



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103288956 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 11

(21) 申请号 201310097070. 9

A61P 11/02 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 03. 25

A61P 19/08 (2006. 01)

A61P 1/00 (2006. 01)

(71) 申请人 中国人民解放军军事医学科学院卫
生学环境医学研究所

地址 300050 天津市和平区大理道一号

(72) 发明人 赵小玲 陈伟强 王俪蒙 王静
王尚 王涛 李佩尧

(74) 专利代理机构 天津市三利专利商标代理有
限公司 12107

代理人 李蕊

(51) Int. Cl.

C07K 16/24 (2006. 01)

C12N 15/13 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 19/02 (2006. 01)

A61P 29/00 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书9页

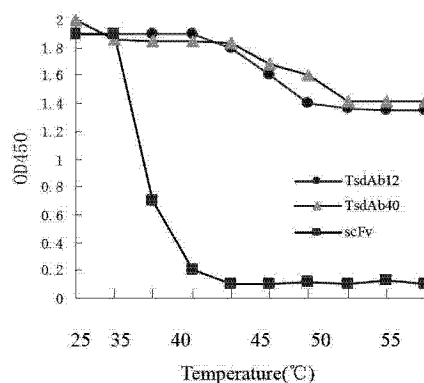
序列表3页 附图1页

(54) 发明名称

抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb40
及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明提供的抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb40 为序列表中 <400>2 所示的序列；是通过定点突变技术和核糖体展示技术筛选制备，对于因 TNF α 过度表达，由免疫介导的炎症性疾病 (IMID) 药物的应用具有极大的市场前景，其基因和其基因产物可用于制备诊断和治疗 TNF α 过度表达引起的疾病，如风湿性关节炎 (RA)、变应性鼻炎 (AR)、牛皮癣关节炎 (PsA)、强直性脊椎炎 (AS)、炎症性肠炎 (IBD)、幼年型慢性关节炎 (JCA) 等疾病的临床用药；所述抗体的制备方法易于规模化工业生产。



1. 抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb40, 其特征在于: 为序列表中 <400>2 所示的序列, 其重链的三个 CDR 区的氨基酸序列为: CDR1 为 S Y S M N, CDR2 为 A I S G S G G S T Y Y A D S V K G, CDR3 为 D R R W D A S H R T Y Y Y D S S G Y A R F D Y。

2. 根据权利要求 1 所述的抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb40, 其特征在于: 所述氨基酸序列的编码基因为序列表中 <400>1 所示的序列。

3. 权利要求 1 或 2 所述抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb40 的制备方法, 其特征在于: 该方法利用基因重组技术的方法来制备, 具体步骤包括:

- (1) 人源抗体的稳定性改构和筛选;
- (2) 抗体基因的克隆表达及特异抗体的鉴定;
- (3) 人源骆驼化基因工程抗体的特异性抗原结合活性检测;
- (4) 人源骆驼化基因工程抗体的稳定性检测;
- (5) 人源骆驼化基因工程抗体的亲和力检测;
- (6) 人源抗体的细胞毒性中和活性研究。

4. 根据权利要求 3 所述的抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb40 的制备方法, 其特征在于: 所述步骤(1)中人源抗体的稳定性改构和筛选的具体步骤包括:

- (1) 人源 VH 基因的骆驼化稳定性改构;
- (2) 用于核糖体展示的人源骆驼化 sdAbs 抗体基因库的构建;
- (3) 体外转录与翻译及核糖体复合物的亲和筛选。

5. 根据权利要求 4 所述的抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb40 的制备方法, 其特征在于: 所述人源 VH 基因的骆驼化稳定性改构在于突变位点是 VH 基因框架区 FR2 区 V37F, G44E, L45R 和 W47G。

6. 根据权利要求 3 所述的抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb40 的制备方法, 其特征在于: 具体步骤如下:

- (1) 人源 VH 基因的骆驼化稳定性改构:

以本研究室前期构建的人源 VH/K 基因为模板扩增 VH 基因。扩增人 VH 基因引物如下:

P1: 5' -ATG (C/G) AG GT (G/C) CA (G/C) CTC GAG (C/G) AG TCT GG

P2: 5' -CTT GGT GGA (G/A) GC TGA (G/A) GA GAC GGT GAC CAG-3'

以 VH 扩增产物 DNA 为模板进行分段定点突变, 制备 mut1 和 mut2 基因; 应用融合 PCR 法将 mut1 片段、mut2 片段融合, 构建人源骆驼化 sdAbs 抗体基因库。VH 基因突变引物如下:

P3: 5' -TGA GAC CCC CTC CCG CTC CTT CCC TGG AGC CTG GCGGAA CCA-3'

P4: 5' -GGG AAG GAG CGG GAG GGG GTC TCA-3';

- (2) 用于核糖体展示的人源骆驼化 sdAbs 抗体基因库的构建:

以纯化的 mutVH DNA 片段为模板, 加上原核核糖体结合位点 (SD 序列)、构建 T7 启动子、5' -茎环结构和 3' -茎环结构。所用引物序列如下:

RDVhhu: 5' -GA GAT ATA TCC ATG (C/G) AG GT (G/C) CA (G/C) CTCGAG (C/G) AG TCT GG-3'

RDVhhfor: 5' -CCG CAC ACC AGT AAG GTG TGC GGT CTT GGTGGA G(A)GC TGA G(A)GA GAC GGT GAC CAG-3'

Tb: 5' -AGA CCA CAA CGG TTT CCC TCT AGA AAT AAT TTT GTTTAA CTT TAA GAA GGA

GAT ATA TCC-3'

T7:5' -ATA CGA AAT TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CACAAC GG-3' ;

- (3) 体外转录与翻译及核糖体复合物的亲和筛选 ;
- (4) 抗体基因的克隆表达及特异抗体的鉴定 ;
- (5) 人源骆驼化基因工程抗体的特异性抗原结合活性检测 ;
- (6) 人源骆驼化基因工程抗体的稳定性检测 ;
- (7) 人源骆驼化基因工程抗体的亲和力检测 ;
- (8) 人源抗体的细胞毒性中和活性研究。

