临床应用价值。

本发明的人源抗破伤风毒素抗体可用于制备诊断破伤风杆菌感染的各种制剂或制剂组合物。比方（但不限于）将抗体同位素标记后用于破伤风杆菌感染的诊断。本发明还包括上述的人源抗破伤风毒素抗体被单独或成与其它药物，制剂或方法一起制备的联合诊断制剂或技术。

实施例 1： 获得和筛选产生分泌抗破伤风毒素抗体的人源浆细胞。

从一新近用破伤风疫苗免疫的 20 岁男性健康捐血者获得 100 毫升的外周血。该捐血者无任何慢性病史，捐血时无任何疾病症状，15 天之前接受破伤风疫苗免疫，除此而外在过去的一年中未注射任何其它疫苗。将该全血经 EDTA 处理，并通过 Ficoll 的密度梯度半小时离心，3000 转/分钟。将 Ficoll 中间

层吸出，从而获得血液白细胞。将白细胞悬浮液放到细胞培养瓶于 37 度保温 1 小时，以除去粘附在塑料表面的单核细胞。将抗 CD19 抗体偶联的磁珠 (Dynabeads) 与清洗过的未粘附的白细胞混合 (20 个磁珠/ 1×10^8 细胞/毫升) 并在 4°C 在旋转器中保温 30 分钟。利用磁场力将磁珠分离。将磁珠上的 B 淋巴细胞按照 Dynal 产品提供的方法分离下来。将所有的 B 细胞悬浮到 300 微升培养液里，加到 transwell 膜板 (Bacton & Dicson) 的上孔里。该孔膜的下面加上趋化因子, 比如 IP-10。经保温 3 小时收集由上孔移动到下孔的浆细胞。将收集到的浆细胞稀释并放到 96 孔板 (平均每孔 1-2 个细胞) 对每个细胞扩增培养。经过 10 天的培养, 收集细胞的上清液。通过酶联免疫方法检测上清中是否有分泌的抗破伤风毒素的抗体。酶联免疫反应法简述如下: 将破伤风毒素 (北京生物制品所) 过夜吸附到酶联反应板上。与含有牛乳蛋白的缓冲液保温以除去了非特异结合。之后, 将上述收集的细胞培养上清液加到酶联反应板上, 共同保温 2 小时。清洗后加酶标二抗 (鼠抗人 IgG 抗体) 并保温 2 小时。清洗除去未游离的二抗, 加入酶底物对结合的酶标二抗显色。酶标显色的结果表示上清标本中抗破伤风毒素抗体的含量。利用此法筛选出一些能分泌抗破伤风毒素抗体的浆细胞克隆总结如表 1。从 200 个克隆中共发现 23 个浆细胞分泌抗破伤风毒素抗体。其中两个克隆产生的抗体与毒素结合的效价特别高 (也即结合的浓度很低)。

实施例 2: 克隆人源抗破伤风毒素抗体可变区基因片段。

首先将实施例 1 筛选出的浆细胞克隆的细胞用含有 NP-40, RNA 酶抑制剂的溶解液在 4°C 溶解 10-30 分钟。将细胞溶解液与含有逆转录酶的缓冲液混合。通过逆转录生化反应将每个克隆的 mRNA 分别转变成 cDNA 库。具体如下: 逆转录反应的条件为 65°C 3 分钟, 缓慢降温至 22°C, 保温 3 分钟。加入新鲜的含有逆转录酶的缓冲液。38°C 保温 100 分钟。之后, 65°C 保温以使逆转录反应终止。

设计一组引物如下所示, 以克隆抗体的轻链和重链。VH 引物包括:

GGG AAT TCC CAT GGA CTG GAC CTG GA
GGG AAT TCA TGG ACA TAC TTT GTT CCA C
CCA AGC TTG CTC YTG GAG SAG GGY GCC AGG GGG AA

VK 恒定区引物包括:

TTA GGA TCC ATG GTG TTG CAG ACC CAG GTC
TCC AGC TTC ATC AGA TGG CGG GAA GAT

V 引物包括:

ATG GCC TGG GTC TCC TTC TAC CTA

ATG GCC TGG ATG ATG CTT CTC CTC

GAG TCA TTC TCG ACT GCT AGC CAC AGT ACG TAG GAC GGT SAS CTT GGT CC

利用上述引物和 dNTP 混合物将各样品中抗体的重链或轻链连带前导序列复制出来。5' -末端及 3' -末端分别接上限制性内切酶切点。PCR 条件如下：94 °C 1 分钟，50 °C 2 分钟，72 °C 2 分钟，共 5 个循环，之后 72 °C 4 分钟；接下来 94 °C 1 分钟，55 °C 1 分钟，72 °C 2 分钟，35 个循环，最后 72 °C 4 分钟。

利用设计的另一组引物可以把抗体轻链和重链的可变区克隆出来。图 1 显示的是克隆出的若干个人源抗破伤风毒素抗体可变区的 DNA 片段(PCR 产物)的凝胶电泳图。复制出的重链和轻链的可变区大小约为 440bp。复制出的抗体重链和轻链大小约为 1400bp。

将抗体的重链和轻链的基因分别接到 pCR2.1 质粒载体 (INVITROGEN) DNA 中。利用抗菌素 Ampicillin 筛选出克隆成功的菌株。制备该菌株的质粒载体。测定该质粒载体中克隆的基因序列。

