



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104530236 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 22

(21) 申请号 201410705404. 0

G01N 33/68(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 11. 26

G01N 33/574(2006. 01)

(71) 申请人 嘉和生物药业有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张衡路 1690
弄 3 号 1-4 层

(72) 发明人 周清 舒孟军 石姝 言苏
谭涛超

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限
公司 11285

代理人 张广育 姜建成

(51) Int. Cl.

C07K 16/30(2006. 01)

C12N 15/13(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 35/02(2006. 01)

权利要求书1页 说明书21页

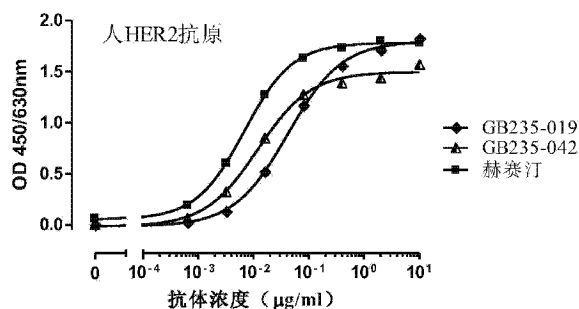
序列表7页 附图12页

(54) 发明名称

一种全人源 HER2 抗体、其编码基因及应用

(57) 摘要

本发明涉及药物化学领域,具体涉及两种全人源 HER2 抗体、其编码基因及应用。本发明提供了两种全人源 HER2 抗体,其中一种 HER2 抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:1,轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:2,另一种 HER2 抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:10,轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:11。全人源 HER2 抗体可降低输液反应和免疫原性,提高药物安全性,具有更好的药物动力学特征。此外,本发明的全人源抗体可以与其他 HER2 阳性肿瘤治疗剂联合用于治疗 HER2 阳性肿瘤。



1. 一种全人源的 HER2 抗体,其中重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:1,轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:2。
2. 一种全人源 HER2 抗体,其中重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:10,轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:11。
3. 权利要求 1 或 2 的全人源 HER2 抗体,其是 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 或 scFv 的形式。
4. 权利要求 1 或 2 的全人源 HER2 抗体,还包括人 IgG 的重链恒定区和轻链恒定区;优选地,所述人 IgG 为 IgG1;更优选地,所述人 IgG 重链恒定区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:5,所述人 IgG 轻链恒定区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:6。
5. 编码权利要求 1 的全人源 HER2 抗体的核苷酸序列;优选地,在所述核苷酸序列中,编码所述重链可变区的核苷酸序列为 SEQ ID NO:3,编码所述轻链可变区的核苷酸序列为 SEQ ID NO:4。
6. 编码权利要求 2 的全人源 HER2 抗体的核苷酸序列;优选地,在所述核苷酸序列中,编码所述重链可变区的核苷酸序列为 SEQ ID NO:12,编码所述轻链可变区的核苷酸序列为 SEQ ID NO:13。
7. 权利要求 5 或 6 的编码全人源 HER2 抗体的核苷酸序列,其中当所述全人源 HRE2 抗体包含重链恒定区和轻链恒定区时,编码所述重链恒定区的核苷酸序列为 SEQ ID NO:7,编码所述轻链恒定区的核苷酸序列为 SEQ ID NO:8。
8. 一种包含权利要求 5 或 6 的核苷酸序列的表达载体,所述核苷酸序列与所述表达载体的表达控制序列可操作地连接;优选地,所述表达载体为 pGEM-T 载体或 293 载体。
9. 一种药物组合物,其包含权利要求 1 或 2 的全人源 HER2 抗体和可药用载体。
10. 一种联合药物,其包含权利要求 1 或 2 的全人源 HER2 抗体和其他 HER2 阳性肿瘤治疗剂,所述其他 HER2 阳性肿瘤治疗剂为赫赛汀或帕妥珠。
11. 一种检测人 HER2 的试剂盒,其包含权利要求 1-3 任一项的全人源 HER2 抗体。
12. 权利要求 1 或 2 的全人源 HER2 抗体用于制备用于治疗受试者中的 HER2 阳性肿瘤的药物的用途;优选地,所述 HER2 阳性的肿瘤选自 HER2 阳性的乳腺癌、胃癌、肺癌、非小细胞肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、皮肤或眼内黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区癌、结肠癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织癌、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、膀胱癌、肾或尿道癌、肾细胞癌、肾盂癌、间皮瘤、肝细胞癌、胆囊癌、慢性或急性白血病、淋巴瘤细胞淋巴瘤、中枢神经系统 (CNS) 癌、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、多形式成胶质细胞瘤 (glioblastoma multiforme), 星形细胞瘤,神经鞘瘤,室管膜瘤,成神经管细胞瘤,脑膜瘤、鳞状细胞瘤和垂体腺瘤;更优选地,所述受试者是患有 HER2 阳性肿瘤的人。

一种全人源 HER2 抗体、其编码基因及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体技术领域,具体涉及一种全人源 HER2 抗体、其编码基因及应用。

背景技术

[0002] 乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤。HER 家族调节正常乳腺的生长和发育,HER2 的过度表达与乳腺癌有关。曲妥珠单抗 (Trastuzumab),商品名赫赛汀 (赫赛汀),是第一个用于治疗人表皮生长因子受体 2(HER2) 阳性转移性乳腺癌的人源化的单克隆抗体药物。虽然在 HER2 阳性的恶性肿瘤中,赫赛汀已成为标准的治疗方案,但仍然有 40% 的患者对赫赛汀没有响应。此外,在抗 HER2 的治疗方法中,耐药性已成为一个常见的严重问题。生长因子的冗余和细胞内信号转导通路之间的串扰被认为是在乳腺癌患者中促进耐药性的主要原因。帕妥珠单抗 (Pertuzumab) 是美国 Genentech 公司与罗氏公司联合开发近来研制出的一种新的抗 HER2 人源化抗体,与赫赛汀不同,它所针对的抗原表位位于 HER2 受体的细胞外 II 区,但临床实验研究结果表明单独使用帕妥珠仅产生较弱的抗肿瘤治疗作用。虽然治疗 HER2 阳性的转移性乳腺癌,尽管有多种方案可供选择,但是仍然没有满足需求。治疗这种疾病的优化方案持续出现,但大多数转移性乳腺癌患者出现了复发的情况。

发明内容

[0003] 本发明提供了一种全人源的 HER2 抗体,其中重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:1,轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:2。

[0004] 本发明还提供了一种全人源的 HER2 抗体,其中重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:10,轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:11。

[0005] 本发明的全人源 HER2 抗体,其是 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 或 scFv 的形式。所述 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 或 scFv 具有本领域所惯常理解的含义。

[0006] 本发明的上述两种全人源 HER2 抗体,还可以包括人 IgG 的重链恒定区和轻链恒定区。在一个具体的实施方案中,所述人 IgG 为 IgG1。在一个具体的实施方案中,所述人 IgG 重链恒定区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:5,所述人 IgG 轻链恒定区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:6。

[0007] 本发明提供了编码本发明全人源 HER2 抗体的核苷酸序列。

[0008] 在一个具体的实施方案中,编码氨基酸序列为 SEQ ID NO:1 的重链可变区的核苷酸序列为 SEQ ID NO:3,编码氨基酸序列为 SEQ ID NO:2 的轻链可变区的核苷酸序列为 SEQ ID NO:4。

[0009] 在一个具体的实施方案中,编码氨基酸序列为 SEQ ID NO:10 的重链可变区的核苷酸序列为 SEQ ID NO:12,编码氨基酸序列为 SEQ ID NO:11 的轻链可变区的核苷酸序列为 SEQ ID NO:13。

[0010] 在一个具体的实施方案中,当本发明的两种全人源 HER2 抗体为全长抗体时,在本发明的核苷酸序列中,编码重链恒定区的核苷酸序列为 SEQ ID NO:7,编码轻链恒定区的核

核苷酸序列为 SEQ ID NO:8。

[0011] 本发明提供了一种表达载体,其中本发明的核苷酸序列与表达载体的表达控制序列可操作地连接。在具体的实施方案中,所述表达载体是 pGEM-T 载体或 293 载体。

[0012] 本发明提供了一种细胞,其包含本发明的表达载体。所述细胞可以是原核或真核的。在具体的实施方案中,所述细胞可以哺乳动物细胞,例如 FreeStyle 293F 细胞。

[0013] 本发明提供了一种药物组合物,其包含本发明的全人源 HER2 抗体和可药用载体。

[0014] 本发明提供了一种联合药物,其包含本发明的全人源 HER2 抗体和其他 HER2 阳性肿瘤治疗剂,所述 HER2 阳性肿瘤治疗剂为赫赛汀和 / 或帕妥珠。其中,所述联合药物可以以如下的量施用于受试者:0.001-500mg/kg 全人源 HER2 抗体 +0.001-500mg/kg 赫赛汀和 / 或帕妥珠;0.001-300mg/kg 全人源 HER2 抗体 +0.001-300mg/kg 赫赛汀和 / 或帕妥珠;0.001-200mg/kg 全人源 HER2 抗体 +0.001-200mg/kg 赫赛汀和 / 或帕妥珠;0.01-200mg/kg 全人源 HER2 抗体 +0.01-200mg/kg 赫赛汀和 / 或帕妥珠;0.01-100mg/kg 全人源 HER2 抗体 +0.01-100mg/kg 赫赛汀和 / 或帕妥珠;0.1-90mg/kg 全人源 HER2 抗体 +0.1-90mg/kg 赫赛汀和 / 或帕妥珠;0.1-70mg/kg 全人源 HER2 抗体 +0.1-70mg/kg 赫赛汀和 / 或帕妥珠;0.1-60mg/kg 全人源 HER2 抗体 +0.1-60mg/kg 赫赛汀和 / 或帕妥珠;0.1-50mg/kg 全人源 HER2 抗体 +0.1-50mg/kg 赫赛汀和 / 或帕妥珠;0.1-40mg/kg 全人源 HER2 抗体 +0.1-40mg/kg 赫赛汀和 / 或帕妥珠;1-40mg/kg 全人源 HER2 抗体 +1-40mg/kg 赫赛汀和 / 或帕妥珠。本发明的全人源 HER2 抗体与所述其他 HER2 阳性肿瘤治疗剂可以分开或同时给予受试者。给药途径可以为本领域常用的抗体给药途径。

[0015] 本发明提供了一种试剂盒,其包含本发明的全人源 HER2 抗体。所述试剂盒可用于检测样品中的 HER2 蛋白。所述试剂盒还可包含本领域检测 HER2 试剂盒中的其他常用组分。

[0016] 本发明提供了本发明的全人源 HER2 抗体用于制备用于治疗受试者中的 HER2 阳性肿瘤的药物的用途。

[0017] 所述“HER2 阳性肿瘤”是指如果 IHC (免疫组化法) 检查结果为 3 个加号 (+++), 即,大于 30% 的肿瘤细胞的胞膜呈现完整的强着色,就表明为 HER2 阳性;如果是 2 个加号 (++) ,即,至少 10% 的肿瘤细胞呈现弱至中度完整的胞膜染色,那么进一步做 FISH (荧光原位杂交法) 或 CISH (显色原位杂交法) 检查,倘若结果为阳性 (发生基因扩增),就可以确诊为 HER2 阳性。优选地,HER2 阳性肿瘤检测结果是使用我国食品药品监督管理总局认证的检测试剂盒 (IHC, FISH 和 CISH 检测试剂盒) 获得的结果。执业医师熟知如何判定肿瘤是否为 HER2 阳性肿瘤。

[0018] 所述 HER2 阳性的肿瘤可以选自 HER2 阳性的乳腺癌、胃癌、肺癌、非小细胞肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、皮肤或眼内黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区癌、结肠癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织癌、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、膀胱癌、肾或尿道癌、肾细胞癌、肾盂癌、间皮瘤、肝细胞癌、胆囊癌、慢性或急性白血病、淋巴瘤、中枢神经系统 (CNS) 癌、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤 (glioblastoma multiforme)、星形细胞瘤、神经鞘瘤、室管膜瘤、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、鳞状细胞瘤和垂体腺瘤。

[0019] 优选地,所述受试者是人。

附图说明

[0020] 图 1A 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 和 GB235-042 重链表达载体 (293-VH-CH) 的结构示意图;图 1B 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 和 GB235-042 轻链表达载体 (293-VL-CL) 的结构示意图。以 PCR 方法,利用相应模板和引物(详见实施例 5) 分别获得含 5' 端 EcoRI 酶切位点的信号肽、重链可变区 (VH)、含 TGA 终止密码子和 3' 端 BamH I 酶切位点的重链恒定区 (CH) 基因片段,并以 over-lapping PCR 方法将三段联接,获得 GB235-019 和 GB235-042 抗体的重链全长基因片段。以相同方法获得 GB235-019 和 GB235-042 抗体含信号肽、轻链可变区 (VL) 和轻链恒定区 (CL) 的轻链全长基因片段。利用 EcoR I 和 BamH I 酶切形成的粘性末端分别将重链和轻链全长基因片段克隆至 pGEM-T 载体。

[0021] 图 2A 和图 2B 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 和 GB235-042 的 SDS-PAGE 电泳结果图。将纯化得到的 GB235-019 和 GB235-042 抗体和赫赛汀对照样品在 50mM 二硫苏糖醇还原条件下经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳解析,结果显示 GB235-019 和 GB235-042 抗体和赫赛汀均呈现分子量为 50KDa 和 25KDa 的两条带,分别为抗体的重链和轻链。

[0022] 图 3A 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019, GB235-042 与人 HER2 抗原的结合结果图。以人 HER2 抗原包被 ELISA 板,以不同浓度的 GB235-019,GB235-042 抗体和赫赛汀与包被于板上的抗原分子结合,并以 HRP 标记的羊抗人 IgG Fc 抗体测定结合的抗体。结果显示与赫赛汀一样,GB235-019, GB235-042 抗体可结合于人 HER2,并呈现出浓度依赖性和可饱和性。

[0023] 图 3B 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019, GB235-042 与猴 HER2 抗原的结合结果图。以猴 HER2 抗原包被 ELISA 板,以不同浓度的 GB235-019,GB235-042 抗体和赫赛汀与包被于板上的抗原分子结合,并以 HRP 标记的羊抗人 IgG Fc 抗体测定结合的抗体。结果显示与赫赛汀一样,GB235-019, GB235-042 抗体可结合于猴 HER2,并呈现出浓度依赖性和可饱和性。

[0024] 图 3C 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019, GB235-042 与小鼠 HER2 抗原的结合结果图。以小鼠 HER2 抗原包被 ELISA 板,以不同浓度的 GB235-019, GB235-042 抗体和赫赛汀与包被于板上的抗原分子结合,并以 HRP 标记的羊抗人 IgG Fc 抗体测定结合的抗体。结果显示,GB235-019,GB235-042 抗体可结合于小鼠 HER2,并呈现出浓度依赖性和可饱和性。

[0025] 图 3D 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019, GB235-042 与人 HER1、HER2、HER3、HER4 抗原的结合结果图。以人 HER1、HER2、HER3、HER4 抗原包被 ELISA 板,以固定浓度的 GB235-019, GB235-042 抗体和赫赛汀与包被于板上的抗原分子结合,并以 HRP 标记的羊抗人 IgG Fc 抗体测定结合的抗体。结果显示,GB235-019,GB235-042 抗体能结合人 HER2,GB235-019, GB235-042 抗体不能结合人 HER1、HER3、HER4 抗原。

[0026] 图 4 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 与 GB235-042 与赫赛汀表位竞争的结果图。用 ELISA 方法,以重组人 HER2 抗原包被 ELISA 板,以不同浓度的 GB235-019 与 GB235-042 抗体和赫赛汀分别与生物素标记的赫赛汀 (0.005 μ g/mL 固定浓度) 共同室温孵育 2 小时后和重组人 HER2 抗原包被的板结合,并用 HRP 标记的抗生物素抗体检测结合的

抗体。结果显示,随赫赛汀浓度增加,生物素标记的赫赛汀在 HER2 上的结合受到抑制;而 GB235-019 与 GB235-042 抗体即使是在实验涉及的最高浓度 ($10 \mu\text{g/mL}$) 时,仍对生物素标记的赫赛汀在 HER2 上的结合无抑制作用。

[0027] 图 5 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 与帕妥珠单抗竞争的结果图。用 ELISA 方法,以重组人 HER2 抗原包被 ELISA 板,以不同浓度的 GB235-019 抗体和帕妥珠单抗分别与生物素标记的 GB235-019 抗体 ($0.1 \mu\text{g/mL}$ 固定浓度) 共同室温孵育 2 小时后和重组人 HER2 抗原包被的板结合,并用 HRP 标记的抗生物素抗体检测结合的抗体。结果显示,随 GB235-019 抗体浓度增加,生物素标记的 GB235-019 抗体在人 HER2 上的结合受到抑制;而帕妥珠单抗即使是在实验涉及的最高浓度 ($30 \mu\text{g/mL}$) 时,仍对生物素标记的 GB235-019 抗体在人 HER2 上的结合无抑制作用。

[0028] 图 6 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 抗体与 BT-474 细胞的结合曲线结果图。将 HER2 高表达的 BT-474 乳腺癌细胞在 96-孔 U 型板中分别与不同浓度的 GB235-019 抗体、赫赛汀和帕妥珠单抗孵育,在充分洗涤后,加入 FITC 标记的羊抗人 Fc 抗体检测,以流式细胞仪检测结合的抗体。结果显示,GB235-019 抗体和赫赛汀、帕妥珠单抗一样可结合于表达 HER2 的细胞表面,且呈现出浓度依赖性和可饱和性,提示 GB235-019 抗体对 HER2 有高度选择性。

