(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103772504 A

(43)申请公布日 2014.05.07

(21)申请号 201210406288.3

(22)申请日 2012.10.17

(71)申请人 上海津曼特生物科技有限公司

地址 201203 上海市张江高科技园区居里路 300 号办公楼 201 室

(72)发明人 刘劼

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 李帆

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C12N 1/15(2006.01)

C12N 1/19(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

权利要求书2页 说明书15页
序列表13页 附图3页

(54) 发明名称

人源化抗表皮生长因子受体抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及人源化抗表皮生长因子受体抗体。本发明还涉及编码所述抗体的核酸分子，含有所述核酸分子的载体、宿主细胞和组合物，以及检测试剂和试剂盒。本发明还涉及所述抗体用于制备预防／治疗表皮生长因子或表皮生长因子受体相关疾病的药物中的用途以及用于制备检测试剂或试剂盒中的用途。本发明的抗体分子具有更低的免疫原性和更高的的靶点结合活性，从而有更强的生物学活性和体内外抗肿瘤活性，可以预期临床应用副作用更低，疗效更好。

CN 103772504 A

1. 抗表皮生长因子受体抗体或其抗原结合部分，其重链 CDR1 的序列选自 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:39 所示序列或其衍生序列，CDR3 的序列选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:40 所示序列或其衍生序列；和／或

其轻链 CDR3 的序列选自 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:41 所示序列或其衍生序列。

2. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分，其重链可变区 CDR 的序列选自以下 (1) ～ (4) 所示序列或其衍生序列：

(1)CDR1 的序列为 SEQ ID NO:1 所示序列，CDR2 的序列为 SEQ ID NO:4 所示序列，CDR3 的序列为 SEQ ID NO:2 所示序列；

(2)CDR1 的序列为 SEQ ID NO:1 所示序列，CDR2 的序列为 SEQ ID NO:4 所示序列，CDR3 的序列为 SEQ ID NO:40 所示序列；

(3)CDR1 的序列为 SEQ ID NO:39 所示序列，CDR2 的序列为 SEQ ID NO:4 所示序列，CDR3 的序列为 SEQ ID NO:3 所示序列；

(4)CDR1 的序列为 SEQ ID NO:39 所示序列，CDR2 的序列为 SEQ ID NO:4 所示序列，CDR3 的序列为 SEQ ID NO:40 所示序列；和／或

其轻链可变区 CDR 的序列选自以下 (5) ～ (8) 所示序列或其衍生序列：

(5)CDR1 的序列为 SEQ ID NO:11 所示序列，CDR2 的序列为 SEQ ID NO:12 所示序列，CDR3 的序列为 SEQ ID NO:9 所示序列；

(6)CDR1 的序列为 SEQ ID NO:11 所示序列，CDR2 的序列为 SEQ ID NO:12 所示序列，CDR3 的序列为 SEQ ID NO:41 所示序列；

(7)CDR1 的序列为 SEQ ID NO:11 所示序列，CDR2 的序列为 SEQ ID NO:12 所示序列，CDR3 的序列为 SEQ ID NO:41 所示序列；

(8)CDR1 的序列为 SEQ ID NO:11 所示序列，CDR2 的序列为 SEQ ID NO:12 所示序列，CDR3 的序列为 SEQ ID NO:10 所示序列。

3. 权利要求 1 或 2 的抗体或其抗原结合部分，其重链 FR1 的序列选自 SEQ ID NO:19 ～ SEQ ID NO:22 所示序列或其衍生序列，FR2 的序列选自 SEQ ID NO:23 ～ SEQ ID NO:25 所示序列或其衍生序列，FR3 的序列选自 SEQ ID NO:26 ～ SEQ ID NO:29 所示序列或其衍生序列，FR4 的序列为 SEQ ID NO:30 所示序列或其衍生序列；和／或

其轻链 FR1 的序列选自 SEQ ID NO:31 ～ SEQ ID NO:32 所示序列或其衍生序列，FR2 的序列选自 SEQ ID NO:33 ～ SEQ ID NO:34 所示序列或其衍生序列，FR3 的序列选自 SEQ ID NO:35 ～ SEQ ID NO:36 所示序列或其衍生序列，FR4 的序列选自 SEQ ID NO:37 ～ SEQ ID NO:38 所示序列或其衍生序列。

4. 权利要求 3 的抗体或其抗原结合部分，其重链可变区 FR 的序列选自以下 (9) ～ (12) 所示序列或其衍生序列：

(9)FR1 的序列为 SEQ ID NO:19 所示序列，FR2 的序列为 SEQ ID NO:23 所示的序列，FR3 的序列为 SEQ ID NO:26 所示的序列，FR4 的序列为 SEQ ID NO:30 所示的序列；

(10)FR1 的序列为 SEQ ID NO:20 所示序列，FR2 的序列为 SEQ ID NO:24 所示的序列，FR3 的序列为 SEQ ID NO:27 所示的序列，FR4 的序列为 SEQ ID NO:30 所示的序列；

(11)FR1 的序列为 SEQ ID NO:21 所示序列，FR2 的序列为 SEQ ID NO:23 所示的序列，

FR3 的序列为 SEQ ID NO :28 所示的序列，FR4 的序列为 SEQ ID NO :30 所示的序列 ；

(12)FR1 的序列为 SEQ ID NO :22 所示序列，FR2 的序列为 SEQ ID NO :25 所示的序列，FR3 的序列为 SEQ ID NO :29 所示的序列，FR4 的序列为 SEQ ID NO :30 所示的序列 ；和 / 或

其轻链可变区 FR 的序列选自以下 (13) ～ (16) 所示序列或其衍生序列 ：

(13)FR1 的序列为 SEQ ID NO :31 所示序列，FR2 的序列为 SEQ ID NO :33 所示的序列，FR3 的序列为 SEQ ID NO :35 所示的序列，FR4 的序列为 SEQ ID NO :37 所示的序列 ；

(14)FR1 的序列为 SEQ ID NO :31 所示序列，FR2 的序列为 SEQ ID NO :33 所示的序列，FR3 的序列为 SEQ ID NO :35 所示的序列，FR4 的序列为 SEQ ID NO :38 所示的序列 ；

(15)FR1 的序列为 SEQ ID NO :32 所示序列，FR2 的序列为 SEQ ID NO :34 所示的序列，FR3 的序列为 SEQ ID NO :36 所示的序列，FR4 的序列为 SEQ ID NO :38 所示的序列 ；

(16)FR1 的序列为 SEQ ID NO :31 所示序列，FR2 的序列为 SEQ ID NO :33 所示的序列，FR3 的序列为 SEQ ID NO :35 所示的序列，FR4 的序列为 SEQ ID NO :37 所示的序列。

5. 权利要求 1-4 任一项的抗体或其抗原结合部分，其还包含人 IgG1 重链恒定区和人 κ 轻链恒定区。

6. 权利要求 1-4 任一项的抗体或其抗原结合部分，其中所述抗原结合部分为单链抗体 (scFv)、嵌合抗体、双抗体、scFv-Fc 二价分子、dAb 和互补决定区 (CDR) 片段、Fab 片段、Fab′ 片段、Fv 或 $F(ab')_2$ 片段。

7. 分离的核酸分子，其编码权利要求 1-6 任一项所述的抗体或其抗原结合部分。

8. 载体，其含有权利要求 7 的核酸分子。

9. 宿主细胞，其含有权利要求 7 的核酸分子或权利要求 8 的载体。

10. 组合物，其含有权利要求 1-6 任一项的抗体或其抗原结合部分，以及任选的一种或多种药学可接受的辅料 ；优选地，所述辅料选自蛋白水解酶抑制剂、药用载体、稀释剂和佐剂。

11. 权利要求 1-6 任一项的抗体或其抗原结合部分、或权利要求 7 的核酸分子、或权利要求 8 的载体、或权利要求 9 的宿主细胞在制备预防 / 治疗表皮生长因子或表皮生长因子受体相关疾病的药物中的用途 ；优选地，所述表皮生长因子或表皮生长因子受体相关疾病是指由于表皮生长因子高表达或表皮生长因子受体高表达而引起的疾病 ；更优选地，所述由于表皮生长因子高表达或表皮生长因子受体高表达而引起的疾病是指恶性肿瘤。