序列表 1 显示的包括抗体 B 和抗体 D 重链可变区序列和轻链可变区序列。

实施例 3：构建人源抗破伤风毒素抗体的表达载体。

图 2 和图 3 为抗体重链载体 hCg1 和抗体轻链载体 hCK 示意图。在这两个载体中我们选择以 CMV 为启动子，以 EU 为增强子。载体的大小约为 7000bp。在这两个载体中，抗体 IgG 重链的恒定区 IgG_v1 和轻链的恒定区 k 的 cDNA 已分别接到载体 CMV 为启动子的下游。将上述实施例 1 所克隆出并接在 pCR2.1 质粒载体的抗体重链和轻链的可变区基因片段用特定的限制性内切酶切下，并分离纯化。将重链和轻链的可变区基因分别接到两个不同的表达载体中：轻链的可变区基因接到抗体轻链载体 hCK 中，与其带有的人源抗体轻链的 k 恒定区基因片段的 5' 末端相连；重链的可变区基因接到抗体重链载体 hCg1 中，与其带有的人源抗体重链的 IgG_v1 恒定区基因片段的 5' 端相连。不同的细胞克隆出的抗体被分别命名为 QA（即轻链 A）和 ZA（即重链 A）；QB 和 ZB；QD 和 ZD, 等等。图 4 显示的是基因重组的人源抗破伤风毒素抗体重链和轻链 cDNA 片段的凝胶电泳图。

实施例 4：人源抗破伤风毒素抗体基因在真核细胞 CHO 里的表达。

具体方法如下：将接好的人源抗破伤风毒素抗体重链基因载体和抗体轻链基因载体，比如载体 QD 和载体 ZD 的 cDNA 线性化后，用电击法转入 CHO 细

胞内。由于抗体重链载体 hCg1 带有抗 Gentamycin 的基因, 所以用 Gentamycin (G418) 来筛选抗体重链的表达; 由于抗体轻链载体 hCK 带有抗 Puromycin 的基因, 所以用 Puromycin 来筛选抗体轻链的表达; 经过用 G418(1 毫克/毫升), 和 Purimycin (2.5 微克/毫升) 3-4 周的筛选, 筛选出同时对 Puromycin 及 Gentamycin 都不敏感的细胞株, 冷冻收藏. 该细胞株为稳定表达细胞克隆。这些细胞克隆有可能生产完整的抗体。为确认这一点, 还需要作进一步检测, 如实施案例 5。

实施例 5: 鉴定基因重组并表达分泌的抗体是由重链和轻链组成的完整抗体。

将上述细胞株 B 和 D 培养两周后, 分别收集各自的细胞培养上清。通过 ELISA 方法鉴定转基因的细胞是否合成并分泌抗体。具体说来, 将收集的培养上清液与制备好的鼠抗人 IgG 1 抗体和鼠抗人 γ 1-重链抗体利用酶联反应作检测试验。图 5 显示克隆 D 和 B 的基因已被插入 CHO 细胞(仓鼠细胞)基因并成功表达, 合成的抗体蛋白已分泌到培养液中, 因而可以与抗人体 IgG 抗体呈剂量依赖的结合竞争。另外, 通过凝胶电泳和 SDS-page 试验证实, 分泌抗体的分子量在不还原的条件下为 75kDa, 在还原的条件下显示两条带, 其分子量分别为 50kDa 和 23kDa (结果为显示), 说明了分泌的抗体是具有轻链和重链的完整体。

实施例 6: 利用无血清培养液制备生产基因重组的人源抗破伤风毒素抗体。

为了获得高产细胞株, 我们将 Dhfr 基因转导到表达抗体的 CHO 细胞。利用提高培养液中 MTX 的办法筛选出高表达细胞株。将 CHO 细胞克隆 D 和 B 在含有 5%小牛血清的 RPMI1640 培养液中培养。每 3 天更换一次培养液。在此过程中逐渐将 RPMI1640 培养液用 INVITROGEN 的无血清培养液取代, 并将小牛血清的浓度减至 1-2%。此后将该 CHO 细胞克隆 D 和 B 在 2 升滚筒式培养瓶中用无血清培养液在 37°C 分别大量培养。其间不断部分更换培养液, 并将细胞浓度维持在大约 $0.5-1 \times 10^6$ /毫升。收集培养上清液, 将其作超滤浓缩, 然后 4°C 短期保存; 或将其冷冻干燥, 于 -20°C 长期保存。

实施例 7: 分离纯化表达生产的人源抗破伤风毒素抗体。

将实施例 6 中收集的 CHO B 和 CHO D 细胞培养上清液经超滤浓缩后(过滤分子大小为 10, 000 Da)。将该抗体浓缩液通过蛋白质 A 制备的亲和柱层吸方

法进行纯化。首先将 CL-4B-Protein A(Pharmacia)缓慢装进层析柱，并用 PH7.0 的磷酸 (Tris) 缓冲液平衡。将该抗体浓缩液缓慢加到层析柱里，室温下保温 10 分钟以使抗体与之结合。用 pH3.0 的 0.1M 甘氨酸 (Glycine) 缓冲液将抗体洗脱下来(洗脱速度 100-150 厘米/小时)。之后再用 pH2.0 的 0.1M Glycine 缓冲液将抗体进一步洗脱。通过抗人体 IgG 的 ELISA 方法测定，从 300 毫升上清中得到 100 毫克人源抗体。经分离纯化测定，CHO B 和 CHO D 细胞生产分泌抗体的产量为每 1×10^6 细胞每天分泌 20 微克。因为该克隆细胞对 Puromycin 和 Neomycin 都不敏感，说明表达的蛋白是由重链和轻链嵌合蛋白组成的完整抗体。

实施例 8：抗破伤风毒素抗体在动物体内的药代动力实验。

50 微克纯化并用碘 125 标记的抗破伤风毒素的抗体，或人源免疫球蛋白 IgG1 (Sigma) 由左耳静脉分别打入体重 2 公斤的兔子体内。每隔 1 小时从兔子的右耳静脉取 5 毫升血。从第二天开始，改为每隔 1-2 天抽从后者取一次样。通过测定同位素检测血液中人的免疫球蛋白重链的含量。如下面表 2 所示， 125 I 标记的抗破伤风毒素的抗体蛋白和人源的免疫球蛋白 IgG1 的半寿期相同，都大约为 110 小时。由于已知人源免疫球蛋白 IgG1 在人体内的半衰期为 21 天，因而本发明的抗破伤风毒素的抗体蛋白其体内半衰期应与人源免疫球蛋白 IgG1 相似，应是目前临床所用的马的抗血清的半衰期很多倍。