[0029] 图 7A 显示了重组全长抗人 HER2 GB235-019 抗体体外抑制 SK-BR-3 细胞增殖活性的实验结果。将 HER2 高表达的 SK-BR-3 乳腺癌细胞在完全培养基中分别与不同浓度的 GB235-019 抗体和赫赛汀孵育 72 小时后用 Alamar Blue 测定细胞活性。结果显示,赫赛汀在完全培养基中能抑制 SK-BR-3 细胞增殖,并呈现出浓度依赖性。GB235-019 抗体在完全培养基中不能抑制 SK-BR-3 细胞增殖。

[0030] 图 7B 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 抗体体外逆转 Heregulin α 诱导 SK-BR-3 细胞对赫赛汀耐药作用的实验结果。将 HER2 高表达的 SK-BR-3 乳腺癌细胞在完全培养基中添加 Heregulin α , 产生对赫赛汀的耐药作用。不同浓度的 GB235-019 抗体和赫赛汀单独给药,或 GB235-019 抗体和赫赛汀联合给药,孵育 72 小时后用 Alamar Blue 测定细胞活性。结果显示,完全培养基中添加 Heregulin α , Heregulin α 诱导了 SK-BR-3 的增殖。SK-BR-3 对赫赛汀单独给药变得不敏感,GB235-019 抗体单独给药没有抑制作用,而 GB235-019 抗体和赫赛汀联合给药抑制了 Heregulin α 的诱导增殖作用,并呈现出浓度依赖性。

[0031] 图 8 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 抗体对乳腺癌 SK-BR-3 细胞信号转导的抑制作用。HER2 高表达乳腺癌细胞 SK-BR-3 在 0.1% 胎牛血清培养基饥饿培养 24 小时后,加入 GB235-019 抗体 $20 \mu\text{g/mL}$, 赫赛汀 $20 \mu\text{g/mL}$ 单独给药,以及 GB235-019 抗体和赫赛汀的联合给药,抗体处理 SK-BR-3 细胞 6 小时后,添加终浓度为 100ng/mL 的 Heregulin α 诱导 15 分钟后取样。以细胞裂解液做免疫印迹,以相应抗体分别探测全部和磷酸化的 HER3、Akt 和 ERK。图 8 的结果显示,相比较不加 Heregulin α 的对照组,Heregulin α 引起 SK-BR-3 细胞 HER3 磷酸化的上调作用。GB235-019 抗体与赫赛汀各自单独用药轻微抑制了 Heregulin α 对 SK-BR-3 细胞中 HER3 磷酸化的上调作用,相比较单独给药,GB235-019 抗体与赫赛汀的联合用药,完全逆转了 Heregulin α 对 HER3 磷酸化的上调作用。同时,GB235-019 抗体与赫赛汀单独用药,没有抑制 Heregulin α 对 Akt 磷酸化的上调作用,相比较单独给药,GB235-019 抗体与赫赛汀的联合用药明显抑制了 Heregulin α 对 Akt 磷酸化

的上调作用。GB235-019 抗体与赫赛汀单独用药,也明显抑制了 Heregulin α 对 ERK1/2 磷酸化的上调作用,而 GB235-019 抗体与赫赛汀联合用药完全逆转了 Heregulin α 对 ERK1/2 磷酸化的上调作用。

[0032] 图 9A 显示了重组全长抗人 HER2GB235-019 抗体体外抑制 BT-474 细胞增殖活性的实验结果。将 P-HER2 高表达的 BT-474 乳腺癌细胞在完全培养基中分别与不同浓度的 GB235-019 抗体和赫赛汀单独给药以及联合给药孵育 72 小时后用 Alamar Blue 测定细胞活性。结果显示,赫赛汀在完全培养基中能抑制 BT-474 细胞增殖,并呈现出浓度依赖性。GB235-019 抗体在完全培养基中不能抑制 BT-474 细胞增殖。GB235-019 抗体与赫赛汀联合用药,没有增加赫赛汀的抑制作用。

[0033] 图 9B 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 抗体体外逆转 Heregulin α 诱导 BT-474 细胞对赫赛汀耐药作用的实验结果。将 P-HER2 高表达的 BT-474 乳腺癌细胞在完全培养基中添加 Heregulin α ,不同浓度的 GB235-019 抗体和赫赛汀单独给药,或 GB235-019 抗体和赫赛汀联合给药,孵育 6 天后用 Alamar Blue 测定细胞活性。结果显示,完全培养基中添加 Heregulin α ,Heregulin α 诱导了 BT-474 细胞的增殖。BT-474 细胞对赫赛汀单独给药变得耐药,GB235-019 抗体单独给药也没有抑制作用。而 GB235-019 抗体和赫赛汀联合给药抑制了 Heregulin α 诱导的增殖作用,并明显抑制到低于 Heregulin α 诱导前的水平,并呈现出浓度依赖性。

[0034] 图 10 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 抗体对乳腺癌 BT-474 细胞信号转导的抑制作用。P-HER2 高表达乳腺癌细胞 BT-474 在 0.1%胎牛血清培养基饥饿培养 24 小时后,加入 GB235-019 抗体 20 μ g/ml,赫赛汀 20 μ g/ml 单独给药,以及 GB235-019 抗体和赫赛汀的联合给药,抗体处理 BT-474 细胞 6 小时后,添加终浓度为 100ng/ml 的 Heregulin α 诱导 10 分钟后取样。以细胞裂解液做免疫印迹,以相应抗体分别探测全部和磷酸化的 HER3、Akt 和 ERK。图 10 的结果显示,相比较不加 Heregulin α 的对照组,Heregulin α 引起 BT-474 细胞 HER3 磷酸化的上调作用。GB235-019 抗体与赫赛汀各自单独用药明显抑制了 Heregulin α 对 BT-474 细胞中 HER3 磷酸化的上调作用,相比较单独给药,GB235-019 抗体与赫赛汀的联合用药,完全逆转了 Heregulin α 对 HER3 磷酸化的上调作用。同时,GB235-019 抗体与赫赛汀单独用药,没有抑制 Heregulin α 对 Akt 磷酸化的上调作用,相比较单独给药,GB235-019 抗体与赫赛汀联合用药微弱的抑制了 Heregulin α 对 Akt 磷酸化的上调作用。GB235-019 抗体与赫赛汀单独用药微弱的抑制了 Heregulin α 对 ERK1/2 磷酸化的上调作用,而 GB235-019 抗体与赫赛汀联合用药完全逆转了 Heregulin α 对 ERK1/2 磷酸化的上调作用。

[0035] 图 11 显示了重组全长抗人 HER2GB235-019 抗体体外抑制 MDA-MB-175 VII 细胞增殖活性的实验结果。将表达中等水平的 HER2 和中等水平的 HER3 的 MDA-MB-175 VII 乳腺癌细胞在完全培养基中分别与不同浓度的 GB235-019 抗体和赫赛汀单独给药以及联合给药孵育 6 天后用 Alamar Blue 测定细胞活性。结果显示,GB235-019 抗体与赫赛汀单独给药在完全培养基中能微弱的抑制 MDA-MB-175 VII 细胞增殖。GB235-019 抗体与赫赛汀联合用药,可以完全抑制 MDA-MB-175 VII 细胞增殖,并呈现出浓度依赖性。

[0036] 图 12A 显示了重组全长抗人 HER2GB235-019 抗体体外抑制 MCF 7 细胞增殖活性的实验结果。将表达较低水平的 HER2 和高水平 HER3,但不表达 P-HER2 和 P-HER3 的 MCF 7 乳

腺癌细胞在完全培养基中分别与不同浓度的 GB235-019 抗体和赫赛汀单独给药以及联合给药孵育 72 小时后用 Alamar Blue 测定细胞活性。结果显示,赫赛汀与 GB235-019 抗体单独给药在完全培养基中都不能抑制 MCF 7 细胞增殖,赫赛汀与 GB235-019 抗体联合给药在完全培养基中,也不能抑制 MCF 7 细胞增殖。

[0037] 图 12B 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 抗体体外对完全培养基中 Heregulin α 诱导 MCF 7 细胞增殖活性的实验结果。将表达较低水平的 HER2 和高水平 HER3,但不表达 P-HER2 和 P-HER3 的 MCF 7 乳腺癌细胞在完全培养基中添加 Heregulin α ,不同浓度的 GB235-019 抗体和赫赛汀单独给药,或 GB235-019 抗体和赫赛汀联合给药,孵育 72 小时后用 Alamar Blue 测定细胞活性。结果显示,完全培养基中添加 Heregulin α ,Heregulin α 微弱的诱导了 MCF 7 细胞的增殖。赫赛汀单独给药抑制了 Heregulin α 对 MCF 7 细胞的诱导增殖作用部分,但作用有限,GB235-019 抗体单独给药没有抑制作用。而 GB235-019 抗体和赫赛汀联合给药没有增加赫赛汀的抑制作用。

[0038] 图 13A 和图 13B 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 抗体体外对低胎牛血清培养基中 Heregulin α 诱导 MCF 7 细胞增殖活性的实验结果。将表达较低水平的 HER2 和高水平 HER3,但不表达 P-HER2 和 P-HER3 的 MCF 7 乳腺癌细胞在低胎牛血清培养基中添加 Heregulin α ,不同浓度的 GB235-019 抗体单独给药,或不同浓度的 GB235-019 抗体和固定浓度赫赛汀联合给药,孵育 72 小时后用 Alamar Blue 测定细胞活性。结果显示,低胎牛血清培养基中添加 Heregulin α ,Heregulin α 显著诱导了 MCF 7 细胞的增殖。GB235-019 抗体单独给药抑制了 Heregulin α 诱导 MCF 7 细胞的增殖,并呈现出浓度依赖性。GB235-019 抗体与 10ng/ml 赫赛汀联合给药,协同抑制了 Heregulin α 诱导 MCF 7 细胞的增殖。GB235-019 抗体与 100ng/ml 赫赛汀联合给药,协同抑制了 Heregulin α 诱导 MCF 7 细胞的增殖,并增加了最大抑制作用。

[0039] 图 14 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 抗体对乳腺癌 MCF 7 细胞信号转导的抑制作用。表达较低水平的 HER2 和高水平 HER3,但不表达 P-HER2 和 P-HER3 的 MCF 7 乳腺癌细胞在 0.1%胎牛血清培养基饥饿培养 24 小时后,加入 GB235-019 抗体 20 μ g/ml,赫赛汀 20 μ g/ml 单独给药,以及 GB235-019 抗体和赫赛汀的联合给药,抗体处理 MCF 7 细胞 6 小时后,添加终浓度为 100ng/ml 的 Heregulin α 诱导 10 分钟后取样。以细胞裂解液做免疫印迹,以相应抗体分别探测全部和磷酸化的 HER3、Akt 和 ERK。图 14 的结果显示,相比较不加 Heregulin α 的对照组,Heregulin α 引起 MCF 7 细胞 HER3 磷酸化的上调作用。GB235-019 抗体与赫赛汀各自单独用药明显抑制了 Heregulin α 对 MCF 7 细胞中 HER3 磷酸化的上调作用,相比较单独给药,GB235-019 抗体与赫赛汀的联合用药,完全逆转了 Heregulin α 对 HER3 磷酸化的上调作用。同时,GB235-019 抗体与赫赛汀单独用药,明显抑制 Heregulin α 对 Akt 磷酸化的上调作用。相比较单独给药,GB235-019 抗体与赫赛汀的联合用药完全逆转了 Heregulin α 对 Akt 磷酸化的上调作用。GB235-019 抗体与赫赛汀单独用药明显抑制了 Heregulin α 对 ERK1/2 磷酸化的上调作用,而 GB235-019 抗体与赫赛汀联合用药完全逆转了 Heregulin α 对 ERK1/2 磷酸化的上调作用。

[0040] 图 15 重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 抗体对乳腺癌 KPL-4 细胞小鼠体内肿瘤生长的抑制作用。人乳腺癌 (KPL-4) 细胞表达高水平的 P-HER2。KPL-4 细胞按 5×10^6 细胞 / 只小鼠分别接种至 38 只 SCID Beige 小鼠身体右侧倒数第二对乳垫下。当肿瘤体积达

到 100-200mm³时,依照肿瘤体积大小和体重选取 24 只小鼠随机分为 4 组,每组 6 只动物。赫赛汀组 (30mg/kg 赫赛汀), GB235-019 抗体组 (30mg/kgGB235-019 抗体), 联合用药组 (30mg/kg 赫赛汀+30mg/kg GB235-019 抗体) 及空白对照组 (PBS), 所有药物给药途径为腹腔注射, 一周一次, 共给药四周。每周两次测量肿瘤体积并进行称量小鼠体重。如图 15 的结果显示赫赛汀单独用药可部分抑制 KPL-4 肿瘤的生长; GB235-019 抗体单独用药不能抑制 KPL-4 肿瘤的生长; GB235-019 抗体与赫赛汀联合用药完全抑制了 KPL-4 肿瘤的生长, 并可使已经生成的肿瘤明显缩小, 体现显著地协同抑制 KPL-4 肿瘤生长作用。

具体实施方式

[0041] 下面以具体的实施例, 对本发明的技术方案做进一步的说明; 但本发明并不限于这些实施例。

[0042] 实施例 1 从全人源 scFv 噬菌体文库中筛选和人 HER2-Fc 特异性结合的克隆

[0043] 利用 ELISA 技术的抗原抗体结合专一性, 将人 HER2(胞外域)-Fc 融合蛋白(简称为 hHER2-Fc) 抗原包被到酶标板, 通过洗涤和淘选特异性地粘附于包被抗原上的噬菌体。人 HER2-Fc(购自 Sino Biological 公司, 货号: 10004-H02H) 抗原用 PBS(0.01M Na₂HPO₄ · 12H₂O+0.002M KH₂PO₄+0.14M NaCl+0.002M KCl, pH = 8.6) 稀释至 5 μg/ml, 按照 100 μl/孔加入酶标板中, 4℃包被过夜。PBST(含 0.05%吐温 20 的 PBS 缓冲液) 洗板 4 次后加入 5% BSA(购自 Amresco, 货号: 0332-100g, 溶液为 PBS) 300 μl/孔, 37℃封闭 1 小时。再用 PBST 洗板 2 次。将含有 7×10¹⁰独立克隆的全人源 scFv 噬菌体抗体文库(此抗体库由优瑞科(北京)生物技术有限公司以多个健康人淋巴细胞的抗体可变区基因与人工合成的重链 CDR3 基因组合构建而成)的悬液按照 100 μl/孔加入酶标板中, 在 37℃条件下孵育 2 小时。孵育结束后, 吸出酶标板孔中的噬菌体悬液, 然后在每孔中加入 PBST 300 μl/孔, 充分吹打一遍, 每遍 5 分钟, 以去除与包被抗原的非特异性结合的噬菌体。加入含 0.1% BSA(购自 Amresco, 货号: 0332-100g, 溶液为 PBS) 的 0.2M 甘氨酸-盐酸(pH = 2.2) 洗脱液, 室温孵育 10 分钟后, 充分地吹打, 洗脱特异性地粘附于包被抗原上的噬菌体。将洗脱下的噬菌体悬液用 1M Tris-HCl(pH9.1) 缓冲液中和。将洗脱的噬菌体感染加入 1ml 对数期的 TG1(OD600 约 0.3 ~ 0.4)(Lucigen, 货号: 60500-0, 美国) 进行感染, 37℃, 静置 1 小时。将感染后菌液取 10 μl 进行 10 倍梯度稀释, 进行 10 倍、100 倍、1000 倍稀释后涂平板计数。取 90 μl 感染后菌液保存甘油菌, 甘油终浓度为 10%, 放 -80℃保存。剩余侵染后菌液全部涂于 150mm 2×YT-A 固体平板(17g/L 胰化蛋白胨, 10g/L 酵母提取物, 5g/L 氯化钠, 15g/L 琼脂, 100 μg/ml 氨苄青霉素), 37℃过夜培养。加入 5ml 2×YT-A-10%甘油培养基到 150mm 平板菌上过夜培养, 并用无菌涂布棒轻轻刮下, 到平板上无残留菌液即可。第二轮扩增, 取适量刮取得菌液到 5ml 2×YT-AMP-glucose 液体培养基(17g/L 胰化蛋白胨, 10g/L 酵母提取物, 5g/L 氯化钠, 2%葡萄糖, 100 μg/ml 氨苄青霉素) 中(OD600 约 0.05 ~ 0.1 即可), 37℃、200rpm 培养到对数期(OD600 约 0.3 ~ 0.4), 加入 20 倍菌体总数的 M13K07 辅助噬菌体(NEB 公司, 货号: N0315S, 美国) 侵染, 37℃, 1 小时。侵染完后 1500g, 5 分钟收集菌体重悬于 2×YT-AMP-Kana 培养基中(17g/L 胰化蛋白胨, 10g/L 酵母提取物, 5g/L 氯化钠, 50 μg/ml 卡那霉素, 100 μg/ml 氨苄青霉素), 30℃、200rpm 过夜培养, 完成重组噬菌体的扩增制备。进行相同的第二轮淘选, 第三轮扩增和淘选。挑取菌落到 5ml (2×YT-AMP-glucose

液体培养基 (17g/L 胰化蛋白胨, 10g/L 酵母提取物, 5g/L 氯化钠, 2% 葡萄糖, 100 μ g/ml 氨苄青霉素), 37℃、200rpm 过夜培养。质粒提取试剂盒 (Qiagen 公司, 货号: 12943, 美国) 抽提质粒, 通过测序鉴定, 质粒 -80℃ 保存。