12. 检测试剂或试剂盒，其含有权利要求 1-6 任一项的抗体或其抗原结合部分 ；

优选地，所述抗体或其抗原结合部分还可包含可检测的标记 ；或者

优选地，所述检测试剂或试剂盒还可包含第二抗体，其特异性识别所述抗体或其抗原结合部分 ；或者

优选地，所述第二抗体还可包含可检测的标记。

13. 权利要求 1-6 任一项的抗体或其抗原结合部分在制备检测试剂或试剂盒中的用途，其中所述检测试剂或试剂盒用于检测表皮生长因子或表皮生长因子受体，或者用于诊断表皮生长因子或表皮生长因子受体相关疾病。

人源化抗表皮生长因子受体抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及人源化抗体，具体涉及人源化抗表皮生长因子受体抗体，本发明还涉及所述抗体在制备预防或治疗与表皮生长因子高活性或高表达相关疾病的药物中的用途。与人鼠嵌合抗体相比，本发明所涉及的人源化抗表皮生长因子抗体进一步降低了抗体的免疫原性，同时增强了其抗原识别活性和体内体外抗瘤功能，有更好的临床应用前景。

背景技术

[0002] 表皮生长因子受体(Epidermal Growth Factor Receptor，EGFR，也称为HER1，c-ErbB1)是表皮生长因子家族的细胞表面受体，是由1186个氨基酸残基构成，分子量为170kD的一种跨膜糖蛋白(Jorissen RN，Walker F，Pouliot N，et al.Epidermal growth factor receptor：mechanisms of activation and signaling.Exp Cell Res，2003；284：31-53)。EGFR属于I型酪氨酸激酶受体ErbB亚族(ErbB 1-4)，具有酪氨酸激酶的活性。EGFR稳定的表达于许多上皮组织，包括皮肤和毛囊。表皮生长因子受体异常表达或因受体突变而活化会导致癌变。有很多实体瘤发现高表达表皮生长因子受体，如直结肠癌、头颈部癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌和食管癌等(Olayioye MA，Neve RM，Lane HA，et al.The EerbB Signaling network：receptor heterodimerzation in development and cancer.The EMBO J，2000；19：3159-3167)。转化生长因子α和表皮生长因子等生长因子是表皮生长因子受体的内源性配体。这些配体与表皮生长因子受体结合，激活受体胞内酪氨酸蛋白激酶的活性，启动下游多条信号转导途径，从而调节正常细胞的生长和分化，增加肿瘤细胞的侵袭力、促进血管生成、抑制肿瘤细胞的凋亡(Ciardiello F，Tortora G.A novel approach in the treatment of cancer：targeting the epidermal growth factor receptor.Clin Cancer Res，2001；7：2958-2970)。表皮生长因子受体在肿瘤中的高度表达及其在肿瘤细胞生长、分化中起重要作用的这些特点，使表皮生长因子受体成为具有良好前景的肿瘤治疗靶点。

[0003] 抗表皮生长因子受体的治疗性抗体，最早来自由表皮生长因子受体高表达表皮癌A431免疫小鼠而得到的鼠源抗体M225。M225与表皮生长因子受体特异结合，阻断其与配体结合，从而抑制表皮生长因子受体酪氨酸蛋白激酶的活性(Goldstein et al，1995，Clin.Cancer.Res.1：1311-1318)。鼠源抗体作为外源蛋白，反复刺激人体，可引起超敏反应，被称为人抗鼠抗体反应。鼠源抗体在体内可能被抗抗体中和，进而被快速清除，甚至导致严重的过敏反应而致死。另外，鼠源单克隆抗体缺乏人抗体具有的免疫效应功能，如抗体依赖细胞介导的细胞毒(ADCC)和补体依赖的细胞毒(CDC)作用，因而疗效不佳。因此人鼠嵌合抗体C225抗体(爱必妥，Erbitux或Cetuximab，ImClone(现在Eli Lilly)公司)采用人IgG1κ和鼠抗M225的可变区，降低了鼠源单抗的免疫原性，保留了与表皮生长因子受体的特异亲和性，可阻断EGF和TGFa等配体与表皮生长因子受体的结合，抑制其磷酸化和下游信号传导，从而抑制肿瘤细胞的生长，诱导凋亡，减少基质金属蛋白酶和血管上皮生长因子的产生。2004年美国FDA批准爱必妥治疗结直肠癌，2006批准治疗头颈部癌，目前有更多临

床试验用于其它肿瘤适应症。与其他化疗药相比，抗体药物特异性强，副作用小，在临床上取得了较好的疗效。然而，人鼠嵌合爱必妥单抗仍有免疫原性，临床报道其免疫原性为5%，容易产生人抗抗体反应而导致免疫复合物介导的抗体清除，和皮肤及粘膜的副作用（An Z, et al.,2009,Therapeutic Monoclonal Antibody,p313）。

[0004] 帕尼单抗（panitumumab，Amgen 公司）是采用转基因小鼠技术制备的全人化单克隆抗体，无鼠源蛋白序列，靶向作用于表皮生长因子受体（EGFR），2006 年 9 月被 FDA 批准上市，与氟嘧啶、奥沙利铂和伊立替康合用或在化疗后用于治疗 EGFR 阳性的转移性直结肠癌。2006 年 FDA 批准其单药治疗化疗耐受的转移性结直肠癌（mCRC）。然而帕尼单抗是 IgG2 亚型抗体，与 IgG1 相比，IgG2 的 CDC 活性及 ADCC 等生物学活性明显减低；另外，IgG2 亚型抗体稳定性较差，这可能是临床效果上全人抗体帕尼单抗与嵌合抗体爱必妥相比没有明显优势的主要原因。

[0005] 因此，本领域亟需具有更低免疫原性和更高生物学活性的人源化抗表皮生长因子受体抗体，以进一步提高疗效，降低副作用。

发明内容

[0006] 本发明人在鼠源抗体的基础上，利用抗体人源化技术，令人惊奇地获得了一种具有更低免疫原性和更高生物学活性的人源化抗表皮生长因子受体抗体，本发明基于以上发现而完成。具体包括以下几个方面：

[0007] 本发明第一方面涉及抗表皮生长因子受体抗体或其抗原结合部分，其重链 CDR1 的序列选自 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:39 所示序列或其衍生序列，CDR3 的序列选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:40 所示序列或其衍生序列；和 / 或

[0008] 其轻链 CDR3 的序列选自 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:41 所示序列或其衍生序列。

[0009] 根据本发明第一方面的抗体或其抗原结合部分，其重链 CDR2 和轻链 CDR1、CDR2 的序列可以为鼠源或人源或人鼠嵌合的抗表皮生长因子受体抗体的相应部分。

[0010] 根据本发明第一方面任一项的抗体或其抗原结合部分，其重链和轻链 FR 的序列可以为鼠源或人源或人鼠嵌合的抗表皮生长因子受体抗体的相应部分。

[0011] 在本发明的实施方案中，所述抗体或其抗原结合部分的重链可变区 CDR 的序列选自以下（1）～（4）所示序列或其衍生序列：

[0012] （1）CDR1 的序列为 SEQ ID NO:1 所示序列，CDR2 的序列为 SEQ ID NO:4 所示序列，CDR3 的序列为 SEQ ID NO:2 所示序列；

[0013] （2）CDR1 的序列为 SEQ ID NO:1 所示序列，CDR2 的序列为 SEQ ID NO:4 所示序列，CDR3 的序列为 SEQ ID NO:40 所示序列；

[0014] （3）CDR1 的序列为 SEQ ID NO:39 所示序列，CDR2 的序列为 SEQ ID NO:4 所示序列，CDR3 的序列为 SEQ ID NO:3 所示序列；

[0015] （4）CDR1 的序列为 SEQ ID NO:39 所示序列，CDR2 的序列为 SEQ ID NO:4 所示序列，CDR3 的序列为 SEQ ID NO:40 所示序列；和 / 或

