

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510024158.3

[51] Int. Cl.

*C07K 16/18 (2006.01)*

*C12N 15/12 (2006.01)*

*C12N 15/63 (2006.01)*

*A61K 39/395 (2006.01)*

*A61P 35/00 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2008 年 1 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 100362018C

[22] 申请日 2005.3.2

[21] 申请号 200510024158.3

[73] 专利权人 上海张江生物技术有限公司

地址 201203 上海市张江高科技园区李冰路 399 号

[72] 发明人 王皓 侯盛

[56] 参考文献

WO2002100348A1 2002.12.19

1YY8A. GeneBank. 2005

1YY8B. GeneBank. 2005

EGFR 单克隆抗体抗结肠癌的实验研究.  
曲娴等. 中国病理生理杂志, 第 18 卷第 9 期.  
2002

抗 EGFR 单克隆抗体 cetuximab 的研究进展.  
代志军等. 中国肿瘤生物治疗杂志, 第 10 卷第 1 期. 2003

审查员 于群

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 范征

权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 1 页

[54] 发明名称

重组抗 EGFR 单克隆抗体

[57] 摘要

本发明提供了一种人源抗表皮生长因子受体单克隆抗体, 它包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区具有 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列, 所述轻链可变区具有 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。 本发明还提供了编码上述氨基酸序列的 DNA 分子、含有该 DNA 分子的表达载体和宿主细胞、抗体的制备方法、用途以及含有该抗体的药物组合物。

1. 一种人源抗表皮生长因子受体单克隆抗体，它包含重链可变区和轻链可变区，其特征在于，所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示，所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。

2. 一种 DNA 分子，它编码权利要求 1 所述的人源抗表皮生长因子受体单克隆抗体，它包含 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列和 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列。

3. 一种表达载体，其特征在于，它含有权利要求 2 所述的 DNA 分子序列以及与所述序列操作性相连的表达调控序列。

4. 一种宿主细胞，其特征在于，它被权利要求 3 所述的表达载体转化。

5. 一种抑制有表皮生长因子受体表达的肿瘤细胞生长的药物组合物，其特征在于，它含有药学上有效量的权利要求 1 所述的人源抗表皮生长因子受体单克隆抗体以及药学上可接受的载体。

6. 权利要求 1 所述的人源抗表皮生长因子受体单克隆抗体在制备用于治疗表皮生长因子受体的肿瘤的药物中的应用。

7. 一种制备权利要求 1 所述的人源抗表皮生长因子受体单克隆抗体的方法，其特征在于，该方法包括：

a)提供一表达载体，该表达载体含有权利要求 2 所述的 DNA 分子序列以及与该序列操作性相连的表达调控序列；

b)用步骤 a)所述的表达载体转化宿主细胞；

c)在适合所述单克隆抗体表达的条件下培养步骤 b)所得的宿主细胞；和

d)分离纯化获得所述单克隆抗体。

## 重组抗 EGFR 单克隆抗体

### 发明领域

本发明涉及生物技术领域。具体地说，本发明涉及一种重组人源抗表皮生长因子受体单克隆抗体。另外，本发明还涉及该单克隆抗体的制备方法、含有该单克隆抗体的药物组合物以及该单克隆抗体的用途。

### 背景技术

癌症是紧跟心脏病之后的人类第二大主要死亡因素，目前治疗这种致命性疾病的新疗法已取得了重大进展。

正常细胞的增殖是通过各自的配体严格激活其生长因子受体来控制的，比如生长因子受体酪氨酸激酶。癌细胞也是在生长因子受体的激活下增殖的，但失去了正常增殖的严格控制。这种失控可能是由很多因素引起，比如生长因子的过度表达或生长因子受体的过度表达，以及由生长因子调控的生化途径的自发性激活。参与致癌的受体包括表皮生长因子受体(EGFR)，来源于血小板的生长因子受体(PDGFR)，类胰岛素生长因子受体(IGFR)，神经生长因子受体(NGFR)和成纤维生长因子受体(FGF)等。

表皮生长因子受体(即 EGFR)也称作 c-erbB1/Her1，其家族成员都是生长因子受体酪氨酸激酶，它们在细胞表面与特异的生长因子或天然配体相互作用，如与 EGF 或 TGF $\alpha$  相互作用，由此活化受体酪氨酸激酶。已发现的该家族第一个成员是表观分子量为 165KD 的糖蛋白。