7. 权利要求 1 或 2 所述抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb40 在制备用于诊断和治疗 TNFa 过度表达引起的疾病的药物中的应用。

8. 根据权利要求 7 所述的抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb40 的应用,其特征 在于 :所述 TNFa 过度表达引起的疾病为风湿性关节炎(RA)、变应性鼻炎(AR),牛皮癣关节炎(PsA)、强直性脊椎炎(AS)、炎症性肠炎(IBM)或幼年型慢性关节炎(JCA)。

抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb40 及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其是抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb40 及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 由于抗体针对抗原具有高特异性和高亲和力的特性,使其在科学研究、疾病诊断和治疗中显示出无可比拟的优越性。抗体正越来越多的应用于科学研究,疾病预防、诊断和治疗等领域。基因工程抗体由于分子量小,易于构建和表达,是近年来抗体工程研究的热点之一,基因工程抗体已广泛应用于医疗和生物技术领域。但是,越来越多的应用显示,许多基因工程抗体的稳定性较差,在非极性液体、蛋白酶或高温环境中会发生降解和变性,从而不能发挥其应有的生物学作用,因此,在很大程度上限制了这些工程抗体的应用。目前,抗体稳定性工程已成为抗体工程研究中的一个特殊领域,探索有效的稳定性改构策略、构建经济、稳定的新型人源基因工程抗体,已经成为抗体工程研究中亟待解决的问题。

[0003] 1993 年,Hamers-Casterman 等报道,骆驼的功能性抗体都由重链组成,天然缺失轻链,称之为重链抗体 (heavy chain antibody, HcAb)。此 HcAb 仅由重链可变区 (Variable domain of heavy chain, VH)、一个铰链区 (hinge region) 和两个恒定区 (constant region of heavy chain, CH) CH2 和 CH3 组成。研究显示,这种结构简单的骆驼 HcAb 具有高度的构象稳定性,热稳定性好,在 37℃ 孵育 1 周后仍具有 80% 的结合活性;而且能耐高温,具有可逆的去折叠能力,将其长期放在高于 90℃ 的环境后仍能重新获得抗原结合能力,而 McAb 及其他的基因工程抗体片段常会在热变性后产生不可逆的聚合,丧失其部分或全部活性。骆驼 HcAb 抗体在蛋白酶、极度 pH 值等条件下显示出高度稳定性。抗体结构研究及基因序列分析结果表明,普通抗体的框架区 (framework, FR) FR2 中, V37、G44、L45 和 W47 这 4 个氨基酸残基参与与 VL 的相互作用,属于疏水性氨基酸,而在 HcAbs 中,这几个氨基酸残基发生了改变,突变为 F37、E44、R45 和 G47,由疏水性变为亲水性氨基酸,会使 HcAb 更易于溶解。利用这一特点,对人源抗体 VH 进行 HcAb 特征性改造,即将人 VH FR2 区 44、45 和 47 位点的疏水性氨基酸残基用 HcAb 中相对应亲水性氨基酸代替,研究表明,所得到的骆驼化单域 VH 抗体不仅保持原有抗体的特异性和亲和力,而且稳定性大大改进,并且具有很好的溶解性。对 scFv 等基因工程抗体的稳定性影响因素分析发现,以上疏水性氨基酸是导致抗体界面不稳定的主要原因,这些疏水性氨基酸使抗体粘性增加,从而导致抗体易于聚集而失去活性。而骆驼 HcAb 界面的疏水性氨基酸残基由特别的亲水性氨基酸代替,有效的阻止了抗体的聚集,稳定了其空间构象,使其具有良好的热稳定性,并且可以抵抗温度、pH 等变性因素的影响而正常发挥其有效的生物学作用。这为有效的抗体稳定性改构策略提供了新的思路,也为骆驼样人源基因工程抗体的研究奠定了理论依据。

[0004] 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 是一种具有多种生物学活性的细胞因子,对多种疾病的发生、发展及转归具有重要影响。TNF- α 主要由单核细胞

和巨噬细胞系产生,参与机体的免疫调节和细胞因子网络协调。正常情况下,TNF- α 对免疫防御和免疫监督起着重要作用,但在某些情况下却有不良作用。研究显示,TNF- α 过量表达可诱导促炎细胞因子如白介素 1 (interleukon-1, IL-1)、IL-6 等的表达、增加内皮细胞通透性、上调粘附分子表达、激活中性白细胞和嗜酸细胞,并且诱导骨滑膜细胞和软骨细胞分泌急性期物质和组织降解酶等促进炎症的发生。这些病理反应在许多免疫介导的炎症性疾病(Immune-mediated inflammatory diseases, IMID)的发生发展中起着非常重要的作用,如风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)、牛皮癣关节炎(psoriatic arthritis, PsA)、强直性脊椎炎(ankylosing spondylitis, AS)、炎症性肠炎(inflammatory bowel disease, IBD)、幼年型慢性关节炎(juvenile chronic arthritis, JCA)以及脉管炎(vasculitis)等。研究表明,TNF- α 是以上多种 IMID 的理想靶标,使用 TNF- α 拮抗药物(TNF- α inhibitors)来中和过量的 TNF- α ,是有效防治因 TNF- α 过度表达所致慢性炎症性疾病的理想途径。

[0005] TNF- α 在临床上的重要性日益突出。随着科学研究和生物技术的发展,以 TNF- α 作为靶标的特异性抗体的研究制备成为免疫学研究领域的热点之一。目前临床上应用的 TNF- α 抗体主要有三种,分别是鼠源性 TNF- α 抗体、人鼠嵌合型 TNF- α 抗体和人源性 TNF- α 抗体。前两种由于其免疫原性过高而存在较明显的副作用。美国 Abbott 公司应用噬菌体展示技术开发的一种人源性 TNF- α 抗体 Adalimumab,虽其临床效果已得到广泛认可,且毒副作用较少、免疫原性较低,但其昂贵的治疗费用给大多数患者带来了沉重的经济负担。目前对能应用于临床诊断和治疗且较为经济的 TNF- α 抗体的需求越来越迫切。