[0016] 其轻链可变区 CDR 的序列选自以下（5）～（8）所示序列或其衍生序列：

[0017] （5）CDR1 的序列为 SEQ ID NO:11 所示序列，CDR2 的序列为 SEQ ID NO:12 所示序

列，CDR3 的序列为 SEQ ID NO:9 所示序列；

[0018] (6)CDR1 的序列为 SEQ ID NO:11 所示序列，CDR2 的序列为 SEQ ID NO:12 所示序列，CDR3 的序列为 SEQ ID NO:41 所示序列；

[0019] (7)CDR1 的序列为 SEQ ID NO:11 所示序列，CDR2 的序列为 SEQ ID NO:12 所示序列，CDR3 的序列为 SEQ ID NO:41 所示序列；

[0020] (8)CDR1 的序列为 SEQ ID NO:11 所示序列，CDR2 的序列为 SEQ ID NO:12 所示序列，CDR3 的序列为 SEQ ID NO:10 所示序列。

[0021] 根据本发明第一方面任一项的抗体或其抗原结合部分，其重链 FR1 的序列选自 SEQ ID NO:19 ～ SEQ ID NO:22 所示序列或其衍生序列，FR2 的序列选自 SEQ ID NO:23 ～ SEQ ID NO:25 所示序列或其衍生序列，FR3 的序列选自 SEQ ID NO:26 ～ SEQ ID NO:29 所示序列或其衍生序列，FR4 的序列为 SEQ ID NO:30 所示序列或其衍生序列；和 / 或

[0022] 其轻链 FR1 的序列选自 SEQ ID NO:31 ～ SEQ ID NO:32 所示序列或其衍生序列，FR2 的序列选自 SEQ ID NO:33 ～ SEQ ID NO:34 所示序列或其衍生序列，FR3 的序列选自 SEQ ID NO:35 ～ SEQ ID NO:36 所示序列或其衍生序列，FR4 的序列选自 SEQ ID NO:37 ～ SEQ ID NO:38 所示序列或其衍生序列。

[0023] 在本发明的实施方案中，所述抗体或其抗原结合部分的重链可变区 FR 的序列选自以下 (9) ～ (12) 所示序列或其衍生序列：

[0024] (9)FR1 的序列为 SEQ ID NO:19 所示序列，FR2 的序列为 SEQ ID NO:23 所示的序列，FR3 的序列为 SEQ ID NO:26 所示的序列，FR4 的序列为 SEQ ID NO:30 所示的序列；

[0025] (10)FR1 的序列为 SEQ ID NO:20 所示序列，FR2 的序列为 SEQ ID NO:24 所示的序列，FR3 的序列为 SEQ ID NO:27 所示的序列，FR4 的序列为 SEQ ID NO:30 所示的序列；

[0026] (11)FR1 的序列为 SEQ ID NO:21 所示序列，FR2 的序列为 SEQ ID NO:23 所示的序列，FR3 的序列为 SEQ ID NO:28 所示的序列，FR4 的序列为 SEQ ID NO:30 所示的序列；

[0027] (12)FR1 的序列为 SEQ ID NO:22 所示序列，FR2 的序列为 SEQ ID NO:25 所示的序列，FR3 的序列为 SEQ ID NO:29 所示的序列，FR4 的序列为 SEQ ID NO:30 所示的序列；和 / 或

[0028] 其轻链可变区 FR 的序列选自以下 (13) ～ (16) 所示序列或其衍生序列：

[0029] (13)FR1 的序列为 SEQ ID NO:31 所示序列，FR2 的序列为 SEQ ID NO:33 所示的序列，FR3 的序列为 SEQ ID NO:35 所示的序列，FR4 的序列为 SEQ ID NO:37 所示的序列；

[0030] (14)FR1 的序列为 SEQ ID NO:31 所示序列，FR2 的序列为 SEQ ID NO:33 所示的序列，FR3 的序列为 SEQ ID NO:35 所示的序列，FR4 的序列为 SEQ ID NO:38 所示的序列；

[0031] (15)FR1 的序列为 SEQ ID NO:32 所示序列，FR2 的序列为 SEQ ID NO:34 所示的序列，FR3 的序列为 SEQ ID NO:36 所示的序列，FR4 的序列为 SEQ ID NO:38 所示的序列；

[0032] (16)FR1 的序列为 SEQ ID NO:31 所示序列，FR2 的序列为 SEQ ID NO:33 所示的序列，FR3 的序列为 SEQ ID NO:35 所示的序列，FR4 的序列为 SEQ ID NO:37 所示的序列。

[0033] 在本发明的具体实施方案中，所述抗体或其抗原结合部分的重链可变区序列为 SEQ ID NO:5 所示的序列，轻链可变区序列为 SEQ ID NO:13 所示的序列。

[0034] 在本发明的另一个具体实施方案中，所述抗体或其抗原结合部分的重链可变区序列为 SEQ ID NO:6 所示的序列，轻链可变区序列为 SEQ ID NO:14 所示的序列。

[0035] 在本发明的另一个具体实施方案中，所述抗体或其抗原结合部分的重链可变区序列为 SEQ ID NO：7 所示的序列，轻链可变区序列为 SEQ ID NO：15 所示的序列。

[0036] 在本发明的另一个具体实施方案中，所述抗体或其抗原结合部分的重链可变区序列为 SEQ ID NO：8 所示的序列，轻链可变区序列为 SEQ ID NO：16 所示的序列。

[0037] 根据本发明第一方面任一项的抗体或其抗原结合部分，其还包含人 IgG1 重链恒定区和人 κ 轻链恒定区。

[0038] 在本发明中，所述 IgG1 重链恒定区包括各种同种异型，如 G1m(f)、G1m(z)、G1m(z，a) 或 G1m(z，a，x)。在本发明的实施方案中，所述 IgG1 重链恒定区为 G1m(z) 型。

[0039] 在本发明中，所述 κ 轻链恒定区包括各种同种异型，如 Km1、Km1，2 或 Km3，在本发明的的实施方案中，所述 κ 轻链恒定区为 Km3 型。

[0040] 根据本发明第一方面任一项的抗体或其抗原结合部分，其中所述抗原结合部分包括单链抗体 (scFv)、嵌合抗体、双抗体、scFv-Fc 二价分子、dAb 和互补决定区 (CDR) 片段、Fab 片段、Fd 片段、Fab′片段、Fv 和 $F(ab')_2$ 片段。

[0041] 本发明第二方面涉及分离的核酸分子，其编码本发明第一方面任一项所述的抗体或其抗原结合部分。

[0042] 本发明第三方面涉及载体，其含有本发明第二方面任一项的核酸分子。

[0043] 在本发明中，所述载体可以为克隆载体或表达载体。所述表达载体例如为原核表达载体，真核表达载体，噬菌体载体或病毒载体，均为本领域常用的载体。其中所述原核表达载体例如为 PET28a、pGEM Ex1、pGEM7ZF(+) 或 pBAD24 等，所述真核表达载体例如为 pBudCE4.1、pcDNA3.1、pCMV-Tag2B 或 pGL3 basic 等，在本发明的实施方案中，所述真核表达载体为 pcDNA3.1，所述病毒载体例如为逆转录病毒、慢病毒、腺病毒和腺相关病毒。在本发明的实施方案中，所述病毒载体为腺病毒载体。

[0044] 本发明第四方面涉及宿主细胞，其含有本发明第二方面的核酸分子或第三方面的载体。

[0045] 在本发明中，所述宿主细胞可以为原核细胞或真核细胞。所述真核细胞例如为哺乳动物细胞。所述宿主细胞可以通过向原核细胞或真核细胞中引入/转染上述的核酸分子或载体而得到。

[0046] 在本发明中，所述原核细胞例如可以为大肠杆菌，所述真核细胞例如可以为酵母细胞、昆虫细胞（如 Sf21)、哺乳动物细胞，所述哺乳动物例如可以为 NSO 细胞、CHO 细胞。在本发明的一个实施方案中，所述宿主细胞为真核细胞。在本发明的一个实施方案中，所述真核细胞为 CHO-S 细胞。