EGFR 在调节肿瘤细胞的生长、修复和生存、新生血管生成、侵袭和转移中具有重要的作用，同时在相当一部分的人类肿瘤中都有表达。在很多恶性肿瘤中，EGFR 的表达往往与较差的预后和较低的生存率相关。因此可知，如果有药物能阻断 EGFR 的活性，那将会抑制其磷酸化和信号传导，从而起到多重途径的抗肿瘤作用，同时也能增加化疗和放疗的抗肿瘤疗效。在一些研究中，EGFR 抑制剂与多种化疗药物和放疗药物联合作用于一些肿瘤细胞株时，表现出累加和协同作用。

EGFR 抑制剂主要包括单克隆抗体、酪氨酸激酶抑制剂、奎唑啉 pyralo-1/吡咯并-1/吡啶并嘧啶、配体-毒素和免疫毒素联结物，以及反义核苷酸和 EGFR/配体主

导的疫苗等。

一些体内和体外实验显示抗 EGFR 抗体成功的抑制了表达 EGFR 的肿瘤细胞株的生长。在实体瘤的治疗中，一些抗 EGFR 单克隆抗体单独应用或与传统治疗方法合并应用的治疗结果令人鼓舞。

以前的技术中已经描述了多种小鼠的抗 EGFR 单克隆抗体，可与 EGFR 高特异的结合，这些抗体大致可分为两类，一类是可与受体结合但不抑制 EGF 结合的抗体，另一类是可与受体结合并且还抑制 EGF 结合的抗体。但是患者对鼠源抗体产生的免疫应答限制了这些抗体在人类治疗和体内诊断中的应用。患者会产生 HAMA 反应（人抗小鼠抗体），从而限制了抗体到达其抗原靶标的能力，使抗体的效能降低。

一些研究人员为了减少 HAMA 反应，研制出了人鼠嵌合的抗体，其中小鼠可变区（V）与人恒定区（C）连接。该抗体证明在临床上好于鼠源抗体，但是嵌合抗体的小鼠 V 区中仍然含有使患者产生免疫原性的成分，限制了其应用。

因此，需要寻找一种人源的 EGFR 抗体，使之在人体不产生免疫原性，并且具有高的亲和力，本发明即是提供一种全人源的单克隆抗体，所述的抗体在体内的亲和力不会低于鼠源抗体，并且其在人体中不产生免疫原性。

## 发明内容

为实现上述目的，本发明一方面提供了一种人源抗表皮生长因子受体单克隆抗体，它包含重链可变区和轻链可变区，其特征在于，所述重链可变区具有 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列，所述轻链可变区具有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列。

另一方面，本发明还提供了编码 SEQ ID NO:3 以及 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列的 DNA 分子。在一个较佳的实施方案中，所述 DNA 分子宜含有 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列。

本发明第三方面提供了含有上述 DNA 分子序列以及与所述序列操作性相连的表达调控序列的表达载体。

本发明第四方面还提供了经上述表达载体转化的宿主细胞。该宿主细胞优选哺乳动物细胞，更优选 CHO 细胞。

本发明第五方面提供了一种抑制有表皮生长因子受体表达的肿瘤细胞生长的药物组合物，该药物组合物含有药学上有效量的上述人源抗表皮生长因子受体单克隆抗体以及药学上可接受的载体。

本发明第六方面提供涉及上述人源抗表皮生长因子受体单克隆抗体在制备治

疗肿瘤的药物中的应用。

本发明第七方面涉及一种制备上述人源抗表皮生长因子受体单克隆抗体的方法，该方法包括：a)提供一表达载体，该表达载体含有上述 DNA 分子序列以及与该序列操作性相连的表达调控序列；b)用步骤 a)所述的表达载体转化宿主细胞；c)在适合所述单克隆抗体表达的条件下培养步骤 b)所得的宿主细胞；和 d)分离纯化获得所述单克隆抗体。

本发明的重组人源抗 EGFR 单克隆抗体是全人源的，其不会在人体产生免疫原性。而且，该抗体在体内的亲和力不低于鼠源抗体，其在宿主细胞(如 CHO 细胞)中的表达量比现有的单克隆抗体也有显著提高。本发明的其它目的和优点可通过下面的详细描述得知。

### 附图简述

图 1 显示了本发明所用的表达载体 pMG18，并且标明了其中的元件及酶切位点。其中，HCMV pro 为人巨细胞病毒主要早期启动子；Ck 为人 $\kappa$ 链恒定区基因；IgG1 为人 $\gamma$ 1 链恒定区基因；pA 为多聚腺苷化信号；DHFR 为二氢叶酸还原酶基因；Amp 为氨苄青霉素抗性基因。