[0006] 随着经济发展和生物技术的进步,市场对抗体的需求飞速增长。抗体工程技术随着现代生物技术的发展而不断完善,已经成为生物技术产业化的主力军,而且抗体类药物已成为生物技术药物中最重要的大类之一。美国食品和药物管理局(FDA)已经批准了大约 20 种抗体治疗药物,同时,有超过上百种抗体治疗药物处于临床研究阶段,超过 500 种处于临床前研究阶段。目前,抗体制备研究正处于快速的发展阶段,市场对抗体的需求亦飞速增长。

[0007] 单克隆全分子抗体(monoclonal antibody, McAb)不仅具有天然抗体完整的分子结构,而且具有比多克隆抗血清更好的靶点特异性及均一性,因此一直以来被认为是理想的抗体模式。自 1975 年细胞杂交瘤技术问世以来,McAb 在科学研究,特别是多种疾病的预防、诊断和治疗中受到了广泛的关注。近年来,随着生物技术的不断发展,McAb 的研究得到了快速的发展,有些治疗性 McAb 已经获得 FDA 通过,更有多种 McAb 处于研发和临床实验阶段。目前,McAb 还存在巨大的发展空间,但其自身的某些缺点大大限制了他们在临床应用上的推广,如:(1)不稳定性。McAb 必须低温储存,否则会在数周内完全失去活性;在高温和强酸强碱的条件下会分解;在消化系统中会很快被降解,只有注射这一种给药方式。(2)异源性。McAb 多由鼠 B 细胞与鼠骨髓瘤细胞融合形成的杂交瘤细胞分泌,具有鼠源性,往往需要进行人源化。(3)价格昂贵。人源化 McAb 的制备工序复杂,费时费力;而且,McAb 结构复杂,主要由哺乳动物细胞培养生产,因此,McAb 制备成本高,不适合大规模工业化生产。(4)分子量大。全分子的 McAb 难以透过血脑屏障进入大脑或穿透毛细血管到达肿瘤实体,制约了其疗效的发挥,使许多疾病无法用 McAb 药物进行治疗。

[0008] 基因工程抗体的研制为解决这些问题提供了新的思路。与单克隆抗体相比,基因

工程抗体具有如下优点：(1) 分子量小，可以部分降低抗体的鼠源性，更具有良好的穿透能力，利于穿透血管壁，进入病灶的核心部位；(2) 结构简单，易于改构，可以根据治疗的需要，制备新型抗体；(3) 可以采用原核细胞、真核细胞和植物系统等多种表达方式，大量表达抗体分子，从而可大大降低生产成本。自从 1984 年第一个基因工程抗体人—鼠嵌合抗体诞生以来，新型基因工程抗体不断出现 [6]。但是，很多研究结果显示，工程抗体的稳定性较差。如，目前报道最多的单链抗体(single chain variable fragments, scFv)常常表现聚集倾向，在非极性液体、蛋白酶或高温等环境中会发生降解和变性，从而不能发挥其应有的生物学作用。我们在前期的研究中也发现，scFv 在血清和 PBS 中 37℃ 孵育 2h，就常常聚集而失去其全部或大部分的活性，而且其热稳定性和抵抗尿素化学变性的能力也较低。为了改进其稳定性，我们运用分子模型技术预测了两个突变位点，应用 PCR 定点突变的方法，在重链的第 44 位氨基酸和轻链的第 100 位氨基酸引入半胱氨酸，成功制备了二硫键稳定性 Fv 抗体(disulfide-stabilized Fv fragments, dsFv)。改构后的 dsFv 保存了其特异性抗原识别结合能力，而其在血清和 PBS 中的稳定性有明显的改进，其热稳定性和抵抗尿素化学变性的能力亦大大改进。然而，由于 dsFv 的重、轻链需先各自以包涵体表达，再在还原条件下复性形成链间二硫键，以改进其空间稳定性。由于复性条件的个性化，导致 dsFv 抗体产率较低，难以形成产业化生产。因此，在很大程度上限制了这些工程抗体的应用。

发明内容

[0009] 本发明所要解决的技术问题在于提供抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb40。

[0010] 本发明所要解决的另一技术问题在于提供所述抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb40 的制备方法。

[0011] 本发明所要解决的另一技术问题在于提供所述抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb40 的应用。

[0012] 为解决上述技术问题，本发明的技术方案是：

[0013] 抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb40 是利用分子生物学技术——定点突变技术和核糖体展示技术筛选到的针对 TNF α 的人源骆驼化抗体基因，是来源于对人源抗体重链骆驼化稳定性改构后的抗体库的富集筛选，是由存在于抗体重链可变区中的高变区 CDRs 特异性基因序列决定，具有很好的稳定性的特异性结合 TNF α 的高亲和力功能性中和抗体。

[0014] 抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb40，为序列表中 <400>2 所示的序列，其重链的三个 CDR 区的氨基酸序列为：CDR1 为 S Y S M N，CDR2 为 A I S G S G G S T Y Y A D S V K G，CDR3 为 D R R W D A S H R T Y Y Y D S S G Y A R F D Y。

[0015] 抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb12，为序列表中 <400>4 所示的序列，其重链的三个 CDR 区的氨基酸序列为：CDR1 为 S Y W M S，CDR2 为 Y I S S S G S T I Y Y A D S V K G，CDR3 为 D R N Y N W K G F D Y。

[0016] 优选的，上述抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb40，所述氨基酸序列的编码基因为序列表中 <400>1 所示的序列。

[0017] 优选的，上述抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb12，所述氨基酸序列的编

码基因为序列表中 <400>3 所示的序列。

[0018] 上述抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb12 和 TsdAb40 的制备方法,该方法利用基因重组技术的方法来制备,具体步骤包括:

[0019] (1) 人源抗体的稳定性改构和筛选;

[0020] (2) 抗体基因的克隆表达及特异抗体的鉴定;