实施例 9：人源抗破伤风毒素抗体对动物的保护作用试验。

将蛋白质 A 亲和层析分离纯化的抗体 B 和 D 粗制备物对动物进行保护作用的试验，并与目前临床唯一使用的药品抗破伤风牛血清制剂的疗效进行比较。举例如下：将破伤风毒素标抗（目前临床使用的药品即抗破伤风毒素的马血清制剂）4.5IU/ml(由北京生物制品所检定)和破伤风毒素（武汉生物制品研究所）分别溶于硼砂缓冲液。取试验小白鼠若干，每组三只，共 5 组。将未经纯化的上述细胞 D 分泌的上清液冷冻干燥物溶于蒸馏水。以不同浓度（0.1 mg/kg-10 mg/kg，蛋白质/体重）的含有人源抗破伤风毒素抗体的细胞 B 和 D 分泌上清与固定量的破伤风毒素混合。作为对照，将 0.5IU/ml 的破伤风毒素标抗 D 与同样剂量的破伤风毒素混合。将各混合物在 37℃ 结合 1 小时之后，分别给小鼠肌肉注射（0.4ml/只）。每天上午，下午各观察一次，记录小鼠发病与死亡情况。结果（表 3）显示，目前临床使用的药品即抗破伤风毒素的马血清制剂（破伤风毒素标抗）治疗组在 69 小时之后动物全部死亡。而

以本发明的人源抗破伤风毒素抗体治疗的动物在治疗剂量为 0.4 mg/kg 体重或以上时全部正常，不发病。本发明的人源抗破伤风毒素抗体百分之百地保护动物防御致死量的破伤风毒素的攻击。重复试验得到相同的结果。初步实验还显示如果将抗体 B 和 D 混合注射，其中和同等量破伤风毒素所需剂量比单纯使用一种抗体所需剂量减少 3-10 倍，重复实验得到相同结果。

初步实验还显示，本发明的基因重组的人源抗破伤风毒素抗体的效价相当高，实验结果显示抗体粗制品的中和毒素的效价已相当于 31,000 IU/克蛋白质粗制备物。本试验使用的抗体是利用含有牛血清培养液生产的，并只经过蛋白质粗制备物中含有大量的非特意免疫球蛋白。所以本发明的人源抗破伤风毒素抗体真实的中和效价应是 31,000 IU/克的至少若干倍，效价相当高。

图表说明

表 1：筛选分泌抗破伤风毒素抗体的人源浆细胞的部分总结

克隆名称	与抗体重链反应结果	与破伤风毒素抗原反应结果	选做基因重组抗体的克隆
1A3	+	+	+
1C8	+	+	+
1H5	+	--	--
2B3	+	+	+
2D6	+	+	+
2E3	+	--	--
2G5	+	+	--

表 2：碘 ¹²⁵ 标记的抗破伤风毒素抗体和人源免疫球蛋白 IgG1 在兔子体内的半寿期

注射蛋白质名称	在兔血浆中的半寿期（小时）
人源抗破伤风毒素抗体	110
人源免疫球蛋白 IgG1	110
人源趋化因子蛋白质	0.25

表 3：基因重组抗破伤风毒素抗体对动物体内保护试验结果

破伤风标抗：4.5IU/毫升，北京生物制品检定所

破伤风毒素：2001 年 6 月，武汉生物制品研究所

试验动物：普通小鼠约 16 克/只

（试验一）发病与死亡情况-：正常

+++：发病程度由轻到重表示为 +， ++， +++， ++++；：死亡

*: 注射后的时间

抗体注射剂量	21 小时*	27 小时*	45 小时*	51 小时*	69 小时*	75 小时*
0.1mg/kg	---	---	ΦΦΦΦ			
1 mg/kg	---	---	---	---	---	---
5 mg/kg	---	---	---	---	---	---
10 mg/kg	---	---	---	---	---	---
标抗 0.5 mg/kg	---	---	---	---	++++ ++++ ΦΦ	ΦΦΦΦ

(试验二) 发病与死亡情况

- : 正常

++++: 发病程度由轻到重表示为 +, ++, +++, +++++

Φ: 死亡

*: 注射后的时间

抗体注射剂量	21 小时*	27 小时*	45 小时*	51 小时*	69 小时*	75 小时*
0.2 mg/kg	---	---	ΦΦΦΦ			
0.4 mg/kg	---	---	---	---	---	---
0.6 mg/kg	---	---	---	---	---	---
0.8 mg/kg	---	---	---	---	---	---
标抗 0.5 mg/kg	---	---	---	---	+++ +++ +++	ΦΦΦΦ ++++

图 1 为本发明克隆的若干人源抗破伤风毒素抗体可变区 cDNA 片段的凝胶电泳图。显示的是克隆出的若干个人源抗破伤风毒素抗体可变区的 DNA 片段 (PCR 产物) 的凝胶电泳图。复制出的重链和轻链的可变区大小约为 440bp。图中在箭头所指位置从左到右依此为轻链可变区 QA, QB, Qc, 重链可变区 ZB。

图 2 为本发明构建的人源抗破伤风毒素抗体轻链的表达载体示意图。图中 CMV 为启动子, EU 为增强子。载体的大小约为 7000bp. VK 为轻链的可变区, CK 为轻链的恒定区, Nhe I 和 xho I 所标之处为该限制性内切酶的切点, Ampicillin 和 Puromycin 为该抗菌素阻抗基因。

图 3 为本发明构建的人源抗破伤风毒素抗体重链的表达载体示意图。图中 CMV 为启动子, EU 为增强子。载体的大小约为 7000bp. VH 为重链的可变区, CH 为重链的恒定区, Nhe I 和 xho I 所标之处为该限制性内切酶的切点, Ampicillin 和 Neomycin 为该抗菌素阻抗基因。