### 具体实施方案

如上所述，本发明首先提供了一种人源抗表皮生长因子受体单克隆抗体，它包含重链可变区和轻链可变区，其特征在于，所述重链可变区具有 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列，所述轻链可变区具有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列。

本文所用的术语“单克隆抗体(单克隆抗体)”指从一类基本均一的群体获得的抗体，即该群体中包含的单个抗体是相同的，除少数可能存在的天然发生的突变外。单克隆抗体高特异性地针对单个抗原位点。而且，与常规多克隆抗体制剂(通常是具有针对不同决定簇的不同抗体)不同，各单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性外，单克隆抗体的好处还在于它们是通过杂交瘤培养来合成的，不会被其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示了抗体的特性，是从基本均一的抗体群中获得的，这不应被解释成需要用任何特殊方法来生产抗体。

本文所用的术语“抗体”和“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约 150000 道尔顿的异四聚糖蛋白，其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连，而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区

(VH)，其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL)，另一端有恒定区；轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对，轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

本文所用的术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同，它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而，可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区，它们大致上呈 $\beta$ -折叠构型，由形成连接环的三个CDR相连，在某些情况下可形成部分 $\beta$ 折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等, NIH Publ. No. 91-3242, 卷I, 647-669页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但是它们表现出不同的效应功能，例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

脊椎动物抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可根据其恒定区的氨基酸序列归为明显不同的两类(称为 $\kappa$ 和 $\lambda$ )中的一类。根据其重链恒定区的氨基酸序列，免疫球蛋白可以分为不同的种类。主要有5类免疫球蛋白：IgA, IgD, IgE, IgG和IgM，其中一些还可进一步分成亚类(同种型)，如IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA和IgA2。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、和 $\mu$ 。不同类免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是众所周知的。

单克隆抗体可用本领域技术人员熟知的各种方法来制得。例如，单克隆抗体可用杂交瘤方法(由Kohler等, Nature, 256:495(1975)首先提出)制得，或用重组DNA方法(美国专利 No. 4,816,567)制得。单克隆抗体也可用例如Clackson等, Nature, 352:624-628(1991)和Marks等, J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)所述的技术从噬菌体抗体库中分离获得。

本发明还提供了编码本发明人源抗表皮生长因子受体单克隆抗体中重链可变区和轻链可变区氨基酸序列的DNA分子。在一个较佳的实例中，该DNA分子含有SEQ ID NO:1所示的编码所述单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列，以及SEQ ID NO:2所示的编码所述单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列。

在获得上述编码本发明的人源抗EGFR单克隆抗体重链可变区和轻链可变区的核苷酸序列后，通常可通过以下方法来制备本发明的单克隆抗体。

首先，提供含有编码本发明单克隆抗体的核苷酸序列以及与该序列操作性相连的表达调控序列的表达载体。但是，本领域普通技术人员也能预计到，将编码本发明单克隆抗体重链可变区和轻链可变区的核苷酸序列分别插入不同的表达载体中

进行共表达也能获得本发明的抗 EGFR 单克隆抗体。

本文所用的术语“表达调控序列”通常指参与控制核苷酸序列表达的序列。表达调控序列包括与目标核苷酸序列操作性相连的启动子和终止信号。它们通常还包括核苷酸序列适当翻译所需的序列。“操作性相连”是指线性 DNA 序列的某些部分能够影响同一线性 DNA 序列其他部分的活性。例如，如果启动子或增强子增加了编码序列的转录，则它与编码序列是操作性相连的。

编码本发明单克隆抗体的 DNA 序列可用本领域技术人员熟知的常规手段来制得。例如，可根据本发明公开的序列人工合成或用 PCR 法扩增得到编码该单克隆抗体重链可变区和轻链可变区的核苷酸序列。然后，用本领域熟知的各种方法通过选择合适的酶切位点将这些核苷酸序列插入合适的表达载体中，使它们分别在表达载体所携带的重链恒定区编码序列和轻链恒定区编码序列之前，并使它们在同一读框内。本发明中所用的表达载体是本领域技术人员已知的各种市售的表达载体，例如购自 Qiagen 和 Promega 公司的表达载体，以及其它可获得的表达载体，如 pMG18(《根据 INCP-9 质粒序列进行环境监测的工具开发》“DEVELOPMENT OF TOOLS FOR ENVIRONMENTAL MONITORING BASED ON INCP-9 PLASMIDS SEQUENCES”. A. Greated, R. Krasowiak, M. Titok, C.M. Thomas, 1992 年出版，具体载体图见该书第 143 页)。