[0047] 在本发明中，可以利用本领域所知的任何种类的转染方法获得转染有特定核酸或载体的宿主细胞。例如，可通过电穿孔或显微注射将核酸引入细胞中。或者，可使用脂转染试剂如 FuGENE6、X-tremeGENE 和 LipofectAmine。或者，可通过基于逆转录病毒、慢病毒、腺病毒和腺相关病毒的适当病毒载体将核酸引入细胞中。

[0048] 本发明第五方面涉及组合物，其含有本发明第一方面任一项的抗体或其抗原结合部分，以及任选的一种或多种药学可接受的辅料；优选地，所述辅料选自蛋白水解酶抑制剂、药用载体、稀释剂和佐剂。

[0049] 本发明第六方面涉及本发明第一方面任一项的抗体或其抗原结合部分、或第二方

面的核酸分子、或第三方面的载体、或第四方面的宿主细胞在制备预防 / 治疗表皮生长因子或表皮生长因子受体相关疾病的药物中的用途。

[0050] 在本发明中,所述表皮生长因子或表皮生长因子受体相关疾病是指由于表皮生长因子高表达或表皮生长因子受体高表达而引起的疾病。在本发明的实施方案中,所述表皮生长因子或表皮生长因子受体相关疾病是指恶性肿瘤,其主要是指发生于上皮组织的恶性肿瘤,其包括但不限于直结肠癌、肝癌、头颈部癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、阴道癌、膀胱癌、食管癌、口腔癌、皮肤癌、乳腺癌、前列腺癌和胰腺癌等。

[0051] 本发明第七方面涉及检测试剂或试剂盒,其含有本发明第一方面任一项的抗体或其抗原结合部分 ;

[0052] 优选地,所述抗体或其抗原结合部分还可包含可检测的标记 ;或者

[0053] 优选地,所述检测试剂或试剂盒还可包含第二抗体,其特异性识别所述抗体或其抗原结合部分 ;或者

[0054] 优选地,所述第二抗体还可包含可检测的标记。

[0055] 本发明第八方面涉及本发明第一方面任一项的抗体或其抗原结合部分在制备检测试剂或试剂盒中的用途,其中所述检测试剂或试剂盒用于检测表皮生长因子或表皮生长因子受体,或者用于诊断表皮生长因子或表皮生长因子受体相关疾病。

[0056] 以下对本发明做进一步描述。

[0057] 本发明的目的是针对已有的抗表皮生长因子受体抗体,利用去免疫原性的抗体人源化技术改变抗体的 CDR 区和 / 或框架区,以获得具有更低免疫原性和更高生物学活性的抗表皮生长因子受体抗体。

[0058] 在本发明的一个实施方案中,首先分析鼠抗 M225 的重链可变区的序列,根据其重链可变区 FR1,FR2,FR3 和 FR4 序列对人抗体基因序列库进行比较,找出与鼠抗 M225 重链可变区 FR1,FR2,FR3 和 FR4 序列相似的人胚系 (germline) 抗体 (比成熟抗体免疫原性更低) 可变区相对应序列。然后经过 insilicon 方法,分析相似序列与 HLA-DR 分子结合的亲和性,选出亲和性最低的框架序列,从而最终确立重链可变区的 FR1,FR2,FR3 和 FR4 的人源化序列。在此框架结构的基础上,应用计算机分子模型分析鼠 M225 抗体的可变区立体空间结构,分析出支持 CDR 构型所需保留的鼠 M225 抗体对应框架氨基酸残基。对 HLA-DR 分子结合的亲和性较高的 CDR1 和 CDR3 的去免疫原化,则应用分子对接,分析表皮生长因子受体抗原鼠 M225 抗体靶位及其周边氨基酸残基与人源化重链可变区的立体空间结合方式,通过计算静电力,溶液媒合 (salvation),范德华引力和熵值,选择 CDR1 和 CDR3 序列中可以优化的氨基酸,以降低于 HLA-DR 分子结合的亲和性,并改善抗体 CDR3 区域与表皮生长因子受体抗原表位的结合。

[0059] 在本发明的另一个实施方案中,分析鼠抗 M225 抗体的轻链可变区的序列,根据其轻链可变区 FR1,FR2,FR3 和 FR4 序列对人抗体基因序列库 (NCBI Ig BLAST) 进行比较,找出与鼠抗 M225 轻链可变区 FR1,FR2,FR3 和 FR4 序列相似的人胚系 (germline) 抗体可变区相对应序列,然后经过 in silicon 分析相似序列与 HLA-DR 分子结合的亲和性,选出亲和性最低的框架序列,从而最终确立轻链可变区的 FR1,FR2,FR3 和 FR4 的人源化序列。在此框架结构的基础上,应用计算机分子模型分析鼠 225 抗体的可变区立体空间结构,分析出支持 CDR 构型所需保留的鼠 M225 抗体对应框架氨基酸残基。对 HLA-DR 分子结合的亲和性较

高的 CDR1 和 CDR3 的去免疫原化，则应用分子对接，分析表皮生长因子受体抗原鼠 M225 抗体靶位及其周边氨基酸残基与人源化重链可变区的立体空间结合方式，通过计算静电力，溶液媒合(salvation)，范德华引力和熵值，选择 CDR1 和 CDR3 序列中可以优化的氨基酸，以降低于 HLA-DR 分子结合的亲和性，并改善抗体 CDR3 区域与表皮生长因子受体抗原表位的结合。

[0060] 在本发明的实施方案中，从正常人 B 细胞中分别获得人 IgG1 重链恒定区 Fc 片段和轻链恒定区 κ 片段，并分别和上述重链可变区和轻链可变区连接，构建抗体重链和轻链表达载体。将所述表达载体共转染哺乳动物细胞进行表达、纯化，得到人源化抗表皮生长因子受体抗体 BA03、BB03、BC03 和 BD03。

[0061] 在本发明的实施方案中，所述抗体在与细胞表面表皮生长因子受体的亲和性、阻断 EGF 配体与细胞表面表皮生长因子受体结合的活性、抑制细胞表面表皮生长因子受体磷酸化的活性和 ADCC 作用方面，与爱必妥相比均具有更高的活性，同时具有更低的免疫原性。

[0062] 在本发明的实施方案中，所述抗体对多种肿瘤细胞的生长都具有抑制作用，例如表皮癌、肺癌、结肠癌、胰腺癌和乳腺癌，并且在动物水平具有明显的抑制肿瘤生长的作用。

[0063] 在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

[0064] 在本发明中，术语“抗体”是指通常由两对相同的多肽链(每对具有一条“轻”(L)链和一条“重”(H)链)组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链可分类为 μ、δ、γ、α 或 ε，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。重链恒定区由 3 个结构域(C_H1、C_H2 和 C_H3)组成。各轻链由轻链可变区(V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。V_H 和 V_L 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 V_H 和 V_L 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(V_H 和 V_L)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health，Bethesda，Md.(1987 and 1991))，或 Chothia& Lesk(1987)J.Mol.Biol.196：901-917；Chothia 等人(1989)Nature342：878-883 的定义。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如，其包括，特别地，重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG(例如，IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4 亚型)，IgA1，IgA2，IgD，IgE 或 IgM 抗体。

[0065] 在本发明中，术语抗体的“抗原结合部分”是指全长抗体的一个或多个部分，所述部分保持结合抗体所结合的相同抗原(例如，ERCC1)的能力，与完整抗体竞争对抗原的特异性结合。通常参见，Fundamental Immunology，Ch.7(Paul，W.，ed.，第 2 版，Raven Press， N.Y.(1989),其以其全文通过引用合并入本文,用于所有目的。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗原结合部分。在一些情况下,抗原结合部分包括 Fab、Fab′、$F(ab')_2$、Fd、Fv、dAb 和互补决定区 (CDR) 片段、单链抗体 (例如,scFv)、嵌合抗体、双抗体 (diabody) 和这样的多肽,其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。

