

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2017 年 1 月 26 日 (26.01.2017)



(10) 国际公布号  
**WO 2017/012567 A1**

(51) 国际专利分类号:

*C07K 16/30* (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)  
*C07K 16/46* (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)  
*C07K 19/00* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)  
*C12N 15/62* (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/090892

(22) 国际申请日: 2016 年 7 月 21 日 (21.07.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201510431481.6 2015 年 7 月 21 日 (21.07.2015) CN

(71) 申请人: 上海益杰生物技术有限公司 (SHANGHAI YIJIE BIOTECHNOLOGY CO. LTD) [CN/CN]; 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 6 号楼 316 室, Shanghai 200233 (CN)。

(72) 发明人: 王华茂 (WANG, Huamao); 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 6 号楼 316 室, Shanghai 200233 (CN)。 宋波 (SONG, Bo); 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 6 号楼 316 室, Shanghai 200233 (CN)。

(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路 958

号天地科技广场 1 号楼 106 室, Shanghai 200333 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: TUMOR-SPECIFIC ANTI-EGFR ANTIBODY AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 肿瘤特异性抗 EGFR 抗体及其应用

(57) Abstract: The present invention provides a tumor-specific anti-EGFR antibody and application thereof. The antibody can be used for preparing targeted antitumor drugs and tumor diagnosis drugs.

(57) 摘要: 本发明提供了一种肿瘤特异性抗 EGFR 抗体及其应用。该抗体可用于制备靶向性抗肿瘤药物以及诊断肿瘤的药物。



WO 2017/012567 A1

## 肿瘤特异性抗 EGFR 抗体及其应用

### 技术领域

本发明属于免疫性领域，更具体地，本发明涉及肿瘤特异性抗 EGFR 抗体及其应用。

5

### 背景技术

EGFR 在很多肿瘤中过量表达或变异，如何选择性地识别这些过量表达或变异的 EGFR 无疑是一个很重要的科学问题。迄今为止，针对 EGFR287-302 表位的抗体被认为可以达到识别肿瘤表面过量表达 EGFR、EGFRvIII、de4 EGFR 的目的，但却不识别正常细胞的 EGFR。很遗憾的是针对该表位的抗体在临床实验中，还是会有病人出现皮疹等副作用 (<http://meetinglibrary.asco.org/content/115945-132>), 表明仅仅针对该表位可能还是会识别正常细胞(如角质上皮细胞)的 EGFR。

10

因此，如何筛选更高肿瘤特异性的抗 EGFR 抗体显得非常迫切。高度肿瘤特异的抗体，不管是用于肿瘤影像学诊断、个体化诊断或者是肿瘤靶向治疗等都具有非常大的潜在应用价值。

15

### 发明内容

本发明的目的在于提供肿瘤特异性抗 EGFR 抗体及其应用。

在本发明的第一方面，提供一种特异性识别肿瘤细胞表达的 EGFRvIII 或者过量表达的 EGFR 的抗体，该抗体具有轻链可变区和重链可变区，且，

20

其轻链可变区的 CDR1 具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 41，SEQ ID NO: 47，SEQ ID NO: 55；

其轻链可变区的 CDR2 具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 42，SEQ ID NO: 53；

其轻链可变区的 CDR3 具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 43，SEQ ID NO: 48，

25

SEQ ID NO: 54，SEQ ID NO: 56，SEQ ID NO: 57；

其重链可变区的 CDR1 具有氨基酸序列：SEQ ID NO: 44；

其重链可变区的 CDR2 具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 45，SEQ ID NO: 49，SEQ ID NO: 51，SEQ ID NO: 52；

其重链可变区的 CDR3 具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 46，SEQ ID NO: 50。

30

在一个优选例中，所述的抗体包括：

抗体(a)，其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 42 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 43 所示的 CDR3；或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 45 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 46 所示的 CDR3；

抗体(b)，其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 47 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 42 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 48 所示的 CDR3；或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 49 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3；

35

抗体(c),其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 42 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 48 所示的 CDR3;或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 51 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3;

5 抗体(d),其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 42 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 43 所示的 CDR3;或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 52 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3;

抗体(e),其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 42 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 43 所示的 CDR3;或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 45 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3;

10 抗体(f),其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 53 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 54 所示的 CDR3;或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 51 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3;

抗体(g),其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 42 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 54 所示的 CDR3;或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 15 51 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3;

抗体(h),其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 55 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 42 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 56 所示的 CDR3;或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 45 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3;

20 抗体(i),其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 53 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 56 所示的 CDR3;或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 52 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3;

抗体(j),其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 42 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 56 所示的 CDR3;或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 52 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3;

25 抗体(k),其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 42 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 57 所示的 CDR3;或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 52 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3; 或

抗体(l), 识别与(a)~(k)中任一项所述的抗体所识别的抗原决定部位相同的抗原决定部位。

30 在另一优选例中,所述的特异性识别肿瘤细胞表达的 EGFRvIII 或者过量表达的 EGFR 可以是:单链抗体(scFV),单克隆抗体,结构域抗体,Fab 片段,Fd 片段,Fv 片段,F(ab')<sub>2</sub> 片段和其衍生物,或其它形式的抗体;较佳地为单链抗体。

在另一优选例中,所述的特异性识别肿瘤细胞表达的 EGFRvIII 或者过量表达的 EGFR 的抗体是人源化的,全人源的,嵌合的或鼠源的。

35 在另一优选例中,所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 中第 124-239 位所示;或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 中第 1-108 位

所示;

所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 59 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 59 中第 1-108 位所示;

5 所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 61 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 61 中第 1-108 位所示;

所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 63 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 63 中第 1-108 位所示;

所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 65 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 65 中第 1-108 位所示;

10 所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 67 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 67 中第 1-108 位所示;

所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 69 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 69 中第 1-108 位所示;

15 所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 71 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 71 中第 1-108 位所示;

所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 73 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 73 中第 1-108 位所示;

所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 75 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 75 中第 1-108 位所示; 或

20 所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 77 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 77 中第 1-108 位所示。

在另一优选例中, 所述的抗体是抗体(a); 更佳的, 所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 中第 1-108 位所示。

25 在本发明的另一方面, 提供编码前面所述的抗体的核酸。

在本发明的另一方面, 提供一种表达载体, 其包含所述的核酸。在另一优选例中, 所述的表达载体是 PH/DHFR 载体。

在本发明的另一方面, 提供一种宿主细胞, 其包含所述的表达载体或基因组中整合有所述的核酸。在另一优选例中, 所述的宿主细胞是真核宿主细胞或原核宿主细胞; 较佳地位  
30 真核宿主细胞, 更佳地为中国仓鼠卵巢细胞(CHO)。

在本发明的另一方面, 提供前面任一所述的抗体的用途, 用于制备特异性靶向表达 EGFRvIII 或过量表达的 EGFR 的肿瘤细胞的靶向性药物, 抗体药物偶联物或多功能抗体; 或用于制备诊断肿瘤的试剂, 该肿瘤表达 EGFRvIII 或过量表达的 EGFR; 或用于制备嵌合  
35 抗原受体修饰的免疫细胞; 较佳地, 所述免疫细胞包括: T 淋巴细胞、NK 细胞或者 NKT 淋巴细胞。

在本发明的另一方面, 提供一种多功能免疫缀合物, 所述的多功能免疫缀合物包括:

前面任一所述的抗体；以及与之连接(包括共价连接、偶联、附着、吸附)的功能性分子；所述的功能性分子选自：靶向肿瘤表面标志物的分子，抑制肿瘤分子，靶向免疫细胞的表面标志物的分子或可检测标记物。

5 在一个优选例中，所述的靶向肿瘤表面标志物的分子是结合肿瘤表面标志物的抗体或配体；或所述的抑制肿瘤分子是抗肿瘤的细胞因子或抗肿瘤的毒素；较佳地，所述的细胞因子包括(但不限于)：IL-12、IL-15、IFN-beta、TNF-alpha。

在另一优选例中，所述的多功能免疫缀合物中，所述的可检测标记物包括：荧光标记物、显色标记物。

10 在另一优选例中，所述的多功能免疫缀合物中，所述的靶向免疫细胞的表面标志物的分子是结合免疫细胞表面标志物的抗体或配体；较佳地，所述的免疫细胞表面标志物包括(但不限于)：CD3，CD16，CD28。

在另一优选例中，所述的多功能免疫缀合物中，所述的靶向免疫细胞的表面标志物的分子是结合 T 细胞表面标志物的抗体，其与前面任一所述的抗体形成 T 细胞参与的双功能抗体(Bispecific T cell engager, BiTE)。

15 在另一优选例中，所述的多功能免疫缀合物中，所述的结合免疫细胞表面标志物的抗体是抗 CD3 抗体。在另一优选例中，所述的抗 CD3 抗体是单链抗体(scFV)，单克隆抗体，Fab 片段，Fd 片段，Fv 片段，F(ab')<sub>2</sub> 片段和其衍生物，或其它形式的抗体；较佳地为单链抗体。在另一优选例中，所述的抗 CD3 抗体是人源化的，全人源的，嵌合的或鼠源的。

20 在另一优选例中，所述的多功能免疫缀合物是融合多肽，且，前面任一所述的抗体以及与之连接的功能性分子之间，还包括连接肽(接头)。

在另一优选例中，所述的连接肽的序列为(GlyGlyGlyGlySer)<sub>n</sub>，其中 n 为 1 到 5 的整数；更佳地，n=3。

在另一优选例中，所述的多功能免疫缀合物采用多肽的形式给药或采用基因给药的方式。

25 在本发明的另一方面，提供编码所述的多功能免疫缀合物的核酸。

在本发明的另一方面，提供前面任一所述的多功能免疫缀合物的用途，用于制备抗肿瘤药物，或用于制备诊断肿瘤的试剂，该肿瘤表达 EGFRvIII 或过量表达的 EGFR；或用于制备嵌合抗原受体修饰的免疫细胞；较佳地，所述免疫细胞包括：T 淋巴细胞、NK 细胞或者 NKT 淋巴细胞。

30 在本发明的另一方面，提供包含前面任一所述的抗体的嵌合抗原受体，其表达于免疫细胞表面，所述的嵌合抗原受体包含顺序连接的：前面任一所述的抗体，跨膜区和胞内信号区；所述的胞内信号区选自：CD3ζ，FcεRIγ，CD27，CD28，CD137，CD134 的胞内信号区序列，或其组合。

在一个优选例中，所述的跨膜区包含 CD8 或 CD28 的跨膜区。

35 在另一优选例中，所述的免疫细胞包括：T 淋巴细胞，NK 细胞或 NKT 细胞。

在另一优选例中，所述的嵌合抗原受体包括如下的顺序连接的抗体，跨膜区和胞内信

号区：

前面任一所述的抗体、CD8 和 CD3 $\zeta$ ；

前面任一所述的抗体、CD8、CD137 和 CD3 $\zeta$ ；

前面任一所述的抗体、CD28 分子的跨膜区、CD28 分子的胞内信号区和 CD3 $\zeta$ ；或

5 前面任一所述的抗体、CD28 分子的跨膜区、CD28 分子的胞内信号区、CD137 和 CD3 $\zeta$ 。

在另一优选例中，所述的抗体是单链抗体或结构域抗体。

在另一优选例中，所述的嵌合抗原受体具有：

SEQ ID NO: 36 或其中第 285-601 位所示的氨基酸序列；或

SEQ ID NO: 37 或其中第 285-702 位所示的氨基酸序列；或

10 SEQ ID NO: 38 或其中第 285-744 位所示的氨基酸序列；或

SEQ ID NO: 39 或其中第 285-749 位所示的氨基酸序列；或

SEQ ID NO: 40 或其中第 285-791 位所示的氨基酸序列。

在本发明的另一方面，提供编码前面任一所述的嵌合抗原受体的核酸。在另一优选例中，编码所述的嵌合抗原受体的核酸具有：

15 SEQ ID NO: 31 或其中第 966-1916 所述的核苷酸序列；或

SEQ ID NO: 32 或其中第 966-2219 所述的核苷酸序列；或

SEQ ID NO: 33 或其中第 966-2345 所述的核苷酸序列；或

SEQ ID NO: 34 或其中第 966-2360 所述的核苷酸序列；或

SEQ ID NO: 35 或其中第 966-2486 所述的核苷酸序列。

20 在本发明的另一方面，提供一种表达载体，其包含前面所述的核酸。

在另一优选例中，所述的表达载体来源于慢病毒质粒 pWPT (或 pWPT-eGFP)。

在本发明的另一方面，提供一种病毒，所述的病毒包含前面所述载体。

前面任一所述的嵌合抗原受体或编码其的核酸、或含有该核酸的表达载体或病毒的用途，用于制备靶向表达 EGFRvIII 或者过量表达 EGFR 的肿瘤细胞的基因修饰的免疫细胞。

25 在本发明的另一方面，提供一种基因修饰的免疫细胞，其转导有所述的核酸，或所述的表达载体或所述的病毒；或其表面表达所述的嵌合抗原受体。

在一个优选例中，所述的免疫细胞还携带外源的细胞因子的编码序列；较佳地，所述的细胞因子包括：IL-12，IL-15 或 IL-21。

30 在另一优选例中，所述的免疫细胞其还表达另一种嵌合抗原受体，该受体不含有 CD3 $\zeta$ ，但含有 CD28 的胞内信号结构域、CD137 的胞内信号结构域或者这两者的组合。

在另一优选例中，所述的免疫细胞还表达趋化因子受体；较佳地，所述的趋化因子受体包括：CCR2。

在另一优选例中，所述的免疫细胞还表达能降低 PD-1 表达的 siRNA 或者阻断 PD-L1 的蛋白。

35 在另一优选例中，所述的免疫细胞还表达安全开关；较佳地，所述的安全开关包括：iCaspase-9，Truncated EGFR 或 RQR8。

在本发明的另一方面，提供所述的基因修饰的免疫细胞的用途，用于制备抑制肿瘤的药物，所述的肿瘤是表达 EGFRvIII 或者过量表达 EGFR 的肿瘤。

在本发明的另一方面，提供药物组合物(包括药物或诊断试剂)，其包括：

前面任一所述的抗体或编码该抗体的核酸；或

5 前面任一所述的免疫组合物或编码该组合物的核酸；或

前面任一所述的嵌合抗原受体或编码该嵌合抗原受体的核酸；或

前面任一所述的基因修饰的免疫细胞。

本发明的其它方面由于本文的公开内容，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

## 10 附图说明

图 1、抗体 7B3 和 Y022 能特异性结合抗原 EGFRvIII 和 N1N2-806(噬菌体 ELISA 实验)。

图 2、抗体 7B3 对抗原 EGFRvIII 的结合曲线。

图 3、抗体 Y022 对抗原 EGFRvIII 的结合曲线。

图 4、三种 scFv-Fc 融合抗体的纯化电泳图。

15 图 5、FACS 检测单链抗体 scFv-Y022-Fc，scFv-806-Fc 以及 scFv-C225-Fc 与细胞表面 EGFR 的结合能力。

图 6、pH-Y022/CD3 表达载体结构示意图。

图 7、单链双功能抗体 Y022/CD3、806/CD3 和 C225/CD3 的 SDS-PAGE 检测。

图 8、FACS 检测 Y022/CD3 单链双功能抗体的抗原结合特异性。

20 图 9、单链双功能抗体的细胞毒性图。

图 10、嵌合抗原受体各部分的连接顺序示意图。

## 具体实施方式

25 本发明人经过深入的研究筛选，获得了一种特异性识别肿瘤细胞 EGFRvIII 或过量表达的 EGFR、而几乎不识别正常细胞 EGFR 的抗体。本发明的抗体可以被应用于制备各种靶向性抗肿瘤药物以及诊断肿瘤的药物。

## 抗 EGFR 抗体

30 本发明人在前期已经获得的人源化抗体基础上进一步进行筛选以及氨基酸突变，找到了一种能够更特异地针对肿瘤细胞 EGFR 的抗 EGFR 抗体，其选择性地结合过量表达 EGFR 或者 EGFRvIII 的肿瘤，而与正常细胞 EGFR 不结合。

本发明的抗体可以是完整的免疫球蛋白分子，也可以是抗原结合片段，包括但不限于 Fab 片段，Fd 片段，Fv 片段，F(ab')<sub>2</sub> 片段、互补决定区(CDR)片段、单链抗体(scFv)、结构域抗体，二价单链抗体、单链噬菌体抗体、双特异双链抗体、三链抗体、四链抗体。

35 抗体的抗原结合特性可由位于重链和轻链可变区的3个特定的区域来描述，称为互补决定区(complementarity determining region, CDR)，所述的CDR区将可变区间隔成4个框架区域

(FR)，4个FR的氨基酸序列相对比较保守，不直接参与结合反应。这些CDR形成环状结构，通过其间的FR形成的 $\beta$ 折叠在空间结构上相互靠近，重链上的CDR和相应轻链上的CDR构成了抗体的抗原结合位点。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了FR或CDR区域。CDR区是免疫学感兴趣的蛋白质的序列，本发明的抗体的CDR区是全新的。所述抗体可包含本文揭示的二、三、四、五或者所有六个CDR区。

本发明的另一方面包括本文所述抗体的功能变体。如果变体能与亲代抗体竞争特异性结合SEQ ID NO: 1，且其识别肿瘤细胞EGFRvIII或过量表达的EGFR的能力接近于本发明实施例中提供的具体的抗体。所述功能变体可以具有保守序列修饰，包括核苷酸和氨基酸取代、添加和缺失。这些修饰可以通过本领域已知的标准技术导入，例如定向诱变和随机PCR介导的诱变，并且可包含天然以及非天然核苷酸和氨基酸。较佳地，序列的修饰发生在所述抗体的CDR区以外的区域上。

### 免疫缀合物

本发明还提供了多功能免疫缀合物，其包含本文所述抗体以及进一步包含至少一种其它类型的功能性分子。所述的功能性分子选自但不限于：靶向肿瘤表面标志物的分子，抑制肿瘤分子，靶向免疫细胞的表面标志物的分子或可检测标记物。所述抗体与所述功能性分子可以通过共价连接、偶联、附着、交联等方式构成缀合物。

作为一种优选方式，所述免疫缀合物可包含：本发明的抗体以及至少一种靶向肿瘤表面标志物的分子或抑制肿瘤分子。所述的抑制肿瘤分子可以是抗肿瘤的细胞因子，或抗肿瘤的毒素；较佳地，所述的细胞因子包括(但不限于)：IL-12、IL-15、IFN-beta、TNF-alpha。所述的靶向肿瘤表面标志物的分子例如可以与本发明的抗体协同作用，更精准地靶向肿瘤细胞。

作为一种优选方式，所述免疫缀合物可包含：本发明的抗体以及可检测标记物。所述的可检测标记物包括但不限于：荧光标记物、显色标记物；如：酶、辅基、荧光材料、发光材料，生物发光材料、放射性材料、正电子发射金属以及非放射性顺磁性金属离子。也可包含一个以上的标记物。为了检测和/或分析和/或诊断目的用于标记抗体的标记依赖于使用的特定检测/分析/诊断技术和/或方法例如免疫组织化学染色(组织)样品、流式细胞计量术等。对于本领域已知的检测/分析/诊断技术和/或方法合适的标记为本领域技术人员所熟知。

作为一种优选方式，所述免疫缀合物可包含：本发明的抗体以及靶向免疫细胞的表面标志物的分子。所述靶向免疫细胞的表面标志物的分子可识别免疫细胞，其携带本发明的抗体达到免疫细胞，同时本发明的抗体可将免疫细胞靶向于肿瘤细胞，从而引发免疫细胞特异性地杀伤肿瘤。

作为通过直接或间接(例如通过接头)缀合而化学产生免疫缀合物的一种方式，所述免疫缀合物可以作为融合蛋白而产生，所述融合蛋白包含本发明的抗体及合适的其它蛋白。融合蛋白可以通过本领域已知方法产生，例如通过构建核酸分子以及随后表达所述核酸分子而重组产生，所述核酸分子包含符合读框的编码抗体的核苷酸序列以及编码合适标记的核苷酸序



列。

本发明另一方面提供了编码本发明的至少一种抗体、其功能变体或者免疫缀合物的核酸分子。一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