[0021] (3) 人源骆驼化基因工程抗体的特异性抗原结合活性检测;

[0022] (4) 人源骆驼化基因工程抗体的稳定性检测;

[0023] (5) 人源骆驼化基因工程抗体的亲和力检测;

[0024] (6) 人源抗体的细胞毒性中和活性研究;

[0025] 优选的,上述抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb12 和 TsdAb40 的制备方法,所述步骤(1)中人源抗体的稳定性改构和筛选的具体步骤包括:

[0026] (1) 人源 VH 基因的骆驼化稳定性改构;

[0027] (2) 用于核糖体展示的人源骆驼化 sdAbs 抗体基因库的构建;

[0028] (3) 体外转录与翻译及核糖体复合物的亲和筛选。

[0029] 优选的,上述抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb12 和 TsdAb40 的制备方法,所述人源 VH 基因的骆驼化稳定性改构在于突变位点是 VH 基因框架区 FR2 区 V37F, G44E, L45R 和 W47G;所述抗体基因的框架区少数位点的突变。

[0030] 优选的,上述抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb12 和 TsdAb40 的制备方法,具体步骤如下:

[0031] (1) 人源 VH 基因的骆驼化稳定性改构:

[0032] 以本研究室前期构建的人源 VH/K 基因为模板扩增 VH 基因。扩增人 VH 基因引物如下:

[0033] P1:5' -ATG(C/G)AG GT(G/C)CA(G/C)CTC GAG(C/G)AG TCT GG

[0034] P2:5' -CTT GGT GGA(G/A)GC TGA(G/A)GA GAC GGT GAC CAG-3'

[0035] 以 VH 扩增产物 DNA 为模板进行分段定点突变,制备 mut1 和 mut2 基因;应用融合 PCR 法将 mut1 片段、mut2 片段融合,构建人源骆驼化 sdAbs 抗体基因库。VH 基因突变引物如下:

[0036] P3:5' -TGA GAC CCC CTC CCG CTC CTT CCC TGG AGC CTG GCGGAA CCA-3'

[0037] P4:5' -GGG AAG GAG CGG GAG GGG GTC TCA-3';

[0038] (2) 用于核糖体展示的人源骆驼化 sdAbs 抗体基因库的构建:

[0039] 以纯化的 mutVH DNA 片段为模板,加上原核核糖体结合位点(SD 序列)、构建 T7 启动子、5'-茎环结构和 3'-茎环结构。所用引物序列如下:

[0040] RDVhhu:5' -GA GAT ATA TCC ATG(C/G)AG GT(G/C)CA(G/C)CTCGAG(C/G)AG TCT GG-3'

[0041] RDVhhfor:5' -CCG CAC ACC AGT AAG GTG TGC GGT CTT GGTGGA G(A)GC TGA G(A)GA GAC GGT GAC CAG-3'

[0042] Tb:5' -AGA CCA CAA CGG TTT CCC TCT AGA AAT AAT TTT GTTTAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA TCC-3'

[0043] T7:5' -ATA CGA AAT TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CACAAC GG-3';

- [0044] (3) 体外转录与翻译及核糖体复合物的亲和筛选；
- [0045] (4) 抗体基因的克隆表达及特异抗体的鉴定；
- [0046] (5) 人源骆驼化基因工程抗体的特异性抗原结合活性检测；
- [0047] (6) 人源骆驼化基因工程抗体的稳定性检测；
- [0048] (7) 人源骆驼化基因工程抗体的亲和力检测；
- [0049] (8) 人源抗体的细胞毒性中和活性研究。
- [0050] 上述抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb12 和 TsdAb40 在制备用于诊断和治疗 TNFa 过度表达引起的疾病的药物中的应用。
- [0051] 优选的, 上述抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb12 和 TsdAb40 的应用, 所述 TNFa 过度表达引起的疾病为风湿性关节炎(RA)、变应性鼻炎(AR), 牛皮癣关节炎(PsA)、强直性脊柱炎(AS)、炎症性肠炎(IBM) 或幼年型慢性关节炎(JCA)。
- [0052] 本发明的有益效果是：
- [0053] 抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb12 和 TsdAb40 是利用分子生物学技术——定点突变技术和核糖体展示技术筛选到的针对 TNFa 的人源骆驼化抗体基因, 其生物学特性研究表明 TsdAb12 和 TsdAb40 是高亲和力, 稳定性较好, 结构简单, 易于构建可以特异中和 TNFa 的人源基因工程抗体；分子量小、易吸收, 可以快速的与 TNF- α 结合, 抑制其细胞毒作用；其基因和其基因产物可用于制备诊断和治疗 TNFa 过度表达引起的疾病, 如风湿性关节炎(RA)、变应性鼻炎(AR), 牛皮癣关节炎(PsA)、强直性脊柱炎(AS)、炎症性肠炎(IBM)、幼年型慢性关节炎(JCA) 等疾病的临床用药；所述抗体的制备方法易于规模化工业生产。

附图说明

- [0054] 图 1 为构建的用于核糖体展示的 sdAbs 基因库；
- [0055] 图 2 为人源骆驼化基因工程抗体的特异性抗原结合活性检测；
- [0056] 图 3 为人源骆驼化基因工程抗体的特异性抗原结合活性检测；
- [0057] 图 4 为人源骆驼化基因工程抗体的稳定性检测；
- [0058] 图 5 为人源骆驼化基因工程抗体的细胞中和活性检测。

具体实施方式

- [0059] 实施例 1
- [0060] 人源 VH 基因的骆驼化稳定性改构：
- [0061] 以人源 VH/K 基因库为模板(人源 VH/K 基因库的构建参见专利 ZL200910070978.4)扩增 VH 基因, 10mmol/L 上下游引物 P1、P2 各 2 μ l, 2.5mmol/L dNTP4 μ l, 10 $\times$ Taq buffer5 μ l, DNA Taq 酶 5U, 总体积 50 μ l。PCR 反应条件为：94 $^{\circ}$ C 变性 50s, 53 $^{\circ}$ C 复性 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60s, 经过 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 目的条带切胶回收纯化。扩增人 VH 基因引物如下：
- [0062] P1: 5' -ATG(C/G)AG GT(G/C)CA(G/C)CTC GAG(C/G)AG TCT GG
- [0063] P2: 5' -CTT GGT GGA(G/A)GC TGA(G/A)GA GAC GGT GAC CAG-3'
- [0064] 以 VH 扩增产物 DNA 为模板进行分段定点突变, 10mmol/L 上下游引物 P1、P3 及 P4、