随后，用上述获得的表达载体转化合适的宿主细胞。“宿主细胞”一般包括原核细胞和真核细胞。常用的原核宿主细胞的例子包括大肠杆菌、枯草杆菌等。常用的真核宿主细胞包括酵母细胞，昆虫细胞、和哺乳动物细胞。在本发明中，优选哺乳动物细胞。通常用哺乳动物细胞系来作为表达真核细胞衍生多肽的宿主细胞。哺乳动物细胞在培养物中的繁殖是本领域熟知的。见《组织培养》，Academic Press, Kruse and Patterson 编辑(1973)，该文纳入本文作为参考。较佳的哺乳动物细胞是许多可购得的无限增殖细胞系。这些无限增殖细胞系包括但不限于，中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、Vero 细胞、海拉细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(如 Hep G2)和其它许多细胞系。它们为蛋白质分子提供了翻译后修饰，包括正确的折叠、正确的二硫键形成以及正确位点的糖基化。尽管在下文实施例中，本发明仅列举了以 CHO 细胞作为宿主细胞的例子，但是本领域技术人员在阅读了本发明的详细描述和具体实施例可以知道，本发明也能采用上述这些细胞系。

用表达载体转化宿主细胞的方法有很多种，所用的转化程序取决于待转化的宿主。将异源多核苷酸导入哺乳动物细胞中的方法是本领域所知的，其包括葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、Polybrene(1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物)介导

转染、原生质体融合、电穿孔、脂质体介导转染以及将 DNA 直接显微注射到胞核中。在本发明中，较佳的方法是电穿孔法或脂质体介导法等。例如可采用 Invitrogen 公司的脂质体法试剂盒来转染诸如 CHO 细胞等宿主细胞。

然后，在适合本发明单克隆抗体表达的条件下，培养转化所得的宿主细胞。然后用常规的免疫球蛋白纯化步骤，如蛋白 A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析、离子交换层析、疏水层析、分子筛层析或亲和层析等本领域技术人员熟知的常规分离纯化手段纯化得到本发明的人源抗 EGFR 单克隆抗体。

所得单克隆抗体可用常规手段来鉴定。单克隆抗体的结合特异性可用免疫沉淀或体外结合试验(如放射性免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))来测定。单克隆抗体的结合亲和力例如可用 Munson 等, *Anal. Biochem.*,107:220(1980)的 Scatchard 分析来测定。

另一方面，本发明还提供了一种抑制有表皮生长因子受体表达的肿瘤细胞生长的药物组合物，该药物组合物含有药学上有效量的本发明单克隆抗体以及药学上可接受的载体。在较佳的实施方案中，该药物组合物中还可含有与本发明的单克隆抗体联用的其它化疗药物和放疗药物。本文所用的术语“药学上可接受的”是指当分子本体和组合物适当地给予动物或人时，它们不会产生不利的、过敏的或其它不良反应。本文所用的“药学上可接受的载体”应当与本发明的单克隆抗体相容，即能与其共混而不会在通常情况下大幅度降低单克隆抗体或药物组合物的药效。可作为药学上可接受的载体或其组分的一些物质的具体例子是糖类，如乳糖、葡萄糖和蔗糖；淀粉，如玉米淀粉和土豆淀粉；纤维素及其衍生物，如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和甲基纤维素；西黄蓍胶粉末；麦芽；明胶；滑石；固体润滑剂，如硬脂酸和硬脂酸镁；硫酸钙；植物油，如花生油、棉籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和可可油；多元醇，如丙二醇、甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇；海藻酸；乳化剂，如 Tween®；润湿剂，如月桂基硫酸钠；着色剂；调味剂；压片剂、稳定剂；抗氧化剂；防腐剂；无热原水；等渗盐溶液；和磷酸盐缓冲液等。

本发明的药物组合物可根据需要制成各种剂型，并可由医师根据患者种类、年龄、体重和大致疾病状况、给药方式等因素确定对病人有益的剂量进行施用。

下面将结合实施例进一步详细地描述本发明。然而应当理解，列举这些实施例只是为了起说明作用，而并不是用来限制本发明。

### 实施例 1. 人源抗体库的构建和筛选

按照 Marks 等人 *J. Mol. Biol.*,222, 581-597; Hoogenboom 和 Winte, *J. Mol. Biol.*, 227, 381-388; Haidaris CG 等, *J Immunol Methods*. 2001 Nov 1;257(1-2):185-202;