5 本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。

### 嵌合抗原受体及基因修饰的免疫细胞

10 本发明提供了一种表达于免疫效应细胞(免疫细胞)表面的嵌合抗原受体，所述的嵌合抗原受体包含顺序连接的：胞外结合区，跨膜区和胞内信号区，其中所述胞外结合区包含本发明的抗体。将该嵌合抗原受体表达于免疫效应细胞的表面，可使得免疫效应细胞对表达 EGFRvIII 或过量表达 EGFR 的肿瘤细胞具有高度特异性的细胞毒性作用。

如本文所用，所述的“免疫细胞”与“免疫效应细胞”可互换使用，其包括：T 淋巴细  
15 胞，NK 细胞或 NKT 细胞等。

作为本发明的优选方式，所述的嵌合抗原受体中，包含的抗体为单链抗体，其通过 CD8 铰链区与 CD8 或者 CD28 的跨膜区相连接，跨膜区后紧接胞内信号区。

本发明也包括编码所述嵌合抗原受体的核酸。本发明还涉及上述多核苷酸的变异体，其编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽或多肽的片段、类似物和衍生物。

20 嵌合抗原受体的跨膜区可以选自 CD8 或 CD28 等蛋白的跨膜区。人 CD8 蛋白是个异二聚体，由  $\alpha\beta$  或者  $\gamma\delta$  两条链组成。在本发明的一个实施方案中，跨膜区选自 CD8 $\alpha$  或者 CD28 的跨膜区。此外，CD8 $\alpha$  铰链区(hinge)是一个柔性区域，因此，CD8 或 CD28 和跨膜区加上铰链区被用于将嵌合抗原受体 CAR 的靶点识别结构域 scFv 和胞内信号区连接起来。

胞内信号区可以选自 CD3 $\zeta$ ，Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ ，CD28，CD137，CD134 蛋白的胞内信号区，及其  
25 组合。CD3 分子由五个亚单位组成，其中 CD3 $\zeta$  亚单位(又称 CD3 zeta，简称 Z)含有 3 个 ITAM 基序，该基序是 TCR-CD3 复合体中重要的信号转导区。CD3 $\delta$ Z 是截短的不具有 ITAM 基序的 CD3 $\zeta$  序列，在本发明实践中一般作为阴性对照的构建。Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  主要分布在肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面，其含有一个 ITAM 基序，在结构、分布及功能上与 CD3 $\zeta$  类似。此外如前所述，CD28，CD137，CD134 是共刺激信号分子，在与各自配体结合后其胞内信号区段产  
30 生的共刺激作用引起免疫效应细胞(主要是 T 淋巴细胞)的持续增殖，并能够提高免疫效应细胞分泌 IL-2 和 IFN- $\gamma$  等细胞因子的水平，同时提高 CAR 免疫效应细胞在体内的存活周期和抗肿瘤效果。

本发明的嵌合抗原受体可以按如下方式顺序连接：

本发明的抗体、CD8 和 CD3  $\zeta$  ；

35 本发明的抗体、CD8、CD137 和 CD3  $\zeta$  ；

本发明的抗体、CD28 分子的跨膜区、CD28 分子的胞内信号区和 CD3  $\zeta$  ；或

本发明的抗体、CD28 分子的跨膜区、CD28 分子的胞内信号区、CD137 和 CD3  $\zeta$ 。

及其组合，其中相关嵌合抗原受体蛋白中 CD28a 代表 CD28 分子的跨膜区，CD28b 代表 CD28 分子的胞内信号区。上述各种嵌合抗原受体统称为 scFv(EGFR)-CAR。

5 本发明还提供了包含上述编码表达于免疫效应细胞表面的嵌合抗原受体蛋白的核酸的载体。在一个具体实施方案中，本发明使用的载体是一种慢病毒质粒载体 pWPT-eGFP。该质粒属于第三代自灭活慢病毒载体系统，该系统共有三个质粒即编码蛋白 Gag/Pol、编码 Rev 蛋白的包装质粒 psPAX2；编码 VSV-G 蛋白的包膜质粒 PMD2.G；及空载体 pWPT-eGFP，其可以用于重组引入目的核酸序列，即编码 CAR 的核酸序列。空载体 pWPT-eGFP 中由延长因子-1  $\alpha$ (elongation factor-1 $\alpha$ , EF-1 $\alpha$ )启动子调控增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, eGFP)的表达。而包含编码 CAR 的目的核酸序列的重组表达载体 pWPT-eGFP-F2A-CAR 是通过由来自口蹄疫病毒(food-and-mouth disease virus, FMDV)的核糖体跳跃序列(ribosomal skipping sequence 2A)(简称 F2A)实现 eGFP 与 CAR 的共表达的。

15 本发明还包括包含上述载体的病毒。本发明的病毒包括包装后的具有感染力的病毒，也包括包含包装为具有感染力的病毒所必需成分的待包装的病毒。本领域内已知的其它可用于将外源基因转导入免疫效应细胞的病毒及其对应的质粒载体也可用于本发明。

20 本发明还提供了基因修饰的免疫效应细胞，其被转导有本发明的核酸或被转导有本发明的上述包含所述含有该核酸的重组质粒，或包含该质粒的病毒。本领域常规的核酸转导方法，包括非病毒和病毒的转导方法都可以用于本发明。基于非病毒的转导方法包括电穿孔法和转座子法。近期 Amaxa 公司研发的 Nucleofector 核转染仪能够直接将外源基因导入细胞核获得目的基因的高效转导。另外，基于睡美人转座子(Sleeping Beauty system)或 PiggyBac 转座子等转座子系统的转导效率较普通电穿孔有较大提高，将 nucleofector 转染仪与睡美人转座子系统联合应用已有报道[Davies JK., et al. Combining CD19 redirection and alloanergization to generate tumor-specific human T cells for allogeneic cell therapy of B-cell malignancies. Cancer Res, 2010, 70(10): OF1-10.]，该方法既具有较高的转导效率又能够实现目的基因的定点整合。在本发明的一个实施方案中，实现嵌合抗原受体基因修饰的免疫效应细胞的转导方法是基于病毒如逆转录病毒或慢病毒的转导方法。该方法具有转导效率高，外源基因能够稳定表达，且可以缩短体外培养免疫效应细胞到达临床级数量的时间等优点。在该转基因免疫效应细胞表面，转导的核酸通过转录、翻译表达在其表面。通过对各种不同的培养的肿瘤细胞进行体外细胞毒实验证明，本发明的免疫效应细胞具有高度特异性的肿瘤细胞杀伤效果(亦称细胞毒性)。因此本发明的编码嵌合抗原受体蛋白的核酸，包含该核酸的质粒，包含该质粒的病毒和转导有上述核酸，质粒或病毒的转基因免疫效应细胞可以有效地用于肿瘤的免疫治疗。

35 本发明所述的免疫细胞还可以携带外源的细胞因子的编码序列；所述的细胞因子包括但不限于：IL-12，IL-15 或 IL-21 等。这些细胞因子具有免疫调节或抗肿瘤的活性，能增强效应 T 细胞及活化的 NK 细胞的功能，或直接发挥抗肿瘤作用。因此，本领域技术人员可以理解，这些细胞因子的运用有助于所述的免疫细胞更好地发挥作用。

本发明所述的免疫细胞还可以表达除了上述嵌合抗原受体以外的另一种嵌合抗原受体，该受体不含有 CD3 $\zeta$ ，但含有 CD28 的胞内信号结构域、CD137 的胞内信号结构域或者这两者的组合。

5 本发明所述的免疫细胞还可以表达趋化因子受体；所述的趋化因子受体包括但不限于 CCR2。本领域技术人员可以理解，所述的 CCR2 趋化因子受体可以使得体内的 CCR2 与之竞争性结合，对于阻断肿瘤的转移是有利的。

本发明所述的免疫细胞还可以表达能降低 PD-1 表达的 siRNA 或者阻断 PD-L1 的蛋白。本领域技术人员可以理解，竞争性阻断 PD-L1 与其受体 PD-1 的相互作用，有利于恢复抗肿瘤 T 细胞反应，从而抑制肿瘤生长。

10 本发明所述的免疫细胞还可以表达安全开关；较佳地，所述的安全开关包括：iCaspase-9，Truncated EGFR 或 RQR8。

### 药物组合物

15 本发明的抗体、包含该抗体的免疫组合物以及基因修饰的免疫细胞可以应用于制备药物组合物或诊断试剂。所述的组合物除了包括有效量的所述抗体、免疫组合物或免疫细胞，还可包含药学上可接受的载体。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。

20 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。

25 本发明的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。给药方式例如可以采用注射或其它治疗方式。

30 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 J.萨姆布鲁克等编著，分子克隆实验指南，第三版，科学出版社，2002 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

### 实施例 1、单链抗体 7B3 亲和力成熟库的构建

35 单链抗体 7B3 是一个经过人源化改造的抗体片段，能特异性识别在肿瘤细胞中暴露的 EGFR 的第 287-302 位氨基酸序列形成的隐蔽表位(<sup>287</sup>CGADSYEMEEDGVRKC<sup>302</sup>)(SEQ ID

NO: 1))。其 VL 和 VH 基因的核苷酸序列得自专利 201210094008.x 中所示的序列 SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 13, 并按照 VL<sub>7B3</sub>-接头-VH<sub>7B3</sub> 的顺序连接而成。

单链抗体 7B3 的核苷酸序列(717 个碱基对, SEQ ID NO: 2):

5 GATATTCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGGAGCGTGGGCGACCGTGTGACC  
ATTACCTGCCATGCGAGCCAGGATATTAACAGCAACATTGGCTGGCTGCAGCAGAAACCG  
GGCAAAGCGTTTAAAGGCCTGATTTATCATGGCAAAAACCTGGAAGATGGCGTGCCGAGC  
CGTTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCG  
GAAGATTTTGCGACCTATTATTGCGTTCAGTACGCCAGTTCCCATATACATTTGGCCAG  
GGCACCAAAGTGGAATTAACGT *GGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGT*  
10 *GGCGGATCG*GATGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCTGGTGCAGCCGGGCGGCAGC  
CTGCGTCTGAGCTGCGCGGTGAGCGGCTATAGCATTACCAGCGATTATGCGTGGAACCTGG  
ATTGCTCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCTATATTAGCTATCGTGGCCGC  
ACCAGCTATAACCCGAGCCTGAAAAGCCGTATTAGCATTACCCGTGATAACAGCAAAAAC  
ACCTTTTTCCTGCAGCTGAACAGCCTGCGTGCGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCG  
15 CGCCTGGGACGCGGCTTCGCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC

单链抗体 7B3 的氨基酸序列(239 个氨基酸, SEQ ID NO: 3; 划线区依次为 7B3 VL CDR1、CDR2、CDR3, 7B3 VH CDR1、CDR2、CDR3):

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCHASQDINSNIGWLQQKPGKAFKGLIYHGKNLEDGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLP  
EDFATYYCVQYAQFPYTFGQGTKVEIKRGGGSGGGSGGGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWNW  
20 IRQAPGKGLEWLGYISYRGRTSYNPSLSKRISITRDNSKNTFFLQLNSLRAEDTAVYYCARLGRGFRYWGQGTLTVSS

为提高 7B3 单链抗体对 EGFR 结合能力, 分别对其轻链 CDR3 和重链 CDR3 区域的部分氨基酸进行随机突变, 并构建对应的亲和力成熟文库。

### 1、7B3 轻链 CDR3 亲和力成熟库的构建

25 通过对 7B3 单链抗体进行序列比对和分析, 7B3 轻链第三个 CDR 区域的部分氨基酸被选定, 通过引物引入随机化突变, 用于构建轻链亲和力成熟文库。

为制备编码 7B3 突变体文库的 DNA 片段, 以质粒 pCantab 5E-7B3(将 7B3 插入到 pCantab 5E-7B3 的 *sfiI*/*NotI* 位点中)为模板, 通过 PCR 方法分别得到两段 DNA 片段, 随后通过搭桥 PCR 的方式拼接而成。具体使用以下操作步骤: 为合成基因, 在 50  $\mu$ l 体积重进行 PCR 反应,  
30 每个反应使用质粒 pCantab 5E-7B3 作为模板, 每条引物的终浓度为 0.2  $\mu$ M, 以及 5  $\mu$ l 10 $\times$  KOD Plus 缓冲液、4  $\mu$ l dNTPs(dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP, 每种 2 mM)、2  $\mu$ l 25 mM MgSO<sub>4</sub> 和 1 U KOD Plus (购自 Takara), 用水补足体积后, 在热循环仪中开始 PCR 程序。反应先加热样品到 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟, 然后保温 25 个循环, 每个循环是 94 $^{\circ}$ C 30 秒、56 $^{\circ}$ C 30 秒和 68 $^{\circ}$ C 30 秒。最后在 68 $^{\circ}$ C 保温 10 分钟。第一个片段的扩增利用引物 pC7B3fw (SEQ ID NO: 4, ATAACAGGCCCAGCCGGCCATGGATATTCAGATGACCCAGAG)和 LR3re(SEQ ID NO: 5, CACTTTGGTGGCCTGGCCAAATGTMNNTGGGNNMN NMNNMNNCTGMN  
35 NGCAATAATAGGTCGCAAAATC), 第二个片段利用引物 LR3f2fw (SEQ ID NO: 6, ACATTTGGCCAGGGCACCAAAG) 和 pC7B3re(SEQ ID NO: 7, ATAAATGCGGCC

预期 PCR 产物通过分析琼脂糖凝胶电泳鉴定，并用 Wizard SV Gel and PCR Clean-up 试剂盒(购自 Promega)从样品中纯化回收。两个片段以等摩尔比加入到第二轮搭桥 PCR 中作为模板，反应体系仍然使用上述提到的 KOD Plus 体系，反应先加热样品到 94℃ 预变性 5 分钟，然后保温 10 个循环，每个循环反应条件是 94℃ 30 秒、60℃ 30 秒和 68℃ 30 秒。最后在 68℃ 保温 10 分钟。随后在反应体系中直接加入终浓度为 0.2 μM 的引物 pC7B3fw 和 pC7B3re，并开始 PCR 程序。反应先加热样品到 94℃ 预变性 5 分钟，然后保温 25 个循环，每个循环是 94℃ 30 秒、56℃ 30 秒和 68℃ 30 秒。最后在 68℃ 保温 10 分钟。预期 PCR 产物通过制备性琼脂糖凝胶电泳分离，并用 Wizard SV Gel and PCR Clean-up 试剂盒根据制造商的说明纯化回收。

完整的文库 DNA 片段两端分别含有 *Sfi*I 和 *Not*I 限制性内切酶识别位点,经限制性内切酶 *Sfi*I/*Not*I (购自 New England Biolabs)进行限制性消化,插入到经过同样双酶切的噬菌粒载体 pCANTAB 5E 中。连接产物使用 Wizard SV Gel and PCR Clean-up 试剂盒分离样品中的 DNA 并脱盐,用于电转化。在电转化时,使用电转化杯和电穿孔仪 Gene Pulser II(购自 Bio-Rad),转化到自制的感受态大肠杆菌 ER2738(购自 New England Biolabs)。最终确认得到一个含有  $1.9 \times 10^9$  个突变体的文库。

通过对 7B3 单链抗体进行序列比对和分析, 7B3 重链第三个 CDR 区域的部分氨基酸被选定, 通过引物引入随机化突变, 用于构建重链亲和力成熟突变体文库。

为制备编码 7B3 突变体文库的 DNA 片段，以质粒 pCantab 5E-7B3 为模板，通过 PCR 方法分别得到两段 DNA 片段，随后通过搭桥 PCR 的方式拼接而成。具体使用以下操作步骤：为合成基因，在 50 μl 体积中进行 PCR 反应，每个反应使用质粒 pCantab 5E-7B3 作为模板，每条引物的终浓度为 0.2 μM，以及 5 μl 10× KOD Plus 缓冲液、4 μl dNTPs(dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP，每种 2 mM)、2 μl 25 mM MgSO<sub>4</sub> 和 1 U KOD Plus，用水补足体积后，在热循环仪中开始 PCR 程序。反应先加热样品到 94℃预变性 5 分钟，然后保温 25 个循环，每个循环是 94℃ 30 秒、56℃ 30 秒和 68℃ 30 秒。最后在 68℃保温 10 分钟。第一个片段的扩增利用引物 HR3f1fw (SEQ ID NO: 8, TCGCAATTCCTTTAGTTGTTCC)和 HR3f1re (SEQ ID NO: 9, CAGGGTGCCCTGGCCCCAGTAANNMNNMNNMNNMNNMNNMNGCGCGCGCAATAATAC AC)，第二个片段利用引物 HR3f2fw (SEQ ID NO: 10, TACTGGGGGCCAGGGCACCTG)和 HR3f2re (SEQ ID NO: 11, GGAATAGGTGTATCACCGTACTCAG)。

预期 PCR 产物通过分析琼脂糖凝胶电泳鉴定，并用 Wizard SV Gel and PCR Clean-up 试剂盒从样品中纯化回收。两个片段以等摩尔比加入到第二轮搭桥 PCR 中作为模板，反应体系仍然使用上述提到的 KOD Plus 体系，在没有引物存在的情况下，反应先加热样品到 94℃ 预变性 5 分钟，然后保温 10 个循环，每个循环反应条件是 94℃ 30 秒、60℃ 30 秒和 68℃ 30 秒。最后在 68℃ 保温 10 分钟。随后在反应体系中直接加入终浓度为 0.2 μM 的引物 HR3f1fw

和 HR3f2re, 并开始 PCR 程序。反应先加热样品到 94℃ 预变性 5 分钟, 然后保温 25 个循环, 每个循环是 94℃ 30 秒、56℃ 30 秒和 68℃ 30 秒。最后在 68℃ 保温 10 分钟。预期 PCR 产物通过制备性琼脂糖凝胶电泳分离, 并用 Wizard SV Gel and PCR Clean-up 试剂盒根据制造商的说明纯化回收。

完整的文库 DNA 片段两端分别含有 *sfi*I 和 *Not*I 限制性内切酶识别位点, 经限制性内切酶 *sfi*I/*Not*I 进行限制性消化, 插入到经过同样双酶切的噬菌粒载体 pCANTAB 5E 中。连接产物使用 Wizard SV Gel and PCR Clean-up 试剂盒分离样品中的 DNA 并脱盐, 用于电转化。在电转化时, 使用电转化杯和电穿孔仪 Gene Pulser II, 转化到自制的感受态大肠杆菌 ER2738。最终确认得到一个含有  $6.0 \times 10^9$  个突变体的文库。

## 实施例 2、利用 7B3 亲和力成熟库针对 EGFRvIII 进行筛选

为得到更高亲和力的 7B3 突变体, 分别利用轻链和重链突变体文库, 各自实施了四轮筛选, 筛选方案如下: 上述文库经辅助噬菌体 M13KO7 感染, 得到相应的噬菌体库。该噬菌体库与生物素标记的抗原 EGFRvIII (购自锐劲生物), 在室温下保温 2 小时, 然后与经封闭液 2%(w/v)BSA(牛血清白蛋白, 购自上海生工)封闭过的链霉亲和素磁珠 MyOne C1(购自 Invitrogen)在室温下保温 30 分钟。随后用 PBST(含 0.1%吐温-20)缓冲液洗涤磁珠, 除去非特异性结合或结合能力较弱的噬菌体。结合能力强的噬菌体, 则用甘氨酸-盐酸(pH 2.2)从磁珠上洗脱下来, 用 Tris 中和液(pH 9.1)中和后, 用于感染处于对数生长中期的大肠杆菌 ER2738, 并被用于下一轮筛选。

在上述四轮筛选中, 磁珠的用量分别为 50 $\mu$ l、25 $\mu$ l、10 $\mu$ l 和 10 $\mu$ l, 生物素标记的抗原 EGFRvIII 浓度分别为 10nM、1nM、0.5nM 和 0.1nM, PBST 的洗涤次数分别为 10 次、10 次、15 次和 20 次。从第二轮筛选开始, 在洗脱前分别加入 50 倍、500 倍和 1000 倍过量的未经生物素标记的抗原 EGFRvIII 用作竞争, 以除去结合能力较弱的突变体。