图 4 为本发明基因重组的人源抗破伤风毒素抗体重链和轻链 cDNA 片段的凝胶电泳图。显示的是的两个人源抗破伤风毒素抗体轻链和轻链的 cDNA 片段 (PCR 产物) 的凝胶电泳图。复制出的重链和轻链大小分别为 1.4kb 和 0.7kb。图中所示从左到右依此为 (1) 100bp 分子标准物, (2) B 抗体重链 cDNA 片段, (3) D 抗体重链 cDNA 片段, (4) B 抗体轻链 cDNA 片段, (5) D 抗体轻链 cDNA 片段, (6) 质粒载体。

图 5 为本发明 CHOB 和 CHOD 细胞上清中所表达分泌的基因重组抗破伤风毒素抗体的测定实验结果。将收集的细胞 CHOB 和 CHOD 培养上清液加到酶联反应板上, 与制备好的鼠抗人 IgG 1 抗体作结合试验。酶标显色的结果表示上清标本中人源抗体的含量。显示的是克隆抗体 D (圆形) 和 B (三角形) 基因转导的 CHO 细胞 (仓鼠细胞) 所表达的人源抗体蛋白已分泌到培养液中, 因而可以与抗人体 IgG 抗体呈剂量依赖的结合竞争。

图 6 为比较单一抗体对动物的保护作用图。给每组小鼠 (每组 2 支) 肌肉注射同样致死剂量的破伤风毒素, 隔夜后分别给小鼠腹腔注射抗体 D (125ng/只) 或不同剂量的抗体 D 的混合物 (1: 1 重量比)。图中显示的是能够保护动物不致死所用的抗体剂量。

以上所述, 仅是本发明的较佳实施例而已, 并非对本发明作任何形式上的限制, 凡是依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与修饰, 均仍属于本发明技术方案的范围。

序列表 1: 本发明的人源抗破伤风毒素抗体重链和轻链可变区的核酸及氨基酸序列

- <110> 龚小迪
- <120> 人源抗破伤风毒素单克隆抗体
- <160> δ
- <210> 1
- <211> 143
- <212> PRT
- <213> 人 (human)

<220>

<221> V-region

<222>

<223>人源抗破伤风毒素单克隆抗体 D 的轻链可变区蛋白质的氨基酸序列 (PS. QD)

<400> 1

Met Asp Arg Gly A la Leu A la His Leu Leu Gly Leu Leu L eu L eu Trp

1 5 10 15

Leu Arg Gly A la Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

20 25 30

Leu Ser Ala Ser V al Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

35 40 45

Gln Ile I le Gly Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln lys Pro Gly Lys

50 55 60

A la Pro Lys Leu Leu I le His Thr Ala S er S er Leu Gln Ser Gly V al

65 70 75 80

Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr L eu T hr

85 90 95

Ile S er S er L eu Gln Arg Glu Asp I le Ala T hr Tyr Tyr Cys Gln Gln

100 105 110

Ser Tyr S er Gly L eu Arg Trp T hr Phe Gly Gln Gly Thr Lys L eu Glu

115 120 125

Ile Lys Arg T hr Val Ala Ala Pro Ser V al Phe I le Phe Pro Pro

130 135 140 143

<210> 1

<211> 142

<212> PRT

<213> 人 (human)

<220>

<221> V-region

<222>

<223>人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B 的轻链可变区蛋白质的氨基酸序列 (PS. QB)

<400> 2

Met Asp Met Glu Phe Leu Val Gln Leu Leu Phe Val Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Pro Asp Ile Thr Gly Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr

20 25 30

Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser

35 40 45

Gln Ser Ile Ser Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

50 55 60

Thr Pro Arg Leu Leu Ile Phe Gly Ala Ser Thr Arg Ala Asn Gly Ile

65 70 75 80

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr

85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

100 105 110

Tyr Asn Asn Gly Ser Gly Ala Phe Gly Gln Gly Thr Ser Trp Arg Ser

115 120 125

Asn Glu Leu Trp Leu His His Leu Ser Ser Ser Ser Arg His

130 135 140 142

<210> 3

<211> 147

<212> PRT

<213> 人 (human)

<220>

<221> V-region

<222>

<223>人源抗破伤风毒素单克隆抗体 D 的重链可变区蛋白质的氨基酸序列 (PS. **ZD**)**<400> 3**Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Arg Ala Ala Leu Leu Arg Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln

20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Gly Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

Ser Arg Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Gly Gly Asn Lys Tyr Tyr Ala

65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

85 90 95

Thr Leu Phe Val Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Met Val Arg Gly Asp Gly Arg Asp

115 120 125

Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

130 135 140

Lys Gly Pro

147

<210> 4

<211> 148

<212> PRT

<213> 人 (human)

<220>

<221> V-region

<222>

<223>人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B 的重链可变区蛋白质的氨基酸序列 (PS. ZB)

<400> 4

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Asn Leu Ser Gly Gly Thr Phe

35 40 45

Asn Ile Tyr Ala Ile Ser Asp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Met Gly Gly Val Ile Pro Ile His Gly Ala Val His Tyr Ala

65 70 75 80

Gln Lys Phe Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Met

100 105 110

Tyr Tyr Cys Gly Leu Leu Thr Thr Lys Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Thr

115 120 125

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

130 135 140

Thr Lys Gly Pro

148

<210> 5

<211> 430

<212> CDS

<213> 人 (human)

<220>

<221> V-region

<222>

<223> 人源抗破伤风毒素单克隆抗体 D 的轻链可变区核酸序列 (NS. QD)

<400> 5

```

Atggacaggg gggccctggc gcaccttctg ggtctcctgc tactctggct cggaggtgcc 60
agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca tctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagatc attggcagtt atttaaattg gtatcagcag 180
aaaccagga aagcccctaa gctcctgac cataccgcat ccagtttga aagtggggtc 240
ccaccaaggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctaccat cagcagtctg 300
caacgtgaag atattgcaac ttactactgt caacagagtt acagtggcct caggtggacg 360
ttcggccaag ggaccaagct ggagatcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac 420
ttcccgcacat ----- 430

```

<210> 3

<211> 426

<212> CDS

<213> 人 (human)