[0066] 在本发明中,术语"Fd 片段"意指由 V_H 和 C_H1 结构域组成的抗体片段 ;术语"Fv 片段"意指由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的抗体片段 ;术语"dAb 片段"意指由 V_H 结构域组成的抗体片段 (Ward 等人,Nature341 :544-546(1989)) ;术语"Fab 片段"意指由 V_L、V_H、C_L 和 C_H1 结构域组成的抗体片段 ;术语"$F(ab')_2$ 片段"意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的抗体片段。

[0067] 在一些情况下,抗体的抗原结合部分是单链抗体 (例如,scFv),其中 V_L 和 V_H 结构域通过使其能够产生为单个多肽链的连接体配对形成单价分子 (参见,例如,Bird 等人,Science 242 :423-426(1988) 和 Huston 等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85 :5879-5883(1988))。此类 scFv 分子可具有一般结构 :NH_2-V_L- 接头 -V_H-COOH 或 NH_2-V_H- 接头 -V_L-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成。例如,可使用具有氨基酸序列 $(GGGGS)_4$ 的接头,但也可使用其变体 (Holliger 等人 (1993),Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90 :6444-6448)。可用于本发明的其他接头由 Alfthan 等人 (1995),Protein Eng.8 :725-731,Choi 等人 (2001),Eur.J.Immunol.31 :94-106,Hu 等人 (1996),Cancer Res.56 :3055-3061,Kipriyanov 等人 (1999),J.Mol.Biol.293 :41-56 和 Roovers 等人 (2001),Cancer Immunol. 描述。

[0068] 在一些情况下,抗体是双抗体,即,双价抗体,其中 V_H 和 V_L 结构域在单个多肽链上表达,但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对,从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位 (参见,例如,Holliger P. 等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA90 :6444-6448(1993),和 Poljak R.J. 等人,Structure 2 :1121-1123(1994))。

[0069] 在本发明中,术语"衍生序列"是指与本发明的抗体或抗原结合部分相应片段的序列高度同源且仍保留与本发明的抗体或抗原结合部分相应片段具有相似的 EGFR 结合活性和免疫原性的序列。

[0070] 可使用本领域技术人员已知的常规技术 (例如,重组 DNA 技术或酶促或化学断裂法) 从给定的抗体 (例如单克隆抗体 2E12) 获得抗体的抗原结合部分 (例如,上述抗体片段),并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合部分。

[0071] 在本发明中,20 种常规氨基酸和其缩写遵从常规用法。参见 Immunology-A Synthesis(第2版,E.S.Golub和D.R.Gren,Eds.,Sinauer Associates,Sunderland,Mass.(1991)),其通过引用合并入本文。

[0072] 在本发明中,所述核酸包括 DNA 和 RNA。

[0073] 发明的有益效果

[0074] 本发明针对已经上市的人鼠嵌合爱必妥单抗,利用去免疫原性的抗体人源化技术改变抗体的框架区和部分引起免疫原性的 CDR 区,形成全新序列的人源化抗表皮生长因子受体 IgG1 亚型抗体分子,所得抗体具有比爱必妥单抗更低的免疫原性和更高的的靶点结

合活性，从而有更强的生物学活性和体内外抗肿瘤活性，可以预期临床应用副作用更低，疗效更好。

附图说明

[0075] 图 1 所示为抗体与细胞表面表皮生长因子受体亲和力的比较。

[0076] 图 2 所示为抗体阻断 EGF 配体与细胞表面表皮生长因子受体结合的比较，其中纵坐标为 OD450 值。

[0077] 图 3 所示为抗体抑制 A431 细胞表面表皮生长因子受体磷酸化的比较。

[0078] 图 4 所示为抗体依赖性细胞介导的细胞毒 (ADCC) 活性测定。

[0079] 图 5 所示为树突状细胞 -T 细胞激活实验测定抗体体外免疫原性。

[0080] 图 6 所示为抗体对人表皮癌 A431 小鼠肿瘤模型的生长抑制作用。

具体实施方式

[0081] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

[0082] 实施例 1、抗表面表皮生长因子受体人源化单克隆抗体重链可变区序列的设计

[0083] 以下为鼠抗 M225 的重链可变区的序列，下划线部分为 FR1，FR2，FR3 和 FR4 框架序列 :<u>QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLT</u>NYGVH<u>WVRQSPGKGLEWLG</u>VIWSGGNTDYNTPFTS<u>RLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCAR</u>ALTYYDYEFAY<u>WGQGTLVTVSA</u>(SEQ ID NO :17)。

[0084] 根据其重链可变区 FR1，FR2，FR3 和 FR4 序列对人抗体基因序列库进行比较，找出与鼠抗 M225 重链可变区 FR1，FR2，FR3 和 FR4 序列相似的人胚系 (germline) 抗体可变区相对应序列。然后用 NetMHCIIpan 软件或自编软件，经过 in silicon 方法，分析相似序列与 HLA-DR 分子结合的亲和性，选出亲和性最低的框架序列，从而最终确立人源化重链可变区的 FR1，FR2，FR3 和 FR4 的序列。在此框架结构的基础上，应用计算机分子模型分析鼠 225 抗体的可变区立体空间结构，分析出支持 CDR 构型所需保留的鼠 225 抗体对应框架氨基酸残基 L29，L48 和 L67。对 HLA-DR 分子结合的亲和性较高的 CDR1 和 CDR3 的去免疫原化，则应用分子对接，分析表皮生长因子受体鼠源 M225 抗体靶位及其周边氨基酸残基与人源化重链可变区的立体空间结合方式，通过计算静电力，溶液媒合 (salvation)，范德华引力和熵值 (Sircar et al，SnugDock :paratope structural optimization during antibody-antigen docking compensates for errors in antibody homology models，PLoS Comput Biol.2010 Jan 22 ;6)，选择 CDR1 和 CDR3 序列中可以优化的氨基酸，将 CDR1 中的 33 位点 GLy 优化为氨基酸 Asp，将 CDR3 中的 100 位点 Thr 优化为氨基酸 Asp，以降低与 HLA-DR 分子结合的亲和性，并改善抗体 CDR3 区域与表皮生长因子受体抗原表位的结合。新设计的重链 CDR1 为 :N Y D V H(SEQ ID NO :1) ;新设计的重链 CDR3 序列为 A L D Y Y D Y E F A Y(SEQ ID NO :2) 和 A L T Y Y D Y D F A Y(SEQ ID NO :3)，由于 CDR2 对 HLA-DR 分子结合的亲和性较低，保留原鼠抗 M225 的 CDR2 序列 (其序列为 VIWSGGNTDYNTPFTS，SEQ ID NO :4)。因此，整合优化的框架序列和 CDR 序列，得到的 4 个新型抗表皮生长因子受体人

源化单克隆抗体重链可变区序列为：

[0085] QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSNYDVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARALDYYDYEFAYWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:5)；

[0086] QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYDVHWIRQPPGKGLEWIGVIWSGGNTDYNTPFTSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:6)；

[0087] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALTYYDYDFAYWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:7)；

[0088] QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSISKDNSKSQVFLRMYSLQTDDTARYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:8)。

[0089] 以上各序列中的各小段序列编号如下：

[0090] QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLS(SEQ ID NO:19)

[0091] QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLT(SEQ ID NO:20)

[0092] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT(SEQ ID NO:21)

[0093] QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLT(SEQ ID NO:22)

[0094] WVRQAPGKGLEWLG(SEQ ID NO:23)

[0095] WIRQPPGKGLEWIG(SEQ ID NO:24)

[0096] WVRQPPGKGLEWLG(SEQ ID NO:25)

[0097] RLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR(SEQ ID NO:26)

[0098] RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR(SEQ ID NO:27)

[0099] RLTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(SEQ ID NO:28)

[0100] RLSISKDNSKSQVFLRMYSLQTDDTARYYCAR(SEQ ID NO:29)

[0101] WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:30)

[0102] NYGVH(SEQ ID NO:39)