为生产在表面展示了 7B3 单链抗体突变体的噬菌体, 在 400 ml 2YT/氨苄青霉素培养基接种由实施例 1 中获得的甘油菌, 使细胞密度达到  $OD_{600} = 0.1$ , 在 37℃ 和 200 rpm 条件下振荡培养直至细胞密度达到  $OD_{600} = 0.5$ 。用  $10^{12}$  pfu 的 M13KO7 辅助噬菌体感染, 在 30℃ 和 50 rpm 条件下培养 30 分钟。加入 50 mg/l 卡那霉素后在 37℃ 和 200 rpm 条件下振荡培养 30 分钟后, 通过离心(15 分钟, 1600 $\times$ g, 4℃)分离沉淀, 重悬于 400 ml 2YT/氨苄青霉素/卡那霉素培养基, 在 37℃ 和 200 rpm 条件下振荡培养 16 小时。最后细胞通过离心(20 分钟, 5000 $\times$ g, 4℃)分离沉淀并丢弃, 上清用 0.45  $\mu$ m 规格滤膜过滤后, 加入 1/4 体积 20%(w/v)PEG8000、2.5 M NaCl 溶液并在冰浴中保温 1 小时沉淀噬菌体颗粒。随后离心沉淀(20 分钟, 8000 $\times$ g, 4℃), 弃上清, 将噬菌体重悬于 25 ml 预冷 PBS(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM  $Na_2HPO_4$ , 2 mM  $KH_2PO_4$ )中, 离心(5 分钟, 20000 $\times$ g, 4℃)。向上清液加入 1/4 体积 20%(w/v)PEG8000、2.5 M NaCl 溶液, 并冰浴 30 分钟再次沉淀噬菌体颗粒。离心沉淀(30 分钟, 20000 $\times$ g, 4℃), 再次将噬菌体沉淀重悬于 2 ml 预冷 PBS 中, 在冰上保持 30 分钟并离心(30 分钟, 17000 $\times$ g, 4℃)。上清液与含 4%(w/v)BSA 的 PBS 溶液以 1:1 混合, 置于旋转混合器上, 室温下保温 30

分钟，然后直接用于筛选。

### 实施例 3、特异性结合 EGFRvIII 的 7B3 突变体的鉴定

经过四轮针对抗原 EGFRvIII 的筛选，从第四轮筛选所得的克隆中随机挑选 96 个，并用单噬菌体 ELISA(酶联免疫吸附实验)分析其和抗原 EGFRvIII 和 N1N2-806(购自锐劲生物)的结合，其中 N1N2-806 是 M13 噬菌体 PIII 蛋白 N1N2 结构域和 EGFR 的第 287-302 位氨基酸的融合蛋白。为此目的，每个单菌落接种 300  $\mu$ l 2YT/氨苄青霉素培养基(含 2%葡萄糖)于 96 孔深孔培养板，并在 37°C 和 250 rpm 下振荡培养 16 小时。用 20  $\mu$ l 培养物接种到 500  $\mu$ l 2YT/氨苄青霉素培养基(含 0.1%葡萄糖)，在 37°C 和 250 rpm 下振荡培养 1.5 小时。准备辅助噬菌体溶液，取 75  $\mu$ l 的 M13KO7(滴度为  $3 \times 10^{12}$  pfu/ml)混入到 15 ml 2YT 培养基中，50  $\mu$ l/孔加到培养板中。在 37°C 和 150 rpm 条件培养 30 分钟，然后加入准备好的卡那霉素溶液 50  $\mu$ l/孔(取 180  $\mu$ l 的 50 mg/ml 卡那霉素，加入到 15 ml 2YT 培养基)，在 37°C 和 250 rpm 下振荡培养 16 小时。最后离心沉淀细胞(30 分钟，5000 $\times$ g，4°C)，上清转移到新的 96 孔深孔培养板。

为进行单噬菌体 ELISA，在 96 孔 MediSorp ELISA 板(购自 Nunc)上分别使用 100 ng/孔抗原 EGFRvIII、N1N2-806 以及阴性对照蛋白 BSA 和 N1N2(购自锐劲生物)，50  $\mu$ l/孔，在 4°C 包被过夜。每个孔用含 2% BSA(w/v)的 PBST 封闭。随后用 PBST 清洗孔三次并排净。然后加入 100  $\mu$ l/孔上面制备的每种噬菌体溶液到板上各孔中。37°C 保温 2 小时后，用 PBST 洗涤三次。为了检测结合的噬菌体，将抗 M13 抗体过氧化物歧化酶偶联物(购自 GE Healthcare)以 1:5000 稀释于 PBST 中，并取 100  $\mu$ l 加到每个孔中。37°C 保温 1 小时后用 PBST 漂洗孔三次，然后用 PBS 漂洗三次。最后吸取 50  $\mu$ l TMB 底物加入到孔中，并在室温下显色 10 分钟，随后加入每孔 50  $\mu$ l 的 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止显色反应。用酶联免疫检测仪(Bio-Rad)在 450 nm 测量消光值。

选取 ELISA 中对抗原结合信号较强，但是对 BSA 没有结合信号的克隆，用于后续评估和测序分析。随后将从轻链亲和力成熟文库中获得的抗体与从重链亲和力成熟文库中通过实施例 2 获得的抗体在轻链可变区和重链可变区序列上进一步组合，得到的抗体同样能够特异性的结合抗原 EGFRvIII 和 N1N2-806，不与对照蛋白 BSA 和 N1N2 结合。

从抗体及抗原决定簇的晶体结构考虑，对 7B3 轻重链突变后的组合抗体与 EGFR<sub>287-302</sub> 的结合进行结构分析，最后选定一些氨基酸位点进行进一步突变，以获得更高亲和力和稳定性。所有发生改变的氨基酸位点包括位于轻链 CDR1 区域的 S31，轻链 CDR3 区域的 V89，A92，Q93，F94 和 Y96，重链 CDR2 区域的 S182，重链 CDR3 区域的 L222，R224，G225，F226 和 R227。在轻重链突变后的组合抗体序列基础上，进一步引入突变位点，得到了抗体 Y022。同亲本抗体 7B3 相比，Y022 包含 12 个氨基酸突变位点(S31V，V89N，A92E，Q93N，F94I，Y96L，S182Q，L222M，R224K，G225N，F226W，R227D)。如图 1 所示，在单噬菌体 ELISA 实验中，Y022 能够特异性的结合抗原 EGFRvIII 和 N1N2-806，不与对照蛋白 BSA 和 N1N2 结合。

单链抗体 Y022 的核苷酸序列(717 个碱基；SEQ ID NO: 12):

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65  
70  
75  
80  
85  
90  
95  
100  
105  
110  
115  
120  
125  
130  
135  
140  
145  
150  
155  
160  
165  
170  
175  
180  
185  
190  
195  
200  
205  
210  
215  
220  
225  
230  
235  
240  
245  
250  
255  
260  
265  
270  
275  
280  
285  
290  
295  
300  
305  
310  
315  
320  
325  
330  
335  
340  
345  
350  
355  
360  
365  
370  
375  
380  
385  
390  
395  
400  
405  
410  
415  
420  
425  
430  
435  
440  
445  
450  
455  
460  
465  
470  
475  
480  
485  
490  
495  
500  
505  
510  
515  
520  
525  
530  
535  
540  
545  
550  
555  
560  
565  
570  
575  
580  
585  
590  
595  
600  
605  
610  
615  
620  
625  
630  
635  
640  
645  
650  
655  
660  
665  
670  
675  
680  
685  
690  
695  
700  
705  
710  
715  
720  
725  
730  
735  
740  
745  
750  
755  
760  
765  
770  
775  
780  
785  
790  
795  
800  
805  
810  
815  
820  
825  
830  
835  
840  
845  
850  
855  
860  
865  
870  
875  
880  
885  
890  
895  
900  
905  
910  
915  
920  
925  
930  
935  
940  
945  
950  
955  
960  
965  
970  
975  
980  
985  
990  
995  
1000

单链抗体 Y022 的氨基酸序列(239 个氨基酸; SEQ ID NO: 13):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDINVNIGWLQQKPGKAFKGLIYHGKNLEDDGVP  
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCNQYENIPLTFGQGTKVEIKRGGGSGGGSGG  
GGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWNWRQAPGKGLEWLGYSYRGR  
TQYNPSLKSRLISITRDNKNTFFLQLNSLRAEDTAVYYCARMGKNWDYWGQGTLLTVSS

其中第 1-108 位是轻链, 且轻链 CDR1 序列: HASQDINVNIG (SEQ ID NO: 41), CDR2 序列: HGKNLED (SEQ ID NO: 42), CDR3 序列: NQYENIPLT (SEQ ID NO: 43)。

其中第 124-239 位是重链, 且重链 CDR1 序列: GYSITSDYAWN (SEQ ID NO: 44), CDR2 序列: YISYRGRTQYNPSLKS (SEQ ID NO: 45), CDR3 序列: MGKNWDY (SEQ ID NO: 46)。

由于筛选自前面构建的突变体文库并进行定点突变, Y022 的核苷酸序列包含于 pCantab 5E 中, 该质粒称为 pCantab 5E-Y022 质粒。

采用与产生抗体 Y022 相同的方法, 本发明人还得到了另外 10 个亲和力和稳定性有显著改善的抗体克隆, 分别是 M14、M15、M25、M26、S7、S8、S17、S22、S23 和 S29。与亲本抗体 7B3 相比, 所有单链抗体包含的氨基酸突变位点如表 1 所示。

表 1

| 抗体   | 氨基酸突变位点                                                                      |
|------|------------------------------------------------------------------------------|
| Y022 | S31V, V89N, A92E, Q93N, F94I, Y96L, S182Q, L222M, R224K, G225N, F226W, R227D |
| M14  | V89N, A92E, Q93N, F94N, Y96I, S182N                                          |
| M15  | S31V, V89N, A92E, Q93N, F94N, Y96I                                           |
| M25  | S31V, V89N, A92E, Q93N, F94I, Y96L, S182R                                    |
| M26  | S31V, V89N, A92E, Q93N, F94I, Y96L, S182Q                                    |
| S7   | S31V, K53T, V89N, A92E, Q93N, F94N, Y96I                                     |
| S8   | S31V, A44S, V89N, A92E, Q93N, F94N, Y96I                                     |
| S17  | S31T, V89N, A92E, Q93N, F94N, Y96L, S182Q                                    |
| S22  | S31V, K53T, V89N, A92E, Q93N, F94N, Y96L, S182R                              |



|     |                                                 |
|-----|-------------------------------------------------|
| S23 | S31V, A44S, V89N, A92E, Q93N, F94N, Y96L, S182R |
| S29 | S31V, V89N, A92E, Q93N, Y96L, S182R             |

单链抗体 M14 的核苷酸序列(717 个碱基; SEQ ID NO: 58):

5 GATATTCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGCGACCGTGTGACC  
ATTACCTGCCATGCGAGCCAGGATATTAACAGCAACATTGGCTGGCTGCAGCAGAAACCG  
GGCAAAGCGTTTAAAGGCCTGATTTATCATGGCAAAAACCTGGAAGATGGCGTGCCGAGC  
CGTTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCG  
GAAGATTTTGCACCTATTATTGCAATCAGTATGAAAATAACCCAATTACATTTGGCCAG  
GGCACCAAAGTGGAATTAACCGTGGTGGAGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGT  
GGCGGATCGGATGTGCAGCTGGTGGAAAGCGCGCGGCCTGGTGCAGCCGGGCGGCAGC  
10 CTGCGTCTGAGCTGCGCGGTGAGCGGTATAGCATTACCAGCGATTATGCGTGGAAGTGG  
ATTCTGTCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCTATATTAGCTATCGTGGCCGC  
ACCAACTATAACCCGAGCCTGAAAAGCCGTATTAGCATTACCCGTGATAACAGCAAAAAC  
ACCTTTTTCCTGCAGCTGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCG  
CGCCTGGGACGCGGCTTCCGCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC

单链抗体 M14 的氨基酸序列(239 个氨基酸; SEQ ID NO: 59):

15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDINSNIGWLQKPGKAFKGLIYHGKNLEDGVPS  
RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCNQYENNPITFGQGTKVEIKRGGGSGGGSGG  
GGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSDYAWNWIRQAPGKLEWLGYISYRGR  
TNYNPSLKSRLITRDNSKNTFFLQLNSLRAEDTAVYYCARLGRGFRYWQGTTLTVSS

20 M14 轻链 CDR1(HASQDINSNIG)、CDR2(HGKNLED)、CDR3(NQYENNPIT)和重链  
CDR1(GYSITSDYAWN)、CDR2(YISYRGRTNYNPSLKS)、CDR3(LGRGFRY)的氨基酸序列  
分别为 SEQ ID NO: 47, 42, 48, 44, 49, 50。

单链抗体 M15 的核苷酸序列(717 个碱基; SEQ ID NO: 60):

25 GATATTCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGCGACCGTGTGACC  
ATTACCTGCCATGCGAGCCAGGATATTAACGTGAACATTGGCTGGCTGCAGCAGAAACCG  
GGCAAAGCGTTTAAAGGCCTGATTTATCATGGCAAAAACCTGGAAGATGGCGTGCCGAGC  
CGTTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCG  
GAAGATTTTGCACCTATTATTGCAATCAGTATGAAAATAACCCAATTACATTTGGCCAG  
GGCACCAAAGTGGAATTAACCGTGGTGGAGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGT  
30 GGCGGATCGGATGTGCAGCTGGTGGAAAGCGCGCGGCCTGGTGCAGCCGGGCGGCAGC  
CTGCGTCTGAGCTGCGCGGTGAGCGGTATAGCATTACCAGCGATTATGCGTGGAAGTGG  
ATTCTGTCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCTATATTAGCTATCGTGGCCGC  
ACCAGCTATAACCCGAGCCTGAAAAGCCGTATTAGCATTACCCGTGATAACAGCAAAAAC  
ACCTTTTTCCTGCAGCTGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCG  
CGCCTGGGACGCGGCTTCCGCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC

35 单链抗体 M15 的氨基酸序列(239 个氨基酸; SEQ ID NO: 61):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDINSNIGWLQKPGKAFKGLIYHGKNLEDGVPS  
RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCNQYENNPITFGQGTKVEIKRGGGSGGGSGG  
GGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSDYAWNWIRQAPGKLEWLGYISYRGR

TSYNPSLKSRLSITRDNSKNTFFLQLNSLRAEDTAVYYCARI LGRGFRYWGQGLTLTVSS

M15 轻链 CDR1(HASQDINVNIG)、CDR2(HGKNLED)、CDR3(NQYENNPIT)和重链 CDR1(GYSITSDYAWN)、CDR2(YISYRGRTSYNPSLKS)、CDR3(LGRGFRY)的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO: 41, 42, 48, 44, 51, 50。

5 单链抗体 M25 的核苷酸序列(717 个碱基; SEQ ID NO: 62):

GATATTCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGCGACCGTGTGACC  
ATTACCTGCCATGCGAGCCAGGATATTAACGTGAACATTGGCTGGCTGCAGCAGAAACCG  
GGCAAAGCGTTTAAAGGCCTGATTTATCATGGCAAAAACCTGGAAGATGGCGTGCCGAGC  
CGTTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCG  
10 GAAGATTTTGCACCTATTATTGCAATCAGTATGAAAATATCCCACTGACATTTGGCCAG  
GGCACCAGAGTGGAAATTAACGTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGT  
GGCGGATCGGATGTGCAGCTGGTGGAAAGCGCGCGGCCTGGTGCAGCCGGGCGGCAGC  
CTGCGTCTGAGCTGCGCGGTGAGCGGCTATAGCATTACCAGCGATTATGCGTGGAACCTGG  
ATTCGTCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCTATATTAGCTATCGTGCCCGC  
15 ACCCGCTATAACCCGAGCCTGAAAAGCCGTATTAGCATTACCCGTGATAACAGCAAAAAC  
ACCTTTTTCCTGCAGCTGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCG  
CGCCTGGGACGCGGCTTCCGCTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC

单链抗体 M25 的氨基酸序列(239 个氨基酸; SEQ ID NO: 63):

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC HASQDINVNIGWLQKPGKAFKGLIYHGKNLEDGVPS  
20 RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCNQYENIPLTFGQGTKVEIKRGGGSGGGSGGG  
GGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWN WIRQAPGKGLEWLGYSYRGR  
TRYNPSLKSRLSITRDNSKNTFFLQLNSLRAEDTAVYYCARI LGRGFRYWGQGLTLTVSS

M25 轻链 CDR1(HASQDINVNIG)、CDR2(HGKNLED)、CDR3(NQYENIPLT)和重链 CDR1(GYSITSDYAWN)、CDR2(YISYRGRTRYNPSLKS)、CDR3(LGRGFRY)的氨基酸序列  
25 分别为 SEQ ID NO: 41, 42, 43, 44, 52, 50。

单链抗体 M26 的核苷酸序列(717 个碱基; SEQ ID NO: 64):

GATATTCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGCGACCGTGTGACC  
ATTACCTGCCATGCGAGCCAGGATATTAACGTGAACATTGGCTGGCTGCAGCAGAAACCG  
GGCAAAGCGTTTAAAGGCCTGATTTATCATGGCAAAAACCTGGAAGATGGCGTGCCGAGC  
30 CGTTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCG  
GAAGATTTTGCACCTATTATTGCAATCAGTATGAAAATATCCCACTGACATTTGGCCAG  
GGCACCAGAGTGGAAATTAACGTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGT  
GGCGGATCGGATGTGCAGCTGGTGGAAAGCGCGCGGCCTGGTGCAGCCGGGCGGCAGC  
CTGCGTCTGAGCTGCGCGGTGAGCGGCTATAGCATTACCAGCGATTATGCGTGGAACCTGG  
35 ATTCGTCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCTATATTAGCTATCGTGCCCGC  
ACCCAGTATAACCCGAGCCTGAAAAGCCGTATTAGCATTACCCGTGATAACAGCAAAAAC  
ACCTTTTTCCTGCAGCTGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCG  
CGCCTGGGACGCGGCTTCCGCTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC

单链抗体 M26 的氨基酸序列(239 个氨基酸; SEQ ID NO: 65):

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC HASQDINVNIGWLQKPGKAFKGLIYHGKNLEDGVPS  
40 RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCNQYENIPLTFGQGTKVEIKRGGGSGGGSGGG  
GGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWN WIRQAPGKGLEWLGYSYRGR  
TRYNPSLKSRLSITRDNSKNTFFLQLNSLRAEDTAVYYCARI LGRGFRYWGQGLTLTVSS

M26 轻链 CDR1(HASQDINVNIG)、CDR2(HGKNLED)、CDR3(NQYENIPLT)和重链  
45 CDR1(GYSITSDYAWN)、CDR2(YISYRGRTQYNPSLKS)、CDR3(LGRGFRY)的氨基酸序列  
分别为 SEQ ID NO: 41, 42, 43, 44, 45, 50。

单链抗体 S7 的核苷酸序列(717 个碱基; SEQ ID NO: 66):

5 GATATTCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGGAGCGTGGGCGACCGTGTGACC  
ATTACCTGCCATGCGAGCCAGGATATTAACGTGAACATTGGCTGGCTGCAGCAGAAACCG  
GGCAAAGCGTTTAAAGGCCTGATTTATCATGGCACCAACCTGGAAGATGGCGTGCCGAGC  
CGTTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCG  
GAAGATTTTGCACCTATTATTGCAATCAGTATGAAAATAACCCAATTACATTTGGCCAG  
GGCACCAAAGTGGAATTAACGTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGT  
GGCGGATCGGATGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCTGGTGCAGCCGGGCGGCAGC  
10 CTGCGTCTGAGCTGCGCGGTGAGCGGCTATAGCATTACCAGCGATTATGCGTGGAACCTGG  
ATTCGTCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCTATATTAGCTATCGTGCCGC  
ACCAGCTATAACCCGAGCCTGAAAAGCCGTATTAGCATTACCCGTGATAACAGCAAAAAAC  
ACCTTTTTCCTGCAGCTGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCG  
CGCCTGGGACGCGGCTTCCGCTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC

单链抗体 S7 的氨基酸序列(239 个氨基酸; SEQ ID NO: 67):