[0044] 实施例 2 用酶联免疫吸附法 (ELISA) 鉴定特异性结合人 HER2-Fc 噬菌体的免疫反应性

[0045] 用酶联免疫吸附法 (ELISA) 进一步鉴定实施例 1 中得到的特异性结合人 HER2-Fc 噬菌体的免疫反应性。人 HER2-Fc 抗原 (购自 Sino Biological 公司, 货号: 10004-H02H) 用 PBS (pH = 8.6) 稀释 2 μ g/ml, 按照 100 μ l/ 孔加入酶标板中, 4℃ 包被过夜。PBST 洗板 4 次后加入 5% BSA (购自 Amresco, 货号: 0332-100g, 溶液为 PBS) 300 μ l/ 孔, 37℃ 封闭 1 小时。再用 PBST 洗板 2 次, 加入 100 μ l/ 孔噬菌体克隆悬液, 在 37℃ 条件下孵育 2 小时。PBST 洗板 4 次。加入 HRP 标记的抗 M13K07 噬菌体抗体 (GE, 货号: 27-9421-01, PBST 1:5000 稀释, 100 μ l/ 孔), 室温孵育 1 小时。PBST 洗板 4 次, 加入 100 μ l/ 孔可溶型单组分 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺底物溶液 (Tiangen, 货号: PA107-01)。室温孵育 15 分钟显色, 加入 50 μ l/ 孔终止液 (1M 硫酸), 在多功能酶标仪 (Bio-Rad, Model 680Micro reader) 上 450/570nm 波长下读出吸光值。

[0046] 结果显示, 经过三轮重复筛选, 共获得 1312 个可与人 HER2-Fc 抗原结合的 scFv 噬菌体克隆, 其中 499 个可与人 HER2-Fc 抗原特异性结合的 scFv 噬菌体克隆数。经 DNA 测序, 这些克隆中有 102 种 DNA/ 氨基酸序列都不相同的 scFv (如表 1 所示)。

[0047] 表 1

[0048]

筛选得到可与 HER2-Fc 结合的克隆数	可与人 HER2-Fc 特异性结合的克隆数	可与人 HER2-Fc 特异性结合且核苷酸有唯一序列的克隆数
1312	499	102

[0049] 实施例 3 用 ELISA 法检测 102 个人 HER2-Fc 特异性 scFv 的种属交叉反应和 HER 家族成员分子间的交叉反应

[0050] 用 ELISA 法检测 102 个人 HER2-Fc 特异性 scFv 的种属交叉反应和与 HER 家族成员分子间的交叉反应。方法同实施例 2, 将包被的人 HER2-Fc 抗原分别换成猴 HER2-Fc (购自 Sino Biological 公司, 货号: 90295-C02H)、小鼠 HER2-Fc (购自 Sino Biological 公司, 货号: 50714-M02H)、人 HER1-Fc (购自 Sino Biological 公司, 货号: 10001-H02H)、人 HER3-Fc (购自 Sino Biological 公司, 货号: 10201-H05H) 和人 HER4-Fc (购自 Sino Biological 公司, 货号: 10363-H02H)。抗原用 PBS (pH = 8.6) 稀释 2 μ g/ml, 按照 100 μ l/ 孔加入酶标板中, 4℃ 包被过夜。PBST 洗板 4 次后加入 5% BSA (购自 Amresco, 货号: 0332-100g, 溶液为 PBS) 300 μ l/ 孔, 37℃ 封闭 1 小时。再用 PBST 洗板 2 次, 加入 100 μ l/ 孔 102 个 scFv 噬菌体克隆悬液, 在 37℃ 条件下孵育 2 小时。PBST 洗板 4 次。加入 HRP 标记的抗 M13K07 噬菌体抗体 (购自 GE, 货号: 27-9421-01, PBST 1:5000 稀释, 100 μ l/ 孔), 室温孵育 1 小时。PBST 洗板 4 次, 加入 100 μ l/ 孔可溶型单组分 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺底物溶液 (购自 Tiangen, 购自: PA107-01)。室温孵育 15 分钟显色, 加入 50 μ l/ 孔终止液 (1M 硫酸), 在多功能酶标仪 (Bio-Rad, Model 680Micro reader) 上 450/570nm 波长下读出

吸光值。

[0051] 结果显示,有 96 个 scFv 噬菌体克隆与猴 HER2-Fc 抗原交叉反应,其中有 20 个 scFv 噬菌体克隆与鼠 HER2-Fc 抗原交叉反应。所有的 102 个克隆与人 HER1-Fc、人 HER3-Fc 和人 HER4-Fc 抗原均无交叉反应(如表 2 所示)。

[0052] 表 2

[0053]

抗原	猴 HER2-Fc	小鼠 HER2-Fc	人 HER1-Fc	人 HER3-Fc	人 HER4-Fc
克隆数	96	20	0	0	0

[0054] 实施例 4102 个 scFv 噬菌体克隆的亲和力排序

[0055] 102 个 scFv 噬菌体克隆通过 ELISA 法亲和力排序,将人 HER2-Fc 抗原用 PBS 缓冲液从 25 μ g/ml 开始十倍比稀释共 8 个梯度,分别与 102 个 scFv 噬菌体克隆的噬菌体悬液在室温孵育 4 小时以达到平衡;将所得到的混合液加入到 2 μ g/ml 人 HER2-Fc 抗原(pH = 8.6PBS, 4℃过夜, 100 μ l/孔)事先包被的酶标板中,并以 5% BSA(购自 Amresco, 货号: 0332-100g, 溶液为 PBS)封闭好的酶标板,以结合未被捕获的 scFv 抗体。加入 HRP 标记的抗 M13 噬菌体抗体(购自 GE, 货号: 27-9421-01, 以 PBST1:5000 稀释, 100 μ l/孔),以与实施例 2 相同的方法检测。以 IC₅₀ 值对 102 个阳性克隆的亲和力进行排序(IC₅₀ 值越低,亲和力越高)。

[0056] 结果显示了 102 个 scFv 噬菌体克隆的 IC₅₀ 值分布范围,其中有 4 个克隆的亲和力高于赫赛汀。

[0057] 表 3

[0058]

IC ₅₀ (nM)	≤ 2.0	2.0-10.	10.0-100.0	> 100.0	未测出
克隆数	4	21	37	25	15

[0059] 实施例 5GB235-019 和 GB235-042 重组全长 IgG1 型抗体的真核表达载体的构建

[0060] 从 102 个 scFv 噬菌体克隆序列中,构建 GB235-019 和 GB235-042 重组全长 IgG1 型抗体的真核表达载体。经全人源 scFv 噬菌体文库筛选得到 WG1-019(scFv 噬菌体文库筛选中得到单链抗体序列克隆命名为 WG1-019)单链抗体克隆的核苷酸序列为 SEQ ID NO:9,其包含的重链可变区序列和轻链可变区的核苷酸序列分别为 SEQ ID NO:3(编码的氨基酸序列为 SEQ ID NO:1)和 SEQ ID NO:4(编码的氨基酸序列为 SEQ ID NO:2)。

[0061] 得到 WG1-042((scFv 噬菌体文库筛选中得到单链抗体序列克隆命名为 WG1-042))单链抗体的克隆核苷酸序列为 SEQ ID NO:14,其包含的重链可变区序列和轻链可变区的核苷酸序列分别为 SEQ ID NO:12(编码的氨基酸序列为 SEQ ID NO:10)和 SEQ ID NO:13(编码的氨基酸序列为 SEQ ID NO:11)。信号肽氨基酸序列为:MELGLSWIFLLAILKGVQC;核苷酸序列为:ATGGAGTTGGGACTGTCTTGGATTTTCTGTTGGCTATTCTGAAAGGTGTGCAGTGT(由上海捷瑞生物工程有限公司合成)。

[0062] GB235-019 和 GB235-042 重组全长抗体的重链恒定区和轻链恒定区的核苷酸序列

为别为 SEQ ID NO:7(编码的氨基酸序列为 SEQ ID NO:5)和 SEQ ID NO:8(编码的氨基酸序列为 SEQ ID NO:6)(由上海捷瑞生物工程有限公司合成)。

[0063] 设计引物用于构建 GB235-019 和 GB235-042 重组全长 IgG1 型抗体重链和轻链的真核表达载体,引物序列如下:

- [0064] 1-1:5'-GAATTCGCGCCGCATGGAGTTGGGACTG-3'
[0065] 2-3:5'-CTGGGTCATCTGGATGTCACACTGCACACCTTTC-3'
[0066] 3-3:5'-GAAAGGTGTGCAGTGTGACATCCAGATGACCCAG-3'
[0067] 4-3:5'-GATGGTGCAGCCACAGTACGTTTGATATCCACTTTG-3'
[0068] 4-4:5'-GATGGTGCAGCCACAGTACGTTTGATCTCCACCTTG-3'
[0069] 5-2:5'-ATCAAACGTACTGTGGCTGCACCATC-3'
[0070] 6-1:5'-GTTTAAACGGATCCCTAACACTCTCCCCTGTTG-3'
[0071] 7-6:5'-GCACCAGCTGGACCTGACACTGCACACCTTTC-3'
[0072] 7-7:5'-GTACCAGCTGGACCTCACACTGCACACCTTTC-3'
[0073] 8-6:5'-GAAAGGTGTGCAGTGTGAGGTCCAGCTGGTGC-3'
[0074] 8-7:5'-GAAAGGTGTGCAGTGTGAGGTCCAGCTGGTAC-3'
[0075] 9-1:5'-GATGGGCCCTTGTTGGAGGCTGAGGAGACGGTCAC-3'
[0076] 10-1:5'-ACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATC-3'
[0077] 11-1:5'-GTTTAAACGGATCCTCATTACCGGGAGACAGGGAG-3'

[0078] 以合成的信号肽序列为模板,1-1 和 2-3 为引物,由 PCR 方法扩增获得含 EcoR I 酶切位点的基因片段,命名为“SPL-GB235-019”;以合成的轻链可变区序列 SEQ ID NO:4 为模板,3-3 和 4-4 为引物,PCR 法扩增获得轻链可变区基因片段,命名为“VL-GB235-019”;同时以合成的轻链恒定区序列 SEQ ID NO:8 为模板,5-2 和 6-1 为引物,PCR 法扩增获得含 TGA 终止密码子和 BamH I 酶切位点的重链恒定区基因片段,命名为“CL-GB235-019”。以 SPL-GB235-019、VL-GB235-019、CL-GB235-019 基因片段为模板,1-1 和 6-1 为引物,通过 over-lapping PCR 方法(Higuchi R,et al.A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments:study of protein and DNA interactions.Nucleic Acids Research,1988,16(15):7351-67.) 扩增获得 GB235-019 抗体的轻链全长基因片段。以合成的信号肽序列为模板,1-1 和 2-3 为引物,由 PCR 方法扩增获得含 EcoR I 酶切位点的基因片段,命名为“SPL-GB235-042”;以合成的轻链可变区序列 SEQ ID NO:13 为模板,3-3 和 4-3 为引物,PCR 法扩增获得轻链可变区基因片段,命名为“VL-GB235-042”;同时以合成的轻链恒定区序列 SEQ ID NO:8 为模板,5-2 和 6-1 为引物,PCR 法扩增获得含 TGA 终止密码子和 BamH I 酶切位点的轻链恒定区基因片段,命名为“CL-GB235-042”。以 SPL-GB235-042、VL-GB235-042、CL-GB235-042 基因片段为模板,1-1 和 6-1 为引物,通过 over-lapping PCR 方法扩增获得 GB235-042 抗体的轻链全长基因片段。

[0079] 同样的方法,以合成的信号肽序列为模板,1-1 和 7-7 为引物,由 PCR(聚合酶链反应)方法扩增获得含 EcoR I 酶切位点的基因片段,命名为“SPH-GB235-019”;以合成的重链可变区序列 SEQ ID NO:3 为模板,8-7 和 9-1 为引物,PCR 法扩增获得重链可变区基因片段,命名为“VH-GB235-019”;同时以合成的重链恒定区序列 SEQ ID NO:7 为模板,10-1 和 11-1 为引物,PCR 法扩增获得含 TGA 终止密码子和 BamH I 酶切位点的重链恒定区基因片

段,命名为“CH-GB235-019”。以 SPH-GB235-019、VH-GB235-019、CH-GB235-019 基因片段为模板,1-1 和 11-1 为引物,通过 over-lapping PCR 方法扩增获得 GB235-019 抗体的重链全长基因片段。以合成的信号肽序列为模板,1-1 和 7-6 为引物,由 PCR(聚合酶链反应)方法扩增获得含 EcoR I 酶切位点的基因片段,命名为“SPH-GB235-042”;以合成的重链可变区序列 SEQ ID NO:12 为模板,8-6 和 9-1 为引物,PCR 法扩增获得重链可变区基因片段,命名为“VH-GB235-042”;同时以合成的重链恒定区序列 SEQ ID NO:7 为模板,10-1 和 11-1 为引物,PCR 法扩增获得含 TGA 终止密码子和 BamH I 酶切位点的重链恒定区基因片段,命名为“CH-GB235-042”。以 SPH-GB235-042、VH-GB235-042、CH-GB235-042 基因片段为模板,1-1 和 11-1 为引物,通过 over-lapping PCR 方法扩增获得 GB235-042 抗体的重链全长基因片段。

[0080] 将以上重链和轻链全长基因片段克隆至 pGEM-T 载体(购自 Promega 公司,货号:A3600),使所述基因片段 5' 端含有 EcoR I 酶切位点,3' 端含有 TGA 终止密码子和 BamH I 酶切位点。经 DNA 测序后,将测序正确的克隆用 EcoR I(购自 NEB 公司,货号:R0101S)和 BamH I(购自 NEB 公司,货号:R0136S)双酶切消化(37℃,4 小时),回收目的基因片段。同时将 293 载体(购自 Invitrogen 公司,货号:K8300-01)用 EcoR I 和 BamH I 双酶切消化(37℃,4 小时),回收 293-EcoRI/BamHI 载体片段。

[0081] 将上述酶切获得的抗体重链全长基因片段和轻链全长基因片段分别与 293-EcoRI/BamHI 载体片段用 T4DNA 连接酶(购自 NEB 公司,货号:M0202S)进行连接(16℃,16 小时),热休克法(42℃,90 秒)转化大肠杆菌,铺板(Amp⁺LB 培养基),挑取克隆,EcoRI/BamHI 双酶切消化(37℃,2 小时)进行鉴定筛选,筛选得到含有构建成功的全长抗体重链真核表达载体或全长抗体轻链真核表达载体的克隆。

[0082] 图 1A 为重组全长抗人 HER2 抗体重链(293-VH-CH)表达载体的结构示意图;图 1B 为重组全长抗人 HER2 抗体轻链(293-VL-CL)表达载体的结构示意图。

[0083] 实施例 6GB235-019 和 GB235-042 重组全长 IgG1 型抗体的真核细胞瞬时转染表达及纯化

[0084] 实施例 5 中所构建的 GB235-019 和 GB235-042 重组载体的表达,可采用共转染 FreeStyle 293F 细胞(购自 Invitrogen,货号:R790-07,美国)的方法。转染前 24 小时,将 FreeStyle 293F 细胞按 6×10^5 个细胞/ml 传代,于恒温摇床 135 转/分,37℃,8% CO₂ 条件下培养,使得转染当天的细胞密度(血球板计数法)为 $1.2-1.5 \times 10^6$ 个细胞/ml。用 FreeStyle 293 培养基(购自 Invitrogen 公司,货号:12338-018,美国)稀释细胞,至密度为 1×10^6 个细胞/ml。为确保最佳转染效果,细胞活力(台盼蓝染色法)应大于 95%。

[0085] 将转染用试剂 FreeStyle Max Reagent(购自 Invitrogen 公司,货号:16447-500,美国)轻度颠倒混匀 4 次。将各 315 μg 重链和轻链表达载体质粒分别加入转染用培养液 OptiPRO SFM(购自 Invitrogen 公司,货号:12309-050,美国)中,并用 OptiPRO SFM 补充体积至 10ml,混匀。另取一支离心管,用 OptiPRO SFM 稀释 625 μl FreeStyle Max Reagent 至 10ml,轻度颠倒混匀。将稀释的质粒与稀释的 FreeStyle Max Reagent 混匀,室温孵育 15 分钟。将所得的 20ml 混合液缓慢加入装有 500ml FreeStyle 293F 培养基(购自 Invitrogen 公司,货号:12338-018,美国)的摇瓶中。摇瓶于恒温摇床培养 7 天(135 转/分,37℃,8% CO₂)。冷冻离心机 9000 转/分离心 20 分钟,收集上清液进行下一步蛋白纯化。

[0086] 上述含 GB235-019 抗体或 GB235-042 抗体的 FreeStyle 293F 细胞上清液,经离心后使用蛋白 A(Protein A)柱(购自 GE Healthcare Bio-Sciences 公司)捕获 IgG1 型抗体,用 50mM 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH = 3.3)洗脱,收集洗脱物(0.5ml),加入 100 μ l 1M 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCL)缓冲液(pH = 11.0)中和至中性,经 10K 透析膜(购自上海捷瑞生物工程有限公司,货号:M1915)在磷酸盐缓冲液 PBS(0.01M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ +0.002M KH_2PO_4 +0.14M NaCl+0.002M KCl, pH = 7.2)中透析后,OD280nm 测定蛋白含量。经 0.22 μ m 滤器(购自 Millipore 公司)过滤除菌后 -80℃ 保存。将纯化得到的 GB235-019 和 GB235-042 抗体在终浓度为 50mM 的二硫苏糖醇还原条件下,经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测其纯度和分子量大小。

[0087] 图 2A,图 2B 的结果显示,在完全还原的条件下,GB235-019 抗体和 GB235-042 抗体各呈现分子量为 50KDa 和 25KDa 的两条带,其分别为抗体的重链和轻链条带(赫赛汀为阳性对照,购自 Roche 公司)。这些结果表明,我们所构建的 GB235-019 和 GB235-042 抗体结构正确,其分子量大小与理论值一致。