[0103] ALTYYDYEFAY(SEQ ID NO:40)。

[0104] 实施例 2、抗表皮生长因子受体人源化单克隆抗体轻链可变区序列的设计

[0105] 以下为鼠抗 M225 的轻链可变区的序列，下划线部分为 FR1，FR2，FR3 和 FR4 框架序列：

[0106] DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELK(SEQ ID NO:18)。

[0107] 同样分析鼠抗 225 抗体的轻链可变区的序列，根据其轻链可变区 FR1，FR2，FR3 和 FR4 序列对人抗体基因序列库进行比较，找出与鼠抗 M225 轻链可变区 FR1，FR2，FR3 和 FR4 序列相似的人胚系 (germline) 抗体可变区相对应序列，然后用 NetMHCIIpan 软件或自编软件，经过 in silicon 分析所选相似序列与 HLA-DR 分子结合的亲和性，选出亲和性最低的框架序列，从而最终确立轻链可变区的 FR1，FR2，FR3 和 FR4 的人源化序列。在此框架结构的基础上，应用计算机分子模型分析鼠 225 抗体的可变区立体空间结构，分析出支持 CDR 构型所需保留的鼠抗体对应框架氨基酸残基 I58。对 HLA-DR 分子结合的亲和性较高的 CDR3 的去免疫原化，则应用分子对接，分析表皮生长因子受体鼠源 M225 抗体靶位及其周边氨基酸残基与人源化重链可变区的立体空间结合方式，通过计算静电力，溶液媒合 (salvation)，范德华引力和熵值 (Sircar et al，SnugDock：paratope structural optimization during antibody-antigen docking compensates for errors in antibody homology models, PLoS Comput Biol. 2010 Jan 22 ;6),选择CDR3序列中可以优化的氨基酸,将CDR3中的93位点的Asn优化为氨基酸Glu,97位点的Thr优化为氨基酸Ser,以降低于HLA-DR分子结合的亲和性,并改善抗体CDR3区域与表皮生长因子受体抗原表位相邻带正电荷氨基酸的结合。新设计的轻链CDR3为:Q Q N N E W PT S(SEQ ID NO:9)和Q Q N N D W P T T(SEQ ID NO:10)。由于轻链CDR1和CDR2对HLA-DR分子结合的亲和性较低,保留原鼠抗M225的CDR1(其序列为RASQSIGTNIH,SEQ ID NO:11)和CDR2序列(其序列为YASESIS,SEQ ID NO:12)。因此,整合优化的框架序列和CDR序列,得到的新型抗表面表皮生长因子受体人源化单克隆抗体轻链可变区序列为:

[0108] EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQNNEWPTSFGQGTKLEIK(SEQ ID NO:13);

[0109] EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQNNNWPTTFGAGTKLEIK(SEQ ID NO:14)

[0110] DIVLTQSPATLSVTPGESVSFSCRASQSIGTNIHWYQQKSHESPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGMYYCQQNNNWPTTFGAGTKLEIK(SEQ ID NO:15)

[0111] EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQNNDWPTTFGQGTKLEIK(SEQ ID NO:16)。

[0112] 以上各序列中的各小段序列编号如下:

[0113] EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC(SEQ ID NO:31)

[0114] DIVLTQSPATLSVTPGESVSFSC(SEQ ID NO:32)

[0115] WYQQKPDQSPKLLIK(SEQ ID NO:33)

[0116] WYQQKSHESPRLLIK(SEQ ID NO:34)

[0117] GIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYC(SEQ ID NO:35)

[0118] GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGMYYC(SEQ ID NO:36)

[0119] FGQGTKLEIK(SEQ ID NO:37)

[0120] FGAGTKLEIK(SEQ ID NO:38)

[0121] QQNNNWPTT(SEQ ID NO:41)。

[0122] 根据上述实施例得到的人源化抗体有以下组合:

[0123] 表1. 人源化抗EGFR抗体组合

[0124]

抗体名称	抗体重链可变区	抗体轻链可变区
BA03	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 13
BB03	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 14
BC03	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 15
BD03	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 16

[0125] 实施例3、抗表皮生长因子受体人源化单克隆抗体的制备

[0126] (1)根据实施例1和2确定的抗体重链可变区序列和轻链可变区序列,分别设计并

合成编码重链和轻链可变区序列的PCR引物寡核苷酸片段，合成时引入需要的酶切位点。PCR引物寡核苷酸片段一般长约54个碱基，相邻寡核苷酸片段约有18个碱基重叠。混合同等量的各个PCR引物片段，进行重叠延伸PCR反应。

[0127] PCR反应体系：dNTPs 0.2μM(最终浓度)；每个PCR引物片段1μl；10×buffer 3μl；cloned pfu(Invitrogen)1μl；加水至30μl。

[0128] PCR反应条件：94℃ 3min→(94℃ 30s→56℃ 30s→72℃ 1min)×30→72℃ 10min

[0129] PCR产物经1％琼脂糖凝胶电泳分离后回收纯化目的片段，经EcoRI酶切后，将抗体重链可变区序列和轻链可变区序列分别克隆到pCR-BluntII-TOPO(Invitrogen)载体中，转化到大肠杆菌TOP10(Invitrogen)后在LB/Kanamycin平板上进行筛选，取10个白色菌斑接种于含有Kanamycin的LB液体培养液中培养，用QIAGEN质粒提取试剂盒(QIAquick PCR purification kit)提取质粒并进行测序，确定重链和轻链可变区序列。

[0130] (2)构建表达载体

[0131] 从正常人B细胞分离RNA，用RT-PCR方法获得人IgG1重链恒定区IgG1Fc片段和轻链恒定区κ片段，在RT-PCR时引入需要的酶切位点，并将其预先构建到pcDNA3.1(Invitrogen)表达载体中，分别得到pcDNA3.1-Fc和pcDNA3.1-κ表达载体，经DH5细菌转化，质粒提取和测序确定阳性克隆。

[0132] 其中人IgG1重链恒定区IgG1Fc片段的序列为：

[0133] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVITVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO：42)

[0134] 其中轻链恒定区κ片段的序列为：

[0135] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO：43)

[0136] 抗体的重链可变区由Eco47III/NheI从pCR-BluntII-TOPO的阳性克隆切下，克隆连入pcDNA3.1-Fc表达载体中，使重链可变区与恒定区连接。抗体的轻链可变区由AscI/BsiWI从pCR-BluntII-TOPO的阳性克隆切下，克隆连入pcDNA3.1-κ表达载体中，使轻链可变区与恒定区连接(可参考文献Morrison SL.Cloning，expression，and modification of antibody V regions.Curr Protoc Immunol.2002 May；Chapter 2：Unit 2.12.)。再次经过DH5细菌转化，质粒提取和测序确定阳性克隆。测序结果与记录的抗体的编码序列一致，即分别得到抗体重链和轻链的表达载体。

[0137] (3)转染CHO细胞及特异抗体表达

[0138] 细胞系及培养条件：CHO-S细胞(购自Invitrogen)培养条件为1×CD-CHO(购自GIBCO)，1×HT(购自GIBCO)，8mM谷氨酰胺(购自GIBCO)，培养于37℃，8％ CO_2 温箱。将步骤(2)获得的抗体重链表达载体和轻链表达载体共转染CHO-S细胞，采用DMRIE-C转染试剂盒(购自Invitrogen)，按照试剂盒说明书操作。转染后的第三天，细胞培养于上述的培养液并加有500μg/ml G418(购自GIBCO)和12.5μg/ml嘌呤霉素(购自Sigma)进行加压

筛选。加压约 14 天后，挑选出的阳性多克隆培养于六孔板中，并用直接 ELISA 的方法（包被 EGFR-Fc 来自表达的 293T 细胞中）检测特异抗体表达量。挑选出表达率最高的阳性多克隆，大批量培养 7 天后，离心收集培养上清，采用蛋白 A 的亲和层析柱（购自 GE）纯化后，透析至 PBS，并经过 0.22um 膜过滤后，即分别得到纯化的抗体 BA03、BB03、BC03 和 BD03，用于以下各实施例。