15 DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCHASQDINVNIGWLQKPGKAFKGLIYHGKNLEDGVP  
RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCNQYENNPITFGQGTKVEIKRGGGSGGGSGG  
GGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSYAWNWIRQAPGKLEWLGYISYRGR  
TSYNPSLKSRLITRDNSKNTFFLQLNSLRAEDTAVYYCARLGRGFRYWGGQTLTVSS

20 S7 轻链 CDR1(HASQDINVNIG)、CDR2(HGKNLED)、CDR3(NQYENNPIT)和重链  
CDR1(GYSITSYAWN)、CDR2(YISYRGRTSYNPSLKS)、CDR3(LGRGFRY)的氨基酸序列  
分别为 SEQ ID NO: 41, 53, 54, 44, 51, 50。

单链抗体 S8 的核苷酸序列(717 个碱基; SEQ ID NO: 68):

25 GATATTCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGGAGCGTGGGCGACCGTGTGACC  
ATTACCTGCCATGCGAGCCAGGATATTAACGTGAACATTGGCTGGCTGCAGCAGAAACCG  
GGCAAAGCGTTTAAAGGCCTGATTTATCATGGCAAAAACCTGGAAGATGGCGTGCCGAGC  
CGTTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCG  
GAAGATTTTGCACCTATTATTGCAATCAGTATGAAAATAACCCAATTACATTTGGCCAG  
GGCACCAAAGTGGAATTAACGTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGT  
GGCGGATCGGATGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCTGGTGCAGCCGGGCGGCAGC  
30 CTGCGTCTGAGCTGCGCGGTGAGCGGCTATAGCATTACCAGCGATTATGCGTGGAACCTGG  
ATTCGTCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCTATATTAGCTATCGTGCCGC  
ACCAGCTATAACCCGAGCCTGAAAAGCCGTATTAGCATTACCCGTGATAACAGCAAAAAAC  
ACCTTTTTCCTGCAGCTGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCG  
CGCCTGGGACGCGGCTTCCGCTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC

35 单链抗体 S8 的氨基酸序列(239 个氨基酸; SEQ ID NO: 69):

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCHASQDINVNIGWLQKPGKSFKGLIYHGKNLEDGVP  
RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCNQYENNPITFGQGTKVEIKRGGGSGGGSGG  
GGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSYAWNWIRQAPGKLEWLGYISYRGR  
TSYNPSLKSRLITRDNSKNTFFLQLNSLRAEDTAVYYCARLGRGFRYWGGQTLTVSS

40 S8 轻链 CDR1(HASQDINVNIG)、CDR2(HGKNLED)、CDR3(NQYENNPIT)和重链  
CDR1(GYSITSYAWN)、CDR2(YISYRGRTSYNPSLKS)、CDR3(LGRGFRY)的氨基酸序列  
分别为 SEQ ID NO: 41, 42, 54, 44, 51, 50。

单链抗体 S17 的核苷酸序列(717 个碱基; SEQ ID NO: 70):

45 GATATTCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGGAGCGTGGGCGACCGTGTGACC  
ATTACCTGCCATGCGAGCCAGGATATTAACACCAACATTGGCTGGCTGCAGCAGAAACCG  
GGCAAAGCGTTTAAAGGCCTGATTTATCATGGCAAAAACCTGGAAGATGGCGTGCCGAGC  
CGTTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCG

GAAGATTTTGCACCTATTATTGCAATCAGTATGAAAATAACCCACTGACATTTGGCCAG  
 GGCACCAAAGTGAAATTAACCGTGGTGGAGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGT  
 GCGGATCGGATGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGCGCCTGGTGCAGCCGGCGGCAGC  
 CTGCGTCTGAGCTGCGCGGTAGCGGCTATAGCATTACCAGCGATTATGCGTGGAATGG  
 ATTCGTCAGGCGCCGGGCAAAGCGCTGGAATGGCTGGGCTATATTAGCTATCGTGCCGC  
 ACCCAGTATAACCCGAGCCTGAAAAGCCGTATTAGCATTACCCGTGATAACAGCAAAAC  
 ACCTTTTTCCTGCAGCTGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACCGCGGTGATTATTGCGCG  
 CGCCTGGGACGCGGCTTCCGCTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC

单链抗体 S17 的氨基酸序列(239 个氨基酸; SEQ ID NO: 71):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDINTNIGWLQKPKAFKGLIYHGKNLEDGVPS  
 RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCNQYENNPLTFGQGTKVEIKRGGGSGGGSGG  
 GSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSSDYAWNWIRQAPGKLEWLGYISYRGR  
 TQYNPSLKSISRITRDNSKNTFFLQLNSLRAEDTAVYYCARLGRGFRYWGQGLTLTVSS

S17 轻链 CDR1(HASQDINTNIG)、CDR2(HGKNLED)、CDR3(NQYENNPLT)和重链  
 CDR1(GYSITSFYAWN)、CDR2(YISYRGRTQYNPSLKS)、CDR3(LGRGFRY)的氨基酸序列  
 分别为 SEQ ID NO: 55, 42, 56, 44, 45, 50。

单链抗体 S22 的核苷酸序列(717 个碱基; SEQ ID NO: 72):

GATATTCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGGAGCGTGGGCGACCGTGTGACC  
 ATTACCTGCCATGCGAGCCAGGATATTAACGTGAACATTGGCTGGCTGCAGCAGAAACCG  
 GGCAAAGCGTTTAAAGGCCTGATTTATCATGGCACCACCTGGAAGATGGCGTGCCGAGC  
 CGTTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCG  
 GAAGATTTTGCACCTATTATTGCAATCAGTATGAAAATAACCCACTGACATTTGGCCAG  
 GGCACCAAAGTGAAATTAACCGTGGTGGAGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGT  
 GCGGATCGGATGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGCGCCTGGTGCAGCCGGCGGCAGC  
 CTGCGTCTGAGCTGCGCGGTAGCGGCTATAGCATTACCAGCGATTATGCGTGGAATGG  
 ATTCGTCAGGCGCCGGGCAAAGCGCTGGAATGGCTGGGCTATATTAGCTATCGTGCCGC  
 ACCCGCTATAACCCGAGCCTGAAAAGCCGTATTAGCATTACCCGTGATAACAGCAAAAC  
 ACCTTTTTCCTGCAGCTGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACCGCGGTGATTATTGCGCG  
 CGCCTGGGACGCGGCTTCCGCTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC

单链抗体 S22 的氨基酸序列(239 个氨基酸; SEQ ID NO: 73):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDINVNIGWLQKPKAFKGLIYHGTNLEDGVPS  
 RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCNQYENNPLTFGQGTKVEIKRGGGSGGGSGG  
 GSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSSDYAWNWIRQAPGKLEWLGYISYRGR  
 TRYNPSTLKSISRITRDNSKNTFFLQLNSLRAEDTAVYYCARLGRGFRYWGQGLTLTVSS

S22 轻链 CDR1(HASQDINVNIG)、CDR2(HGTNLED)、CDR3(NQYENNPLT)和重链  
 CDR1(GYSITSFYAWN)、CDR2(YISYRGRTQYNPSLKS)、CDR3(LGRGFRY)的氨基酸序列  
 分别为 SEQ ID NO: 41, 53, 56, 44, 52, 50。

单链抗体 S23 的核苷酸序列(717 个碱基; SEQ ID NO: 74):

GATATTCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGGAGCGTGGGCGACCGTGTGACC  
 ATTACCTGCCATGCGAGCCAGGATATTAACGTGAACATTGGCTGGCTGCAGCAGAAACCG  
 GGCAAAGCGTTTAAAGGCCTGATTTATCATGGCAAAACCTGGAAGATGGCGTGCCGAGC  
 CGTTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCG  
 GAAGATTTTGCACCTATTATTGCAATCAGTATGAAAATAACCCACTGACATTTGGCCAG  
 GGCACCAAAGTGAAATTAACCGTGGTGGAGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGT  
 GCGGATCGGATGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGCGCCTGGTGCAGCCGGCGGCAGC  
 CTGCGTCTGAGCTGCGCGGTAGCGGCTATAGCATTACCAGCGATTATGCGTGGAATGG  
 ATTCGTCAGGCGCCGGGCAAAGCGCTGGAATGGCTGGGCTATATTAGCTATCGTGCCGC  
 ACCCGCTATAACCCGAGCCTGAAAAGCCGTATTAGCATTACCCGTGATAACAGCAAAAC

ACCTTTTTCCTGCAGCTGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCG  
CGCCTGGGACGCGGCTTCCGCTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC

单链抗体 S23 的氨基酸序列(239 个氨基酸; SEQ ID NO: 75):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDINVNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGKNLEDGVPS  
RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCNQYENNPLTFGGQTKVEIKRGGGSGGGSGG  
GGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSYAWNWIRQAPGKGLEWLGYSYRGR  
TRYNPSLKSRLSITRDNSKNTFFLQLNSLRAEDTAVYYCARTLGRGFRYWGGTLTVSS

S23 轻链 CDR1(HASQDINVNIG)、CDR2(HGKNLEDG)、CDR3(NQYENNPLT)和重链  
CDR1(GYSITSYAWN)、CDR2(YISYRGRTRYNPSLKS)、CDR3(LGRGFRY)的氨基酸序列  
分别为 SEQ ID NO: 41, 42, 56, 44, 52, 50。

单链抗体 S29 的核苷酸序列(717 个碱基; SEQ ID NO: 76):

GATATTCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGGAGCGTGGGCGACCGTGTGACC  
ATTACCTGCCATGCGAGCCAGGATATTAACGTGAACATTGGCTGGCTGCAGCAGAAACCG  
GGCAAAGCGTTTAAAGGCCTGATTTATCATGGCAAAACCTGGAAGATGGCGTGCCGAGC  
CGTTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTACCCTGACCATAGCAGCCTGCAGCCG  
GAAGATTTTGCACCTATTATTGCAATCAGTATGAAAATTTCCCACTGACATTTGGCCAG  
GGCACCAAAGTGAAATTAACGTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGAGGTGGCTCTGGCGGT  
GGCGGATCGGATGTGCAGCTGGTGGAAAGCGCGCGGCGCTGGTGCAGCCGGGCGGCAGC  
CTGCGTCTGAGCTGCGCGGTGAGCGGCTATAGCATTACCAGCGATTATGCGTGGAAGTGG  
ATTCGTCAGGCGCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCTATATTAGCTATCGTGCCGC  
ACCCGCTATAACCCGAGCCTGAAAAGCCGTATTAGCATTACCCGTGATAACAGCAAAAC  
ACCTTTTTCCTGCAGCTGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCG  
CGCCTGGGACGCGGCTTCCGCTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC

单链抗体 S29 的氨基酸序列(239 个氨基酸; SEQ ID NO: 77):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQDINVNIGWLQQKPGKAFKGLIYHGKNLEDGVPS  
RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCNQYENFPLTFGGQTKVEIKRGGGSGGGSGG  
GGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSYAWNWIRQAPGKGLEWLGYSYRGR  
TRYNPSLKSRLSITRDNSKNTFFLQLNSLRAEDTAVYYCARLGRGFRYWGGTLTVSS

S23 轻链 CDR1(HASQDINVNIG)、CDR2(HGKNLED)、CDR3(NQYENFPLT)和重链  
CDR1(GYSITSYAWN)、CDR2(YISYRGRTRYNPSLKS)、CDR3(LGRGFRY)的氨基酸序列  
分别为 SEQ ID NO: 41, 42, 57, 44, 52, 50。

#### 实施例 4、抗体的表达和纯化

将各抗体的基因插入到表达载体 pET22B(+)的 NdeI/XhoI 位点中, 在 *E.coli* BL21(DE3)  
重组制备抗体蛋白, 并用羧基端融合的 6×组氨酸多肽通过镍柱进行纯化。具体来说, 为制  
备抗体蛋白, 用各单菌落接种 5 ml 2×YT/氨苄青霉素培养基, 并在 37℃和 220 rpm 下振荡培  
养 16 小时。用这种预培养物 1 ml 接种 100 ml 2×YT/氨苄青霉素培养基, 并在 37℃和 220 rpm  
下振荡培养, 直到细胞密度达到 OD<sub>600</sub> = 0.5。加入 1 mM α-D-异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱  
导外来基因表达后, 继续在 30℃和 220 rpm 下振荡培养 6 小时。然后离心沉淀细胞(15 分钟,  
3500×g, 4℃)并重悬于 35 ml 破碎缓冲液(50 mM PB, 300 mM NaCl, 2M 尿素, 0.5% Triton  
X-100, pH 8.0)。超声破碎后, 样品放置于室温摇晃 30 分钟, 彻底溶解细胞碎片。然后离心  
(15 分钟, 10,000×g, 4℃)收集包涵体沉淀, 加入 20 ml 变性缓冲液(50 mM PB, 300 mM NaCl,  
8 M 尿素, 10 mM 咪唑, pH 8.0), 室温摇晃一小时。离心(15 分钟, 10,000×g, 4℃)去除沉

淀, 收集溶解上清, 用 5 ml HisTrap HP 纯化柱(购自 GE Healthcare)纯化蛋白。通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析纯化后抗体蛋白的纯度, 并用 BCA 法测定蛋白浓度。

### 实施例 5、抗体的结合活性测定

5 通过浓度梯度 ELISA 实验, 测定抗体对抗原 EGFRvIII 的结合活性。为此目的, 用 0.1M NaHCO<sub>3</sub>(pH 9.6)包被液稀释抗原 EGFRvIII, 每孔包被 200 ng, 50 μl/孔, 4℃包被过夜, 并用含 2% (w/v)BSA 的 PBST 于室温下封闭 2 小时。然后用 PBST 漂洗平板三次并去除干净。随后, 向每个孔板加入 100 μl 含一系列浓度(起始浓度 50 ng/孔, 18 nM, 直至稀释到 1:81)的各抗体蛋白的 PBST 溶液, 每个样品的测定使用平行三孔分析。37℃保温 2 小时后, 用 PBST 漂洗三次, 随后加入 1:2000 稀释的鼠抗 His-tag 抗体(购自 Santa cruz)100 μl/孔, 37℃反应 1 小时。为检测结合的抗体, HRP 标记的羊抗鼠抗体(购自 Santa cruz)以 1:15000 稀释度稀释于 PBST 中, 并向每个孔加入 100 μl, 37℃孵育 1 小时。为了检测, 用 PBST 漂洗孔三次, 然后用 PBS 漂洗三次, 最后加入 TMB 显示 15 分钟, 用每孔 50 μl 的 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止显色反应, 用酶联免疫检测仪(Bio-Rad)在 450 nm 测量消光值。用 Sigma Plot 软件评估所得到的吸光强度值, 计算抗体的结合强度。为此目的, 每种情况下测量的消光值对相应的抗体浓度作图, 并用下面的非线性回归对所得曲线进行拟合。

$$y = \frac{a * x}{(b + x)}$$

其中鉴定固定的抗原和抗体蛋白之间的结合/解离平衡是:

x=抗体蛋白的浓度;

20 y=抗原/抗体复合体的浓度(通过显色反应后的吸光值间接测量);

a=固定化抗原的总浓度;

b=解离常数(K<sub>D</sub>)。

抗体 7B3 在浓度梯度 ELISA 实验中获得的结合曲线示例性表示于图 2, 其 K<sub>D</sub> 值约为 22.4 nM; 抗体 Y022 对 EGFRvIII 的结合曲线如图 3 所示, 其表观 K<sub>D</sub> 值约为 2.7 nM。

25

### 实施例 6、Y022 与细胞表面 EGFR 结合的活性分析

#### 1、scFv-Y022-Fc, scFv-806-Fc 及 scFv-C225-Fc 融合抗体的表达和纯化

根据标准方案, 使用引物对 V5-Y022-F (SEQ ID NO: 14, ACAGTGCTAGCAGATATTCAGATGACCCAG) 和 V5-Y022-R (SEQ ID NO: 15, AAGAATGCGGCCGCTGCTCACGGTCACCAG)从所得克隆中扩增出 scFv-Y022 片段; 使用引物对 V5-806-F (SEQ ID NO: 16, ACAGTGCTAGCAGACATCCTGATGACCCAAT) 和 V5-806-R (SEQ ID NO: 17, AAGAATGCGGCCGCTGCAGAGACAGTGACCAG)以 pH-806/CD3(参见 201210094008.X)为模板扩增出 scFv-806 片段; 使用引物对 V5-C225-F (SEQ ID NO: 18, ACAGTGCTAGCAGACATCTTGCTGACTCAG)和 V5-C225-R (SEQ ID NO: 19, AAGAATGCGGCCGCTGCAGAGACAGTGACCAG)以 C225(VL-linker-VH) DNA 片段 (序列

根据专利 US20090099339A1 中 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:12 确定, 由上海锐劲生物技术有限公司通过全基因合成获得。)为模板扩增出 scFv-C225 片段; 扩增产物通过 NheI/NotI (购自 NEB) 双酶切, 以 T4 DNA 连接酶(购自 NEB)于同样以 NheI/NotI 双酶切载体质粒 pCMV-V5-Fc (该载体在多克隆位点下游融合表达人抗体 IgG1 的 Fc 片段, 以下简称 V5-Fc, 5 购自上海锐劲生物技术有限公司)连接并转化于宿主菌 TOP10 中, 挑取克隆通过 PCR 鉴定阳性克隆并通过测序确认, 分别获得 V5-scFv-Y022-Fc、V5-scFv-806-Fc 和 V5-scFv-C225-Fc 真核表达质粒。

将上述表达质粒分别转染生长良好的 HEK-293F 细胞, 37℃, 5%CO<sub>2</sub>, 125rpm 摇床连续培养 7 天, 4000rpm 离心 10min, 去除沉淀, 收集上清, 并用 0.45 μm 滤膜过滤, 将处理 10 好的样品以 protein A (购自 GE) 亲和柱进行亲和纯化, 最终获得纯化的抗体-Fc 融合蛋白 scFv-Y022-Fc、scFv-806-Fc 和 scFv-C225-Fc, 鉴定结果如图 4 所示。

## 2、FACS 检测单链抗体 scFv-Y022-Fc, scFv-806-Fc 以及 scFv-C225-Fc 与细胞表面 EGFR 的结合能力

15 通过荧光激活细胞分选仪(FACS) (BD 公司, FACS Calibur)分析单链抗体 scFv-Y022-Fc, scFv-806-Fc 以及 scFv-C225-Fc 各自与下列细胞系的结合能力。

具体方法如下:

1) 取对数生长期的如表 2 所列各肿瘤细胞接种到 6cm 平皿中, 接种细胞密度约为 90%, 37℃孵箱过夜培养。

20 2) 使用 10mM 的 EDTA 消化细胞, 200g×5min 离心收集细胞。以  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ /mL 的浓度重悬于 1%含小牛血清的磷酸盐缓冲液(NBS PBS)中, 按 100ul/管的量加入流式专用管中。

3) 200g×5min 离心, 弃上清。

4) 分别加入待测抗体 scFv-Y022-Fc, scFv-806-Fc 和 scFv-C225-Fc, 同时以 PBS 作为阴性对照, 抗体终浓度为 20μg/ml, 每管加入 100ul。冰浴, 45 分钟。

25 5) 每管加入 2ml 1% NBS PBS, 以 200g×5min 离心, 共二遍。

6) 弃上清, 加入 1:50 稀释的 FITC 荧光标记的羊抗人抗体(来自上海康成生物工程有限公司), 每管加入 100ul。冰浴, 45 分钟。

7) 每管加入 2ml 1%NBS PBS, 以 200g×5min 离心, 共二遍。

8) 弃上清, 重悬于 300ul 1%NBS PBS 中, 流式细胞仪检测。

30 9) 应用流式细胞仪数据分析软件 WinMDI 2.9 分析数据。

表 2

| 肿瘤细胞名称   | 来源       | 细胞性质               | EGFR 表达情况 |
|----------|----------|--------------------|-----------|
| U87      | ATCC     | 胶质瘤细胞系             | 低表达 EGFR  |
| U87-EGFR | 上海市肿瘤研究所 | 转染了 EGFR 的 U87 细胞系 | 过表达 EGFR  |

|              |          |                        |              |
|--------------|----------|------------------------|--------------|
| U87-EGFRvIII | 上海市肿瘤研究所 | 转染了 EGFRvIII 的 U87 细胞系 | 过表达 EGFRvIII |
| A431         | ATCC     | 阴道上皮癌                  | 过表达 EGFR     |
| CAL 27       | ATCC     | 舌癌细胞系                  | 过表达 EGFR     |
| MDA-MB-468   | ATCC     | 乳腺癌细胞系                 | 过表达 EGFR     |
| RWPE-1       | ATCC     | 前列腺正常上皮细胞              | 正常表达 EGFR    |
| K2           | 上海市肿瘤研究所 | 人原代角质细胞                | 正常表达 EGFR    |