P2 各 2 μ l, 2.5mmol / L dNTP4 μ l, 10 $\times$ Taq buffer5 μ l, DNA Taq 酶 5U, 总体积 50 μ l。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 50s, 53 $^{\circ}$ C 复性 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60s, 经过 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 扩增产物进行 1g / L 琼脂糖凝胶电泳, 以 DNA marker (DL2000) 为标准分子量确定产物 mut1 和 mut2 大小。人 VH 基因突变引物如下:

[0065] P3: 5' -TGA GAC CCC CTC CCG CTC CTT CCC TGG AGC CTG GCGGAA CCA-3'

[0066] P4: 5' -GGG AAG GAG CGG GAG GGG GTC TCA-3'

[0067] 将电泳后的 mut1 和 mut2 基因目的条带进行凝胶回收, 并进行融合 PCR。mutVH1 和 mutVH2 各 4 μ l, 2.5mmol / L dNTP4 μ l, 10 $\times$ Taq buffer5 μ l, DNA Taq 酶 5U, 总体积 50 μ l。94 $^{\circ}$ C 50s, 68 $^{\circ}$ C 100s, 7 经过 8 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。再以融合 PCR 产物 5 μ l 为模板, 10mmol/L 上下游引物 P1、P2 各 2 μ l, 2.5mmol / L dNTP4 μ l, 10 $\times$ Taq buffer5 μ l, DNA Taq 酶 5U, 总体积 50 μ l。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 50s, 53 $^{\circ}$ C 复性 40s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60s, 经过 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 扩增产物进行 1g / L 琼脂糖凝胶电泳, 以 DNA marker (DL2000) 为标准分子量确定产物 mutVH 大小。

[0068] 结果表明, 如图 1 所示, 以本研究室前期构建的人源 VH/K 基因库为模板扩增 VH 基因; 采用定点突变方法, 将 VH 基因 FR2 中的 V37, G44, L45 和 W47 突变, 由 HcAb 中相对应氨基酸: F37, E44, R45 和 G47 替代, 扩增制备突变片段 mut1 片段和 mut2 片段; 如图 3 所示, 应用融合 PCR 法将 mut1 片段、mut2 片段融合, 成功构建人源骆驼化 sdAbs 抗体基因库。

[0069] 实施例 2

[0070] 用于核糖体展示的人源骆驼化 sdAbs 抗体基因库的构建:

[0071] 以纯化的 mutVH DNA 片段为模板, 分别以 RDVhhu 和 RDVhhfor 为引物进行两步 PCR, 第 1 步在 N 端加上原核核糖体结合位点 (SD 序列)。第 2 步在基因两端分别构建 T7 启动子、5'-茎环结构和 3'-茎环结构。Taq DNA 多聚酶 5U, 总体积 50 μ l, 94 $^{\circ}$ C 60s, 50 $^{\circ}$ C 80s, 72 $^{\circ}$ C 120s, 扩增 30 循环后, 琼脂糖凝胶电泳检测构建效果。所用引物序列如下:

[0072] RDVhhu: 5' -GA GAT ATA TCC ATG(C/G)AG GT(G/C)CA(G/C)CTCGAG(C/G)AG TCT GG-3'

[0073] RDVhhfor: 5' -CCG CAC ACC AGT AAG GTG TGC GGT CTT GGTGGA G(A)GC TGA G(A)GA GAC GGT GAC CAG-3'

[0074] Tb: 5' -AGA CCA CAA CGG TTT CCC TCT AGA AAT AAT TTT GTTTAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA TCC-3'

[0075] T7: 5' -ATA CGA AAT TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CACAAC GG-3'

[0076] 结果表明, 如图 1 所示, 在 sdAbs (mutVH) 基因两端构建了 T7 启动子、核糖体结合位点、5' 端和 3' 端的茎环结构等用于核糖体展示的基本元件, 成功构建了用于核糖体展示的 sdAbs 基因库。

[0077] 实施例 3

[0078] 体外转录与翻译及核糖体复合物的亲和筛选

[0079] 外转录和翻译采用 expresswayTMPlus Expression System, 20 μ l 的 IVPS Plus E. coli Extract, 20 μ l 的 2.5 $\times$ IVPS Plus E. coli Reaction Buffer, 1 μ l 的 75mmol/L methionine, 1 μ l 的 200 μ mol/L Anti-ssrA oligonucleotide, 1 μ l 的 PCR product, 和 6 μ l 的 DNase-free water 加入在 2.0mL 的 EP 管中。反应溶液 37 $^{\circ}$ C 保温 30min, 用 4 倍体

积的冰预冷的 WBTH(50mmol/L Tris-acetate pH7.5, 150mmol/L NaCl, 50mmol/L magnesium acetate, 1g/L Tween-20, 2.5g/L heparin, Sigma) 终止反应后, 在上清液中加入预冷的 1/5 体积的含有 100g/L(w/v) BSA 的 WBT。反应混合物在 4℃, 1400g 离心 5min 后, 将上清液转移到一个新的冰预冷的 EP 管中。

[0080] 为筛选到针对 TNF- α 的特异 mutVH 抗体基因, 用重组 TNF- α 纯化蛋白包被 96 孔板, 40 μ g/孔, 4℃过夜。BSA-S cerevisiae RNA—PBS 封闭。洗板后将翻译混合物转至包被的孔中, 随筛选轮次的增加, 温度从 25℃到 50℃(5℃~10℃递增/轮), 微孔板在温箱中反应 30min, 倾掉翻译反应液, 微孔板用 WBT 洗 5 次。随后在孔中加入预冷的洗脱缓冲液, 冰上轻摇 5min 以洗脱 mRNA。洗脱下来的 mRNA 用 RNeasy kit 进行纯化。纯化后 mRNA 溶于 RNase-free 水中, 用 RNase-free DNase 进行处理, 去掉反应液中的 DNA 分子。以纯化的 mRNA 作为模板, 进行 RT-PCR, PCR 产物用作下一轮循环, 即: 转录-翻译-筛选。共进行 5 轮筛选。