[0088] 实施例 7 重组全长抗人 HER2GB235-019 和 GB235-042 抗体的免疫学活性鉴定

[0089] 用 ELISA 结合实验验证 GB235-019 和 GB235-042 抗体与人 HER2 抗原的结合能力。方法如下:将人 HER2 抗原(购自 Sino Biological 公司,货号:10004-H08H)抗原用 PBS 缓冲液稀释至 1 μ g/ml,按照 100 μ l/孔加入酶标板中,4℃ 包被过夜。PBST 洗板 4 次后加入 5% BSA 300 μ l/孔(购自 Amresco,货号:0332-100g,溶液为 PBS),室温封闭 1 小时。PBST 洗板 4 次后,将 GB235-019、GB235-042 抗体和赫赛汀(购自 Roche 公司)分别从 10 μ g/ml 开始五倍比稀释共 7 个梯度,按照 100 μ l/孔加入酶标板中,在室温条件下孵育 1 小时。PBST 洗板 4 次,将 HRP 标记的羊抗人 IgG Fc 抗体(购自 CalBiochem 公司)用 PBS 缓冲液以 1:10000 稀释,按照 100 μ l/孔加入酶标板中,室温孵育 1 小时。PBST 洗板 4 次,加入 100 μ l/孔显色液,室温孵育 15 分钟显色,加入 50 μ l/孔终止液,在 M5 多功能酶标仪上 450/630nm 波长下读出吸光值。

[0090] 用 ELISA 结合实验验证 GB235-019 和 GB235-042 抗体分别与猴 HER2(购自 Sino Biological 公司,货号:90295-C08H)、小鼠 HER2(购自 Sino Biological 公司,货号:50714-M08H)、人 HER1(购自 Sino Biological 公司,货号:10001-H08H)、人 HER3(购自 Sino Biological 公司,货号:10201-H08H-10)、人 HER4(购自 Sino Biological 公司,货号:10201-H08H)抗原的交叉反应。方法如下:猴 HER2、小鼠 HER2、人 HER1、人 HER3 或人 HER4 抗原用 PBS 稀释至 1 μ g/ml,按照 100 μ l/孔加入酶标板中,4℃ 包被过夜。PBST 洗板 4 次后加入 5% BSA 300 μ l/孔(购自 Amresco,货号:0332-100g,溶液为 PBS),室温封闭 1 小时。PBST 洗板 4 次后,将 GB235-019 和 GB235-042 抗体分别用 PBS 缓冲液从 10 μ g/ml 开始五倍比稀释共 8 个梯度,按照 100 μ l/孔加入酶标板中,在室温条件下孵育 1 小时。PBST 洗板 4 次,将 HRP 标记的羊抗人 IgG Fc 抗体用 PBS 缓冲液以 1:10000 稀释,按照 100 μ l/孔加入酶标板中,室温孵育 1 小时。PBST 洗板 4 次,加入 100 μ l/孔显色液,室温孵育 15 分钟显色,加入 50 μ l/孔终止液,在 M5 多功能酶标仪上 450/630nm 波长下读出吸光值。

[0091] 图 3A,图 3B 的结果显示,GB235-019,GB235-042 抗体具有与人 HER2 和猴 HER2 抗原特异性的结合能力,图 3C 的结果显示,GB235-019,GB235-042 抗体具有与小鼠 HER2 特异性的结合能力;图 3D 的结果显示,GB235-019,GB235-042 抗体与人 HER1、人 HER3、人 HER4

抗原均没有结合能力,表明 GB235-019,GB235-042 抗体与人 HER2 其它家族成员没有交叉反应。

[0092] 实施例 8 竞争 ELISA 法鉴定重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 与 GB235-042 分别与赫赛汀的表位竞争结果

[0093] 将人 HER2 抗原(购自 Sino Biological 公司,货号:10004-H08H)用 PBS 缓冲液稀释至 $1\mu\text{g/ml}$,按照 $100\mu\text{l}$ /孔加入酶标板中, 4°C 包被过夜。PBST 洗板 4 次后加入 5% BSA $300\mu\text{l}$ /孔(购自 Amresco,货号:0332-100g,溶液为 PBS),室温封闭 1 小时。将 GB235-019 和 GB235-042 抗体分别从 $10\mu\text{g/ml}$ 开始十倍比稀释共 8 个梯度,分别与 $0.005\mu\text{g/ml}$ 生物素标记(由上海友科生物科技有限公司标记)的赫赛汀在室温孵育 2 小时,按照 $100\mu\text{l}$ /孔加入酶标板中,室温孵育 1 小时;PBST 洗板 4 次,将 HRP 标记的抗生物素抗体(购自 Invitrogen 公司)用 PBS 缓冲液以 1:10000 稀释,按照 $100\mu\text{l}$ /孔加入酶标板中,室温孵育 1 小时。PBST 洗板 4 次,加入 $100\mu\text{l}$ /孔显色液,室温孵育 15 分钟显色,加入 $50\mu\text{l}$ /孔终止液,在 M5 多功能酶标仪上 $450/570\text{nm}$ 波长下读出吸光值。

[0094] 图 7 结果显示,GB235-019 和 GB235-042 抗体都与赫赛汀不发生竞争,表明其结合表位在赫赛汀的结合表位之外。

[0095] 实施例 9 竞争 ELISA 法鉴定重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 与帕妥珠的表位竞争结果

[0096] 将人 HER2 抗原(购自 Sino Biological 公司,货号:10004-H08H)用 PBS 缓冲液稀释至 $1\mu\text{g/ml}$,按照 $50\mu\text{l}$ /孔加入酶标板中, 4°C 包被过夜。PBST 洗板 4 次后加入 2% BSA $200\mu\text{l}$ /孔(购自 Amresco,货号:0332-100g,溶液为 PBS),室温封闭 2 小时。将帕妥珠(购自 Roche 公司)和未标记生物素的 GB235-019 抗体从 $30\mu\text{g/ml}$ 开始十倍比稀释 3 个梯度和从 $10\mu\text{g/ml}$ 开始十倍比稀释 3 个梯度,分别与 $0.1\mu\text{g/ml}$ 生物素标记(购自 Invitrogen 公司,APEX Biotin 试剂盒标记,货号:A10495)的 GB235-019 抗体在室温孵育 2 小时,按照 $100\mu\text{l}$ /孔加入酶标板中,室温孵育 1 小时;PBST 洗板 4 次,将 HRP 标记的 Streptavidin 抗体(购自 Invitrogen 公司)用 1% BSA(购自 Amresco,货号:0332-100g,溶液为 PBS)以 1:10000 稀释,按照 $100\mu\text{l}$ /孔加入酶标板中,室温孵育 1 小时。PBST 洗板 4 次,加入 $100\mu\text{l}$ /孔显色液,室温孵育 15 分钟显色,加入 $50\mu\text{l}$ /孔终止液,在 M5 多功能酶标仪(Molecular Devices 公司)上 $450/630\text{nm}$ 波长下读出吸光值。

[0097] 图 8 结果显示,GB235-019 抗体与帕妥珠不发生竞争,表明其结合表位在帕妥珠的结合表位之外。

[0098] 实施例 10 重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 的体外细胞结合活性测定

[0099] 乳腺癌细胞 BT-474(购自美国典型培养物保藏中心,登录号:HTB-20)中等水平的 HER2 和中等水平的 HER3,同时表达高水平的 P-HER2,但不表达 P-HER3(Richard M. Neve. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. CANCER CELL, 2006, 515-527.)。BT-474 细胞以 $2.0 \times 10^5/100\mu\text{l}$ 接种 96 孔 U 型板。同时将本发明的抗体 GB235-019 与赫赛汀(购自 Roche 公司),帕妥珠(购自 Roche 公司),分别从 $20\mu\text{g/ml}$ 开始,用 PBS 含 0.1% 胎牛血清(购自 Invitrogen 公司,货号:10099-141)缓冲液进行三倍比稀释共 7 个梯度,分别为 20, 6.6, 2.2, 0.74, 0.25, 0.08, $0.03\mu\text{g/ml}$ 。

[0100] 96 孔 U 型板的细胞 1000rpm, 5min 离心后弃上清, 稀释后的 GB235-019 抗体, 赫赛汀和帕妥珠按照 100 μ l/ 孔分别加入 BT-474 细胞, 在 4℃ 孵育 1 小时。再次离心后弃上清, 用 200 μ l PBS-0.1% FBS 缓冲液洗涤 2 次, 加入 FITC 标记的羊抗人 Fc 抗体 (购自 Abcam 公司, 英国, 货号: ab97224), 100 μ l/ 孔 (用 PBS 含 0.1% 胎牛血清缓冲液 1:10000 稀释), 并在 4℃ 孵育 45 分钟。细胞离心后, 用 200 μ l/ 孔 PBS 含 0.1% 胎牛血清缓冲液洗涤 2 次, 加入 200 μ l PBS 含 0.1% 胎牛血清缓冲液, 并连同细胞转移到含有 300 μ l PBS 含 0.1% 胎牛血清缓冲液的流式管的样品管 (Beckman), 重悬样品管中的细胞, 流式细胞仪检测 (FC500, Beckman) 检测 FITC 荧光值。通过分析荧光值与抗体浓度的曲线表示相应抗体与 BT-474 细胞亲和力。

[0101] 图 9 的结果显示, GB235-019 抗体和赫赛汀、帕妥珠一样可结合于表达 HER2 的 BT-474 细胞表面, 且呈现出浓度依赖性和可饱和性, 表明 GB235-019 抗体对 HER2 有高度选择性。GB235-019 抗体与 BT-474 细胞在结合率为 50% 时所对应的半结合浓度为 0.77 μ g/ml, 赫赛汀与 BT-474 细胞在结合率为 50% 时所对应的半结合浓度为 0.48 μ g/ml, 帕妥珠与 BT-474 细胞的在结合率为 50% 时所对应的半结合浓度 (结合率为 50% 时所对应的浓度) 为 1.62 μ g/ml。本发明的 GB235-019 抗体与 BT-474 细胞的结合活性与赫赛汀类似, 优于帕妥珠。

[0102] 实施例 11 重组全长抗人 HER2GB235-019 抗体体外抑制 SK-BR-3 细胞增殖活性

[0103] 乳腺癌 SK-BR-3 细胞表达高水平的 HER2 和中等水平的 HER3, 同时表达高水平的 P-HER2 和中等水平的 P-HER3 (Richard M. Neve. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. CANCER CELL, 2006: 515-527.)。将处于对数生长期的 SK-BR-3 细胞 (购自美国典型培养物保藏中心, 登录号: HTB-30) 以 5000 个细胞每孔于 RPMI1640 (购自 Invitrogen 公司, 货号: A10491) 含 10% 胎牛血清 (购自 Invitrogen 公司, 货号: 10099-141) 的完全培养基中培养到 96 孔培养板, 37℃, 5% CO₂ 中培养 24 小时。GB235-019 抗体单独用药和与赫赛汀联合用药抑制试验。单独用药组分别加入 GB235-019 抗体和赫赛汀 (工作终浓度为 75, 18.8, 4.7, 1.2, 0.29, 0.07, 0.018, 0.005, 0.0011, 0 μ g/ml)。37℃, 5% CO₂ 中继续培养 72 小时。加入 AlamarBlue (购自 Invitrogen 公司, 货号: DAL1100) 检测 SK-BR-3 细胞活性, 在 M5 多功能酶标仪 (Molecular Devices 公司) 上 544/590nm 波长下读取荧光值。

[0104] 完全培养基中添加 Heregulin α (购自 R&D 公司, 货号: 296-HR) 诱导增殖的抑制试验中, 单独用药组分别加入 GB235-019 抗体和赫赛汀 (工作终浓度为 75, 18.8, 4.7, 1.2, 0.29, 0.07, 0.018, 0.005, 0.0011, 0 μ g/ml), 同时联合用药组加入以上述每个剂量的 GB235-019 抗体和赫赛汀。在上述 GB235-019 抗体单独用药和与赫赛汀联合用药处理 2 小时后, 加入工作终浓度为 100ng/ml 的 Heregulin α 溶液, 设置未加 Heregulin α 溶液的孔, 37℃, 5% CO₂ 中继续培养 72 小时。加入 AlamarBlue (购自 Invitrogen 公司, 货号: DAL1100) 检测 SK-BR-3 细胞活性, 在 M5 多功能酶标仪 (Molecular Devices 公司) 上 544/590nm 波长下读取荧光值。

[0105] 图 7A 显示了重组全长抗人 HER2GB235-019 抗体体外抑制 SK-BR-3 细胞增殖活性的实验结果。结果显示, 赫赛汀在完全培养基中能抑制 SK-BR-3 细胞增殖, 并呈现出浓度依赖性。GB235-019 抗体在完全培养基中不能抑制 SK-BR-3 细胞增殖。

[0106] 图 7B 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 抗体体外逆转 Heregulin α 诱导 SK-BR-3 细胞对赫赛汀耐药作用的实验结果。结果显示,完全培养基中添加 Heregulin α , Heregulin α 诱导了 SK-BR-3 的增殖。SK-BR-3 对赫赛汀单独给药变得不敏感,GB235-019 抗体单独给药也没有抑制作用,而 GB235-019 抗体和赫赛汀联合给药抑制了 Heregulin α 的诱导增殖作用,并呈现出浓度依赖性。乳腺癌 SK-BR-3 细胞表达高水平的 HER2 和中等水平的 HER3,同时表达高水平的 P-HER2 和中等水平的 P-HER3。赫赛汀抑制 SK-BR-3 细胞 P-HER2 驱动的生长作用,但不能抑制 Heregulin α 诱导 SK-BR-3 细胞的生长作用。生长因子 Heregulin α 使 SK-BR-3 细胞产生了对赫赛汀的耐药性,GB235-019 抗体和赫赛汀联合给药抑制了生长因子 Heregulin α 对 SK-BR-3 细胞的诱导生长作用。

[0107] 实施例 12 重组全长抗人 HER2GB235-019 抗体对乳腺癌 SK-BR-3 细胞信号转导的抑制作用

[0108] 将处于对数生长期的 SK-BR-3 细胞以 1.8×10^5 细胞每孔于 RPMI1640 (购自 Invitrogen 公司,货号:A10491) 含 10% 胎牛血清 (购自 Invitrogen 公司,货号:10099-141) 完全培养基中培养到 6 孔培养板,37℃,5% CO₂ 中培养 24 小时。第二天,弃去培养基换成 0.1% 胎牛血清 (购自 Invitrogen 公司,货号:10099-141) 的低血清培养基培养 24 小时。随后添加 GB235-019 抗体 20 μ g/ml,赫赛汀 20 μ g/ml 单独给药,以及 GB235-019 抗体和赫赛汀的联合给药,抗体处理 SK-BR-3 细胞 6 小时后,添加终浓度为 100ng/ml 的 Heregulin α (购自 R&D 公司,货号:296-HR) 诱导 15 分钟,设置未加 Heregulin α 的空白对照孔。4℃ 预冷的 PBS 洗涤一次后终止反应,添加 120 μ l LDS (购自 Invitrogen 公司,货号:NP0007),冰上放置并迅速收集细胞裂解液,-80℃ 保存备用。

[0109] 收集的细胞裂解液在终浓度为 50mM 的二硫苏糖醇 (购自 Sangon 公司,货号:D0281) 还原条件下,经 Western-blot 分析检测抗体对 Heregulin α (购自 R&D 公司,货号:296-HR) 诱导 SK-BR-3 细胞中 HER-3, Akt 和 ERK1/2 磷酸化的影响。Western-blot 方法如下:将电泳后的胶通过电转移 (300mA, 80 分钟) 的方法转移至 NC 膜上 (购自 Pall 公司,货号:S80209),5% 脱脂奶粉 (购自 Sangon 公司,货号:NB0669) 封闭后分别加入以 1:1000 稀释的兔一抗 P-HER3Y1289 (购自 Cell Signaling Technology 公司,货号:8017),1:1000 稀释的兔一抗 P-AktS473 (购自 Cell Signaling Technology 公司,货号:4060),1:1000 稀释的兔一抗 Akt (购自 Cell Signaling Technology 公司,货号:4691),1:500 稀释的兔一抗 P-ERK1/2 (购自 Cell Signaling Technology 公司,货号:4370),1:1000 稀释的兔一抗 ERK1/2 (购自 Cell Signaling Technology 公司,货号:4695),1:5000 稀释的兔一抗 GAPDH (Cell Signaling Technology 公司,货号:5174),4℃ 孵育过夜。用 1×TBST 洗三遍,洗膜后再加入 1:10000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔抗体 (购自 MERCK 公司,货号:401315),用 1×TBST 洗三遍,后再加入 ECL (购自 PerkinElmer 公司,货号:NEL104001EA) 显示,胶片曝光记录信号 (购自 Kodak 公司,货号:FF057)。

[0110] 图 8 的结果显示,相比较不加 Heregulin α 的对照组,Heregulin α 引起 SK-BR-3 细胞 HER3 磷酸化的上调作用。GB235-019 抗体与赫赛汀各自单独用药轻微抑制了 Heregulin α 对 SK-BR-3 细胞中 HER3 磷酸化的上调作用,相比较单独给药,GB235-019 抗体与赫赛汀的联合用药,完全逆转了 Heregulin α 对 HER3 磷酸化的上调作用。同时,GB235-019 抗体与赫赛汀单独用药,没有抑制 Heregulin α 对 Akt 磷酸化的上调作用,相比

较单独给药, GB235-019 抗体与赫赛汀的联合用药明显抑制了 Heregulin α 对 Akt 磷酸化的上调作用。GB235-019 抗体与赫赛汀单独用药, 也明显抑制了 Heregulin α 对 ERK1/2 磷酸化的上调作用, 而 GB235-019 抗体与赫赛汀联合用药完全逆转了 Heregulin α 对 ERK1/2 磷酸化的上调作用。