结果如图 5 所示, 本发明的单链抗体 Y022 与外源过表达 EGFR 的 U87-EGFR(构建方法根据: Wang H., et al., Identification of an Exon 4-Deletion Variant of Epidermal Growth Factor Receptor with Increased Metastasis-Promoting Capacity. Neoplasia, 2011, 13, 461-471)及过表达 EGFRvIII 的 U87-EGFRvIII(构建方法根据: WO/2011/035465), 内源过表达 EGFR 的 A431, CAL 27 以及 MDA-MB-468 细胞均有不同程度的结合, 尤其与 U87-EGFRvIII 以及 A431 细胞结合较高, 但结合能力均不如单链抗体 806 高。而单链抗体 C225 与上述细胞的结合能力均非常强。这些单链抗体与 U87 细胞几乎没有结合。

此外, Y022 和 806 这两个单链抗体都几乎不能与脑胶质瘤细胞系 U87 细胞结合。尤为值得关注的是: 单链抗体 Y022 与正常前列腺上皮细胞 RWPE-1 以及人原代角质细胞 K2 亦不结合, 而单链抗体 806 与这两种正常细胞均有不同程度的结合。

这些结果表明, 单链抗体 Y022 可以特异性地和过表达 EGFR 以及 EGFRvIII 的肿瘤细胞结合, 而几乎不与表达 EGFR 的正常细胞结合。

#### 实施例 7、包含编码 Y022/CD3 单链双功能抗体的核苷酸序列的表达载体的构建

以实施例 3 获得的 pCantab 5E-Y022 质粒为模板, 采用正向引物 pH7B3f2\_fw (SEQ ID NO: 20, GATATTCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAG)和反向引物 pH7B3f2\_re (SEQ ID NO: 21, AATAGGATCCACCACCTCCGCTGCTCACGGTCAC) 为引物对, PCR 扩增获得 Y022 scFv 的 DNA 片段。另外一个包含 pH 载体信号肽序列的 DNA 片段通过 PCR 的方式获得, 以 pH-7B3/CD3 质粒(参见 201210094008.X 实施例 3 和图 2)为模板, 采用正向引物 pH7B3f1\_fw (SEQ ID NO: 22, CCATTGACGCAAATGGGCGGTAGG)和反向引物 pH7B3f1\_re (SEQ ID NO: 23, CTGCTCGGGCTCTGGGTCATCTGAATATC)。两个片段以等摩尔比混合, 进行片段拼接并 PCR, 拼接条件为: 预变性: 94℃, 4min; 变性: 94℃, 40s; 退火: 60℃, 40s; 延伸: 68℃, 140s, 进行 5 个循环, 然后总延伸 68℃, 10min。随后补充 DNA 聚合酶及正向引物 pH7B3f1\_fw 和反向引物 pH7B3f2\_re, 扩增 30 个循环, 扩增条件为预变性: 94℃, 4min; 变性: 94℃, 40s; 退火: 60℃, 40s; 延伸: 68℃, 140s, 进行 30 个循环, 然后总延伸 68℃, 10min。

扩增得到的序列用限制性内切酶 NheI/BamHI 同时酶切, 按照酶供应商 (New England Biolabs, NEB)建议的反应条件进行双酶切。表达载体 pH (参见 201210094008.X 实施例 3 和图 2)也用限制性内切酶 NheI/BamHI 进行同样的酶切。然后按照酶供应商(NEB)建议的反应



条件,用 T4 DNA 连接酶连接双酶切后的 Y022 scFv 片段和 pH 载体片段。由此得到编码 Y022 单链抗体多肽的核苷酸序列被克隆到载体中,与载体上已经含有的编码 CD3 单链抗体多肽的核苷酸序列一起,可以转录为一条 mRNA,最终翻译为 Y022/CD3 单链双功能抗体多肽。新质粒命名为 pH-Y022/CD3,其详细结构如图 6 所示。

5

#### 实施例 8、单链双功能抗体 Y022/CD3、pH-806/CD3 和 pH-C225/CD3 的表达和纯化

表达载体 pH-Y022/CD3、pH-806/CD3 和 pH-C225/CD3(参见 201210094008.X)分别根据 FreeStyle MAX Reagent 转染试剂(来自 Invitrogen)说明书操作步骤转染到中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中,然后根据 OptiCHO™ 蛋白表达试剂盒(来自 Invitrogen)筛选稳定的克隆。分  
10 别转染有上述表达载体之一的 CHO 细胞的稳定克隆在摇瓶中 37℃,130rpm 培养 7 天,所用培养基为 CD OptiCHO(来自 Gibco)。通过离心获得培养上清,然后储存于-20℃。

按照生产商提供的方法步骤,采用组氨酸亲和层析柱(His Trap HP column,购自 GE Healthcare)进行蛋白纯化。具体而言,层析柱用缓冲液 A (20mM sodium phosphate pH 7.4, 0.4M NaCl)平衡,然后 PBS 透析后将细胞培养上清 (500 mL 上清)加入到层析柱上 (1 mL),  
15 流速为 3ml/min。然后用 5 倍体积的缓冲液 A 和 10 倍体积的含有 50mM 咪唑的缓冲液 A 清洗柱子,以去除杂蛋白。结合的目的蛋白用添加 250mM 咪唑的同样缓冲液 A 进行洗脱。所有的纯化步骤都在 4℃下操作。

纯化的单链双功能抗体通过还原性 SDS-PAGE 进行检测,如图 7 所示,这些抗体分子的分子量均在 60kD 左右,符合根据氨基酸序列计算得到的单链双功能抗体的分子量。

20

#### 实施例 9、Y022/CD3 等单链双功能抗体的抗原结合特异性分析

通过荧光激活细胞分选仪(FACS)(BD 公司, FACSCalibur)分析单链双功能抗体 Y022/CD3 与 EGFR 的结合能力。

具体方法如下:

25 1、取对数生长期的如上表 2 所列各肿瘤细胞接种到 6cm 平皿中,接种细胞密度约为 90%,37℃孵箱过夜培养。

2、使用 10mM 的 EDTA 消化细胞,200g×5min 离心收集细胞。以  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ /mL 的浓度重悬于 1%含小牛血清的磷酸盐缓冲液(NBS PBS)中,按 100ul/管的量加入流式专用管中。

3、200g×5min 离心,弃上清。

30 4、分别加入待测抗体 Y022/CD3,同时以无关抗体 NGR/CD3 作为阴性对照,抗体终浓度为 5μg/ml,每管加入 100ul。冰浴,45 分钟。

5、每管加入 2ml 1% NBS PBS,以 200g×5min 离心,共二遍。

6、弃上清,加入 1:50 稀释的小鼠抗组氨酸标签抗体(来自上海睿星基因技术有限公司),每管加入 100ul。冰浴,45 分钟。

35 7、每管加入 2ml 1% NBS PBS,以 200g×5min 离心,共二遍。

8、弃上清,加入 1: 50 稀释的 FITC 荧光标记的羊抗小鼠抗体(来自上海康成生物工程

有限公司), 每管加入 100 ul。冰浴, 45 分钟。

9、每管加入 2 ml 1% NBS PBS, 以 200g×5min 离心, 共二遍。

10、弃上清, 重悬于 300 ul 1% NBS PBS 中, 流式细胞仪检测。

11、应用流式细胞仪数据分析软件 WinMDI 2.9 分析数据。

5 结果如图 8 所示, 本发明的双功能抗体 Y022/CD3 能够与 U87-EGFR, U87-EGFRvIII 以及 A431 细胞结合, 但几乎不能与 U87 以及人角质上皮细胞结合。这些结果表明, Y022/CD3 可以特异性地和突变的人 EGFR 及过表达的 EGFR 的肿瘤细胞结合, 而不与正常表达 EGFR 的组织结合。

10 此外, 如图所示 Y022/CD3 也能和人外周血单核细胞(PBMC)或 Jurkat 细胞(人外周血白血病 T 细胞, CD3 表达阳性)结合, 提示本发明的双功能抗体能够特异性地与 T 细胞表面的 CD3 抗原结合。

15 根据实施例 7 和 8 中提到的方法分别构建表达质粒(将实施例 7 和 8 中的 Y022 替换为其它突变形式的抗体)并表达纯化了 M14/CD3, M15/CD3, M25/CD3, M26/CD3, S7/CD3, S8/CD3, S17/CD3, S22/CD3, S23/CD3, S29/CD3。根据本实施例的方法, 分别测定了这些抗体对过表达 EGFRvIII 的 U87-EGFRvIII 和内源过表达 EGFR 的 CAL 27 细胞的结合能力。以上抗体均能够结合这两种细胞, 其平均荧光强度(MFI)值如表 13 所示。

表 13

| 抗体  | U87MG-EGFRvIII | CAL 27 |
|-----|----------------|--------|
| PBS | 1              | 3.11   |
| M14 | 36.52          | 28.39  |
| M15 | 37.86          | 29.43  |
| M25 | 36.52          | 24.14  |
| M26 | 41.42          | 24.58  |
| S7  | 42.17          | 27.88  |
| S8  | 38.54          | 29.96  |
| S17 | 31.62          | 25.03  |
| S22 | 31.34          | 24.58  |
| S23 | 32.2           | 29.69  |
| S29 | 34.6           | 25.71  |

20 实施例 10、Y022/CD3 等单链双功能抗体的生物学活性分析-对各种肿瘤细胞的细胞毒性

25 外周血单核细胞(PBMC)用 Ficoll(来自 Biochrom)密度梯度离心方法, 按照标准步骤从健康人供主的血液中分离。离心后, 用浓度为 0.1M 的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞然后重悬于 RPMI 1640 完全培养基(Gibco), 将细胞浓度调整到  $5 \times 10^5/\text{mL}$ 。PBMC 用作细胞毒性实验中的效应细胞。不同的肿瘤细胞作为靶细胞(target cells)。用 RPMI 1640 完全培养基将靶细胞浓度调整到  $5 \times 10^4/\text{mL}$ 。同样体积的靶细胞和效应细胞混合, 使效应细胞: 靶细胞(E:T)比值

为 10: 1。

将混合后的细胞悬液以 75μL/孔的体积加到 96 孔板中。然后各孔分别添加 25 μL 从 1000 ng/mL 到 0.1 ng/mL 的十倍系列梯度稀释的下列试剂:

(1) Y022/CD3 单链双功能抗体(BiTe);

5 (2) RPMI 1640 完全培养基(背景对照);

(3) NGR/CD3 单链双功能抗体(阴性对照, NGR 为新生血管靶向肽, 其与 EGFR 没有交叉结合位点。其根据常规方法制备)。

10 在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 40 小时后, 根据生产商的操作说明, 用 CytoTox96® 非放射性细胞毒性检测试剂盒(Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit, 来自 Promega) 检测抗体的细胞毒作用。

CytoTox 96®非放射性细胞毒性检测是基于比色法的检测方法, 可替代 51Cr 释放法。CytoTox 96®检测定量地测量乳酸脱氢酶(LDH)。LDH 是一种稳定的胞质酶, 在细胞裂解时会释放出来, 其释放方式与 51Cr 在放射性分析中的释放方式基本相同。释放出的 LDH 培养基上清中, 可通过 30 分钟偶联的酶反应来检测, 在酶反应中 LDH 可使一种四唑盐(INT)转  
15 化为红色的甲臢(formazan)。生成的红色产物的量与裂解的细胞数成正比。

如下表 3 所列举的 5 种与 EGFR 有关的肿瘤细胞被用来分别分析本发明双功能抗体 Y022/CD3 以及作为对照的与 EGFR 不相关的 NGR/CD3 单链双功能抗体介导的 T 细胞肿瘤杀伤能力。

20 肿瘤细胞的杀伤率(即, 细胞毒性%)是根据 CytoTox96® 非放射性细胞毒性检测 G1780 产品使用说明书提供的下列公式计算的:

$$\text{细胞毒性\%} = \frac{\text{实验-效应细胞自发-靶细胞自发}}{\text{靶细胞最大-靶细胞自发}} \times 100$$

其中:

“实验”指的是加入抗体/效应细胞/靶细胞的实验孔所产生的 LDH 释放值,

“效应细胞自发”指的是效应细胞自发产生的 LDH 释放,

25 “靶细胞自发”是指细胞不受其他因素处理时产生的 LDH 释放,

“靶细胞最大”是用 0.8%Triton X-100 处理后靶细胞完全裂解所产生的 LDH 释放,

“靶细胞最大-靶细胞自发”代表着细胞受外界处理后完全裂解所产生的 LDH 释放。

表 3

| 肿瘤细胞系        | 1000 ng/ml<br>Y022/CD3 的细胞毒性% | 1000 ng/ml<br>NGR/CD3 的细胞毒性% |
|--------------|-------------------------------|------------------------------|
| U87          | 2.0                           | 3.4                          |
| U87-EGFR     | 32.1                          | 3.7                          |
| U87-EGFRvIII | 66.2                          | 6.3                          |
| A431         | 48.7                          | 5.2                          |
| K2           | 5.1                           | 4.5                          |

上述表 3 的结果表明, 表达突变的 EGFR 和/或过表达 EGFR 的肿瘤细胞如

U87-EGFRvIII, U87-EGFR 以及 A431, 都会被双功能特异性抗体 Y022/CD3 导向的 T 细胞特异性杀伤。

具体而言, 用 Y022/CD3 处理的上述肿瘤细胞组中, 最小的特异性细胞毒性为 32.1%, 最大可达 66.2%。而 Y022/CD3 对表达低水平 EGFR 的细胞 U87 以及人原代角质细胞的细胞毒性非常低, 分别为 3.4%和 4.5%, 显著低于对上述表达突变 EGFR 和/或过表达 EGFR 的肿瘤细胞的细胞毒性。

更具体的, Y022/CD3 和对照抗体 NGR/CD3 在不同浓度下对各肿瘤的细胞毒性%结果如下列表 4-8 所示。

表 4

| ng/ml | U87     |          |
|-------|---------|----------|
|       | NGR/CD3 | Y022/CD3 |
| 1000  | 3.4±1.2 | 2.0±1.3  |
| 100   | 4.8±1.1 | 1.6±3.2  |
| 10    | 4.3±1.5 | 2.5±2.3  |
| 1     | 5.2±2.1 | 0.5±1.2  |
| 0.1   | 5.4±2.2 | 0.2±1.7  |

表 5

| ng/ml | U87-EGFR |          |
|-------|----------|----------|
|       | NGR/CD3  | Y022/CD3 |
| 1000  | 3.7±2.6  | 32.1±3.1 |
| 100   | 4.9±1.7  | 21.7±4.4 |
| 10    | 4.3±2.7  | 12.6±3.2 |
| 1     | 3.3±1.9  | 6.3±2.6  |
| 0.1   | 0.7±1.2  | 5.1±2.0  |

表 6

| ng/ml | U87-EGFRvIII |          |
|-------|--------------|----------|
|       | NGR/CD3      | Y022/CD3 |
| 1000  | 6.3±1.3      | 66.2±5.8 |
| 100   | 7.4±2.4      | 52.5±4.5 |
| 10    | 6.5±0.8      | 33.6±3.2 |
| 1     | 4.7±2.1      | 25.3±2.9 |
| 0.1   | 2.6±1.4      | 6.7±2.3  |

表 7

| ng/ml | A431    |          |
|-------|---------|----------|
|       | NGR/CD3 | Y022/CD3 |
| 1000  | 5.2±2.9 | 48.7±4.3 |
| 100   | 5.6±2.7 | 35.3±5.1 |
| 10    | 3.7±2.4 | 22.7±3.3 |
| 1     | 1.3±0.6 | 10.8±4.4 |
| 0.1   | 1.5±1.1 | 4.3±2.1  |

表 8

| ng/ml | K2      |          |
|-------|---------|----------|
|       | NGR/CD3 | Y022/CD3 |
| 1000  | 4.5±2.2 | 5.1±1.1  |

|     |         |         |
|-----|---------|---------|
| 100 | 4.1±2.8 | 3.2±1.2 |
| 10  | 3.5±2.4 | 1.7±1.0 |
| 1   | 2.1±1.8 | 2.7±1.2 |
| 0.1 | 4.3±2.9 | 2.1±1.3 |

另外，采用相同的方法分别对表达纯化的如下 BiTe: M14/CD3, M15/CD3, M25/CD3, M26/CD3, S7/CD3, S8/CD3, S17/CD3, S22/CD3, S23/CD3, S29/CD3 进行了体外毒性实验分析，结果如图 9 所示。

由图 9 可以看到，表达突变的 EGFR 和/或过表达 EGFR 的肿瘤细胞如 U87-EGFR $\nu$ III, U87-EGFR 以及 CAL27, 都会被双功能特异性抗体 M14/CD3, M15/CD3, M25/CD3, M26/CD3, S7/CD3, S8/CD3, S17/CD3, S22/CD3, S23/CD3, S29/CD3 抗体导向的 T 细胞不同程度的杀伤。而对表达低水平 EGFR 的细胞 U87 几乎没有产生杀伤作用。

实施例 11、表达本发明核酸编码的嵌合抗原受体蛋白的慢病毒质粒的构建及病毒包装  
构建嵌合抗原受体，本发明示例的嵌合抗原受体各部分的连接顺序如表 9 和图 10。

表 9

| 嵌合抗原受体           | 胞外结合区-跨膜区-胞内信号区 1-胞内信号区 2 等           | 描述   |
|------------------|---------------------------------------|------|
| Y022- $\delta$ Z | scFv(EGFR)-CD8-CD3 $\delta$ zeta      | 阴性对照 |
| Y022-Z           | scFv(EGFR)-CD8-CD3 zeta               | 第一代  |
| Y022-BBZ         | scFv(EGFR)-CD8-CD137-CD3 zeta         | 第二代  |
| Y022-28Z         | scFv(EGFR)-CD28a-CD28b-CD3 zeta       | 第二代  |
| Y022-28BBZ       | scFv(EGFR)-CD28a-CD28b-CD137-CD3 zeta | 第三代  |

注：CD28a 代表 CD28 分子的跨膜区，CD28b 代表 CD28 分子的胞内信号区。

## 1、核酸片段的扩增

### (1) scFv 序列的扩增

以 pCantab 5E-Y022 质粒为模板，采用正向引物(SEQ ID NO: 24, 包含部分 CD8 信号肽的序列)和反向引物(SEQ ID NO: 25, 包含部分 CD8 绞链的序列) 为引物对，PCR 扩增获得 Y022 scFv。

SEQ ID NO: 24 (TGCTCCACGCCGCCAGGCCGGATATTCAGATGACCCAG)

SEQ ID NO: 25 (CGCGGCGCTGGCGTCGTGGTGCTGCTCACGGTCAC)

### (2) 嵌合抗原受体其他部分的核酸序列

抗 EGFR $\nu$ III 嵌合抗原受体蛋白的除 Y022 scFv 外其它部分的核酸序列分别以专利申请号为 201310164725.X 中公开的序列 SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29 和 30 为模板通过 PCR 方式获得。具体地，其中 eGFP-F2A-CD8sp 序列以专利申请号 201310164725.X 中所载的 SEQ ID NO: 27 质粒为模板，以引物对(SEQ ID NO: 26, 27)进行 PCR 扩增获得。CD8-CD3 $\delta$  zeta( $\delta$ Z) 以申请专利 201310164725.X 中 SEQ ID NO: 26 质粒为模板，采用引物对(SEQ ID NO: 28, 29) 通过 PCR 扩增获得。CD8-CD3 zeta(Z)、CD8-CD137-CD3 zeta(BBZ)、CD28a-CD28b-CD3 zeta(28Z)和 CD28a-CD28b-CD137-CD3 zeta(28BBZ)序列分别以申请专利 201310164725.X 中

SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29 和 SEQ ID NO: 30 对应的质粒为模板，采用引物对(SEQ ID NO: 28, 30)通过 PCR 扩增获得。

SEQ ID NO: 26 (TGCAGTAGTCGCCGTGAAC)

SEQ ID NO: 27 (CGGCCTGGCGGCGTGGAGCA)

5 SEQ ID NO: 28 (ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAC)

SEQ ID NO: 29 (GAGGTCGACCTACGCGGGGGCGTCTGCGCTCCTGCTGAACTTCACTCT)

SEQ ID NO: 30 (GAGGTCGACCTAGCGAGGGGGCAGGGCCTGCATGTGAAG)

## 2、核酸片段的拼接

10 分别将如前述获得的 eGFP-F2A-CD8sp 核酸片段，与等摩尔的 Y022 scFv 核酸片段以及等摩尔的 CD8-CD3 $\delta$  zeta( $\delta$ Z) 或 CD8-CD3 zeta(Z) 或 CD8-CD137-CD3 zeta(BBZ) 或 CD28a-CD28b-CD3 zeta(28Z)或 CD28a-CD28b-CD137-CD3 zeta(28BBZ)核酸片段，按图 9 所示进行三片段拼接并 PCR，拼接条件为：预变性：94℃，4min；变性：94℃，40s；退火：60℃，40s；延伸：68℃，140s，进行 5 个循环，然后总延伸 68℃，10min，补充 DNA 聚合酶及正向引物(SEQ ID NO: 24)和反向引物(CD8-CD3 $\delta$  zeta 对应的反向引物为 SEQ ID NO: 15 29，其余的为 SEQ ID NO: 30)后 PCR 扩增 30 个循环，扩增条件为预变性：94℃，4min；变性：94℃，40s；退火：60℃，40s；延伸：68℃，140s，进行 30 个循环，然后总延伸 68℃，10min。扩增获得的片段分别称为(表 2)：

|    |                                |                  |
|----|--------------------------------|------------------|
|    | eGFP-F2A-Y022 scFv- $\delta$ Z | (SEQ ID NO: 31), |
|    | eGFP-F2A-Y022 scFv-Z           | (SEQ ID NO: 32), |
| 20 | eGFP-F2A-Y022 scFv-BBZ         | (SEQ ID NO: 33), |
|    | eGFP-F2A-Y022 scFv-28Z         | (SEQ ID NO: 34), |
|    | eGFP-F2A-Y022 scFv-28BBZ       | (SEQ ID NO: 35)。 |

## 3、慢病毒质粒载体的构建

25 作为示例，以下构建的慢病毒质粒载体使用的载体系统属于第三代自灭活慢病毒载体系统，该系统共有三个质粒即编码蛋白 Gag/Pol、编码 Rev 蛋白的包装质粒 psPAX2(购自 addgene)；编码 VSV-G 蛋白的包膜质粒 PMD2.G(购自 addgene)及基于空载体 pWPT-eGFP(购自 addgene)的编码目的基因 CAR 的重组表达载体。

30 在空载体 pWPT-eGFP 中，自带的延长因子-1 $\alpha$ (elongation factor-1 $\alpha$ , EF-1 $\alpha$ )的启动子可调控增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, eGFP)的表达，在空载体中插入本实施例前述构建的构建体后，形成编码目的基因 CAR 的重组表达载体，其中通过来自口蹄疫病毒的核糖体跳跃序列(food and mouth disease virus, FMDV, ribosomal skipping sequence, F2A)实现 eGFP 与目的基因 CAR 的共表达。F2A 是来自口蹄疫病毒的 2A(或称为“自剪切多肽 2A”)的一段核心序列，具备 2A 的“自剪切”功能，可以实现上游和下游基因共表达。2A 由于其剪切效率高、上下游基因表达平衡性高及自身序列短小的优点为构建基 35 因治疗多顺反子载体提供了一种有效的可行策略。尤其在基于嵌合抗原受体基因修饰 T 淋巴细胞的免疫治疗中多应用该序列实现目的基因与 GFP 或者 eGFP 的共表达，通过检测 GFP

或者 eGFP 即可间接检测 CAR 的表达。

本实施例构建了由 F2A 相连的 eGFP 与特异性 CAR 共表达的慢病毒表达载体, 统称为 pWPT-eGFP-F2A-CAR。上述步骤 2 中获得的的目的基因 eGFP-F2A-CAR(参见实施例 7 中的 2, F2A 后面的组件简称为 CAR)通过 MluI 和 SalI 限制性内切酶双酶切, 连入同样双酶切的 pWPT 载体中, 从而构建表达各嵌合抗原受体的慢病毒载体。构建成功的载体经 MluI 和 SalI 酶切鉴定及序列测定正确后, 可以准备用于慢病毒包装。如前所述, eGFP-F2A-CAR 转录为一条 mRNA, 但最终翻译为 eGFP 和抗 EGFRvIII 嵌合抗原受体两条肽链, 其中在 CD8 $\alpha$  信号肽的引导下抗 EGFRvIII 嵌合抗原受体将定位在细胞膜上。

得到的含有各目的 CAR 的载体如下 (F2A 后面的组件可简称为 CAR):

pWPT-eGFP-F2A-Y022 scFv- $\delta$ Z;

pWPT-eGFP-F2A-Y022 scFv-Z;

pWPT-eGFP-F2A-Y022 scFv-BBZ;

pWPT-eGFP-F2A-Y022 scFv-28Z;

pWPT-eGFP-F2A-Y022 scFv-28BBZ。

通过以上构建, 分别可获得五个 eGFP-F2A-CAR 多肽序列, 称为:

eGFP-F2A-Y022 scFv- $\delta$ Z (SEQ ID NO: 36);

eGFP-F2A-Y022 scFv-Z (SEQ ID NO: 37);

eGFP-F2A-Y022 scFv-BBZ (SEQ ID NO: 38);

eGFP-F2A-Y022 scFv-28Z (SEQ ID NO: 39);

eGFP-F2A-Y022 scFv-28BBZ (SEQ ID NO: 40)。

#### 4、质粒转染 293T 包装慢病毒

以  $6 \times 10^6$  的密度接种培养至第 6~10 代的 HEK-293T 细胞(ATCC: CRL-11268)于 10cm 培养皿中, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培养过夜准备用于转染。培养基为含 10%胎牛血清(购自 PAA 公司)的 DMEM(购自 PAA 公司)

转染的步骤如下:

4.1 A 液配制: 将 10 $\mu$ g mock 对照或 10 $\mu$ g 的各目的基因质粒 pWPT-eGFP-F2A-CAR, 分别与 7.5 $\mu$ g 包装质粒 PAX2: 和 3 $\mu$ g 包膜质粒 pMD2.G, 溶入 800 $\mu$ L 的无血清 DMEM 培养液中, 混匀。

4.2 B 液配制: 将 60 $\mu$ g PEI(聚乙烯亚胺, 购自 Polysciences 公司)溶解于 800 $\mu$ L 的无血清 DMEM 培养液中, 轻轻混匀, 室温孵育 5min。

4.3 转染复合物的形成: 将 A 液加入 B 液中轻轻混合, 加入后立即涡旋混合或轻轻混匀, 室温下孵育 20min。

4.4 将转染复合物 1.6ml 滴加入 HEK-293T 细胞中, 4-5h 小时后, 用 2%FBS 的 DMEM 培养基给转染的 293T 细胞换液。

在转染次日观察转染效率(即呈绿色荧光的细胞比例), ~80%的阳性转染效率即为转染实验成功。在转染 72h 后, 使用 0.45 $\mu$ m 滤器(购自 Millipore 公司)过滤收集病毒, 然后采用

Beckman Optima L-100XP 超速离心机 28000rpm, 4℃离心 2 小时, 弃离心上清, 离心所得沉淀用 1/10~1/50 原液体积的 AIM-V 培养液(购自 Invitrogen 公司)进行重悬, 以 100μL/管分装冻存于-80℃, 以待病毒滴定或感染 T 淋巴细胞。

### 5、测定包装有 mock 或者 eGFP-F2A-CAR 的慢病毒滴度

5 第一天, 以  $1 \times 10^5$ /mL 接种 293T 细胞于 96 孔培养板, 100μL/孔, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养, 培养液为含 10%胎牛血清的 DMEM。第二天, 弃 50μL/孔培养上清, 补加 50μL/孔新鲜上述培养液, 并含终浓度为 6μg/mL 的 polybrene, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵育 30min。加 10μL/孔的病毒原液或 1μL/孔的病毒浓缩液, 3 倍稀释, 6 个梯度, 两个复孔, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养。感染 48h 后, 流式细胞仪检测 eGFP, 以阳性率为 5~20%的细胞数为宜, 计算滴度(U/mL)=阳性率×稀释倍数×100×10<sup>4</sup>。PEI 转染法包装的上述包含 mock 即空载体对照和各 eGFP-F2A-CAR 10 的病毒的滴度均为约 0.5~ $1 \times 10^7$ U/mL 的水平, 经浓缩后所测的病毒滴度约为 0.5~ $1 \times 10^8$ U/mL。

### 实施例 12、重组慢病毒感染 T 细胞

15 由健康人外周血通过密度梯度离心法获得人外周血单个核细胞 (上海市血液中心提供), 以约  $2 \times 10^6$ /mL 密度加入 AIM-V 淋巴细胞培养基(购自 Invitrogen 公司)培养, 并以细胞:磁珠比例为 1:1 加入包被有抗 CD3 和 CD28 抗体的磁珠(Invitrogen 公司), 同时加入终浓度 300U/mL 的重组人 IL-2(购自上海华新生物高技术有限公司)刺激培养 48h, 然后以用上述重组慢病毒(MOI≈15)感染 T 细胞。感染的 T 细胞在培养第 8 天时通过流式细胞检测各不同嵌 20 合抗原受体表达, 由于 eGFP 与 CAR 共表达, 检测 eGFP 的阳性细胞即为表达嵌合抗原受体的阳性细胞。以未感染的 T 淋巴细胞作为阴性对照, 表达不同嵌合抗原受体的病毒感染 T 细胞其阳性率如表 10 所示。该阳性率结果表明, 通过慢病毒感染的方法能够获得一定阳性率的 CAR T 细胞。

表 10

| 转染有下列 CAR 的 T 细胞 | CAR T 细胞 eGFP 阳性率 |
|------------------|-------------------|
| Y022-δZ(Mock)    | 66%               |
| Y022-Z           | 58%               |
| Y022-BBZ         | 53%               |
| Y022-28Z         | 54%               |
| Y022-28BBZ       | 52%               |

25 T 细胞在分别感染包装有不同嵌合抗原受体的病毒后, 以细胞密度为  $5 \times 10^5$ /ml 隔天传代培养、计数、并对传代的细胞培养液补加 IL-2(终浓度为 300U/ml), 培养第 11 天约有 100~1000 倍的扩增, 表明表达不同嵌合抗原受体的 T 细胞在体外能够进行一定数量的扩增, 为后续体外毒性试验及体内试验提供了保证。

### 30 实施例 13、CAR-Y022 的体外抗肿瘤活性

体外毒性实验使用的材料如下:



靶细胞分别为如表 5 所示的 U87, U87-EGFR, U87-EGFRvIII, A431, CAL 27, MDA-MB-468, RWPE-1 细胞以及人原代角质细胞 K2。效应细胞为体外培养 12 天的 FACS 检测嵌合抗原受体表达阳性的 T 淋巴细胞(CAR T 细胞)。

5 效靶比分别为 3:1, 1:1 和 1:3, 靶细胞数量为 10000/孔, 每组均设 5 个复孔。检测时间为 18h。

其中各实验组和各对照组如下:

各实验组: 各靶细胞+表达不同嵌合抗原受体的 CAR T 淋巴细胞;

对照组 1: 靶细胞最大释放 LDH;

对照组 2: 靶细胞自发释放 LDH;

10 对照组 3: 效应细胞自发释放 LDH。

检测方法: 采用 CytoTox 96 非放射性细胞毒性检测试剂盒(Promega 公司)进行。该方法是基于比色法的检测方法, 可替代  $^{51}\text{Cr}$  释放法。CytoTox 96®检测定量地测量乳酸脱氢酶(LDH)。LDH 是一种稳定的胞质酶, 在细胞裂解时会释放出来, 其释放方式与  $^{51}\text{Cr}$  在放射性分析中的释放方式基本相同。释放出的 LDH 培养基上清中, 可通过 30 分钟偶联的酶反应来  
15 检测, 在酶反应中 LDH 可使一种四唑盐(INT)转化为红色的甲臍(formazan)。生成的红色产物的量与裂解的细胞数成正比。具体参照 CytoTox 96 非放射性细胞毒性检测试剂盒说明书。

细胞毒性计算公式为:

$$\text{细胞毒性}\% = \frac{\text{实验组} - \text{对照组 2} - \text{对照组 3}}{\text{对照组 1} - \text{对照组 2}} \times 100\%$$

具体如表 11 和表 12 所示, 在不同效靶比的情况下, 与 806-CAR T 相比, 本发明的表  
20 达嵌合抗原受体的 Y022-28Z CAR T 和 Y022-28BBZ CAR T 对高表达 EGFR 以及 EGFRvIII 的细胞具有明显的杀伤作用, 并呈现效靶比梯度依赖性即效靶比越高细胞毒性作用越强。效靶比依赖性的数据进一步显示表达本发明的嵌合抗原受体的 CAR T 细胞对高表达 EGFR 及其变异体细胞的特异性细胞毒作用。

值得关注的是, Y022-CAR T 对正常表达 EGFR 的 RWPE-1 细胞以及人原代角质细胞  
25 K2 几乎没有杀伤作用, 在效靶比 3: 1 时, 嵌合抗原受体 Y022-28BBZ CAR T 淋巴细胞对 RWPE-1 细胞以及人原代角质细胞 K2 的细胞毒性分别为 12%和 2%, Y022-28Z CAR T 淋巴细胞对 RWPE-1 细胞以及人原代角质细胞 K2 的细胞毒性分别为 8%和 3%。相比较而言, 806-CAR T 对这两种细胞均有不同程度的杀伤, 806-28BBZ CAR T 淋巴细胞对 RWPE-1 细胞以及人原代角质细胞 K2 的细胞毒性分别为 25%和 22%, 806-28Z CAR T 淋巴细胞对  
30 RWPE-1 细胞以及人原代角质细胞 K2 的细胞毒性分别为 15%和 13%。

另外, 被含有 mock 质粒(携带 scFv-Y022- $\delta$ Z)的病毒转染的作为阴性对照的 CAR T 显示对上述细胞系的细胞毒性作用均非常低。

以上结果表明, 针对 EGFR 及其变异体的单链抗体所构建的嵌合抗原受体 Y022-CAR T,

能够选择性地杀伤高表达 EGFR 及其变异体(EGFRvIII)的肿瘤细胞, 而对正常表达 EGFR 的细胞几乎没有杀伤作用。此外, 从细胞毒性数据来看, 第三代(Y022-28BBZ)的 CAR T 比第二代(Y022-28Z)的 CART 对靶细胞的杀伤毒性更强。

表 11

| 细胞毒性%        | Y022-28BBZ<br>不同效靶比 |     |     | Y022-28Z<br>不同效靶比 |     |     | mock<br>不同效靶比 |     |     |
|--------------|---------------------|-----|-----|-------------------|-----|-----|---------------|-----|-----|
|              | 3:1                 | 1:1 | 1:3 | 3:1               | 1:1 | 1:3 | 3:1           | 1:1 | 1:3 |
| U87          | 2                   | 4   | 5   | 4                 | 3   | 1   | -4            | -3  | 2   |
| U87-EGFR     | 35                  | 17  | 6   | 25                | 16  | 7   | -1            | 5   | 1   |
| U87-EGFRvIII | 73                  | 42  | 19  | 65                | 31  | 9   | 3             | 0.3 | 1   |
| A431         | 67                  | 37  | 12  | 45                | 24  | 5   | 9             | 7   | 4   |
| CAL27        | 70                  | 49  | 15  | 50                | 23  | 8   | 7             | 5   | 5   |
| MDA-MB-468   | 57                  | 45  | 14  | 41                | 23  | 1   | 6             | 8   | 7   |
| RWPE-1       | 12                  | 7   | 3   | 8                 | 6   | 4   | 3             | 2   | 0.2 |
| K2           | 11                  | 2   | 0.3 | 3                 | 0.6 | 2   | -3            | -1  | 2   |

5

表 12

| 细胞毒性%        | 806-28BBZ<br>不同效靶比 |     |     | 806-28Z<br>不同效靶比 |     |     | mock<br>不同效靶比 |     |     |
|--------------|--------------------|-----|-----|------------------|-----|-----|---------------|-----|-----|
|              | 3:1                | 1:1 | 1:3 | 3:1              | 1:1 | 1:3 | 3:1           | 1:1 | 1:3 |
| U87          | 3                  | 4   | 2   | 5                | 0.6 | 2   | 1             | 3   | -3  |
| U87-EGFR     | 68                 | 49  | 18  | 55               | 36  | 12  | 3             | 7   | 4   |
| U87-EGFRvIII | 83                 | 51  | 23  | 75               | 42  | 15  | 6             | 5   | 2   |
| A431         | 75                 | 48  | 16  | 56               | 35  | 12  | 7             | 7   | 5   |
| CAL27        | 81                 | 57  | 25  | 65               | 33  | 18  | 3             | 6   | 2   |
| MDA-MB-468   | 62                 | 49  | 32  | 51               | 32  | 16  | 6             | 9   | 7   |
| RWPE-1       | 29                 | 17  | 10  | 15               | 10  | 7   | -2            | -3  | 2   |
| K2           | 27                 | 15  | 2   | 13               | 9   | 4   | 0.2           | 1   | 3   |

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

10

## 权 利 要 求

1. 一种特异性识别肿瘤细胞表达的 EGFR<sub>vIII</sub> 或者过量表达的 EGFR 的抗体, 其特征在于, 该抗体具有轻链可变区和重链可变区, 且,

5 其轻链可变区的 CDR1 具有选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 55;

其轻链可变区的 CDR2 具有选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 53;

其轻链可变区的 CDR3 具有选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57;

10 其重链可变区的 CDR1 具有氨基酸序列: SEQ ID NO: 44;

其重链可变区的 CDR2 具有选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52;

其重链可变区的 CDR3 具有选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 50。

2. 如权利要求 1 所述的抗体, 其特征在于, 所述的抗体包括:

15 抗体(a), 其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 42 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 43 所示的 CDR3; 或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 45 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 46 所示的 CDR3;

抗体(b), 其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 47 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 42 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 48 所示的 CDR3; 或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 20 49 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3;

抗体(c), 其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 42 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 48 所示的 CDR3; 或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 51 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3;

25 抗体(d), 其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 42 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 43 所示的 CDR3; 或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 52 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3;

抗体(e), 其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 42 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 43 所示的 CDR3; 或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 45 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3;

30 抗体(f), 其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 53 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 54 所示的 CDR3; 或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 51 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3;

35 抗体(g), 其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 42 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 54 所示的 CDR3; 或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 51 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3;

抗体(h), 其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 55 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 42 所示的 CDR2、

SEQ ID NO: 56 所示的 CDR3; 或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 45 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3;

5 抗体(i), 其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 53 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 56 所示的 CDR3; 或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 52 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3;

抗体(j), 其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 42 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 56 所示的 CDR3; 或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 52 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3;

10 抗体(k), 其轻链可变区具有 SEQ ID NO: 41 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 42 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 57 所示的 CDR3; 或其重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 52 所示的 CDR2、SEQ ID NO: 50 所示的 CDR3; 或

抗体(l), 识别与(a)~(k)中任一项所述的抗体所识别的抗原决定部位相同的抗原决定部位。

3. 如权利要求 2 所述的抗体, 其特征在于, 所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如  
15 SEQ ID NO: 13 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 中第 1-108 位所示;

所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 59 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 59 中第 1-108 位所示;

20 所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 61 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 61 中第 1-108 位所示;