[0081] 实施例 4

[0082] 抗体基因的克隆表达及特异抗体的鉴定

[0083] 将筛选回收 mRNA 的 RT-PCR 基因产物两端插入 NcoI 和 NotI 位点, 双酶切后与经同样双酶切的表达载体 pET22b(+) 用 T4 连接酶连接, 16℃反应过夜, 然后转化入大肠杆菌 E. coli BL21(DE3) 感受态中。接种 180 个重组单菌落于 10mL 含 100mg/L Amp 的 LB 培养基中, 37℃振荡培养过夜。按 1:50 将过夜培养物接种于新鲜 2YT-A(含 100mg/L Amp) 培养基, 37℃振荡培养至 $A_{600}=0.6-1.0$ (0.1 梯度), 加 IPTG 诱导(终浓度为 0.3-1mmol/L), 37℃振荡培养 3-6h (0.5h 梯度)。8000r/min 离心 10min 收集菌体。悬于裂解缓冲液, 超声破碎, 离心收集上清, 产物待用于 ELISA 检测。

[0084] ELISA 鉴定阳性克隆并进行序列分析: 用 TNF- α 重组蛋白包被 96 孔板, 湿盒中 4℃过夜。3%BSA-PBS (pH7.0) 进行封闭, 37℃ 1h。加入上述制备抗体, 37℃ 1h。加入 HRP 标记的鼠抗 His-tag 二抗, 37℃ 1h。A、B 液显色, 用 H_2SO_4 终止反应后, 在 450nm 波长下测定 OD 值, 鉴定阳性克隆。阳性克隆提取质粒, 送公司测序, 将其与已知基因序列比较, 并用相关软件分析。

[0085] 结果表明, 筛选获得 6 株 ELISA 阳性克隆, 其中抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb12 和 TsdAb40 显示出极高的 ELISA 值, 提取质粒, 送公司测序, 将其与已知基因序列比较, 并用相关软件分析, 结果表明这 2 株克隆的重链均属 IGHV3 家族, 具有完全不同的 VH CDR3 序列, 是全新的人源抗 TNF- α sdAbs 抗体。

[0086] 实施例 5

[0087] 抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb12 和 TsdAb40 的特异性抗原结合活性检测

[0088] 将 TNF- α 重组蛋白用包被液稀释成不同浓度, 96 孔板上每孔加 60 μ l, 重复 3 个孔, 用 Gp(狂犬病毒糖蛋白) 作为阴性对照, PBS 作空白对照, 湿盒中 4℃过夜。37℃, 30g/L BSA-PBS (pH7.0) 进行封闭。加入用 PBS 稀释的纯化抗体, 每孔 70 μ l, 37℃ 1h。加入 HRP 标记的抗人 IgG K 链二抗, 每孔 50 μ l, 37℃ 1h。A、B 液显色, 用 H_2SO_4 终止反应后, 在 450nm 波长下测定 A 值。

[0089] 结果显示, 如图 2 和图 3 所示, 人源 TsdAb12 和 TsdAb40 抗体均可以特异识别

TNF- α ，而不能与 Gp 和 BSA 结合，表明它们是特异针对 TNF- α 的人源基因工程抗体，而且克隆 12 和 40 均有很好的抗原浓度依赖性。

[0090] 实施例 6

[0091] 抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb12 和 TsdAb40 的稳定性检测

[0092] 稳定性是影响抗体功能的最重要的生物学特性之一。热稳定性的比较通过将纯化抗体与 PBS 在不同温度下共同孵育 3h 来检测。结果显示，如图 4 所示，35℃时 scFv 的活性开始降低，40℃时其活性全部丧失。而 sdAbs 在 45℃时活性才开始下降，50℃还具活性。

[0093] 实施例 7

[0094] 抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb12 和 TsdAb40 的亲和力检测

[0095] 抗体的亲和力应用基于表面等离子共振 (Surface Plasmon Resonance SPR) 技术的 Biacore3000 (瑞士 BIAcore AB 公司) 进行测定。10 μ g/ml 人 TNF α 重组蛋白藕联固化于 CM5 传感芯片上 (10mmol/L NaAc, pH4.5)，抗原反应值预设 3000RU。不同浓度的纯化抗体依次上样，流经藕联重组 TNF α 的 CM5 传感芯片，流速 20 μ l/min，流动相为 HBS-EP (pH7.4)。抗原抗体结合动力学结果用 BIA evaluation4.1 软件进行分析计算。结果表明所筛选得的抗体具有很好的亲和力，TsdAb12 和 TsdAb40 的亲和力分别为 0.459nM 和 0.26nM，见表 1，人源骆驼化基因工程抗体的亲和力检测。

[0096] 表 1 人源骆驼化基因工程抗体的 TsdAb12 和 TsdAb40 的亲和力

[0097]

抗体	K_a , $M^{-1}s^{-1}$	K_d , s^{-1}	KD , nM
TsdAb12	3.66×10^5	1.68×10^{-4}	0.459
TsdAb40	3.96×10^5	1.03×10^{-4}	0.260