[0111] 实施例 13 重组全长抗人 HER2GB235-019 抗体体外抑制乳腺癌 BT-474 细胞增殖活性

[0112] 乳腺癌 BT-474 细胞表达中等水平的 HER2 和中等水平的 HER3, 同时表达高水平的 P-HER2, 但不表达 P-HER3 (Richard M. Neve. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. CANCER CELL, 2006:515-527)。将处于对数生长期的 BT-474 细胞以 5000 细胞每孔于 RPMI1640 (购自 Invitrogen 公司, 货号: A10491) 含 10% 胎牛血清 (购自 Invitrogen 公司, 货号: 10099-141) 完全培养基中培养到 96 孔培养板, 37°C, 5% CO₂ 中培养 24 小时。GB235-019 抗体单独用药和与赫赛汀联合用药抑制试验。单独用药组分别加入 GB235-019 抗体和赫赛汀 (工作终浓度为 75, 18.8, 4.7, 1.2, 0.29, 0.07, 0.018, 0.005, 0.0011, 0 μ g/ml), 同时联合用药组加入以上每个剂量的 GB235-019 抗体和赫赛汀。37°C, 5% CO₂ 中继续培养 72 小时。加入 AlamarBlue (购自 Invitrogen 公司, 货号: DAL1100) 检测 BT-474 细胞活性, 在 M5 多功能酶标仪 (Molecular Devices 公司) 上 544/590nm 波长下读取荧光值。

[0113] 完全培养基中添加 Heregulin α (购自 R&D 公司, 货号: 296-HR) 的增殖抑制试验中, 在上述 GB235-019 抗体单独用药和与赫赛汀联合用药处理 2 小时后, 加入工作终浓度为 100ng/ml 的 Heregulin α 溶液, 设置未加 Heregulin α 溶液的孔, 37°C, 5% CO₂ 中继续培养 6 天。加入 AlamarBlue (购自 Invitrogen 公司, 货号: DAL1100) 检测 BT-474 细胞活性, 在 M5 多功能酶标仪 (Molecular Devices 公司) 上 544/590nm 波长下读取荧光值。

[0114] 图 9A 显示了重组全长抗人 HER2GB235-019 抗体体外抑制 BT-474 细胞增殖活性的实验结果。结果显示, 赫赛汀在完全培养基中能抑制 BT-474 细胞增殖, 并呈现出浓度依赖性。GB235-019 抗体在完全培养基中不能抑制 BT-474 细胞增殖。GB235-019 抗体与赫赛汀联合用药, 没有增加赫赛汀的抑制作用。

[0115] 图 9B 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 抗体体外逆转 Heregulin α 诱导 BT-474 细胞对赫赛汀耐药作用的实验结果。结果显示, 完全培养基中添加 Heregulin α , Heregulin α 诱导了 BT-474 细胞的增殖。BT-474 细胞对赫赛汀单独给药变得不敏感, GB235-019 抗体单独给药也没有抑制作用。而 GB235-019 抗体和赫赛汀联合给药抑制了 Heregulin α 诱导的增殖作用。GB235-019 抗体和赫赛汀联合给药使得不仅抑制了 Heregulin α 诱导 BT-474 细胞增殖的作用, 并明显抑制到低于 Heregulin α 诱导前的水平, 并呈现出浓度依赖性。

[0116] 乳腺癌 BT-474 细胞表达中等水平的 HER2 和中等水平的 HER3, 同时表达高水平的 P-HER2, 但不表达 P-HER3。赫赛汀抑制 P-HER2 驱动的生长作用, 但不能抑制 Heregulin α 诱导 BT-474 细胞的生长作用。生长因子 Heregulin α 使 BT-474 细胞产生了对赫赛汀的耐药性, GB235-019 抗体和赫赛汀联合给药抑制了生长因子 Heregulin α 对 BT-474 细胞的诱导生长作用, 并且明显抑制到低于 Heregulin α 诱导前的水平, GB235-019 抗体和赫赛汀联合给药不仅关闭了 HER2 信号通路驱动的生长作用, 也关闭了 HER3 信号通路驱动的生长作

用,产生协同抑制作用。

[0117] 实施例 14 重组全长抗人 HER2GB235-019 抗体体外对乳腺癌 BT-474 细胞信号转导的抑制作用

[0118] 将处于对数生长期的 BT-474 细胞 1.8×10^5 细胞每孔于 RPMI1640 完全培养基中培养到 6 孔培养板, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 中培养 24 小时。第二天, 弃去培养基换成含 0.1% 血清的低血清培养基饥饿培养 24 小时。随后添加 GB235-019 抗体 $20 \mu\text{g/ml}$, 赫赛汀 $20 \mu\text{g/ml}$ 单独给药, 以及 GB235-019 抗体和赫赛汀的联合给药, 抗体处理 BT-474 细胞 6 小时后, 添加终浓度为 100ng/ml 的 Heregulin α (购自 R&D 公司, 货号: 296-HR) 诱导 10 分钟, 设置未加 Heregulin α 的空白对照孔。 4°C 预冷的 PBS 洗涤一次后终止反应, 添加 $120 \mu\text{l}$ LDS (购自 Invitrogen 公司, 货号: NP0007), 冰上放置并迅速收集细胞裂解液, -80°C 保存备用。

[0119] 收集的细胞裂解液在终浓度为 50mM 的二硫苏糖醇 (购自 Sangon 公司, 货号: D0281) 还原条件下, 经 Western-blot 分析检测抗体对 Heregulin α 诱导 BT-474 细胞 HER3 磷酸化的影响, 以及对 HER3 下游 Akt 和 ERK1/2 磷酸化的影响。 Western-blot 方法同实施例 12。

[0120] 乳腺癌 BT-474 细胞表达高水平的 P-HER2, 但不表达 P-HER3, 是对赫赛汀敏感的细胞株。图 10 的结果显示, 相比较不加 Heregulin α 的对照组, Heregulin α 引起 BT-474 细胞 HER3 磷酸化的上调作用。 GB235-019 抗体与赫赛汀各自单独用药明显抑制了 Heregulin α 对 BT-474 细胞中 HER3 磷酸化的上调作用, 相比较单独给药, GB235-019 抗体与赫赛汀的联合用药, 完全逆转了 Heregulin α 对 HER3 磷酸化的上调作用。同时, GB235-019 抗体与赫赛汀单独用药, 没有抑制 Heregulin α 对 Akt 磷酸化的上调作用, 相比较单独给药, GB235-019 抗体与赫赛汀的联合用药微弱的抑制了 Heregulin α 对 Akt 磷酸化的上调作用。 GB235-019 抗体与赫赛汀单独用药微弱的抑制了 Heregulin α 对 ERK1/2 磷酸化的上调作用, 而 GB235-019 抗体与赫赛汀联合用药完全逆转了 Heregulin α 对 ERK1/2 磷酸化的上调作用。

[0121] 实施例 15 重组全长抗人 HER2GB235-019 抗体体外抑制乳腺癌 MDA-MB-175 VII 细胞的增殖活性

[0122] 乳腺癌 MDA-MB-175 VII 细胞表达中等水平的 HER2 和中等水平的 HER3。同时 MDA-MB-175 VII 细胞是一个内源性分泌 HER 3 配体 Heregulin α 且依赖性的细胞株, 所以 MDA-MB-175 VII 细胞表达高水平的 P-HER3, 但不表达 P-HER2 (Richard M. Neve. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. CANCER CELL, 2006: 515-527.)。将处于对数生长期的 MDA-MB-175 VII (购自美国典型培养物保藏中心, 登录号: HTB-25) 细胞 2×10^4 细胞每孔于 $100 \mu\text{l}$ L-15 (购自 Invitrogen 公司, 货号: 11415-064) 含 10% 胎牛血清 (购自 Invitrogen 公司, 货号: 10099-141) 培养基中培养到 96 孔培养板, 37°C , 空气中培养 24 小时。 GB235-019 抗体单独用药和与赫赛汀联合用药抑制试验。单独用药组分别加入 GB235-019 抗体和赫赛汀, 工作终浓度为 (75, 18.8, 4.7, 1.2, 0.29, 0.07, 0.018, 0.005, 0.0011, $0 \mu\text{g/ml}$), 同时联合用药组加入上述每个剂量的 GB235-019 抗体和赫赛汀。 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 中继续培养 6 天。加入 AlamarBlue (购自 Invitrogen 公司, 货号: DAL1100) 检测 MDA-MB-175 VII 细胞活性, 在 M5 多功能酶标仪 (Molecular Devices 公司) 上 $544/590\text{nm}$ 波长下读取荧光值。

[0123] 图 11 显示了重组全长抗人 HER2GB235-019 抗体体外抑制 MDA-MB-175 VII 细胞增殖活性的实验结果。结果显示, GB235-019 抗体与赫赛汀单独给药在完全培养基中能微弱的抑制 MDA-MB-175 VII 细胞增殖。GB235-019 抗体与赫赛汀联合用药, 明显增加了协同抑制作用, 并呈现出浓度依赖性。

[0124] 实施例 16 重组全长抗人 HER2GB235-019 抗体体外对乳腺癌 MCF 7 细胞在完全培养基中增殖活性的影响

[0125] 乳腺癌 MCF 7 细胞表达较低水平的 HER2 和高水平 HER3, 但不表达 P-HER2 和 P-HER3 (Richard M. Neve. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. CANCER CELL, 2006:515-527.)。将处于对数生长期的 MCF 7 (购自美国典型培养物保藏中心, 登录号: HTB-22) 细胞 6000 细胞每孔于 RPMI 1640 (购自 Invitrogen 公司, 货号: A10491) 含 10% 胎牛血清 (购自 Invitrogen 公司, 货号: 10099-141) 的完全培养基中培养到 96 孔培养板, 37℃, 5% CO₂ 中培养 24 小时。GB235-019 抗体单独用药和与赫赛汀联合用药抑制试验。单独用药组分别加入 GB235-019 抗体和赫赛汀 (工作终浓度为 75, 18.8, 4.7, 1.2, 0.29, 0.07, 0.018, 0.005, 0.0011, 0 μg/ml), 同时联合用药组加入 GB235-019 抗体和赫赛汀 (工作终浓度均为 75, 18.8, 4.7, 1.2, 0.29, 0 μg/ml)。37℃, 5% CO₂ 中继续培养 72 小时。加入 AlamarBlue (购自 Invitrogen 公司, 货号: DAL1100) 检测 MCF 7 细胞活性, 在 M5 多功能酶标仪 (Molecular Devices 公司) 上 544/590nm 波长下读取荧光值。

[0126] 完全培养基中添加 Heregulin α (购自 R&D 公司, 货号: 296-HR) 的诱导增殖抑制试验中, 在上述 GB235-019 抗体单独用药和与赫赛汀联合用药处理 2 小时后, 加入工作终浓度为 100ng/ml 的 Heregulin α 溶液, 设置未加 Heregulin α 溶液的孔, 37℃, 5% CO₂ 中继续培养 3 天。加入 AlamarBlue (购自 Invitrogen 公司, 货号: DAL1100) 检测 MCF 7 细胞活性, 在 M5 多功能酶标仪 (Molecular Devices 公司) 上 544/590nm 波长下读取荧光值。

[0127] 图 12A 显示了重组全长抗人 HER2GB235-019 抗体体外对完全培养基中抑制 MCF 7 细胞增殖活性的实验结果。结果显示, 赫赛汀与 GB235-019 抗体单独给药在完全培养基中都不能抑制 MCF 7 细胞增殖, 赫赛汀与 GB235-019 抗体联合给药在完全培养基中, 也不能抑制 MCF 7 细胞增殖。

[0128] 图 12B 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 抗体体外对完全培养基中 Heregulin α 诱导 MCF 7 细胞增殖活性的实验结果。结果显示, 完全培养基中添加 Heregulin α, Heregulin α 微弱的诱导了 MCF 7 细胞的增殖。赫赛汀单独给药抑制了 Heregulin α 对 MCF 7 细胞的诱导增殖作用, 并呈现出浓度依赖性, GB235-019 抗体单独给药没有抑制作用。而 GB235-019 抗体和赫赛汀联合给药没有增加赫赛汀的抑制作用。

[0129] 实施例 17 重组全长抗人 HER2GB235-019 抗体体外对乳腺癌 MCF 7 细胞在低血清培养中 Heregulin α 诱导生长的抑制作用

[0130] 乳腺癌 MCF 7 细胞表达较低水平的 HER2 和高水平 HER3, 但不表达 P-HER2 和 P-HER3 (Richard M. Neve. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. CANCER CELL, 2006:515-527.)。将处于对数生长期的 MCF 7 细胞 1×10⁴ 细胞每孔于 100 μl RPMI 1640 (购自 Invitrogen 公司, 货号: A10491) 含 10% 胎牛血清 (购自 Invitrogen 公司, 货号: 10099-141) 完全培养基中培养到

96 孔培养板, 37℃, 5% CO₂ 中培养 24 小时。吸去培养基后, 每孔换成含 0.1% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 饥饿培养 24 小时。GB235-019 抗体单独用药抑制试验, 吸去培养基, 加入 GB235-019 抗体, 工作终浓度为 (30, 6.0, 1.2, 0.24, 0.048, 0.0096, 0.0019, 0.0004, 0 μg/ml)。联合用药抑制试验中, 上述每个剂量的 GB235-019 抗体, GB235-019 抗体上述每个剂量分别与 10ng/ml 和 100ng/ml 的赫赛汀的联合用药组。37℃, 5% CO₂ 中培养 2 小时后, 加入工作终浓度为 100ng/ml 的 Heregulin α 溶液 (购自 R&D 公司, 货号: 296-HR), 设置未加 Heregulin α 溶液的对照孔, 37℃, 5% CO₂ 中继续培养 72 小时。加入 AlamarBlue (购自 Invitrogen 公司, 货号: DAL1100) 检测 MCF 7 细胞活性, 在 M5 多功能酶标仪 (Molecular Devices 公司) 上 544/590nm 波长下读取荧光值, 细胞生长倍数计算时以不加 Heregulin α 诱导的细胞活性的对照组设为 100%。

[0131] 图 13A 和图 13B 显示了重组全长抗人 HER2 抗体 GB235-019 抗体体外对低胎牛血清培养基中 Heregulin α 诱导 MCF 7 细胞增殖活性的实验结果。结果显示, 低胎牛血清培养基中添加 Heregulin α, Heregulin α 诱导了 MCF 7 细胞的增殖。GB235-019 抗体单独给药抑制了 Heregulin α 诱导 MCF 7 细胞的增殖, 并呈现出浓度依赖性。GB235-019 抗体与 10ng/ml 赫赛汀联合给药, 协同抑制了 Heregulin α 诱导 MCF 7 细胞的增殖。GB235-019 抗体与 100ng/ml 赫赛汀联合给药, 协同抑制了 Heregulin α 诱导 MCF 7 细胞的增殖, 增加了最大抑制作用。

[0132] 实施例 18 重组全长抗人 HER2GB235-019 抗体体外对乳腺癌 MCF 7 细胞信号转导的抑制作用

[0133] 乳腺癌 MCF 7 细胞表达较低水平的 HER2 和高水平 HER3, 但不表达 P-HER2 和 P-HER3。评价了 GB235-019 抗体单独用药或与赫赛汀联合用药对 Heregulin α 激活的 HER3 信号通路的抑制作用。

[0134] 将处于对数生长期的 MCF 7 细胞 1.0×10^5 细胞每孔于 RPMI1640 (购自 Invitrogen 公司, 货号: A10491) 含 10% 胎牛血清 (购自 Invitrogen 公司, 货号: 10099-141) 完全培养基中培养到 12 孔板中培养 24 小时。第二天, 弃去培养基换成含 0.1% 胎血清的低血清培养基饥饿培养 24 小时。随后含 20 μg/ml 的 GB235-019 抗体和 20 μg/ml 的赫赛汀的 RPMI-0.1% 胎血清的培养基单独用药处理或者联合用药处理 MCF 7 细胞 6 小时, 随后加入工作终浓度为 100ng/ml 的 Heregulin α (购自 R&D 公司, 货号: 296-HR) 诱导 10 分钟。设置未加 Heregulin α 的空白对照孔。4℃ 预冷的 PBS 洗涤一次后终止反应, 添加 120 μl LDS (购自 Invitrogen 公司, 货号: NP0007), 冰上放置迅速收集细胞裂解液, -80℃ 保存备用。

[0135] 收集的细胞裂解液在终浓度为 50mM 的二硫苏糖醇还原条件下, 经 Western-blot 分析检测抗体对 Heregulin α 诱导 MCF 7 细胞 HER3 磷酸化的影响, 以及对 HER3 下游 Akt 和 ERK1/2 磷酸化的影响。Western-blot 方法同实施例 12。

[0136] 图 14 显示了 GB235-019 抗体对乳腺癌 MCF 7 细胞信号转导的抑制作用。图 14 的结果显示, 相比较不加 Heregulin α 的对照组, Heregulin α 引起 MCF 7 细胞 HER3 磷酸化的上调作用。GB235-019 抗体与赫赛汀各自单独用药明显抑制了 Heregulin α 对 MCF 7 细胞中 HER3 磷酸化的上调作用, 相比较单独给药, GB235-019 抗体与赫赛汀的联合用药, 完全逆转了 Heregulin α 对 HER3 磷酸化的上调作用。同时, GB235-019 抗体与赫赛汀单独用药, 明显抑制 Heregulin α 对 Akt 磷酸化的上调作用, 相比较单独给药, GB235-019 抗体与赫赛

汀的联合用药完全逆转了 Heregulin α 对 Akt 磷酸化的上调作用。GB235-019 抗体与赫赛汀单独用药明显抑制了 Heregulin α 对 ERK1/2 磷酸化的上调作用,而 GB235-019 抗体与赫赛汀联合用药完全逆转了 Heregulin α 对 ERK1/2 磷酸化的上调作用。