Griffiths, A. D.等 *EMBO J.*,13, 3245-3260(1994); Nissim, A.等 *EMBO J.*,13, 692-698(1994)中描述的方法构建人源抗体库。

起始材料为2028位健康人的外周血,按照上述文献中提供的方法,制备mRNA,用PCR方法进行体外扩增免疫球蛋白重链和轻链的可变区基因,并将其克隆到噬菌体载体,利用抗体分子片段在噬菌体表面呈现的特点,以EGFR蛋白(购自晶美生物公司)为抗原,筛选到对EGFR蛋白特异性的抗体。

将复苏的抗体库菌株1毫升加入新鲜LB培养基14毫升,37℃培养18小时。

12000rpm高速离心10分钟,转移上清至一个无菌的50毫升离心管中,保存备用。其滴度应在 $2 \times 10^{11}$ 以上。以EGFR蛋白为抗原,包被25毫升细胞培养瓶。在包被后的细胞瓶中加入不少于 $3 \times 10^{10}$ 噬菌体颗粒,37℃温育1小时。

然后,倒掉瓶中的液体,用10毫升加入了1%Tween-20的PBS洗涤培养瓶10次。在培养瓶中加入1毫升对数期的TG1细胞,37℃温育震荡培养18小时。重复进行4个循环。

将上述获得的细胞稀释至100000细胞/毫升,然后在加入0.1%氨苄青霉素的1.5%琼脂平板上进行培养以获得单克隆。取上述平板上的克隆在96孔深孔板上进行培养,每孔一个克隆,共作960个克隆(10块96孔板)。将上述深孔板在96孔板离心机上5000rpm离心20分钟,将上清转移到新的无菌深孔板,封口后保藏于4℃备用。

取96孔板10块,每孔中加入EGFR(10微克/毫升)10微升常规包被后,分别加入上述保存的上清10微升,37℃温育1小时后用含有1%Tween-20的PBS洗涤20次。加入1微升HRP标记的羊抗M13单克隆抗体,37℃温育30分钟后用1%Tween-20的PBS洗涤10次。

加入含有0.025%DAB显色剂的PBS 200微升和1微升1%的 $H_2O_2$ ,37℃温育显色20分钟后在读板机上读取595纳米处的光吸收。根据光吸收读数确定显色反应强的孔,这些孔相对应的克隆即为亲和力较强的抗体可变区克隆。

通过上述过程筛选出了442个阳性克隆,最强的克隆的亲和力测定结果见下表1。根据读数确定其中亲和力最强的克隆5D8和3F2,用于以后的研究。

表 1 各克隆的亲合力

	1	2	3	4	5	6	7
克隆号	5D8	3F2	6F1	4E7	2A3	5E1	3A5
光吸收	27.38±0.70	24.15±1.01	22.42±1.38	18.21±1.12	15.36±0.96	14.73±0.77	13.50±0.85

### 实施例 2. 抗体可变区编码序列的表达载体的克隆

将实施例 1 得到的克隆的菌株，在 100 毫升 LB 培养基中扩增，用 Promega 公司的质粒 DNA 抽提纯化试剂盒纯化质粒 DNA。

用 XbaI 和 NheI 酶切上述质粒 DNA 后在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳上分离酶切片段，取 360bp 左右的带进行胶回收，所得片段即为重链可变区编码序列。

用 HindIII 和 Bsi WI 酶切上述质粒 DNA 后在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳上分离酶切片段，取 320bp 左右的带进行胶回收，所得片段即为轻链可变区编码序列。

然后首先将上述重链可变区编码序列插入到表达载体 pMG18 (参见书籍 DEVELOPMENT OF TOOLS FOR ENVIRONMENTAL MONITORING BASED ON INCP-9 PLASMIDS SEQUENCES. A. Greated, R. Krasowiak, M. Titok, C.M. Thomas, 1992 年出版。具体载体图见该书第 143 页) 的 XbaI/NheI 位点中，再用 Hind III 和 Bsi WI 将上述抗体轻链可变区编码序列插入到插入有重链可变区编码序列的 pMG18 的 HindIII/Bsi WI 位点中，构建成人源抗 EGFR 单克隆抗体基因的表达载体。