[0139] 实施例 4 流式细胞仪检测抗体与细胞表面表皮生长因子受体的亲和活性

[0140] 用 A431 细胞 (ATCC) 检测表达抗体对表皮生长因子受体的特异性亲和能力。A431 细胞与不同浓度的产物抗体结合，4℃，1 小时。用 PBS 洗三遍，加入 100 倍稀释的 FITC 标记的抗人 Fcγ 特异性二抗（购自 The Jakson Laboratory），4℃一小时。PBS 洗三遍后用流式细胞仪检测结合的荧光信号（图 1）。根据平均荧光强度利用 Prism 软件计算 EC50（半数有效浓度）值，结果见表 2。其结果表明本发明的人源化抗体 BA03、BD03 比爱必妥（购于百泰生物药业有限公司）有更高结合活性，BB03 和 BC03 与爱必妥相似。所有四个抗体的结合活性均强于泰欣生 (Nimotuzumab，购于 Merck KgaA)。

[0141] 表 2 抗体与 EGFR 结合活性的 EC50 值

[0142]

抗体	EC50（μg/ml）
BA03	0.21
BB03	0.25
BC03	0.32
BD03	0.23
爱必妥	0.28
泰欣生	0.42

[0143] 实施例 5 抗体阻断 EGF 与细胞表面表皮生长因子受体结合

[0144] 用 A431 细胞 (ATCC)Cell-ELISA 方法（请参见 Bioo Scientific 公司 MaxDiscovery in Cell ELISA kit 说明书）检测表达抗体对 EGF 与细胞表面表皮生长因子受体结合的阻断能力。不同浓度的抗体与 A431 细胞在 4℃孵育 1 小时后加入生物素标记的重组人表皮生长因子 EGF（购自 R&D），用 PBS 洗三遍。然后用 HRP 标记的亲和素检测与细胞表面表皮生长因子受体结合的生物素标记的重组人表皮生长因子（图 2）。根据测得的 OD450 值利用 Prism 软件计算 IC50（半数抑制浓度）值，结果见表 3。其结果表明本发明的人源化抗体 BA03、BD03 比爱必妥有更强的阻断配体与细胞表面表皮生长因子受体结合的活性，BB03 和 BC03 与爱必妥相似。四个抗体的阻断活性均强于强于泰欣生。

[0145] 表 3 抗体阻断 EGF 与 EGFR 结合活性的 IC50 值

[0146]

抗体	IC50（μg/ml）

BA03	2.31
BB03	4.38
BC03	3.59
BD03	2.91
爱必妥	3.25
泰欣生	8.25

[0147] 实施例 6 抗体抑制 A431 细胞表面表皮生长因子受体磷酸化

[0148] 用 6 孔板接种 5×10^5 个 / 孔 A431 细胞，用完全培养基 (DMEM+10％ FBS) 过夜培养。换用 2ml DMEM 培养，使细胞缺乏营养 16-18 小时。再换用 1ml 预热新鲜的培养基 (DMEM，不含 10％ FBS) 培养 1-2 小时。在用 50ng/ml 重组 EGF(表皮生长因子，购自 R&D systems) 刺激前 60 分钟，加 5ug/ml 抗表皮生长因子受体抗体到 A431 细胞。用预冷的 1×PBS 洗 3 遍，加 250μl 细胞裂解液 (cell lysis buffer，购自 Cell Signalling) 裂解后，离心，14000rpm，4℃，15 分钟，收集裂解液，用 BCA 试剂盒蛋白定量。经 western blot 方法，分别用 anti-pEGFR(pY1068) 抗体 (购自 Abnova) 测定表皮生长因子受体磷酸化，用抗总表皮生长因子受体抗体 (购自 Abnova) 测定总表皮生长因子受体含量。其结果表明本发明的人源化抗体 BA03 比爱必妥有更强的抑制 A431 细胞表面表皮生长因子受体磷酸化的活性。两者均强于泰欣生 (图 3)。

[0149] 实施例 7 体外抗体依赖性细胞介导的细胞毒 (ADCC) 试验

[0150] 正常志愿者获取的血液吸入至肝素化的注射器中，与相同体积不含 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的 HBSS(Life Technologies) 混合，置于淋巴细胞梯度分离剂 (Life Technologies) 上分层，并且在 800g 离心 30 分钟。收集在分界面上的 PBMC，在 HEPES 缓冲盐水中洗涤，并且再次悬浮于测定培养基，即含 1％热灭活 FBS(HyClone Laboratories，Logan，UT)，2nM L- 谷氨酰胺，10mM HEPES，和 50mg/mL 庆大霉素的 RPMI 1640 培养基 (Life Technologies) 中。将置于 50mL 分析缓冲液中的 Ramos 细胞 (ATCC)(10^4 个细胞 / 孔) 和各种浓度的抗体 (置于 50mL 分析缓冲液中) 加入到圆底的 96 孔培养板上。将此混合物在 37℃进行预培养 30 分钟。接着将 50μL 的 5×10^5 效应细胞分配于各孔并且在 37℃孵育 4h。使用 40 ∶ 1 的效应细胞 (PBMC) ∶靶细胞 (Ramos 细胞) 比率进行实验。该培养板在 250g 离心 10 分钟，然后收集上清液。使用细胞毒性检测试剂盒 (Boehringer Mannheim，Indianapolis，IN) 及制造商的说明来检测上清液中的乳酸脱氢酶活性，根据样本的平均吸光率来计算毒性的百分比。特异性裂解率＝ (平均实验释放 - 平均自发释放)/(平均最大释放 - 平均自发释放). 其结果如图 4 所示，本发明的人源化抗体 BA03、BD03 比爱必妥 (cetuximab) 有更高的 ADCC 活力，在 0.1ug/ml 和 1ug/ml 均高于爱必妥 ($p < 0.05$，Student’s t 检验)，BB03 和 BC03 与爱必妥相似。

[0151] 实施例 8 树突状细胞 -T 细胞激活实验测定抗体体外免疫原性

[0152] 将从正常志愿者 (n ＝ 12) 获取的血液吸入至肝素化的注射器中，与相同

体积不含 $Ca2^+/Mg2^+$ 的 HBSS(Life Technologies) 混合，置于淋巴细胞梯度分离剂 (Life Technologies) 上分层，并且在 800g 离心 30 分钟。收集在分界面上的外周血单核细胞，在 HEPES 缓冲盐水中洗涤，并且再次悬浮于测定培养基 RPMI 1640 培养基 (Life Technologies) 中。所得外周血单核细胞继续在 50ml 添加 1 ∶ 100 稀释的 beta-mercaptoethanol 无血清 AIM V 培养基 (Gibco) 贴壁培养 2 小时收获单核细胞。加入 800units/ml 的 GM-CSF(Endogen) 和 500units/ml 的 IL-4(Endogen) ;继续培养 5 天。然后再加入 0.2units/ml 的 TNFα (Endogen) 和终浓度为 50units/ml 的 IL-1α (Endogen) 继续培养 2 天。第 7 天，加入 50mg/ml 的 Mitomycin C1 小时，以停止树突状细胞的继续分化，然后以 600G 离心收集分化成熟的树突状细胞。以 2×10^4 细胞 / 孔 (100ul) 接种于一个圆底的 96 孔培养板。用 $CD4^+$Cellect Kit(Biotex) 的负向选择来收集人 $CD4^+$T 细胞在含有 2％人血清的 AIMV 培养基。在含有 100μl 树突状细胞 (1×10^4 个 /ml) 的 96 孔培养板中加入 10μl、浓度为 5mM 的检测抗体 (对照组加入 DMSO)，然后每孔加入 100μl 的 $CD4^+$T 细胞 (1×10^5 个 /ml)。激活的 T 细胞增殖数用 alamarblue 试剂测定 (测定方法参照 Invitrogen 的 alamaraBlue Assay kit 试剂盒说明书)。将结果换算成 T 细胞激活指数 (计算方法为 T 细胞激活指数＝抗体组的 T 细胞增殖数 /DMSO 组的 T 细胞增殖数，可参考文献 Stickler MM et al.A human dendritic cell-based method to identify CD4+T-cell epitopes in potential protein allergens.Environ Health Perspect.2003 February ;111(2) : 251-254.)。其结果如图 5 所示，本发明的四个人源化抗体比人鼠嵌合抗体爱必妥有更低的免疫原性，其中 BA03 和 BB03 与爱比妥相比有显著降低 ($p < 0.05$，Student's t 检验)。