[0137] HER3 受体在 HER2 过度表达的乳腺癌中 HER2 介导的转化和肿瘤进展以及对 HER2 抑制剂治疗获得性的耐药中,发挥至关重要的作用。HER3 的靶向抑制剂在 HER2 依赖性的多个乳腺癌模型中增加了 HER2 受体抑制剂的药效 (Joan T. Garrett. Dual Blockade of HER2 in HER2-Overexpressing Tumor Cells Does Not Completely Eliminate HER3 Function. Clin Cancer Res 2013(19):610-619.)。GB235-019 抗体在低血清培养基中单独给药抑制了 HER3 配体 Heregulin α 诱导 MCF 7 细胞的增殖活性,GB235-019 抗体与 10ng/ml 赫赛汀联合用药可以产生协同抑制 Heregulin α 诱导 MCF7 乳腺癌细胞 (表达较低水平的 HER2 和高水平 HER3,但不表达 P-HER2 和 P-HER3) 的增殖活性,GB235-019 抗体与 100ng/ml 赫赛汀联合用药可以增强赫赛汀抑制 Heregulin α 诱导 MCF 7 细胞增殖活性的最大抑制作用。同时,GB235-019 抗体与赫赛汀在完全培养基中联合用药可以抑制 HER3 配体 Heregulin α 诱导乳腺癌 SK-BR-3 细胞 (表达高水平的 HER2 和中等水平的 HER3,同时表达高水平的 P-HER2 和中等水平的 P-HER3) 增殖作用部分,GB235-019 抗体与赫赛汀在完全培养基中联合用药不仅可以抑制 HER3 配体 Heregulin α 诱导乳腺癌 BT-474 细胞 (表达中等水平的 HER2 和中等水平的 HER3,同时表达高水平的 P-HER2,但不表达 P-HER3) 增殖作用部分,且并明显抑制到低于 Heregulin α 诱导前的水平。GB235-019 抗体在完全培养基中单独给药微弱抑制了乳腺癌 MDA-MB-175 VII 细胞 (表达中等水平的 HER2 和中等水平的 HER3,同时 MDA-MB-175 VII 细胞是一个内源性分泌 HER 3 配体 Heregulin 且依赖性的细胞株,所以 MDA-MB-175 VII 细胞表达高水平的 P-HER3,但不表达 P-HER2) 的增殖活性,GB235-019 抗体与赫赛汀在完全培养基中联合用药可以完全抑制乳腺癌 MDA-MB-175 VII 细胞的增殖作用,并呈现出浓度依赖性。在信号通路的研究中,GB235-019 抗体 20 μ g/ml 单独给药部分抑制了 HER 3 配体 Heregulin α 诱导 SK-BR-3 细胞 HER3 的磷酸化,GB235-019 抗体 20 μ g/ml 与赫赛汀 20 μ g/ml 联合用药完全抑制了配体 Heregulin α 激活的 HER3 信号通路。GB235-019 抗体 20 μ g/ml 单独给药明显抑制了 HER 3 配体 Heregulin α 诱导 BT-474 细胞 HER3 的磷酸化,GB235-019 抗体 20 μ g/ml 与赫赛汀 20 μ g/ml 联合用药也完全抑制了配体 Heregulin α 激活的 HER3 信号通路。同样,GB235-019 抗体 20 μ g/ml 单独给药明显抑制了 HER 3 配体 Heregulin α 诱导 MCF 7 细胞 HER3 的磷酸化,GB235-019 抗体 20 μ g/ml 与赫赛汀 20 μ g/ml 联合用药也完全抑制了配体 Heregulin α 激活的 HER3 信号通路。这些结果表明,GB235-019 抗体通过抑制 HER-3 信号通路,与赫赛汀联合用药在 HER2 高表达的乳腺癌细胞中发挥协同抑制作用。

[0138] 实施例 19 重组全长抗人 HER2GB235-019 抗体对人乳腺癌 (KPL-4) 细胞小鼠移植瘤的生长抑制作用

[0139] 人乳腺癌 KPL-4 细胞表达高水平的 P-HER2 (Werner Scheuer. Strongly Enhanced Antitumor Activity of Trastuzumab and Pertuzumab Combination Treatment on HER2-Positive Human Xenograft Tumor Models. Cancer Res, 2009(69):9330-9336.)。重组全长抗人 HER2GB235-019 抗体对人乳腺癌 (KPL-4) 细胞小鼠移植瘤的生长抑制作用 (实验委托南京金斯瑞生物科技有限公司完成,合同号:GRBI-2013-057)。扩增培养 KPL-4 细胞

(南京金斯瑞生物科技有限公司保存),按 5×10^6 细胞 / 只小鼠 (细胞悬液和 Matrigel (购自 BD 公司) 体积比为 1:1) 分别接种至 38 只 SCID Beige 小鼠 (购自北京维通利华) 身体右侧倒数第二对乳垫下。当肿瘤体积达到 $100-200\text{mm}^3$ 时,依照肿瘤体积大小和体重选取 24 只小鼠随机分为 4 组,每组 6 只动物。

[0140] 赫赛汀组 (30mg/kg 赫赛汀), GB235-019 抗体组 (30mg/kg GB235-019 抗体), 联合用药组 (30mg/kg 赫赛汀 +30mg/kg GB235-019 抗体) 及空白对照组 (PBS), 所有药物给药途径为腹腔注射, 一周一次, 共给药四周。每周两次测量肿瘤体积并进行称量小鼠体重。

[0141] 如图 15, 赫赛汀 30mg/kg 单独用药可部分抑制 KPL-4 肿瘤的生长; GB235-019 抗体 30mg/kg 单独用药不能抑制 KPL-4 肿瘤的生长; GB235-019 抗体 30mg/kg 与赫赛汀 30mg/kg 联合用药完全抑制了 KPL-4 肿瘤的生长, 体现显著地协同抑制 KPL-4 肿瘤生长作用。

[0142] KPL-4 细胞表达高水平的 P-HER2, 但是对低剂量的赫赛汀显示耐药作用。赫赛汀 30mg/kg 单独用药可明显抑制 KPL-4 肿瘤的生长, 但是 GB235-019 抗体 30mg/kg 与赫赛汀 30mg/kg 联合用药完全抑制了 KPL-4 肿瘤的生长, 说明 GB235-019 抗体有不同机理的抑制作用, 结合前面 GB235-019 抗体体外细胞学研究数据, GB235-019 抗体可以抑制 HER-3 信号通路。提示 GB235-019 抗体通过抑制 HER-3 信号通路与赫赛汀在体内联合用药可以协同抑制肿瘤的生长。

[0001]

序列表

<110> 嘉和生物药业有限公司

<120> 一种全人源HER2抗体、其编码基因及应用

<130> CP1141597/CB

<160> 14

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Pro Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Tyr Leu Ser Arg Gly Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

[0002]

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 3
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 3
gaggtccagc tgggtacagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggccccc agtgaaggtc 60
tectgcaagg cttctggata caccttcncc agctatgata tcaactgggt gcgacaggec 120
actggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atgaacccta acagtggtaa cacaggetat 180
gcacagaagt tccagggeag agtcaccatg accaggaaca cctccataag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gcgcggttac 300
tacctgtctc gtggtgattt ctggggfcaa ggtactctgg tgaccgtctc ctca 354

<210> 4
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 4
gacatceaga tgacceagtc tccattctcc gtgtctgeat ctgtaggaga cagagteacc 60
atcaattgtc gggcagatca gggatattgc agctggtttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc cttaagctcct gatctatgct gcattccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggate tgggacagat tteactctca ccatcageag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acgt 324

<210> 5
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 5
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

[0003]

85								90				95			
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
		115					120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165					170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195					200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225					230					235					240
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245					250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
			325					330							
<210> 6															
<211> 106															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<400> 6															
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln
1				5						10				15	
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
			20					25					30		

[0004]

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 7
 <211> 989
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 7
 gectccacca agggcccata ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggteaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtct 120
 tggaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtctca 180
 ggactctact cctcagcag cgtggtagac gtgcctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg lggacaagaa agttagcccc 300
 aaatcttctg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagctt tctcttccc cccaaaacc aaggacacce tcatgatctc ccggaccct 420
 gaggtcacat gcgtgggtt ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gtccaactgg 480
 tacttggaag gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gggtagtcac gtctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg 600
 agtacaagtg caaggctcc aacaaagccc tccagcccc ctagagaaa accatctcca 660
 aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggatgagc 720
 tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg ctctatccc agcgacatcg 780
 ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc 840
 tggactcega cggctcttct tctcttaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc 900
 agcaggggaa cgtcttctca tgetccgtga tgeatgagc tctgcacaac cactacacgc 960
 agaagagcct ctccctgtct cccgtaaa 989

<210> 8
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 8
 actgtggctg caccatctgt ctctatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
 actgcctctg ttgtgtgctt gcigaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
 aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
 aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgtga gcaaagcaga ctacgagaaa 240

[0005]

cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccg	300
ttcaacaggg gagagtgt	318
<210> 9	
<211> 1217	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 9	
gtggggggcc gggatacaat fgaattcagg aggaatttaa aatgaaaaag acagctatcg	60
cgattgcagt ggcactggct gggttcgcta ccgtggccca ggcggccgag ctcgacatcc	120
agatgaacca gtctccatct tccgtgtctg catctgtagg agacagagtc accatcaatt	180
gtggggcgag tcagggtatt agcagctggg tagcctggta tcagcagaaa ccagggaanag	240
ccccaaagt ccctgactat gcctgcatca gtttgaaaag tgggggccca tcaagggtca	300
gcggcagtggt atctgggaca gatttcactc tcaccatcag cagcctgcag cctgaagatt	360
tigcaacfta ctattgtcaa caggctaaac gtttccctct cactttcggc ggagggacca	420
aggtggagat caaacgttct agagggtgtg gtggtagcgg cggcgccggc tctggtggtg	480
gtggatccct cgagatggcc gaggtccagc tggtagctg tggagctgag gtgaagaagc	540
ctggggcccc agtgaaggtc tctgcaagg cttctggata cactttcacc agctatgata	600
teaactgggt gcgacaggcc actggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atgaacccta	660
acagtggtaa cacaggtat gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accaggaaca	720
cctccataag cacagctac atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt	780
attactgtgc gcgcggttac tacctgtctc gtggtgattt ctgggggtcaa ggtactctgg	840
tgaccgtctc ctcaactagt ggccaggecg gccagcacca tcaccatcac catggcgcat	900
acccgtacga cgttcgggac tacgtttctt aggagggtgg tggtctctgag ggtggcggtt	960
ctgagggtgg cggctctgag ggaggcggtt ccggtggtgg ctctgggttc cggtgatttt	1020
gattatgaaa gatgcaaac gctaataagg gggtatgac cgaaaatgcc gatgaacgt	1080
gctacagtct gacgtataag caactgattc tgctgctact gatacgtgt gctatcgatg	1140
gttcattgct gacgtttcag ctgctaattg tatgggtgt cactgggtgg taattttggt	1200
tgggtctctt aattcga	1217
<210> 10	
<211> 120	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<400> 10	
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr	
20 25 30	
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
35 40 45	
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	
50 55 60	

[0006]

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Gln Trp Lys Tyr Met Ser Lys Gly Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Thr Val Ile Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Asn Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105

<210> 12
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 12
caggteccagc tggatgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggccctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggetactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggaactga gcaggtgac atctgacgac acggccgtat attactgtgc gcgcgctcag 300
tggaaatata tgtctaaagg tgatttctgg ggteaaggta ctctgggtgac cgtctectca 360

<210> 13
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

[0007]

<400> 13
gacatccaga tgaccacgct tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cacagtcate 60
attacttgct gggcgagtea ggctattaac agctggtag cctggtatec gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatctatact acatccaatt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagag ttcactctca ccataccag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ttgcaacag gctaacagtt tccccctcac tttcggecct 300
gggaccaaag tggatatcaa acgt 324

<210> 14
<211> 1214
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 14
gggcccttcc tcccggggcc ccccccgtgt tgggtggcgg aacattgatt caggaggaat 60
ttaaanaatgaa aaagacagct atcgcgattg cagtggcact ggctggtttc gctaccgtgg 120
cccaggcggc cgagctcgac atccagatga ccagctctcc atcttccgtg tctgcatctg 180
taggagacac agtcatcatt acifgtcggg cgagtcaggc tattaacage tgggtagcct 240
ggtatcagca gaaaccaggg aaagccccta aactcctgat ctatactaca tccaatttgc 300
aaagtggggt cccatcaagg ttcagcggca gtggatctgg gacagagttc actctacca 360
tcaccagcct gcagcctgaa gattttgcaa ctattatttg tcaacagget aacagtttcc 420
ccctcacttt cggccctggg accaaagtgg atatcaaacg ttctagaggt ggtggtggta 480
gcggcggcgg cggctctggg ggtggtggat ccctcgagat ggcccaggtc cagctggtgc 540
agtctggggc tgaggtgaag aagcctgggg cctcagtgaa ggtctctgc aaggcttctg 600
gatacacctt caccggctac tatatgcact ggggtcgaca ggcccctgga caagggcttg 660
agtggatggg atggatcaac cctaacagtg gtggcacaaa ctatgcacag aagtffcagg 720
gcagggtcac catgaccagg gacacgtcca tcagcacagc ctacatggaa ctgagcaggc 780
tgacatctga cgacacggcc gtatattact gtgcgcgcgc tcagtggaaa tacatgtcia 840
aaggtgattt ctggggfcaa ggtactctgg tgaccgtctc ctcaactagt ggccaggccg 900
gccagcacca tcaccatcac catggcgcac acccgtaega cgttccggac tacgcttctt 960
aggagggtgg tggctctgag gtggcgggtc tgagggtggc gctctgagga gcggttcccg 1020
tgtggctctg gttccggtga ttgattatg aaaagatggc aacgtatatat ggggctatga 1080
ccgaaaatgc gatgaaacgt gctacagctc gacgcttaag caaacttgat ctggctccta 1140
ctgaaiacgt gctgctatcg aatgttcatg tgacgtcgac ttgctatggg aatgggtgcta 1200
ctgetgaatt tgcg 1214