所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 63 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 63 中第 1-108 位所示;

所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 65 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 65 中第 1-108 位所示;

25 所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 67 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 67 中第 1-108 位所示;

所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 69 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 69 中第 1-108 位所示;

30 所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 71 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 71 中第 1-108 位所示;

所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 73 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 73 中第 1-108 位所示;

所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 75 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 75 中第 1-108 位所示; 或

35 所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 77 中第 124-239 位所示; 或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 77 中第 1-108 位所示。

4 如权利要求 2 所述的抗体，其特征在于，所述的抗体是抗体(a)；更佳的，所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 中第 124-239 位所示；或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 中第 1-108 位所示。

5. 编码权利要求 1-4 任一所述的抗体的核酸。

5 6. 一种表达载体，其包含权利要求 5 所述的核酸。

7. 一种宿主细胞，其包含权利要求 6 所述的表达载体或基因组中整合有权利要求 5 所述的核酸。

8. 权利要求 1-4 任一所述的抗体的用途，用于制备特异性靶向表达 EGFRvIII 或过量表达的 EGFR 的肿瘤细胞的靶向性药物，抗体药物偶联物或多功能抗体；或

10 用于制备诊断肿瘤的试剂，该肿瘤表达 EGFRvIII 或过量表达的 EGFR；或

用于制备嵌合抗原受体修饰的免疫细胞；较佳地，所述免疫细胞包括：T 淋巴细胞、NK 细胞或者 NKT 淋巴细胞。

9. 一种多功能免疫缀合物，其特征在于，所述的多功能免疫缀合物包括：

权利要求 1-4 任一所述的抗体；以及

15 与之连接的功能性分子；所述的功能性分子选自：靶向肿瘤表面标志物的分子，抑制肿瘤分子，靶向免疫细胞的表面标志物的分子或可检测标记物。

10. 如权利要求 9 所述的多功能免疫缀合物，其特征在于，所述的靶向肿瘤表面标志物的分子是结合肿瘤表面标志物的抗体或配体；或

20 所述的抑制肿瘤分子是抗肿瘤的细胞因子或抗肿瘤的毒素；较佳地，所述的细胞因子包括：IL-12、IL-15、IFN-beta、TNF-alpha。

11. 如权利要求 9 所述的多功能免疫缀合物，其特征在于，所述的可检测标记物包括：荧光标记物、显色标记物。

25 12. 如权利要求 9 所述的多功能免疫缀合物，其特征在于，所述的靶向免疫细胞的表面标志物的分子是结合免疫细胞表面标志物的抗体或配体；较佳地，所述的免疫细胞表面标志物包括：CD3，CD16，CD28。

13. 如权利要求 12 所述的多功能免疫缀合物，其特征在于，所述的靶向免疫细胞的表面标志物的分子是结合 T 细胞表面标志物的抗体，其与权利要求 1-4 任一所述的抗体形成 T 细胞参与的双功能抗体。

30 14. 如权利要求 13 所述的多功能免疫缀合物，其特征在于，所述的结合免疫细胞表面标志物的抗体是抗 CD3 抗体。

15. 如权利要求 9 所述的多功能免疫缀合物，其特征在于，其是融合多肽，权利要求 1-4 任一所述的抗体以及与之连接的功能性分子之间，还包括连接肽。

16. 编码权利要求 9-15 任一所述的多功能免疫缀合物的核酸。

35 17. 权利要求 9-15 任一所述的多功能免疫缀合物的用途，用于制备抗肿瘤药物，或用于制备诊断肿瘤的试剂，该肿瘤表达 EGFRvIII 或过量表达的 EGFR；或用于制备嵌合抗原受体修饰的免疫细胞；较佳地，所述免疫细胞包括：T 淋巴细胞、

NK 细胞或者 NKT 淋巴细胞。

18. 包含权利要求 1-4 任一所述的抗体的嵌合抗原受体，其表达于免疫细胞表面，其特征在于，所述的嵌合抗原受体包含顺序连接的：权利要求 1-4 任一所述的抗体，跨膜区和胞内信号区。

5 19. 如权利要求 18 所述的嵌合抗原受体，其特征在于，所述的胞内信号区选自：CD3 $\zeta$ ，Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ ，CD27，CD28，CD137，CD134 的胞内信号区序列，或其组合。

20. 如权利要求 19 所述的嵌合抗原受体，其特征在于，所述的跨膜区包含 CD8 或 CD28 的跨膜区。

10 21. 如权利要求所述 19 的嵌合抗原受体，其特征在于，所述的免疫细胞包括：T 淋巴细胞，NK 细胞或 NKT 细胞。

22. 如权利要求 19 所述的嵌合抗原受体，其特征在于，所述的嵌合抗原受体包括如下顺序连接的抗体，跨膜区和胞内信号区：

权利要求 1-4 任一所述的抗体、CD8 和 CD3 $\zeta$ ；

权利要求 1-4 任一所述的抗体、CD8、CD137 和 CD3 $\zeta$ ；

15 权利要求 1-4 任一所述的抗体、CD28 分子的跨膜区、CD28 分子的胞内信号区和 CD3 $\zeta$ ；  
或

权利要求 1-4 任一所述的抗体、CD28 分子的跨膜区、CD28 分子的胞内信号区、CD137 和 CD3 $\zeta$ 。

20 23. 如权利要求 19 所述的嵌合抗原受体，其特征在于，所述的抗体是单链抗体或结构域抗体。

24. 如权利要求 19 所述的嵌合抗原受体，其特征在于，所述的嵌合抗原受体具有：

SEQ ID NO: 36 或其中第 285-601 位所示的氨基酸序列；或

SEQ ID NO: 37 或其中第 285-702 位所示的氨基酸序列；或

SEQ ID NO: 38 或其中第 285-744 位所示的氨基酸序列；或

25 SEQ ID NO: 39 或其中第 285-749 位所示的氨基酸序列；或

SEQ ID NO: 40 或其中第 285-791 位所示的氨基酸序列。

25. 编码权利要求 18-24 任一所述的嵌合抗原受体的核酸。

26. 一种表达载体，其特征在于，其包含权利要求 25 所述的核酸。

27. 一种病毒，其特征在于，所述的病毒包含权利要求 26 所述载体。

30 28. 权利要求 18-24 任一所述的嵌合抗原受体、或权利要求 25 所述的核酸、或权利要求 26 所述的表达载体、或权利要求 27 所述的病毒的用途，用于制备靶向表达 EGFRvIII 或者过量表达 EGFR 的肿瘤细胞的基因修饰的免疫细胞。

29. 一种基因修饰的免疫细胞，其特征在于，其转导有权利要求 25 所述的核酸，或权利要求 26 所述的表达载体或权利要求 27 所述的病毒；或

35 其表面表达权利要求 18-24 任一所述的嵌合抗原受体。

30. 如权利要求 29 所述的免疫细胞，其特征在于，其还携带外源的细胞因子的编码序

列；较佳地，所述的细胞因子包括：IL-12，IL-15 或 IL-21。

31. 如权利要求 29 所述的免疫细胞，其特征在于，其还表达另一种嵌合抗原受体，该受体不含有 CD3 $\zeta$ ，但含有 CD28 的胞内信号结构域、CD137 的胞内信号结构域或者这两者的组合。

5        32. 如权利要求 29 所述的免疫细胞，其特征在于，其还表达趋化因子受体；较佳地，所述的趋化因子受体包括：CCR2。

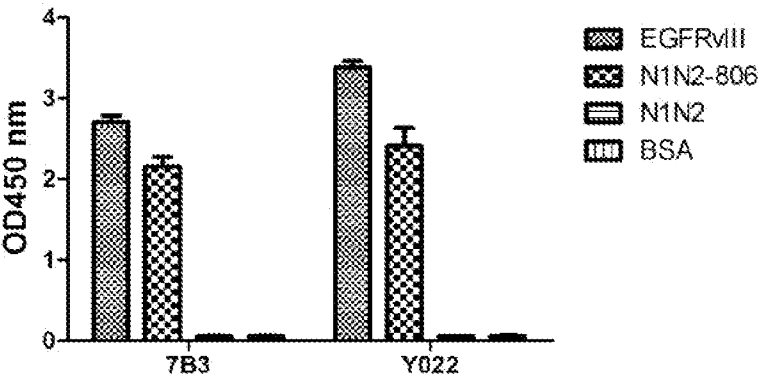
33. 如权利要求 29 所述的免疫细胞，其特征在于，其还表达能降低 PD-1 表达的 siRNA 或者阻断 PD-L1 的蛋白。

10       34. 如权利要求 29 所述的免疫细胞，其特征在于，其还表达安全开关；较佳地，所述的安全开关包括：iCaspase-9，Truncated EGFR 或 RQR8。

35. 权利要求 29-34 任一所述的基因修饰的免疫细胞的用途，其特征在于，用于制备抑制肿瘤的药物，所述的肿瘤是表达 EGFRvIII 或者过量表达 EGFR 的肿瘤。

36. 药物组合物，其特征在于，其包括：

15       权利要求 1-4 任一所述的抗体或编码该抗体的核酸；或  
      权利要求 9-15 任一所述的免疫组合物或编码该组合物的核酸；或  
      权利要求 18-24 任一所述的嵌合抗原受体或编码该嵌合抗原受体的核酸；或  
      权利要求 29-34 任一所述的基因修饰的免疫细胞。