[0098] 其中， K_a 为结合常数；

[0099] K_d 为解离常数；

[0100] KD 为亲和力，其中 $KD = K_d / K_a$

[0101] 实施例 8

[0102] 人源抗体的细胞毒性中和活性研究

[0103] 小鼠成纤维细胞株 L929 细胞培养于 RPMI1640 培养液，含 100mL/L 胎牛血清，抗生素 (100mg/L 青霉素，100mg/L 链霉素)。传代接种于 96 孔细胞培养板内，密度为 2×10^4 个/孔，过夜培养。将制备的抗体片段用 MEM 培养液调整为 400mg/L，并用 MEM 培养基作梯度稀释，各稀释度管内加入 TNF α 重组蛋白 10ng，37℃ 1h。取一定量各稀释度的抗体混合物加入上述 24 孔细胞培养板内，37℃ 培养 24h。抗 TNF α 单克隆抗体 TmcAb 作阳性对照，PBS 和无关抗体 scFv (抗狂犬病毒 Gp 抗体 scFv) 为阴性对照，弃上清，加入 20 μ l MTT (5mg/L)，继续培养 4h。加入 DMSO 100 μ l/孔，混匀，酶标仪测定各孔 A 值。结果显示，如图 5 所示，人源抗 TNF- α TsdAb12 and TsdAb40 与抗 TNF- α mAb1 一样均可抑制 TNF- α 对 L929 细胞的细胞毒性，并且随着抗体浓度的增加细胞存活率增加。

[0104] 如背景技术所述，TNF- α 过量表达可诱导促炎细胞因子如白介素 1

(interleukon-1, IL-1)、IL-6 等的表达、增加内皮细胞通透性、上调粘附分子表达、激活中性白细胞和嗜酸细胞,并且诱导骨滑膜细胞和软骨细胞分泌急性期物质和组织降解酶等促进炎症的发生。这些病理反应在许多免疫介导的炎症性疾病(Immune-mediated inflammatory diseases, IMID)的发生发展中起着非常重要的作用,如风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)、牛皮癣关节炎(psoriatic arthritis, PsA)、强直性脊椎炎(ankylosing spondylitis, AS)、炎症性肠炎(inflammatory bowel disease, IBD)、幼年型慢性关节炎(juvenile chronic arthritis, JCA)以及脉管炎(vasculitis)等。现有研究表明, TNF- α 是上述多种 IMID 的理想靶标,使用 TNF- α 拮抗药物(TNF- α inhibitors)来中和过量的 TNF- α ,是有效防治因 TNF- α 过度表达所致慢性炎症性疾病的理想途径,因此,本发明所述 TsdAb12 和 TsdAb40 可以有效防治因 TNF- α 过度表达所致慢性炎症性疾病,如风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)、牛皮癣关节炎(psoriatic arthritis, PsA)、强直性脊椎炎(ankylosing spondylitis, AS)、炎症性肠炎(inflammatory bowel disease, IBD)、幼年型慢性关节炎(juvenile chronic arthritis, JCA)以及脉管炎(vasculitis)等。

[0105] 本发明的有益效果分析:

[0106] 本发明所制备的人源 TNF- α 单克隆抗体是基于定点突变方法和核糖体抗体展示技术,通过构建了核糖体展示骆驼化人源 sdAb 基因库,并筛选获得了 2 株特异针对重组人 TNF- α 的骆驼化人源 sdAbs。生物学特性研究表明,这 2 株筛选抗体 TsdAb12 和 TsdAb40 与 scFv 相比, sdAbs, 的热稳定性的能力大大改进,具有理想的稳定性,而且具有很高的亲和力(0.8-26nM)。此研究将稳定性的定向改造法和进化方法相结合,稳定性改构和亲和力成熟相统一,筛选制备的抗体不仅具有很好的抗原特异性,而且具有高亲和力和良好的稳定性,这为稳定、高亲和力人源新型基因工程抗体的研究提供了科学的理论依据和技术基础。人源抗体的分子形式、稳定性及其糖基化程度,决定了抗体的靶标结合能力、给药方式、治疗疗程及机体耐受性等,也是影响抗体临床应用的关键因素。人源骆驼化 sdAb 的独特生物学特点,以及其处于极端温度和 pH 环境中的稳定性,使得应用抗体经注射外给药方式进行疾病的治疗成为可能。这些特点和优点,为抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体在临床上的应用奠定了基础,使该新型抗体具有广阔的临床应用前景。

[0107] 上述参照具体实施方式对该抗 TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体 TsdAb40 及其制备方法与应用进行的详细描述,是说明性的而不是限定性的,可按照所限定范围列举出若干个实施例,因此在不脱离本发明总体构思下的变化和修改,应属本发明的保护范围之内。

[0001]

抗TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体TsdAb40及其制备方法与应用, ST25. txt
SEQUENCE LISTING

<110> 中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所

<120> 抗TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体TsdAb40及其制备方法与应用

<130>

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 390

<212> DNA

<213> human

<220>

<221> 抗TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体TsdAb40重链可变区核苷酸序列

<222> (1).. (390)

<400> 1

```

aggatgcacct cgagcagctct gggggaggcgc tgggtccagcc tgggaggtcc ctgagactct      60
ccigtgcage ctctggattc accttcagta gctatagcat gaactgggtc cggcaggctc      120
cgggggaagga gcgaggagggt gtctcagcta ttagtggttag tgggtggtagc acatactacg      180
cagaactccgt gaagggccgg ttcaccatct ccagagacaa ttccaagaac acgctgtatc      240
cgcaaatgaa cagccctgaga gccgaggaca cgcccggtata ttactgtgcg aaagacagga      300
ggtgggacgc ctcccatcgc acgtattact atgatagtag tggttatgcg agatttgact      360
actgggggcca gggaacctcg gtcaccgtct

```

<210> 2

<211> 130

<212> PRT

<213> human

<220>

<221> 抗TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体TsdAb40重链可变区氨基酸序列

<222> (1).. (130)

<400> 2

```

Val His Leu Glu Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser
1           5           10           15

```

```

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser
20           25           30

```

```

Met Asn Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser
35           40           45

```

```

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50           55           60

```

```

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Pro
65           70           75           80

```

```

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85           90           95

```

```

Lys Asp Arg Arg Trp Asp Ala Ser His Arg Thr Tyr Tyr Asp Ser

```

[0002]

抗TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体TsdAb40及其制备方法与应用, ST25. txt