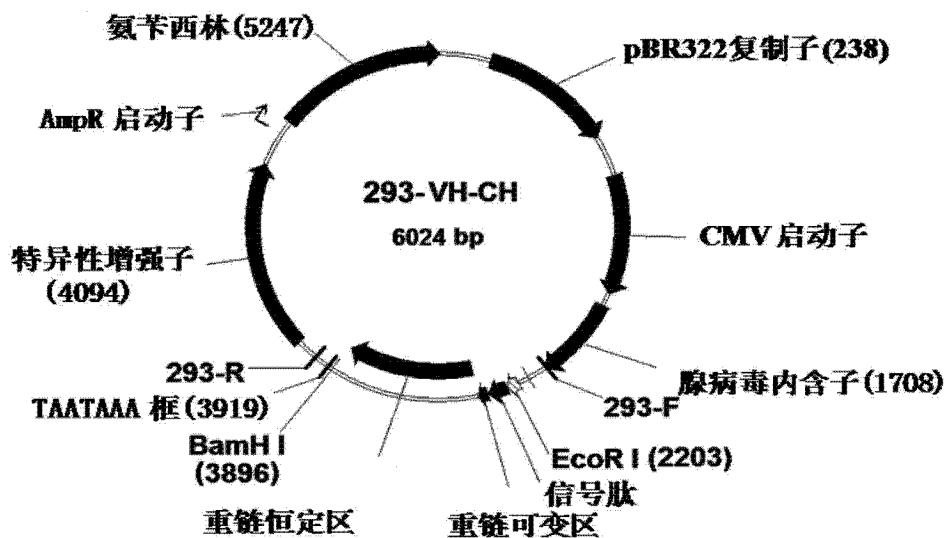


图 1A

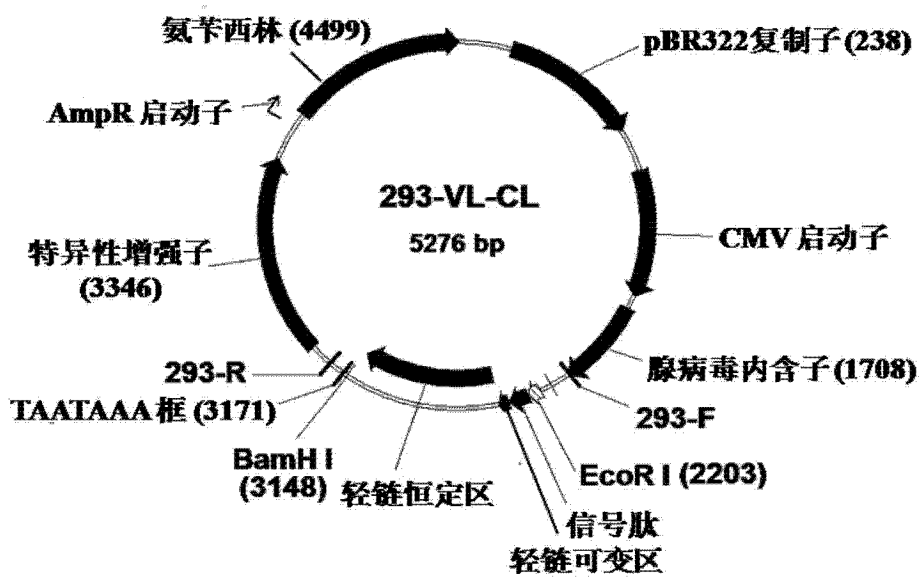


图 1B

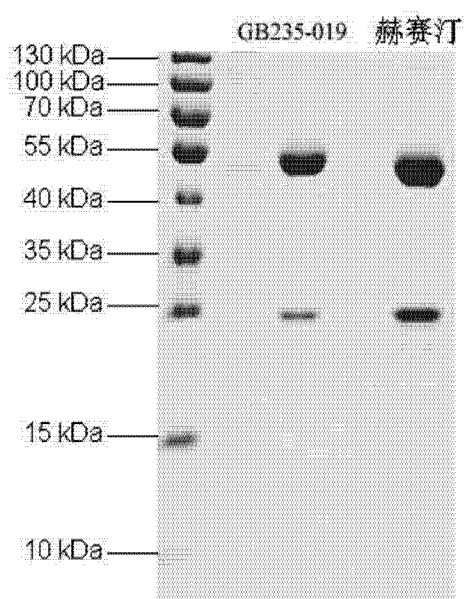


图 2A

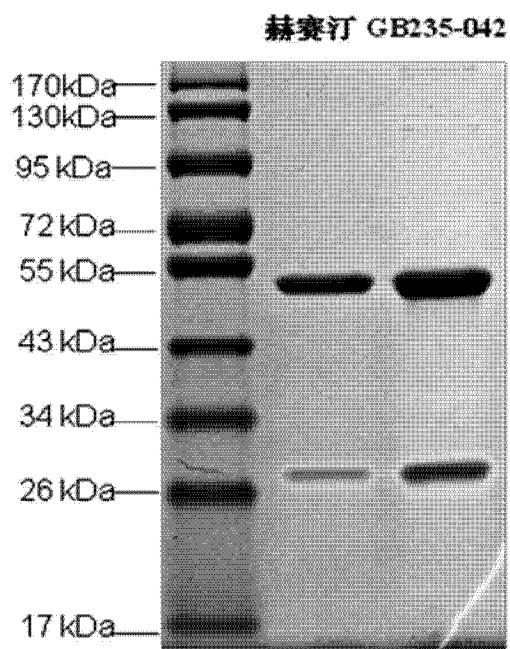


图 2B

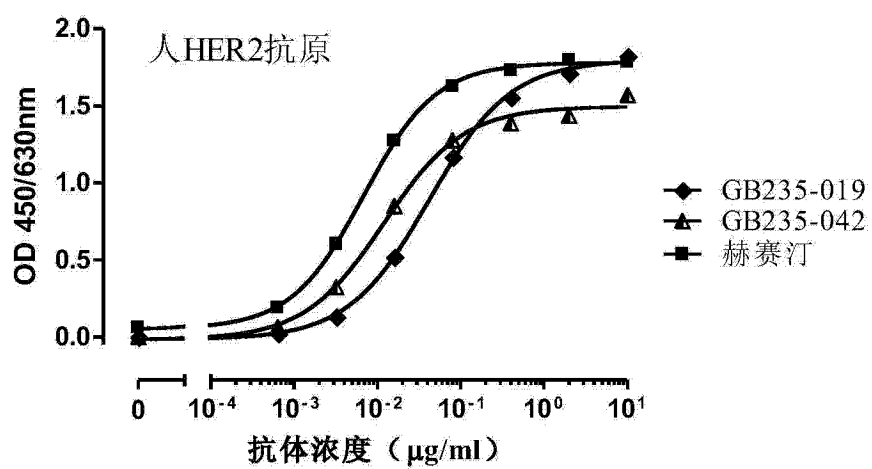


图 3A

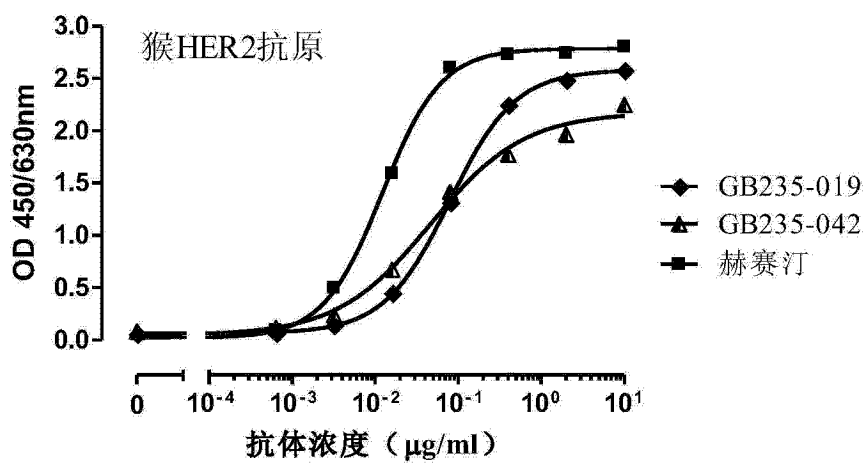


图 3B

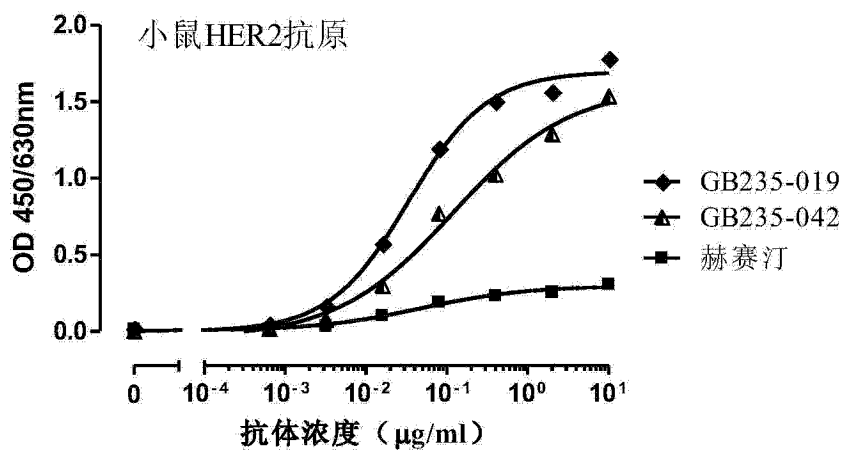


图 3C

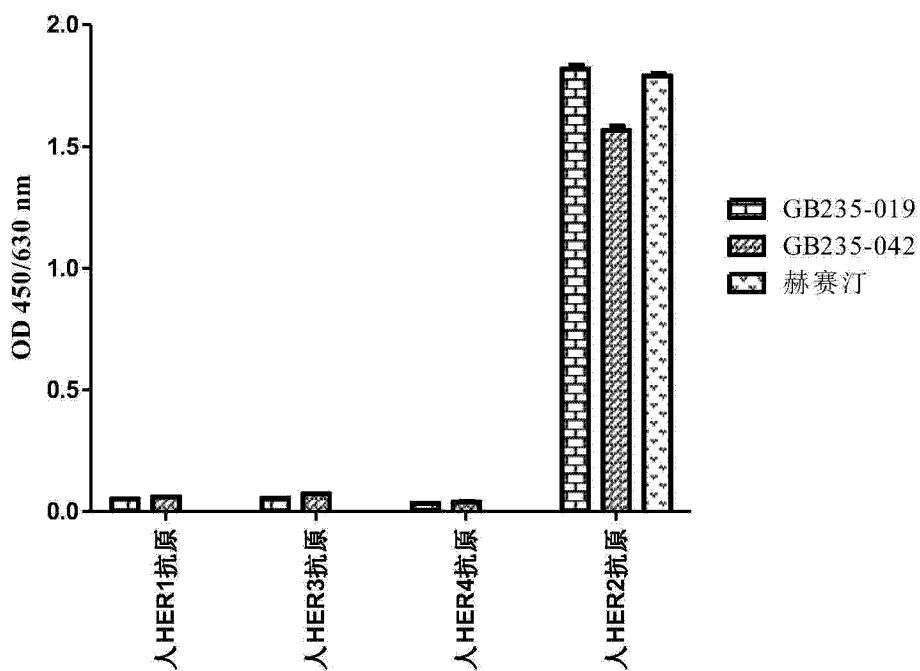


图 3D

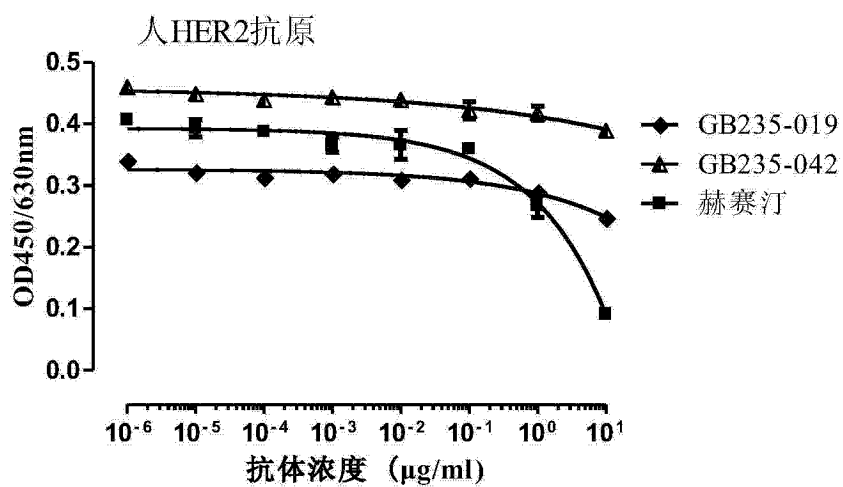


图 4

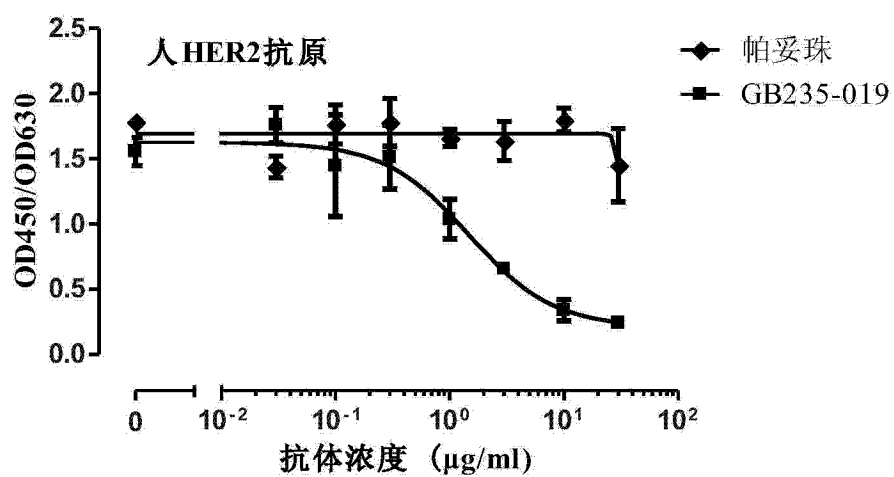


图 5

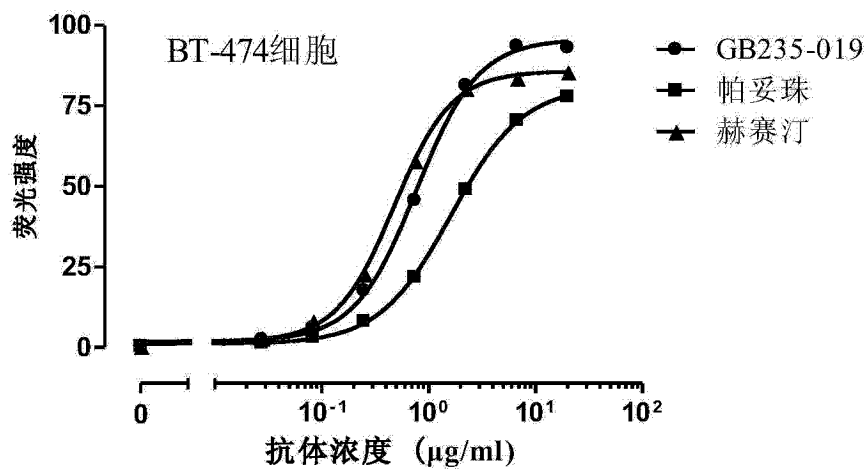


图 6

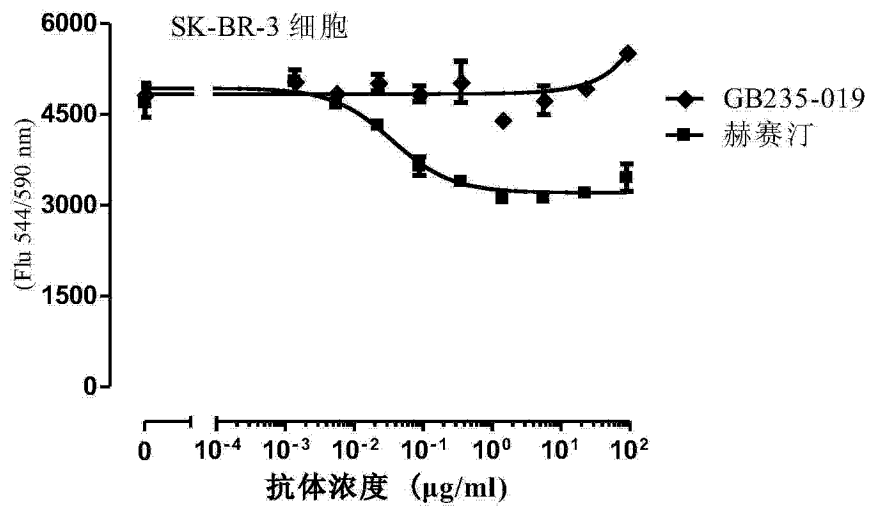


图 7A