### 实施例 3. CHO 细胞的转染与重组克隆的筛选

上述实施例 2 中构建的带有抗体基因的表达载体转入在大肠杆菌 DH5 α 菌株，然后接种于 100 毫升 LB 培养基中进行扩增，用 Qiagen 公司的超纯质粒 DNA 纯化试剂盒(Ultrapure Plasmid DNA Purification Kit)抽提纯化质粒 DNA。将上述纯化的质粒 DNA 采用 Invitrogen 公司的脂质体法试剂盒转染 CHO 细胞，操作参照厂家的说明书进行。

转化的 CHO 细胞在选择培养基上进行连续 9 周的选择，最后在 96 孔板上进行极度稀释培养，连续进行 3 次，进行单克隆化。

挑出的单克隆细胞系在 RPM1641 培养基上进行培养，对上清进行 Western 印迹实验，根据染色反应判断表达强度，挑选出表达强的克隆作为候选细胞株，得到表达强度较高的候选克隆 6 个，即 1D4、3C6、2B7、7A3、6H4、5E3。

#### 实施例 4. 单克隆抗体的纯化

本实施例用硫酸铵沉淀法来纯化单克隆抗体。将上述单克隆抗体的纯化采用 Protein A 亲和层析柱从细胞培养上清中直接分离纯化。培养上清经过简单离心，除去细胞残片后即可直接进行 protein A 亲和层析。

将 protein A 填料按照每 100 毫升上清 1 毫升的比例加入填料后，在 4℃ 慢速搅拌 24 小时。然后在 100mM pH8.2 的 Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 缓冲液中漂洗 4 次后，用含 250mM 氯化钠的同样缓冲液洗脱后进行硫酸铵分步沉淀，起始浓度为 35% 饱和度，终止浓度 63% 饱和度。4℃ 处理 12 小时后高速离心，取沉淀，重新溶于上述不含氯化钠的缓冲液中，并于同样缓冲液透析过夜后浓缩 10 倍，待用。

上述样品经 HPLC 检定纯度以及 Follin 酚法定量蛋白质含量，结果发现经过纯化的重组蛋白，其纯度可达 90% 以上，并具有显著的生物活性。

以上亲和层析的产物再次经过分子筛层析，获得了纯度 >98% 的样品。这些样品可以用于以下的进一步分析与研究。

#### 实施例 5. 抗体基因在 CHO 细胞中的表达强度和亲和力测定

##### (a) 表达强度

将上述筛选得到的高表达候选克隆培养于 10cm 的组织培养皿，采用 ELISA 法测量抗体的表达量：羊抗人 IgG (Fc) 包被于 ELISA 板，4℃ 过夜，经 2%BSA 于 37℃ 封闭 2 小时，加入待测的培养上清和标准品(人 IgG1)，37℃ 孵育 2 小时，加入 HRP-羊抗人 IgG(κ) 进行结合反应，37℃ 孵育 1 小时，加入 TMB 于 37℃ 作用 10 分钟，最后用 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应，测 A450 值。测得上述 6 个候选克隆的表达量如下表 2 所示：

表 2 抗体基因在 CHO 细胞中表达强度

细胞株编号	7A3	3C6	2B7	5E2	6H4	1D4
表达量(ug/ml)	158.7	170.5	108.0	92.6	82.3	70.2

从表 2 可以看出，编号为 3C6 的细胞株具有很高的表达水平，该细胞株的表达超过了 150ug/ml，而目前国内外一般的表达量是 100ug/ml 左右，因此本发明获得的细胞株的表达已经超出了国内外单克隆抗体类的一般表达水平。

##### (b) 亲和力测定

按以下方法对各克隆的细胞培养液进行纯化。10000rpm 离心除去细胞和细胞碎

片, 100Kd 截留分子量的滤膜超滤浓缩至 1/10 体积, 超滤缓冲液是 100mM Tris-HCl, pH7.5。过 SPA-sepharose 亲和层析柱, 上样液为 100mM Tris-HCl, pH7.5, 洗脱液为 100mM Tris-HCl, pH7.5, 100mM NaCl。分子筛(Sephadex G200)层析。洗脱液为 100mM Tris-HCl, pH7.5, 得纯品。

亲和力测定采用 Scatchard 分析法(Munson et al, 1980, Anal. BioChem., 107:220)进行, 结果表明, 3C6 单克隆抗体的亲和力达到了  $1.36 \times 10^{-8}$ 。