<220>

<221> V-region

<222>

<223> 人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B 的轻链可变区核酸序列 (NS. QB)

<400> 6

```

Atggacatgg agttcctggg gcagcttctc ttctcctgc tactctggct cccagatata 60
actggagaga tagtgaatgac gcagtctcca gccaccctgt ctgtgtctcc aggggaaaga 120
gccaccctct cctgcagggc cagtcagagt attagcagca acttagcctg gtatcagcag 180
aagcctggcc agactcccag gctcctcacc tttgggtgcat ccaccagggc caatggcacc 240
ccagccaggt tcagtggcag tgggtatggg acagagtcca cgctcaccat tagcagcctg 300
cagtctgaag attttgcagt ttattactgt cagcaatata ataatgggtc cggggcgctc 360
ggccaaggga ccagctggag atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc ttcactctcc 420
cgccat 426

```

<210> 7

<211> 442

<212> CDS

<213> 人 (human)

<220>

<221> V-region

<222>

<223>人源抗破伤风毒素单克隆抗体 D 的重链可变区核酸序列 (NS. ZD)

<400>7

```

Atggagcttg ggctgagctg ggtttttcgc gctgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag      60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggtgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc      120
tgtgttggct ctggattcac cttcagtcgt tatgetatgc attgggtccg ccaggctccg      180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcatcaaca tcataigatg gaggcaataa atactacgca      240
gactccgtga agggccgatt caccatttcc agagacaatt ccaagaacac cttatttgtg      300
caaatgagca gcctgagagc agaggacacg gctgtttatt actgtgcgag agatgggagt      360
atggttcgcg gagacggaag ggatgacttc tggggccagg gaaccatggt caccgtctcc      420
tcagctagca ccaagggccc a t                                             442

```

---cg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc gca agc ttt ata aag ggc gaa ttc

<210> 8

<211> 445

<212> CDS

<213> 人 (human)

<220>

<221> V-region

<222>

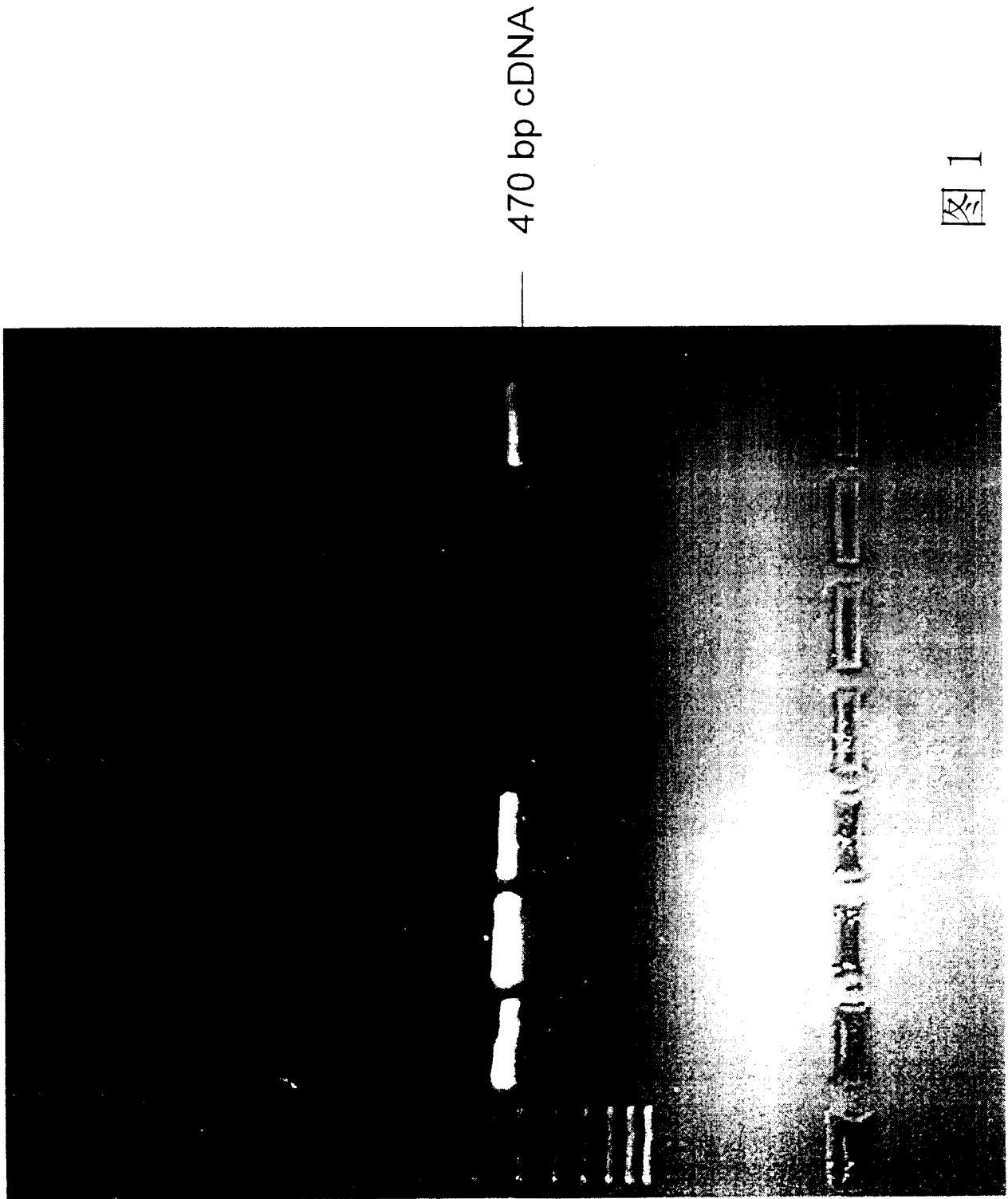
<223>人源抗破伤风毒素单克隆抗体 B 的重链可变区核酸序列 (NS. ZB)