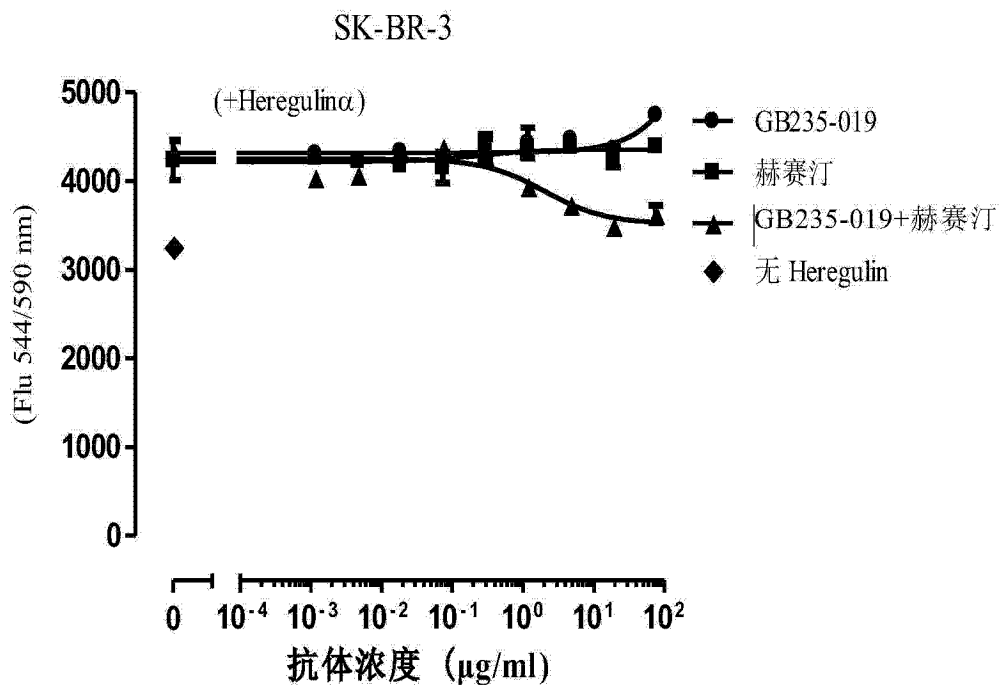


图 7B

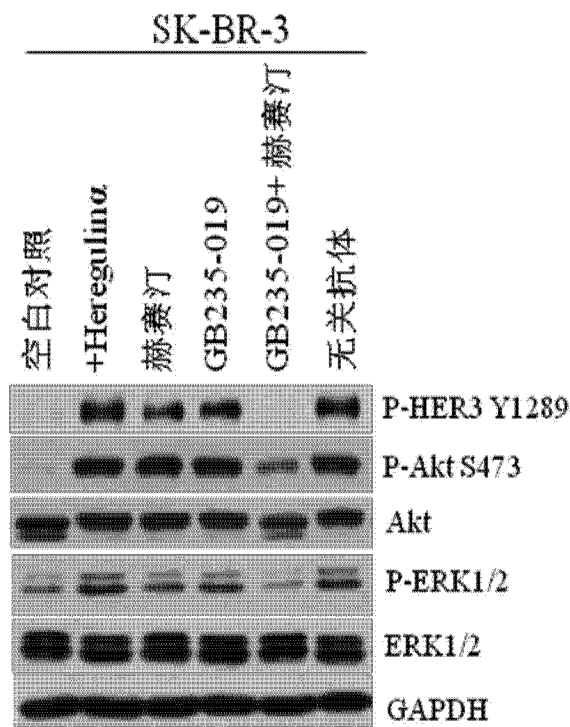


图 8

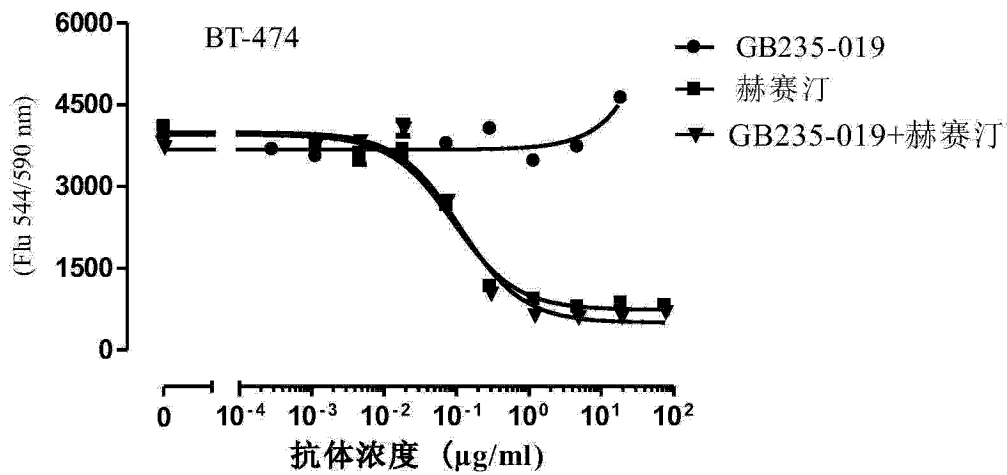


图 9A

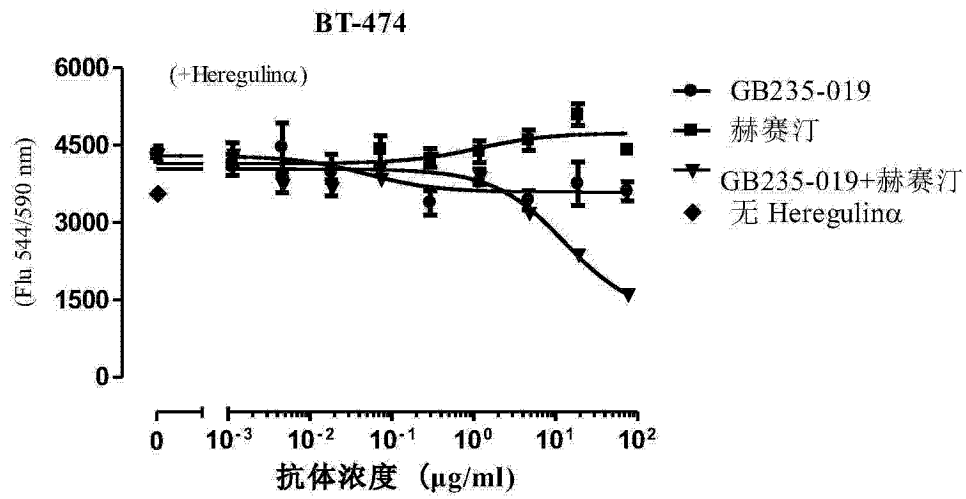


图 9B

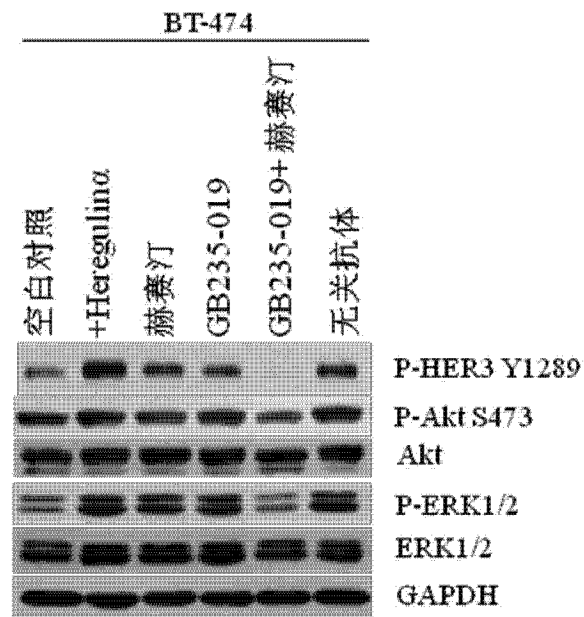


图 10

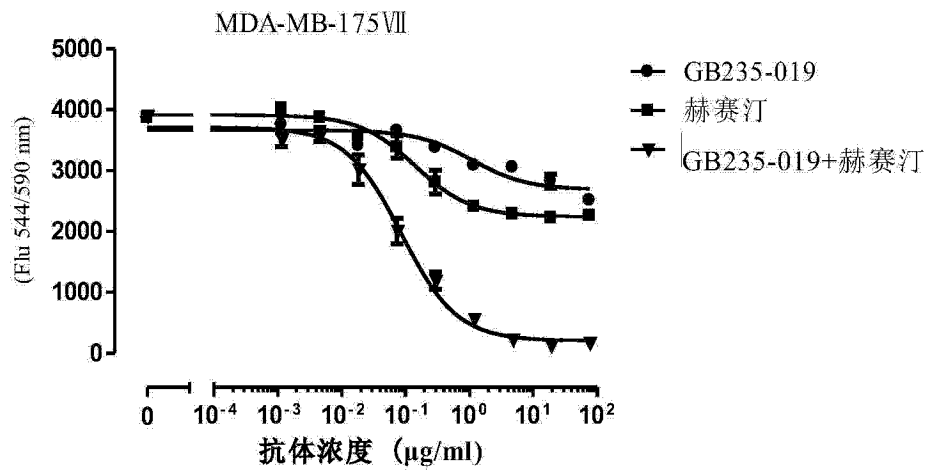


图 11

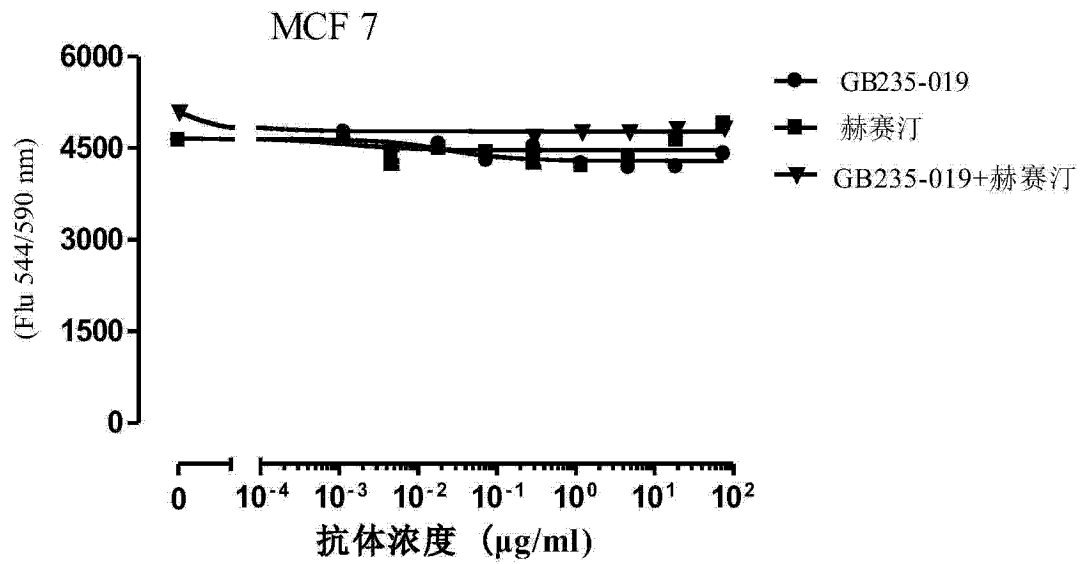


图 12A

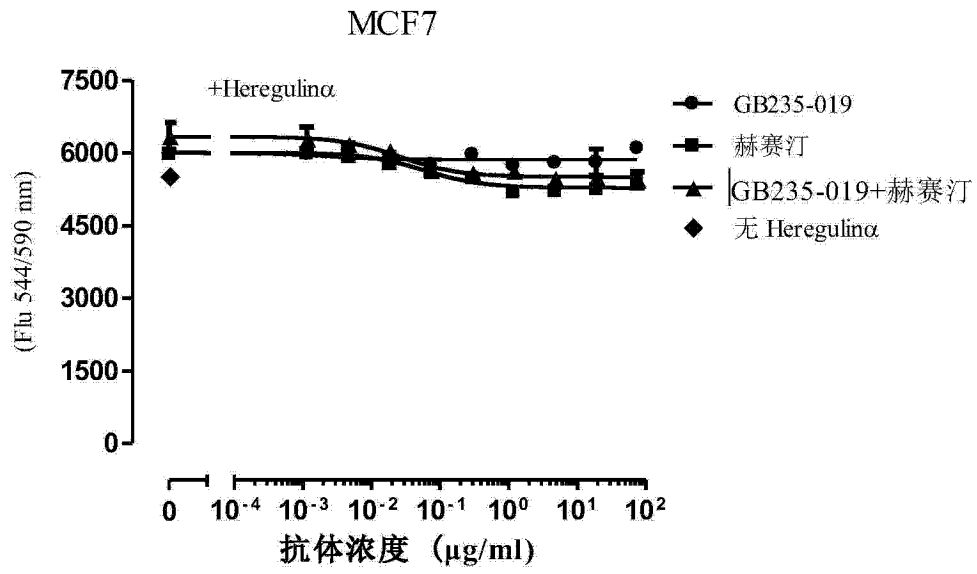


图 12B

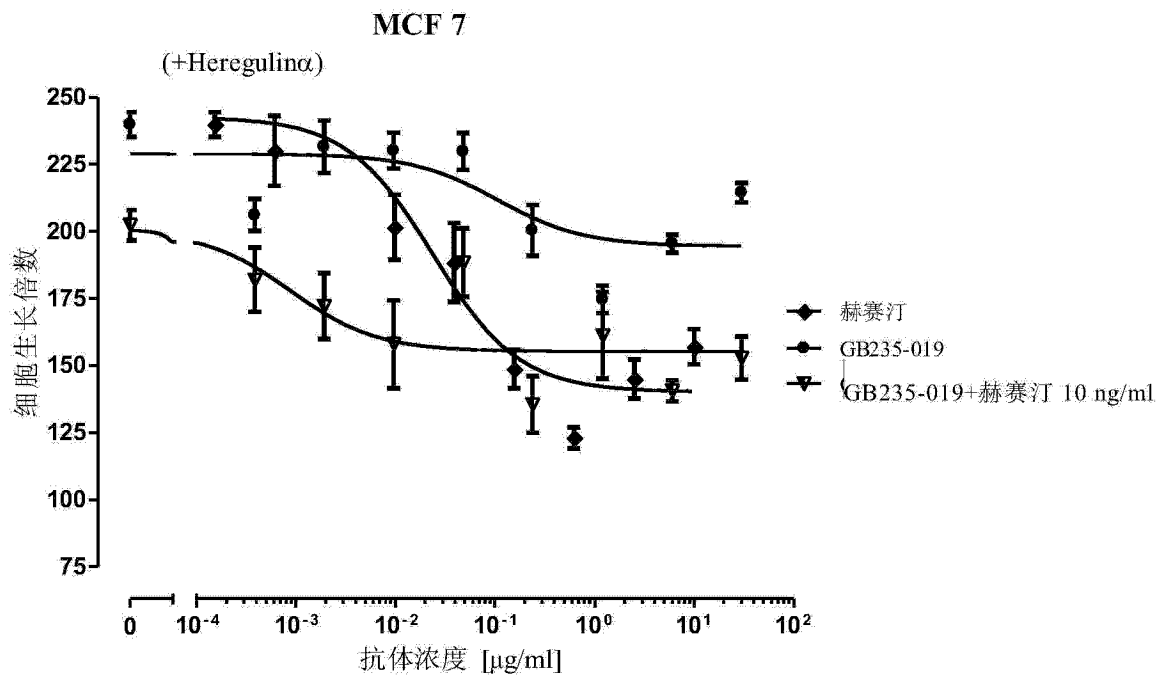


图 13A

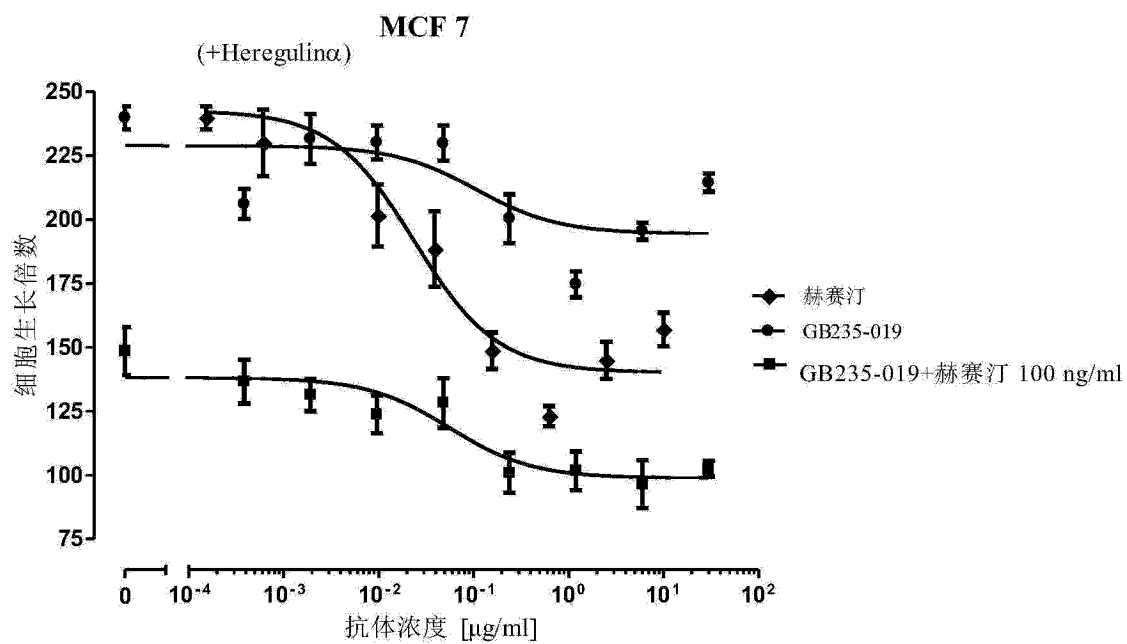


图 13B

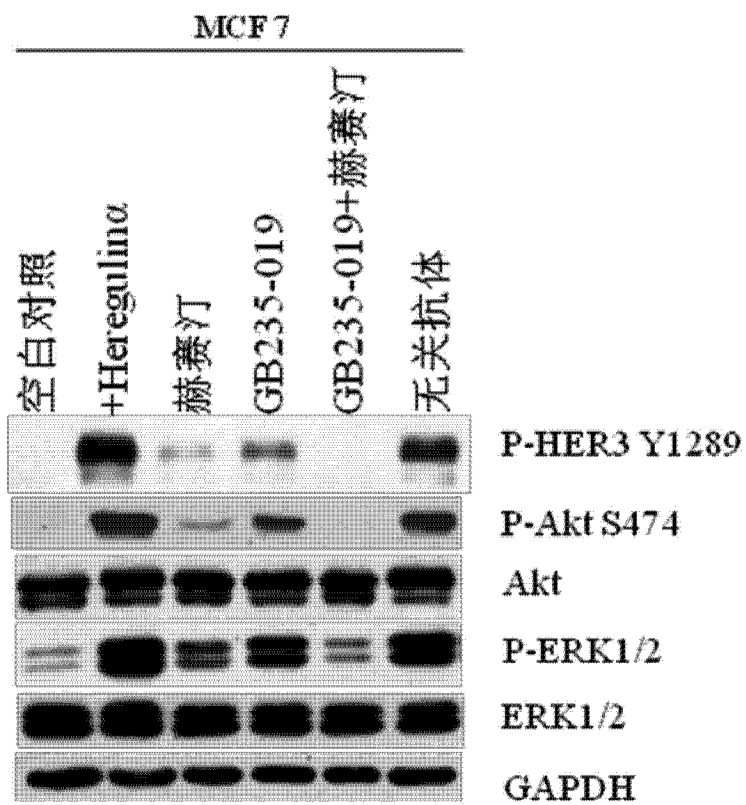


图 14

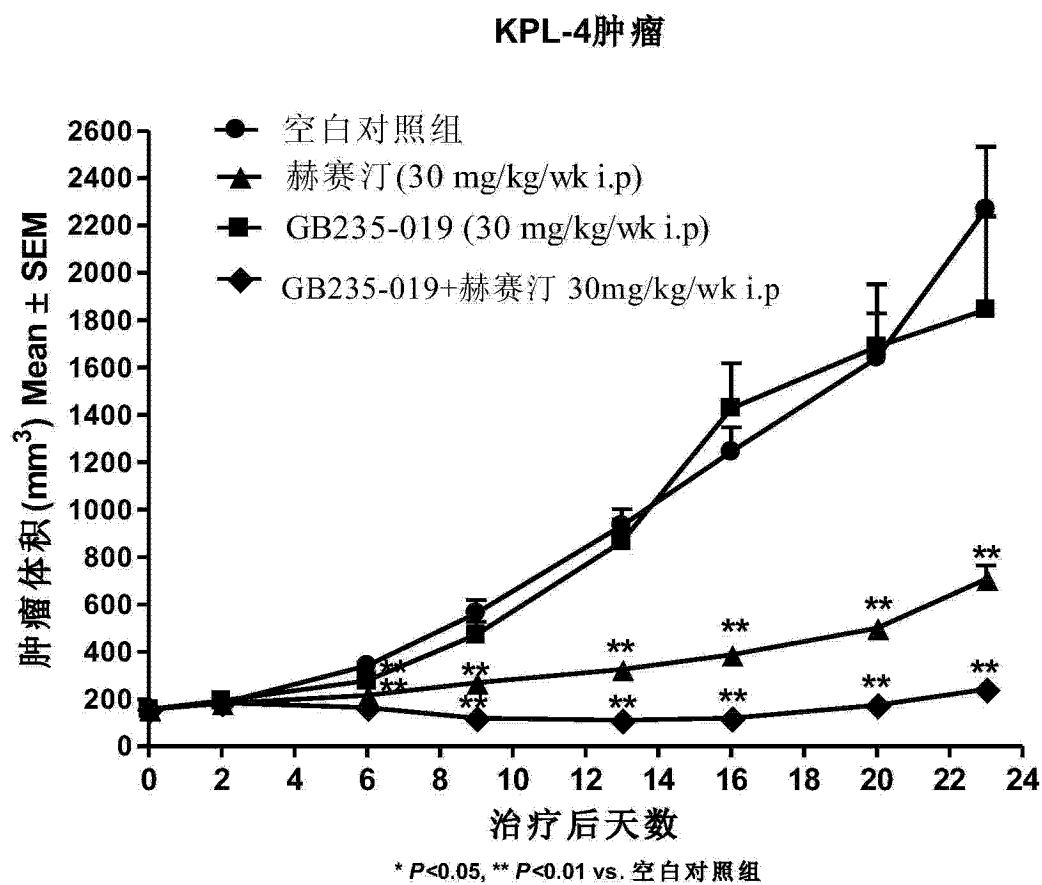


图 15