抗体克隆

图 1

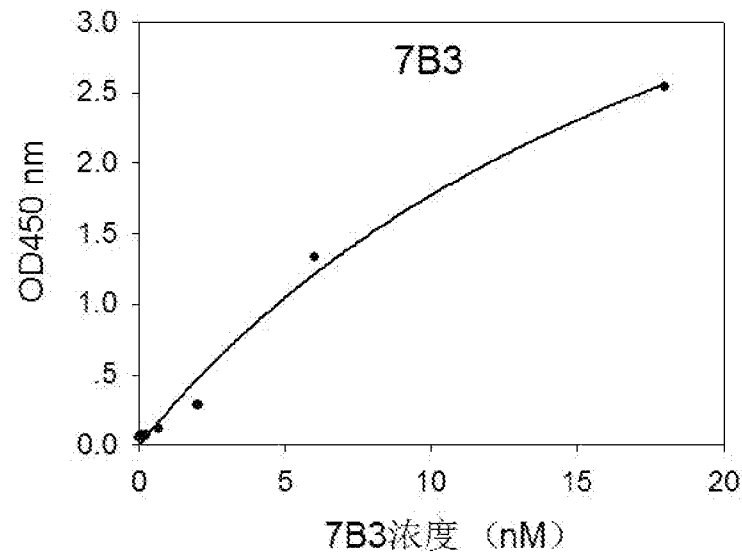


图 2

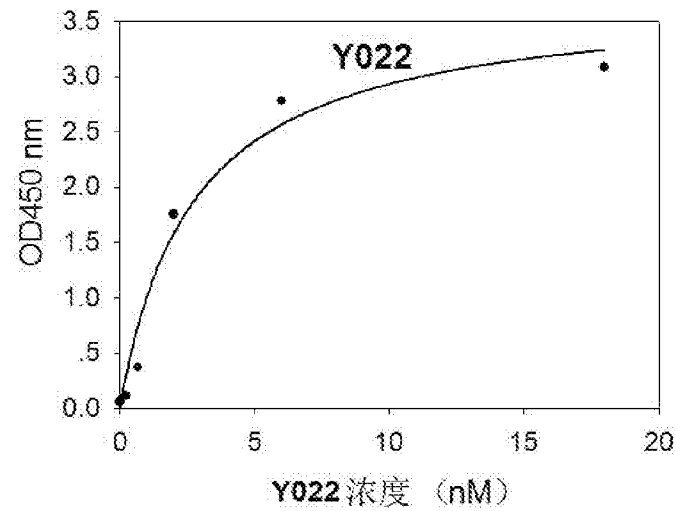


图 3



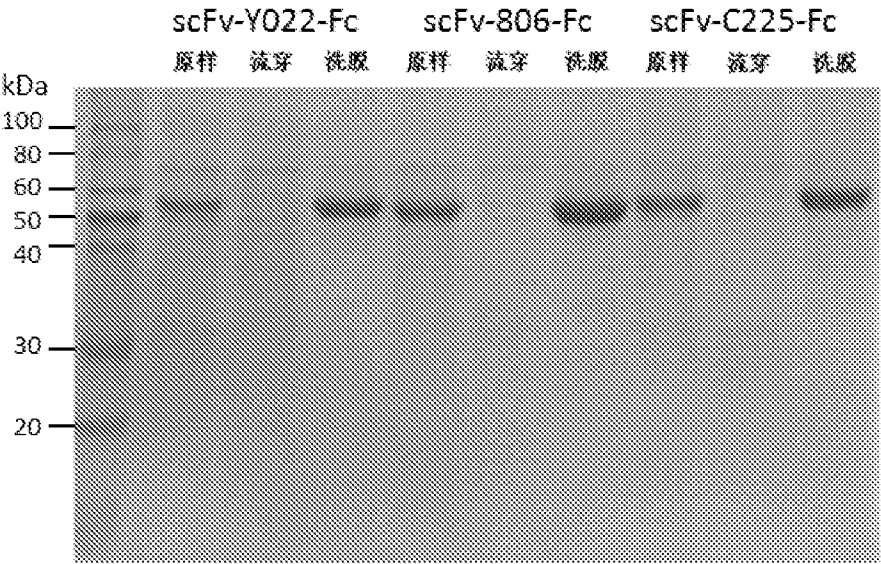


图 4

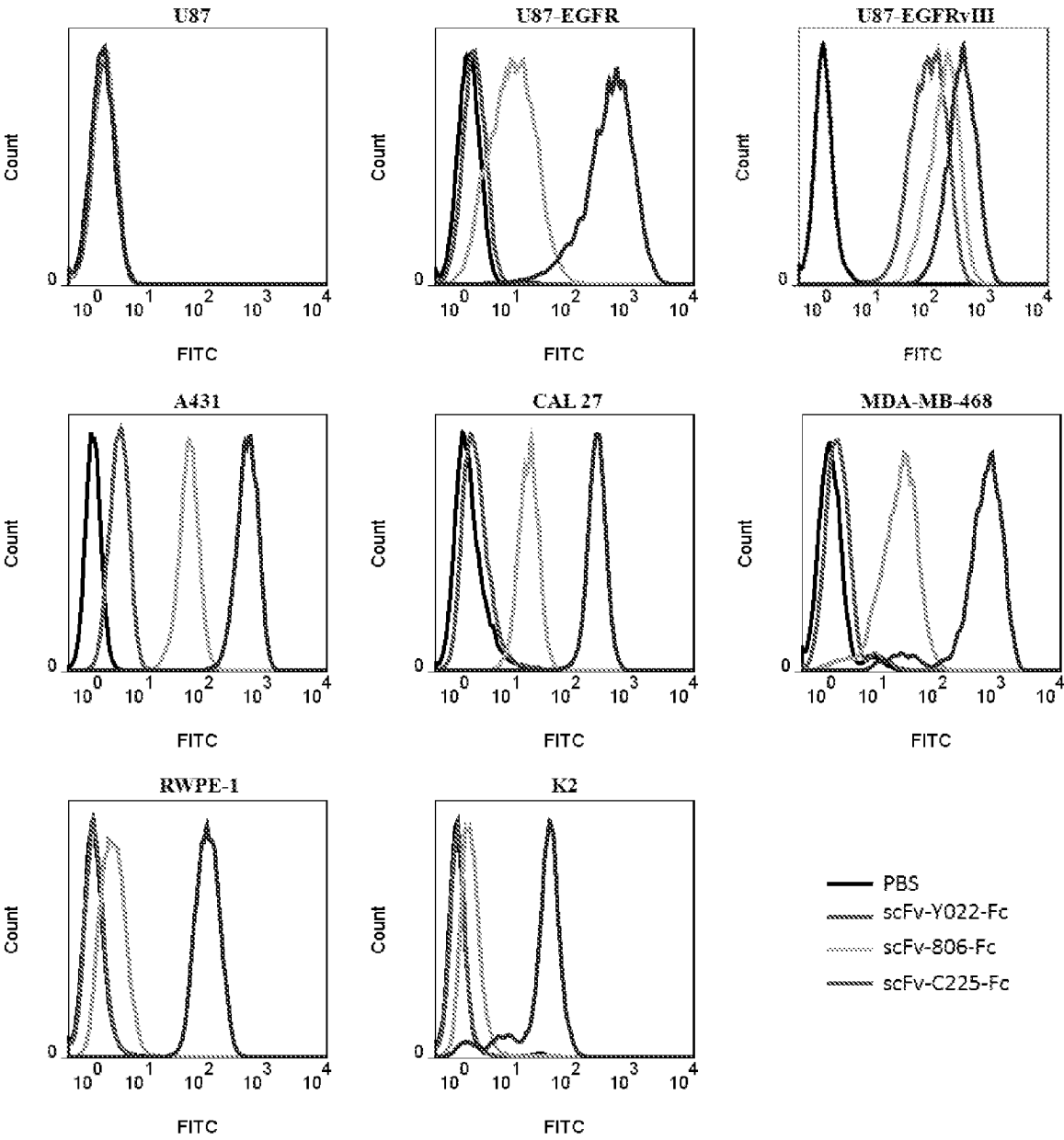


图 5

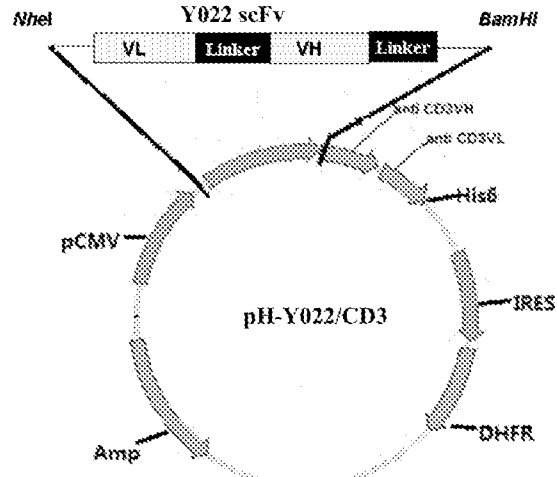


图 6

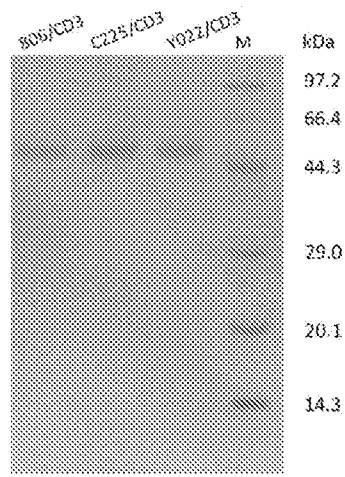


图 7

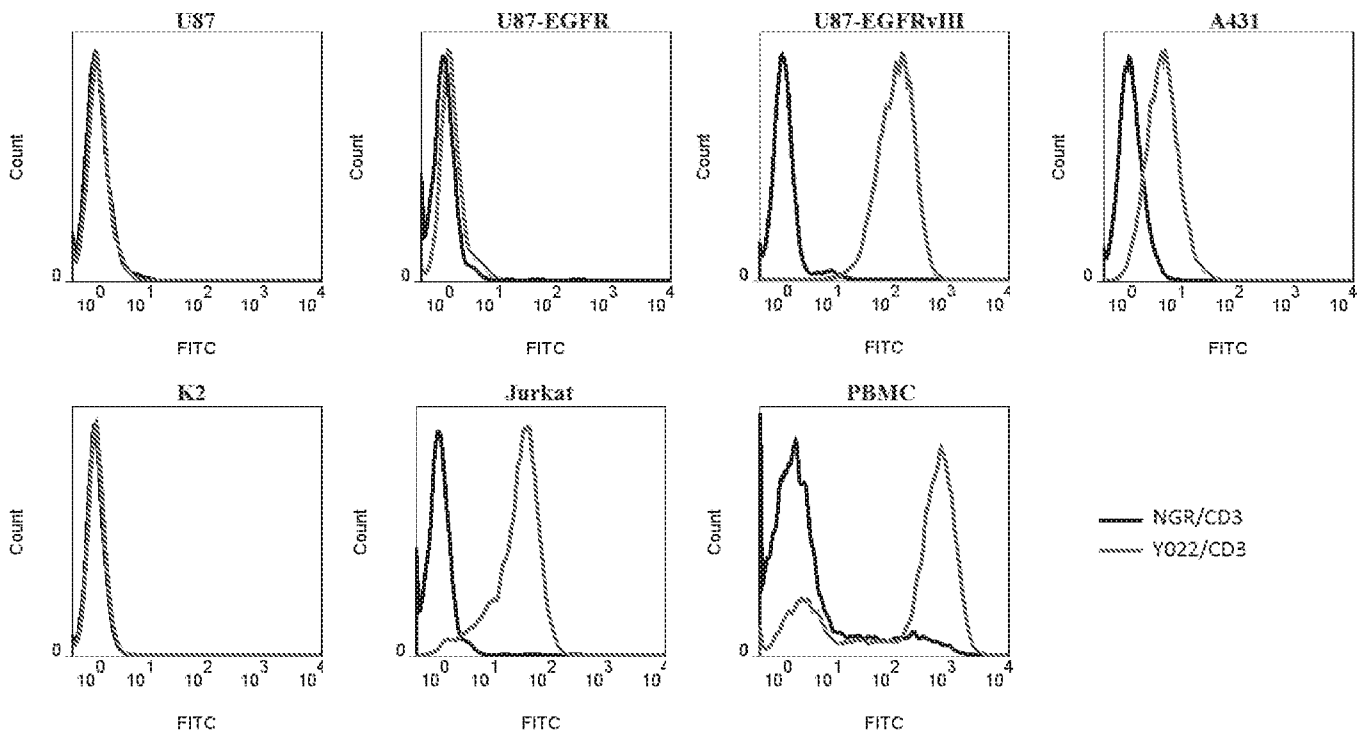
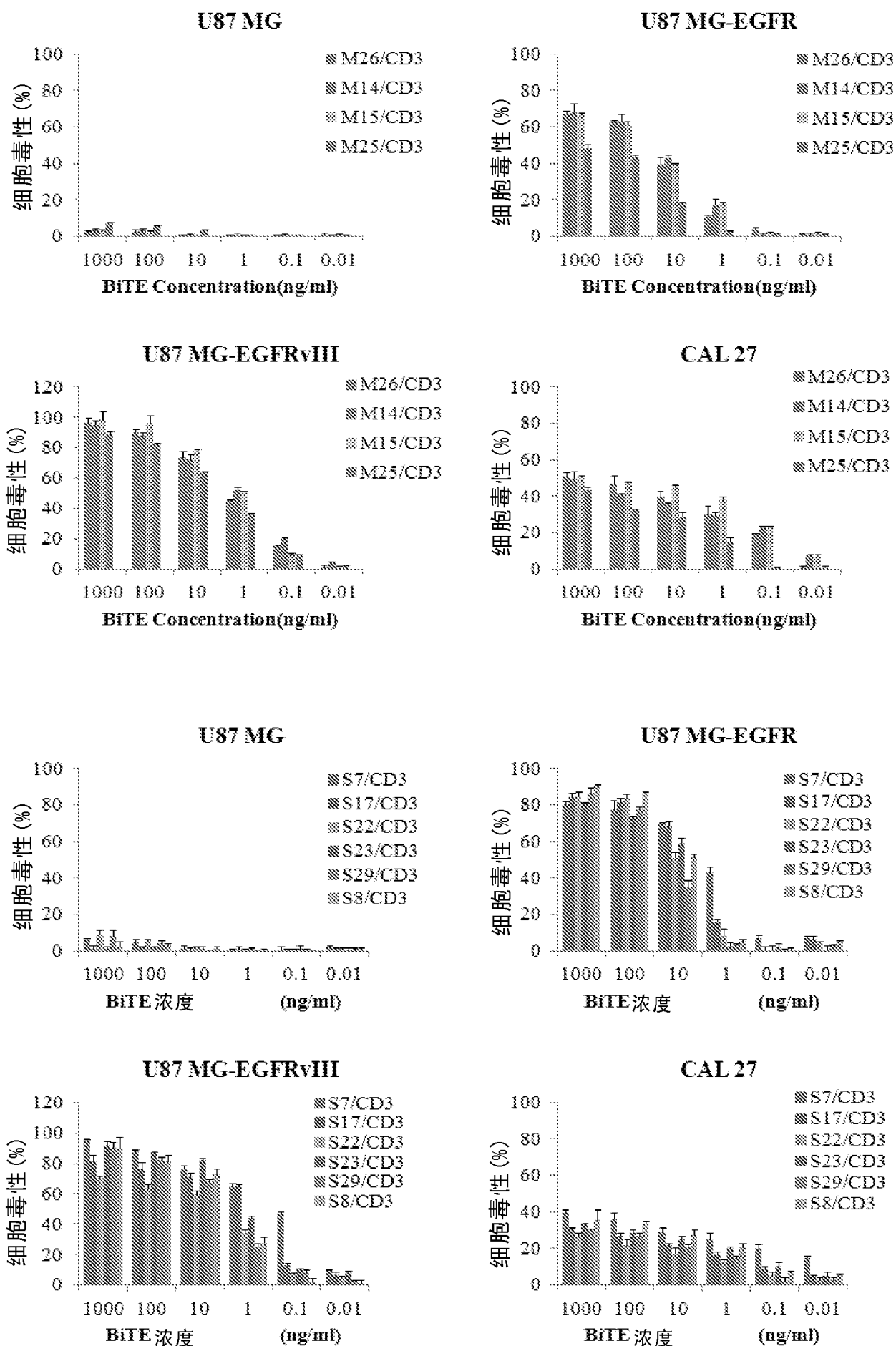


图 8



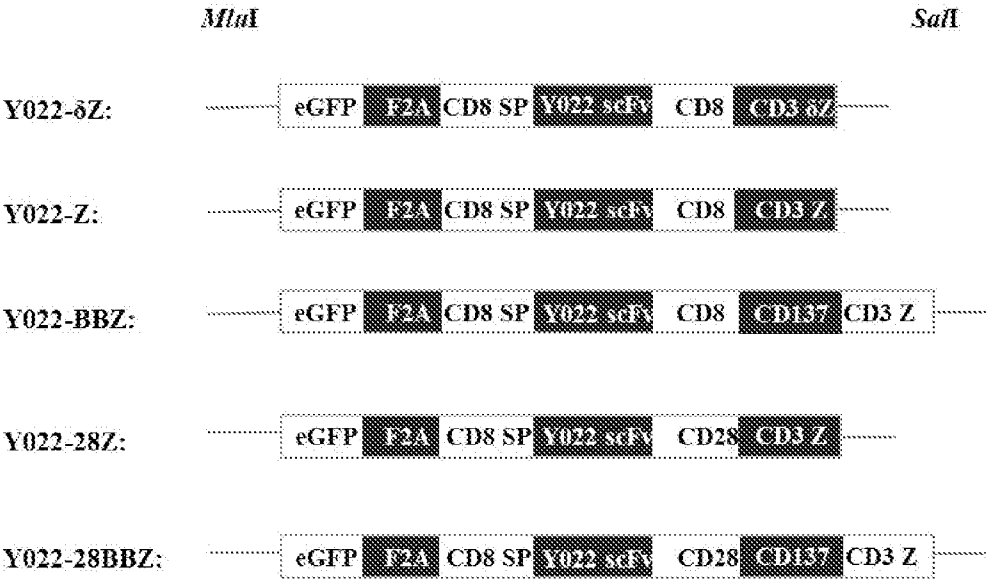


图 10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2016/090892**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/30 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; C07K 16/46 (2006.01) i; C07K 19/00 (2006.01) i; C12N 15/62(2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; C12N 5/10 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61K 48/00 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; G01N 33/574(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P; G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE and Search terms: EGFR, antibody, single-chain antibody, chimeric antigen receptor, CAR etc.;

GENBANK, EMBL, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT and searched sequences: SEQ ID NOs: 13 and 36-46

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                        | Relevant to claim No.                |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| A         | CN 103382223 A (SHANGHAI YIJIE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 06 November 2013 (06.11.2013), the whole document, particularly claims 1-21, and embodiments 1-7 | 1-3, 5-23, 25-36 (partial) and 4, 24 |
| A         | CN 103113470 A (SICHUAN UNIVERSITY), 22 May 2013 (22.05.2013), the whole document, particularly claims 1-13                                               | 1-3, 5-23, 25-36 (partial) and 4, 24 |
| A         | CN 1124501 A (MERCK PATENT GMBH), 12 June 1996 (12.06.1996), the whole document                                                                           | 1-3, 5-23, 25-36 (partial) and 4, 24 |
| A         | CN 104087607 A (SHANGHAI YIJIE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 08 October 2014 (08.10.2014), the whole document                                                 | 1-3, 5-23, 25-36 (partial) and 4, 24 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                                              |
| “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                                                                | “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                                                                     |
| “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date                                                                               | “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | “&” document member of the same patent family                                                                                                                                                                                                    |
| “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                  |
| “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                  |

|                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Date of the actual completion of the international search<br>18 October 2016 (18.10.2016)                                                                                                                          | Date of mailing of the international search report<br><b>26 October 2016 (26.10.2016)</b> |
| Name and mailing address of the ISA/CN:<br>State Intellectual Property Office of the P. R. China<br>No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao<br>Haidian District, Beijing 100088, China<br>Facsimile No.: (86-10) 62019451 | Authorized officer<br><b>LI, Chen</b><br>Telephone No.: (86-10) <b>62411100</b>           |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2016/090892**

### Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☒ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/090892

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] Invention 1: claims 1-3, 5-23, 25-36 (partial) and claims 4 and 24, relates to antibody (a), the variable region of light chain thereof having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 41, 42 and 43, and variable region of the heavy chain having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 44, 45 and 46.
- [2] Invention 2: claims 1-3, 5-23, 25-36 (partial), relates to antibody (b), the variable region of light chain thereof having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 47, 42 and 48, and variable region of the heavy chain having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 44, 49 and 50.
- [3] Invention 3: claims 1-3, 5-23, 25-36 (partial), relates to antibody (c), the variable region of light chain thereof having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 41, 42 and 48, and variable region of the heavy chain having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 44, 51 and 50.
- [4] Invention 4: claims 1-3, 5-23, 25-36 (partial), relates to antibody (d), the variable region of light chain thereof having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 41, 42 and 43, and variable region of the heavy chain having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 44, 52 and 50.
- [5] Invention 5: claims 1-3, 5-23, 25-36 (partial), relates to antibody (e), the variable region of light chain thereof having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 41, 42 and 43, and variable region of the heavy chain having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 44, 45 and 50.
- [6] Invention 6: claims 1-3, 5-23, 25-36 (partial), relates to antibody (f), the variable region of light chain thereof having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 41, 53 and 54, and variable region of the heavy chain having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 44, 51 and 50.
- [7] Invention 7: claims 1-3, 5-23, 25-36 (partial), relates to antibody (g), the variable region of light chain thereof having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 41, 42 and 54, and variable region of the heavy chain having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 44, 51 and 50.
- [8] Invention 8: claims 1-3, 5-23, 25-36 (partial), relates to antibody (h), the variable region of light chain thereof having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 55, 42 and 56, and variable region of the heavy chain having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 44, 45 and 50.
- [9] Invention 9: claims 1-3, 5-23, 25-36 (partial), relates to antibody (i), the variable region of light chain thereof having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 41, 53 and 56, and variable region of the heavy chain having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 44, 52 and 50.
- [10] Invention 10: claims 1-3, 5-23, 25-36 (partial), relates to antibody (j), the variable region of light chain thereof having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 41, 42 and 56, and variable region of the heavy chain having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 44, 52 and 50.
- [11] Invention 11: claims 1-3, 5-23, 25-36 (partial), relates to antibody (k), the variable region of light chain thereof having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 41, 42 and 57, and variable region of the heavy chain having CDR1, CDR2 and CDR3 as shown in SEQ ID NOs: 44, 52 and 50.
- [12] The same or the corresponding technical feature among the above-mentioned 11 inventions is EGFRvIII expressed by specific recognition tumor cells or antibody of over-expressed EGFR. However, the prior art (for example, CN 103382223 A) has disclosed EGFRvIII expressed by specific recognition tumor cells or antibody of over-expressed EGFR, i.e. the above-mentioned same or the corresponding technical feature has been disclosed by the prior art, which is not a special technical feature that makes a contribution over the prior art. Therefore, inventions 1-11 do not fall within a single general inventive concept, lack unity of invention and do not comply with the requirements of PCT Rule 13.1.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-3, 5-23, 25-36 (partial), 4 and 24 (i.e. invention 1)

### Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/CN2016/090892**

| Patent Documents referred<br>in the Report | Publication Date | Patent Family    | Publication Date |
|--------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| CN 103382223 A                             | 06 November 2013 | US 2015093386 A1 | 02 April 2015    |
|                                            |                  | WO 2013149526 A1 | 10 October 2013  |
|                                            |                  | EP 2835379 A1    | 11 February 2015 |
|                                            |                  | EP 2835379 A4    | 28 October 2015  |
|                                            |                  | CN 103382223 B   | 10 June 2015     |
| CN 103113470 A                             | 22 May 2013      | CN 103113470 B   | 22 April 2015    |
| CN 1124501 A                               | 12 June 1996     | ZA 9502174 A     | 27 December 1995 |
|                                            |                  | CN 1073158 C     | 17 October 2001  |
|                                            |                  | ZA 9502174 B     | 27 December 1995 |
| CN 104087607 A                             | 08 October 2014  | None             |                  |



## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/090892

## A. 主题的分类

C07K 16/30(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i;  
C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K  
48/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

## B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; A61K; A61P; G01N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE和检索词:EGFR, 抗体, 单链抗体, 嵌合抗原受体, antibody, single-chain antibody, chimeric antigen receptor, CAR等; GENBANK, EMBL, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NOs: 13和36-46

## C. 相关文件

| 类 型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                                     | 相关的权利要求                   |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| A    | CN 103382223 A (上海益杰生物技术有限公司) 2013年 11月 6日 (2013 - 11 - 06)<br>全文, 特别是权利要求1-21和实施例1-7 | 1-3、5-23、25-36 (部分) 和4、24 |
| A    | CN 103113470 A (四川大学) 2013年 5月 22日 (2013 - 05 - 22)<br>全文, 特别是权利要求1-13                | 1-3、5-23、25-36 (部分) 和4、24 |
| A    | CN 1124501 A (默克专利股份有限公司) 1996年 6月 12日 (1996 - 06 - 12)<br>全文                         | 1-3、5-23、25-36 (部分) 和4、24 |
| A    | CN 104087607 A (上海益杰生物技术有限公司) 2014年 10月 8日 (2014 - 10 - 08)<br>全文                     | 1-3、5-23、25-36 (部分) 和4、24 |

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

\* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&amp;” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2016年 10月 18日

国际检索报告邮寄日期

2016年 10月 26日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)  
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

李晨

电话号码 (86-10)62411100

## 第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：

a. (提交提供)

☐ 纸件形式

☒ 电子形式

b. (提交时间)

☒ 含在申请提交时的国际申请中

☐ 以电子形式与国际申请一起提交

☐ 为检索之用随后提交本单位

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

## 第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

- [1] 发明1：权利要求1-3、5-23、25-36（部分）和权利要求4、24，涉及抗体(a)，其轻链可变区具有SEQ ID NO：41、42、43所示的CDR1、CDR2和CDR3，重链可变区具有SEQ ID NO：44、45、46所示的CDR1、CDR2和CDR3。
- [2] 发明2：权利要求1-3、5-23、25-36（部分），涉及抗体(b)，其轻链可变区具有SEQ ID NO：47、42、48所示的CDR1、CDR2和CDR3，重链可变区具有SEQ ID NO：44、49、50所示的CDR1、CDR2和CDR3。
- [3] 发明3：权利要求1-3、5-23、25-36（部分），涉及抗体(c)，其轻链可变区具有SEQ ID NO：41、42、48所示的CDR1、CDR2和CDR3，重链可变区具有SEQ ID NO：44、51、50所示的CDR1、CDR2和CDR3。
- [4] 发明4：权利要求1-3、5-23、25-36（部分），涉及抗体(d)，其轻链可变区具有SEQ ID NO：41、42、43所示的CDR1、CDR2和CDR3，重链可变区具有SEQ ID NO：44、52、50所示的CDR1、CDR2和CDR3。
- [5] 发明5：权利要求1-3、5-23、25-36（部分），涉及抗体(e)，其轻链可变区具有SEQ ID NO：41、42、43所示的CDR1、CDR2和CDR3，重链可变区具有SEQ ID NO：44、45、50所示的CDR1、CDR2和CDR3。
- [6] 发明6：权利要求1-3、5-23、25-36（部分），涉及抗体(f)，其轻链可变区具有SEQ ID NO：41、53、54所示的CDR1、CDR2和CDR3，重链可变区具有SEQ ID NO：44、51、50所示的CDR1、CDR2和CDR3。
- [7] 发明7：权利要求1-3、5-23、25-36（部分），涉及抗体(g)，其轻链可变区具有SEQ ID NO：41、42、54所示的CDR1、CDR2和CDR3，重链可变区具有SEQ ID NO：44、51、50所示的CDR1、CDR2和CDR3。
- [8] 发明8：权利要求1-3、5-23、25-36（部分），涉及抗体(h)，其轻链可变区具有SEQ ID NO：55、42、56所示的CDR1、CDR2和CDR3，重链可变区具有SEQ ID NO：44、45、50所示的CDR1、CDR2和CDR3。
- [9] 发明9：权利要求1-3、5-23、25-36（部分），涉及抗体(i)，其轻链可变区具有SEQ ID NO：41、53、56所示的CDR1、CDR2和CDR3，重链可变区具有SEQ ID NO：44、52、50所示的CDR1、CDR2和CDR3。
- [10] 发明10：权利要求1-3、5-23、25-36（部分），涉及抗体(j)，其轻链可变区具有SEQ ID NO：41、42、56所示的CDR1、CDR2和CDR3，重链可变区具有SEQ ID NO：44、52、50所示的CDR1、CDR2和CDR3。
- [11] 发明11：权利要求1-3、5-23、25-36（部分），涉及抗体(k)，其轻链可变区具有SEQ ID NO：41、42、57所示的CDR1、CDR2和CDR3，重链可变区具有SEQ ID NO：44、52、50所示的CDR1、CDR2和CDR3。
- [12] 上述11项发明间相同或相应的技术特征为特异性识别肿瘤细胞表达的EGFRvIII或过量表达的EGFR的抗体。然而，现有技术中（例如CN103382223A）已经公开了特异性识别肿瘤细胞表达的EGFRvIII或过量表达的EGFR的抗体，即上述相同或相应的技术特征已经被现有技术公开，不是对现有技术做出贡献的特定技术特征。因此，发明1-11间不属于一个总的发明构思，不具有单一性，不符合PCT细则13.1的规定。

- 1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
- 2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
- 3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
- 4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明：包含该发明的权利要求是：1-3、5-23、25-36（部分）和4、24（即发明1）

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/090892

| 检索报告引用的专利文件 |           |   | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|-----------|---|----------------|------|------------|----|----------------|
| CN          | 103382223 | A | 2013年 11月 6日   | US   | 2015093386 | A1 | 2015年 4月 2日    |
|             |           |   |                | WO   | 2013149526 | A1 | 2013年 10月 10日  |
|             |           |   |                | EP   | 2835379    | A1 | 2015年 2月 11日   |
|             |           |   |                | EP   | 2835379    | A4 | 2015年 10月 28日  |
|             |           |   |                | CN   | 103382223  | B  | 2015年 6月 10日   |
| CN          | 103113470 | A | 2013年 5月 22日   | CN   | 103113470  | B  | 2015年 4月 22日   |
| CN          | 1124501   | A | 1996年 6月 12日   | ZA   | 9502174    | A  | 1995年 12月 27日  |
|             |           |   |                | CN   | 1073158    | C  | 2001年 10月 17日  |
|             |           |   |                | ZA   | 9502174    | B  | 1995年 12月 27日  |
| CN          | 104087607 | A | 2014年 10月 8日   | 无    |            |    |                |

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)