上述结果表明, 3C6 单克隆抗体的亲和力已经达到 1nM 的水平, 其亲和力已经达到单克隆抗体药物的要求。

### 实施例 6. EGFR 单克隆抗体基因的序列确定

对上述细胞株 3C6 的抗 EGFR 单克隆抗体基因进行 DNA 测序。即用人源抗体可变区通用引物, 进行 PCR 扩增, 获得的轻链和重链可变区委托上海生工公司进行 PCR 测序。

结果显示在下表 3 中。SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO:2 分别是本发明获得的高活性高表达 EGFR 单克隆抗体 3C6 的重链可变区和轻链可变区的 DNA 编码序列; SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 分别是根据上述 DNA 编码序列推测的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

表 3

3C6 重链可变区基因序列(5'-3', 357BP) EGF HV DNA 序列 CAG GTG CAG CTG AAG GAG TCC GGC CCC GGC CTG GTG GCC CCC TCC CAG TCC CTG TCC ATC ACC TGC ACC GTG TCC GGC TTC TCC CTG ACC AAC TAC GGC GTG CAC TGG GTG CGC CAG CCC CCC GGC AAG GGC CTG GAG TGG CTG GGC GTG ATC TGG TCC GGC GGC AAC ACC GAC TAC AAC ACC CCC TTC ACC TCC CGC CTG AAC ATC TCC AAG GAC AAC TCC AAG TCC CAG GTG TTC CTG CGC ATG TAC TCC CTG CAG ACC GAC GAC ACC GCC CGC TAC TAC TGC GCC CGC GCC CTG ACC TAC TAC GAC TAC GAG TTC GCC TAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTG ACC GTG TCC TCC	SEQ ID NO:1
3C6 轻链可变区基因序列(5'-3', 321bp) EGF LV DNA 序列 GAC ATC CTG CTG ACC CAG TCC CCC GCC ATC CTG TCC GTG TCC CCC GGC GAG CGC GTG TCC TTC TCC	SEQ ID NO:2

TGC CGC GCC TCC CAG TCC ATC GGC ACC AAC ATC CAC TGG TAC CAG CAG CGC ACC AAC GGC CCC CCC CGC CTG CTG ATC AAG TAC GCC TCC GAG TCC ATC TCC GGC ATC CCC TCC CGC TTC TCC GGC TCC GGC TCC GGC ACC GAC TTC ACC CTG TCC ATC TCC TCC GTG GAG TCC GAG GAC ATC GCC GAC TAC TAC TGC CAG CAG AAC AAC AAC TGG CCC ACC ACC TTC GGC GGC GGC ACC AAG CTG GAG ATC AAG	
3C6 重链可变区氨基酸序列(5'-3', 119aa) QVQLKESGPGGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVR QPPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFSLNISKDNSKS QVFLRMYSLQTDDTARYYCARALTYDYEFAYWGQG TLVTVSS	SEQ ID NO:3
3C6 轻链可变区的氨基酸序列(5'-3', 107aa) DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRT NGPPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSSSVESE DIADYYCQQNNNWPTTFGGGKLEIK	SEQ ID NO:4

### 实施例 7. 3C6 所产生的单克隆抗体的生物学活性检测

用常规方法分离人外周血淋巴细胞，调整细胞密度为  $2 \times 10^6$  细胞/毫升。将两人 PBMC (同种异体双向 MLR) 等体积混合，以  $2 \times 10^5$  细胞/孔的密度接种“U”型 96 孔培养板。加入不同体积的纯化融合蛋白，设置等体积相应空载体转染上清或培养基作对照，每组 3 个孔， $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  培养 5 天，终止培养前 16 小时加入  $^3\text{H-TdR}$  (终浓度  $5\mu\text{Ci/ml}$ )。收集细胞于 0.45 微米微孔滤膜上，烘干，用液体闪烁计数器测 DPM 值。统计学处理结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示，用 Microsoft Excel 统计程序进行均数差异显著性分析。

在 MLR 反应体系中，分别加入 1 微升、5 微升和 10 微升经抗 EGFR 单克隆抗体表达载体或空载体转染、Protein A 纯化的 CHO 细胞上清。结果表明，即使加入 1 微升 Protein A 纯化的细胞上清也能显著抑制人外周血 MLR，抑制率为 66%~75%；而加入同样体积的空载体转染的 CHO 细胞上清，则无此作用。经单因素方差分析，其差异达到非常显著的水平，结果见表 3。