<400> 8

```

Atggactgga cctggagggt cttcttcgtg gtggcagcgg ctacaggtgt ccagtcccag      60
gtacagctgg tgcagtcagg ggccgaggtg aagaagcctg ggtcctcggg gaaggtctcc      120
tgcaaccttt ctggaggcac cttcaacatc tatgetatca gctgggtgcg acaggccct      180
ggacaagggc ttgagtggat gggaggggtc atcccgatec atggtgcagt gcactacgcc      240
cagaagtcc aggatagagt caccattacc gcggacgagt ccacgagcac agcctacatg      300
gagctgagca gcctgagate tgacgacacg gccatgtatt attgtggcct tctgactacg      360
aagaattact actactacta cccatggac gtctggggcc aaggaccat ggtcaccgtc      420
tcctcageta gcaccaaggg cccat                                             445

```



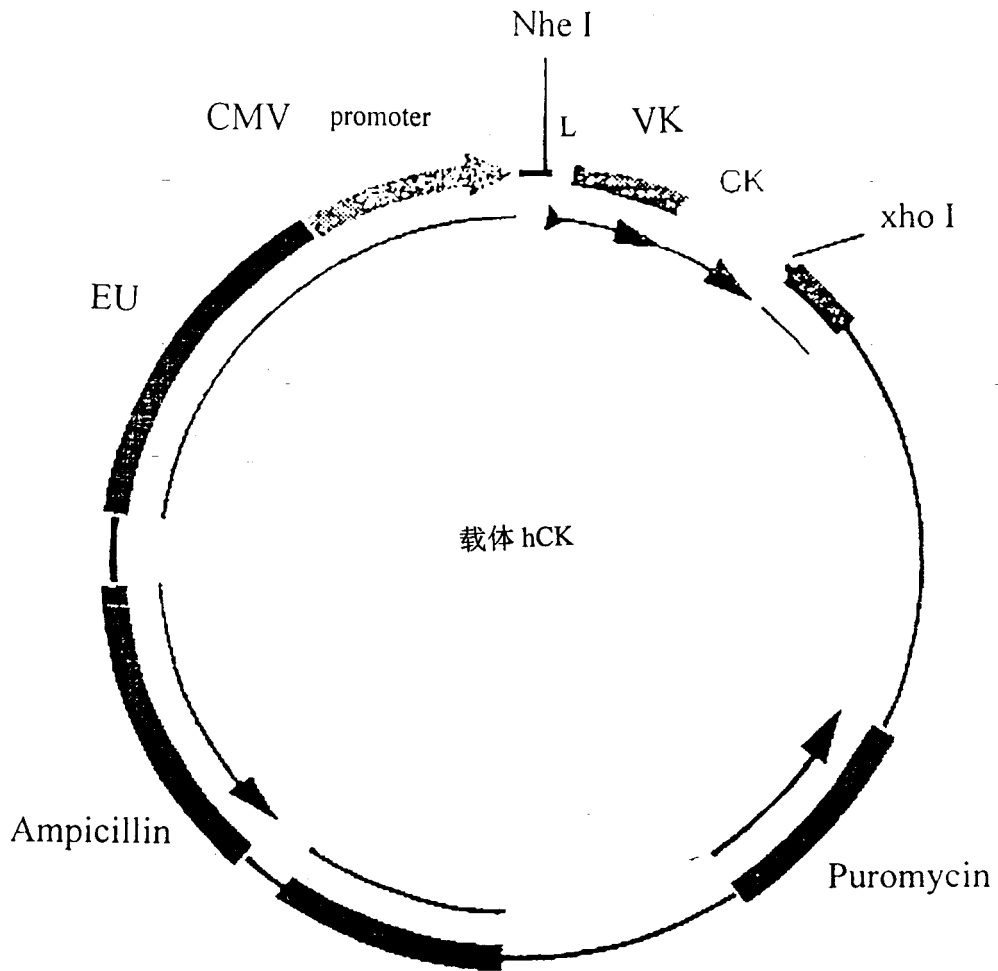


图 2

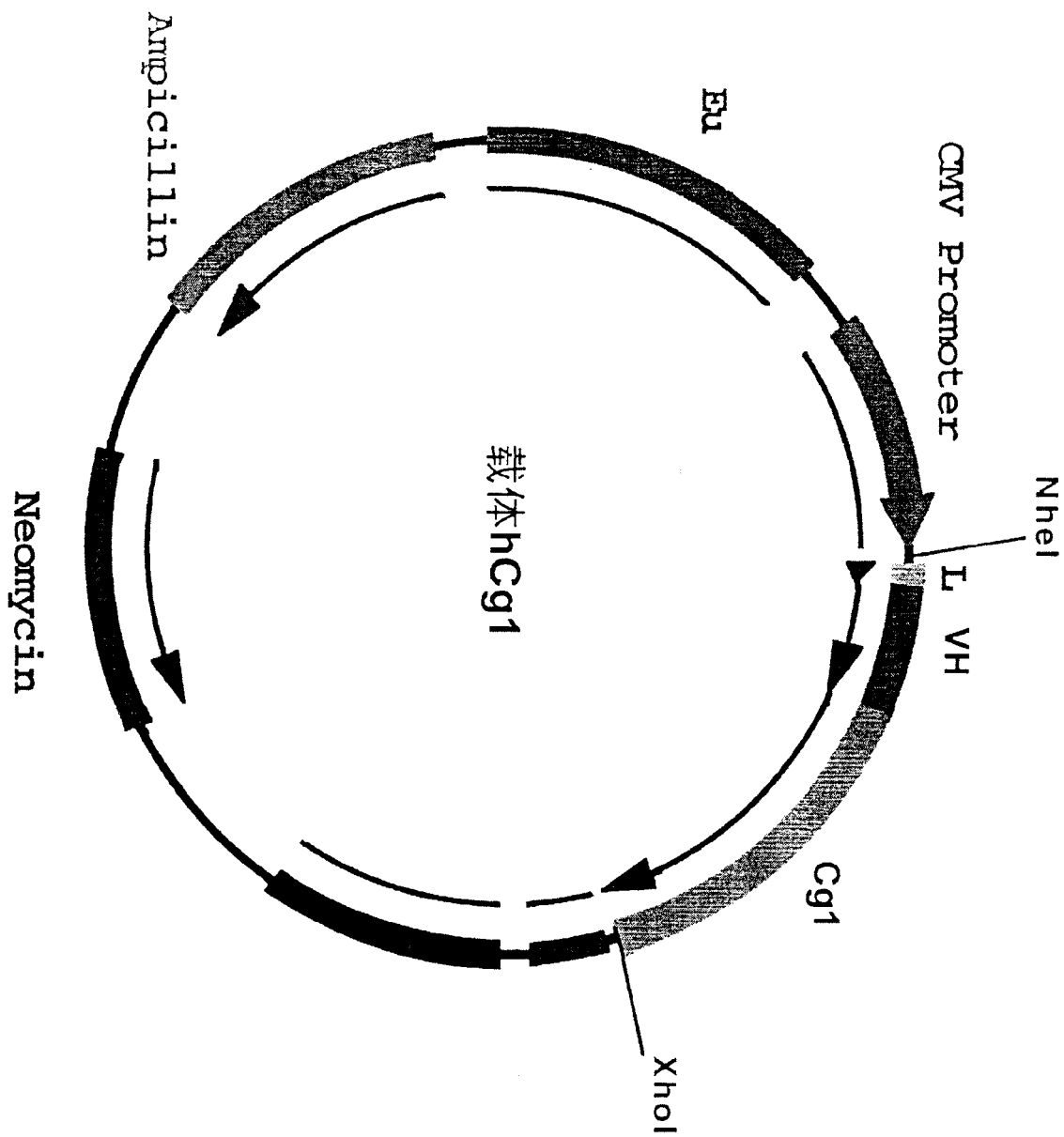


图 3

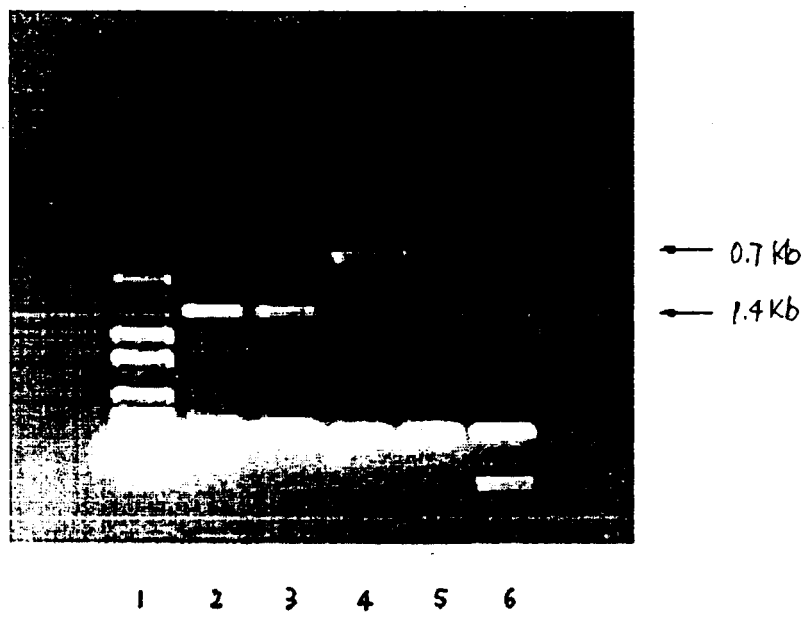


图 4

与抗人源IgG1抗体结合滴定曲线

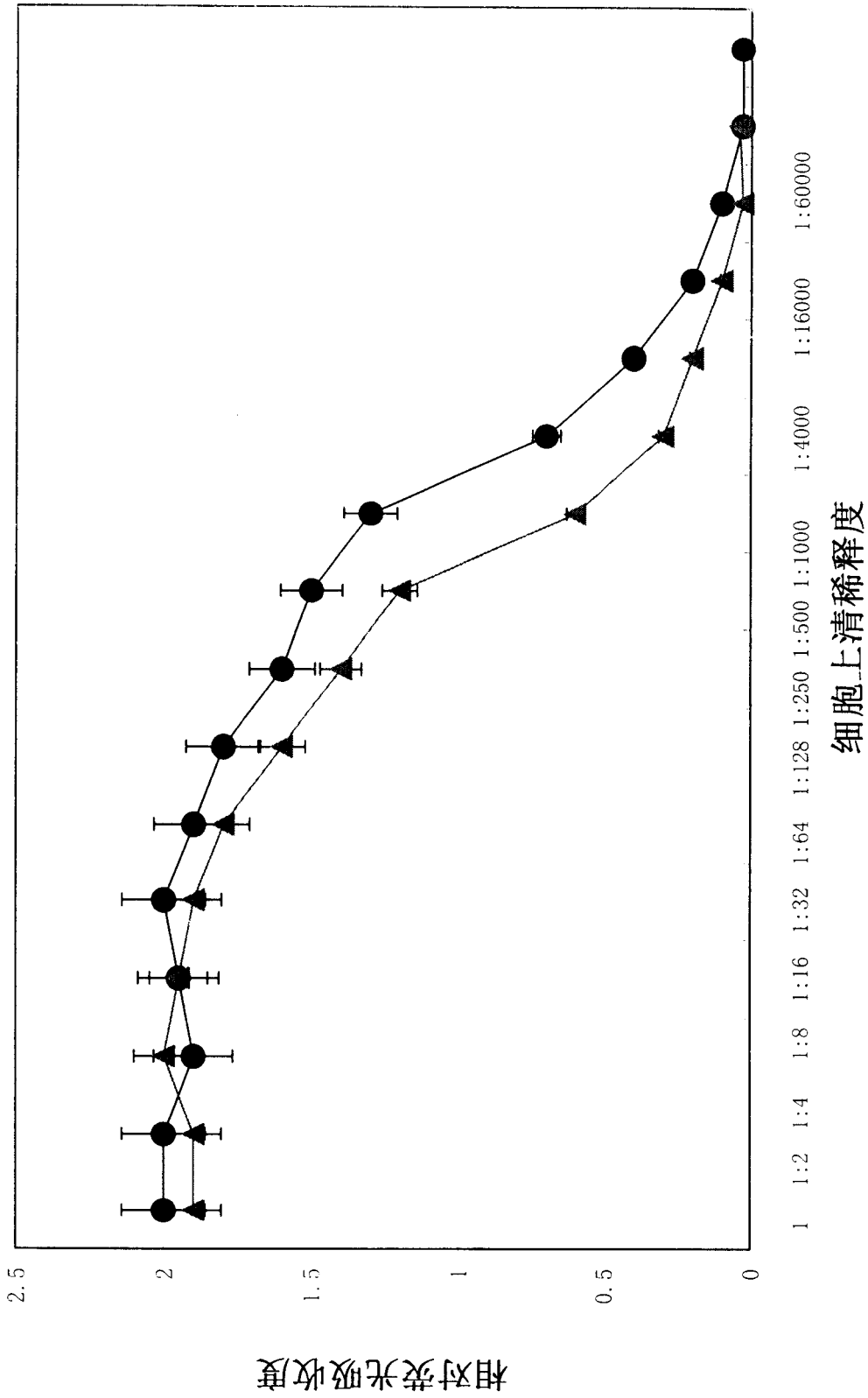


图 5

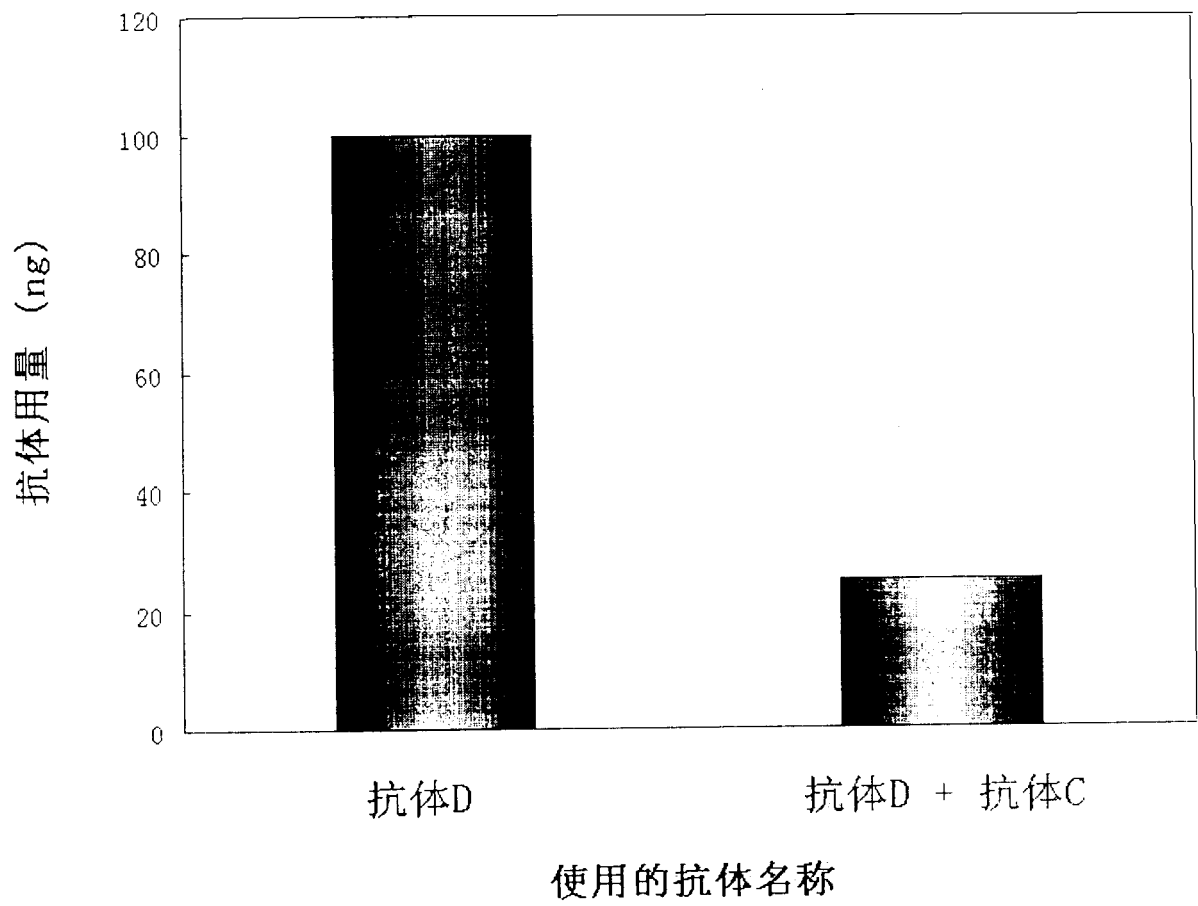


图 6

专利名称(译)	人源抗破伤风毒素单克隆抗体的制备和应用		
公开(公告)号	CN101220096A	公开(公告)日	2008-07-16
申请号	CN200610144981.2	申请日	2003-12-30
[标]发明人	龚疆红 李卓娅		
发明人	龚疆红 李卓娅		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/13 C12P21/08 A61K39/395 A61P31/00 G01N33/53 G01N33/577		
代理人(译)	胡婉明		
其他公开文献	CN101220096B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种人源抗破伤风毒素单克隆抗体，其为人源抗体，包括抗体可变区，该抗体包括或不包括抗体的恒定区，该抗体具有中和破伤风毒素的能力，抗体可变区的基因和蛋白质序列如序列表1所示；其具有不会诱发明显的过敏反应，有较高的效价且长效，产品无动物病毒污染，可以无限量地生产；本发明还提供了其生物功能、测定方法、生产制造方法及其应用。