100	105	110
Ser Gly Tyr Ala Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
115	120	125
Val Ser		
130		
<210> 3		
<211> 354		
<212> DNA		
<213> human		
<220>		
<221> 抗TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体TsdAb12重链可变区核苷酸序列		
<222> (1)..(354)		
<400> 3		
cagggtccacc tcgagcagtc tggaggagge ttgatccagc ctgggggggc cctgagactc	60	
tectgtgcag cctctggggt caccgtcagt agctattgga tgagctgggt ccgccagget	120	
ccagggaagg agcgggaggg ggtctcatac attagtagta gtggtagtac catatactac	180	
gcagactctg tgaaggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctcactgtat	240	
ctgcaaatga acagcctgag agcggaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcgt	300	
aactataact ggaaaggatt tgactactgg ggccaggga ccctgggtcac cgtc	354	
<210> 4		
<211> 118		
<212> PRT		
<213> human		
<220>		
<221> 抗TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体TsdAb12重链可变区氨基酸序列		
<222> (1)..(118)		
<400> 4		
Gln Val His Leu Glu Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly		
1 5 10 15		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr		
20 25 30		
Trp-Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val		
35 40 45		
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50 55 60		
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
65 70 75 80		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85 90 95		
Ala Arg Asp Arg Asn Tyr Asn Trp Lys Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln		
100 105 110		

[0003]

抗TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体TsdAb40及其制备方法与应用, ST25, txt
Gly Thr Leu Val Thr Val
115

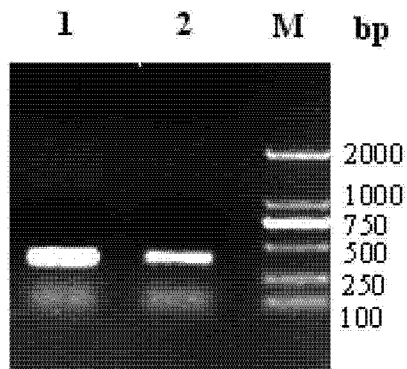


图 1

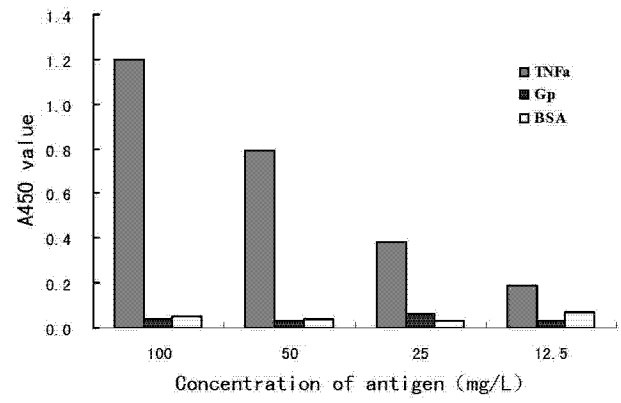


图 2

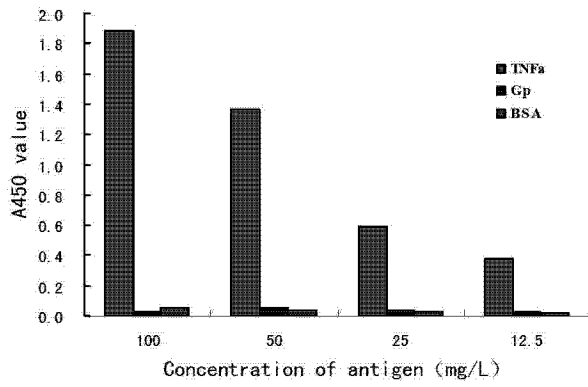


图 3

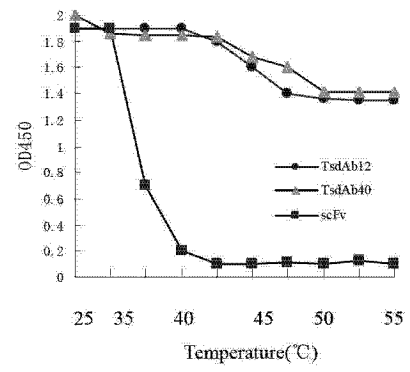


图 4

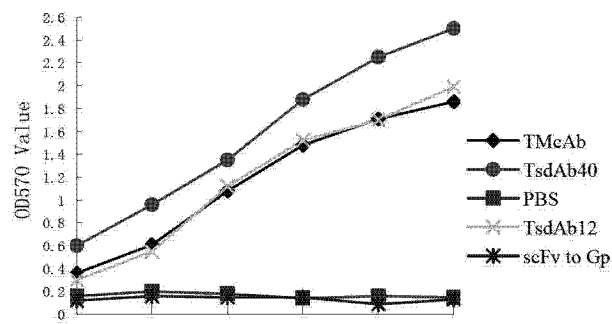


图 5

专利名称(译)	抗TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体TsdAb40及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN103288956A	公开(公告)日	2013-09-11
申请号	CN201310097070.9	申请日	2013-03-25
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
[标]发明人	赵小玲 陈伟强 王丽蒙 王静 王尚 王涛 李佩尧		
发明人	赵小玲 陈伟强 王丽蒙 王静 王尚 王涛 李佩尧		
IPC分类号	C07K16/24 C12N15/13 G01N33/53 A61K39/395 A61P19/02 A61P29/00 A61P11/02 A61P19/08 A61P1/00		
代理人(译)	李蕊		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供的抗TNF- α 人源骆驼化基因工程抗体TsdAb40为序列表中2所示的序列；是通过定点突变技术和核糖体展示技术筛选制备，对于因TNFa过度表达，由免疫介导的炎症性疾病（IMID）药物的应用具有极大的市场前景，其基因和其基因产物可用于制备诊断和治疗TNFa过度表达引起的疾病，如风湿性关节炎（RA）、变应性鼻炎（AR），牛皮癣关节炎（PsA）、强直性脊柱炎（AS）、炎症性肠炎（IBD）、幼年型慢性关节炎（JCA）等疾病的临床用药；所述抗体的制备方法易于规模化工业生产。