表3 纯化 EGFR 单克隆抗体对人 MLR 中淋巴细胞增殖的影响 (DPM, n=3)

试验分组 ( $\mu\text{l}/\text{孔}$ )	0	1	5	10
纯化的单克隆抗体 3C6	3690 $\pm$ 286	2216 $\pm$ 220	1530 $\pm$ 188	856 $\pm$ 190
对照	4239 $\pm$ 325	4476 $\pm$ 302	4585 $\pm$ 310	4310 $\pm$ 290

MLR 实验表明测试蛋白具有抑制免疫应答反应的活性，并且 3C6 所产生的单克隆抗体具有很强的抑制作用。以上结果表明在 CHO 细胞中表达了有生物学活性的抗 EGFR 单克隆抗体。

尽管本发明描述了具体的例子，但是有一点对于本领域技术人员来说是明显的，即在不脱离本发明的精神和范围的前提下可对本发明作各种变化和改动。因此，所附权利要求覆盖了所有这些在本发明范围内的变动。

---

 序列表

<110> 上海张江生物技术有限公司

<120> 重组抗 EGFR 单克隆抗体

<130> 051028

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 357

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

cagggtgcagc tgaaggagtc cggccccggc ctggtggccc cctcccagtc cctgtccatc      60
acctgcaccg tgtccggctt ctccctgacc aactacggcg tgcaactgggt gcgccagccc      120
cccggcaagg gcctggagtg gctgggcgtg atctggtccg gcggcaaac cgactacaac      180
acccccttca cctccgcct gaacatctcc aaggacaact ccaagtcca ggtgttctctg      240
cgcatgtact cctgcagac cgacgacacc gcccgtact actgagcccg cgccctgacc      300
tactacgact acgagttcgc ctactggggc cagggcaccc tggtgaccgt gtcctcc      357

```

<210> 2

<211> 321

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2  
 gacatcctgc tgaccagtc cccgccatc ctgtccgtgt cccccggcga gcgcgtgtcc 60  
 ttctctgcc ggcctccca gtccatcggc accaacatcc actggtacca gcagcgcacc 120  
 aacggccccc cccgctgct gatcaagtac gcctccgagt ccatctccgg catcccctcc 180  
 cgcttctccg gctccggctc cggcaccgac ttcacctgt ccatctctc cgtggagtcc 240  
 gaggacatcg ccgactacta ctgccagcag aacaacaact ggcccaccac cttcggcggc 300  
 ggcaccaagc tggagatcaa g 321

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr  
 50 55 60

Ser Arg Leu Asn Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn  
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Pro Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Glu Ser  
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

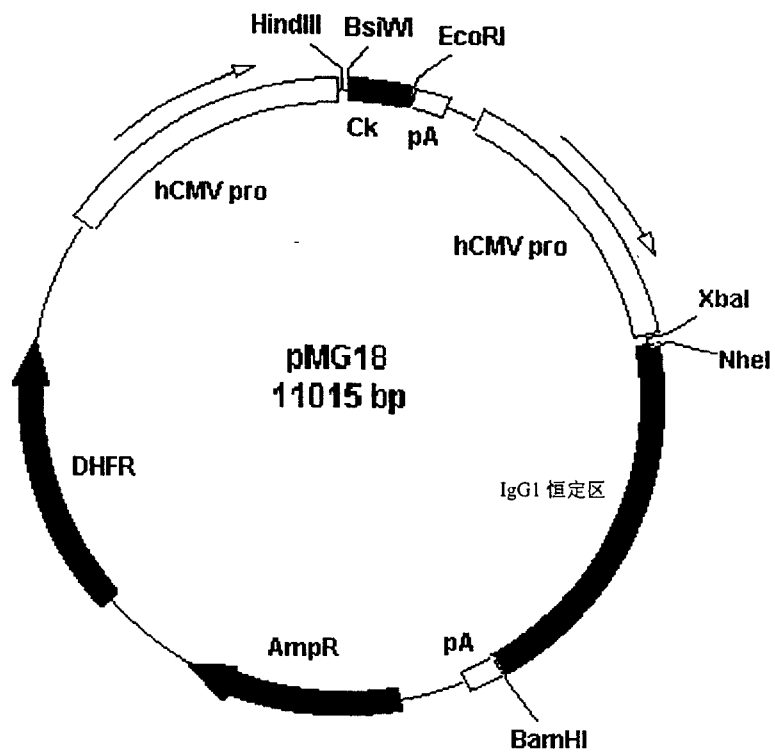


图 1