[0153] 实施例 9 BA03 对肺癌，结肠癌，胰腺癌和乳腺癌肿瘤细胞的体外抗瘤活性

[0154] BA03 对肺癌，结肠癌，胰腺癌和乳腺癌肿瘤细胞的体外抗瘤活性，分别对各肿瘤细胞的 ADCC 活性和体外增长抑制作用进行了探讨。ADCC 活性测定方法与实施例 7 相同。体外增长抑制作用测定方法如下 :用 96 孔板接种 300-2000 个 / 孔不同肿瘤细胞 (根据不同肿瘤细胞特性确定接种细胞密度)，在完全培养基中加入终浓度为 10μg/ml 的 BA03 和 IgG1 对照抗体 (购自 R&D systems) 培养 5-10 天后，加入 Alamablue 测定细胞活性 (测定方法参照 Invitrogen 的 alamaraBlue Assay kit 试剂盒说明书)。与 IgG1 对比计算相对细胞比活性 (％ ADCC) 和细胞生长抑制率 . 每个肿瘤细胞株生长抑制试验至少重复两次 (三个复孔)。肿瘤细胞中加入抗体后，再加入 PE 荧光标记的二抗 (PE-labled anti-human IgG1, Southern biotechnology)，再利用 FACS 测定 EGFR 表达水平。其结果如表 4 所示，本发明的人源化抗体 BA03 对多种肺癌，结肠癌，胰腺癌和乳腺癌肿瘤细胞生长有显著抑制作用 (表 4)。

[0155] 表 4 :BA03 对不同肿瘤细胞的体外活性

[0156]

肿瘤类型	肿瘤细胞株	EGFR 表达水平	% ADCC	肿瘤细胞生长抑制率

[0157]

肺癌	H460	+	14 %	+
	A549	++	28 %	++
	H292	++	18 %	++
结肠癌	DLD-1	++	27 %	+
	HT-29	++	29 %	+/-
胰腺癌	BXPC3	++	17 %	++
	HPAC	+	15 %	+
乳腺癌	BT474	+/-	3 %	+/-
	SKBr3	+	9 %	+/-
	BT20	+++	22 %	++
	MDA-MB468	+++	18 %	+
	HCC1937	++	21%	++

[0158] 抑制率 :+/-5-10%，+10-20%，++20-40%

[0159] 实施例 10 动物药效学实验

[0160] 给 Balb/c 裸鼠在第 0 天时皮下注射人皮肤基底细胞癌 A431 细胞 (5×10^6 个细胞 /0.1ml/ 每只小鼠)。肿瘤的尺寸用测径器测量，肿瘤的大小使用公式 (长 × 宽 ^{2})/2 来计算。当肿瘤大小其平均值达到 100mm^3(61-158mm^3) 时，根据肿瘤大小把荷瘤小鼠随机分配成 3 组。两周内的每个周一、周四腹腔内以 5mg/kg 给药，共计给药 5 次。生理盐水 (作为阴性对照)。肿瘤的体积如图 6 所示，生理盐水对照组，肿瘤在三周中很快增长到＞ 1500mm^3，本发明的人源化抗体 BA03 和爱必妥治疗后小鼠肿瘤的增长与对照组相比都被明显抑制 ($p < 0.001$，Student’s t 检验)，但人源化 BA03 抗体具有比爱必妥更好的抗肿瘤活性 ($p < 0.05$，Student’s t 检验)。

[0161] 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

[0001]

序列表

<110> 上海津曼特生物科技有限公司
<120> 人源化抗表皮生长因子受体抗体及其用途
<130> IDC120126
<160> 43
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 1
Asn Tyr Asp Val His
1 5

<210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 2
Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 3
Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Asp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 4
Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

<210> 5
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 5

[0002]

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr
20 25 30
Asp Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 6
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30
Asp Val His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 7
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0003]

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 8
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80
Arg Met Tyr Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 9
Gln Gln Asn Asn Glu Trp Pro Thr Ser
1 5

[0004]

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 10
Gln Gln Asn Asn Asp Trp Pro Thr Thr
1 5

<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 11
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 12
Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 13
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30
Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Glu Trp Pro Thr
85 90 95
Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

[0005]

<210> 14
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 14

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                   10                  15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30
Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 15

```
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1               5                   10                  15
Glu Ser Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30
Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Gly Met Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 16
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 16

[0006]

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30
Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asp Trp Pro Thr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 17
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 17
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 18
Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn

[0007]

20 25 30
Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 19
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 19
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
20 25 30

<210> 20
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 20
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
20 25 30

<210> 21
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 21
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr
20 25 30

<210> 22
<211> 30
<212> PRT

[0008]

<213> 人工序列

<400> 22

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
20 25 30

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 23

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
1 5 10

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 24

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 25

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
1 5 10

<210> 26

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 26

Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 27

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

[0009]

<400> 27
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 28
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 28
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 29
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 29
Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Arg
1 5 10 15
Met Tyr Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 30
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 31
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 31
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 32

[0010]

<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 32
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Ser Val Ser Phe Ser Cys
20

<210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 33
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys
1 5 10 15

<210> 34
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 34
Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys
1 5 10 15

<210> 35
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 35
Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 36
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 36
Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Tyr Cys
20 25 30

[0011]

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 37
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 38
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 39
Asn Tyr Gly Val His
1 5

<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 40
Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 41
Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr
1 5

<210> 42
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 42
[0012]

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 43
<211> 107

[0013]

<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 43

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

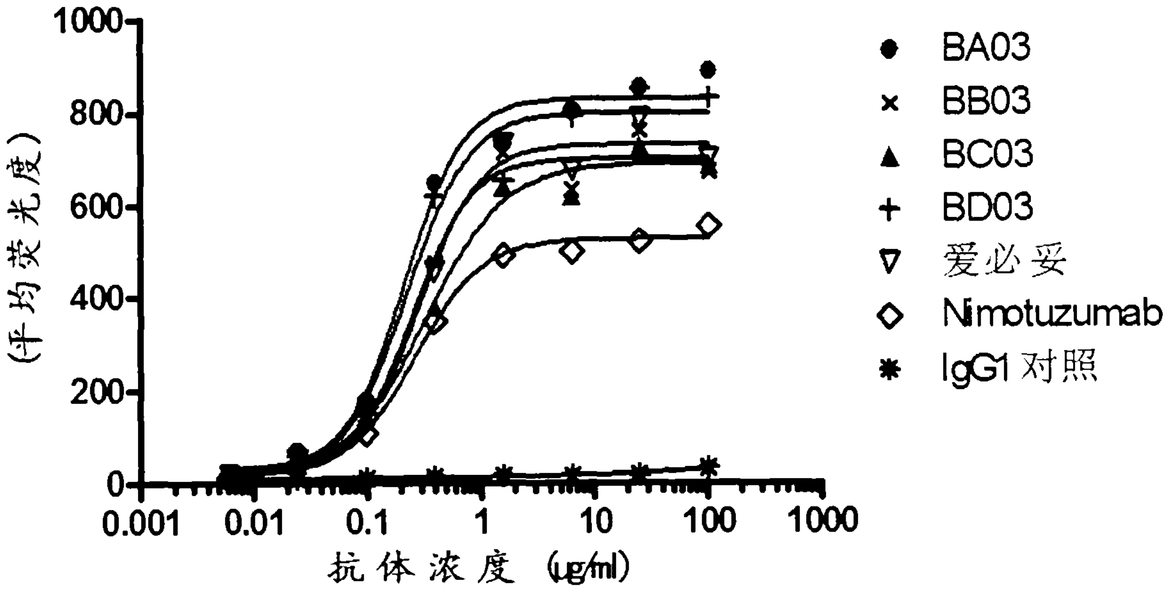
1000
800
600
400
200
0
(平均荧光度)
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度 (μg/ml)
BA03
BB03
BC03
BD03
爱必妥
Nimotuzumab
IgG1 对照

图 1

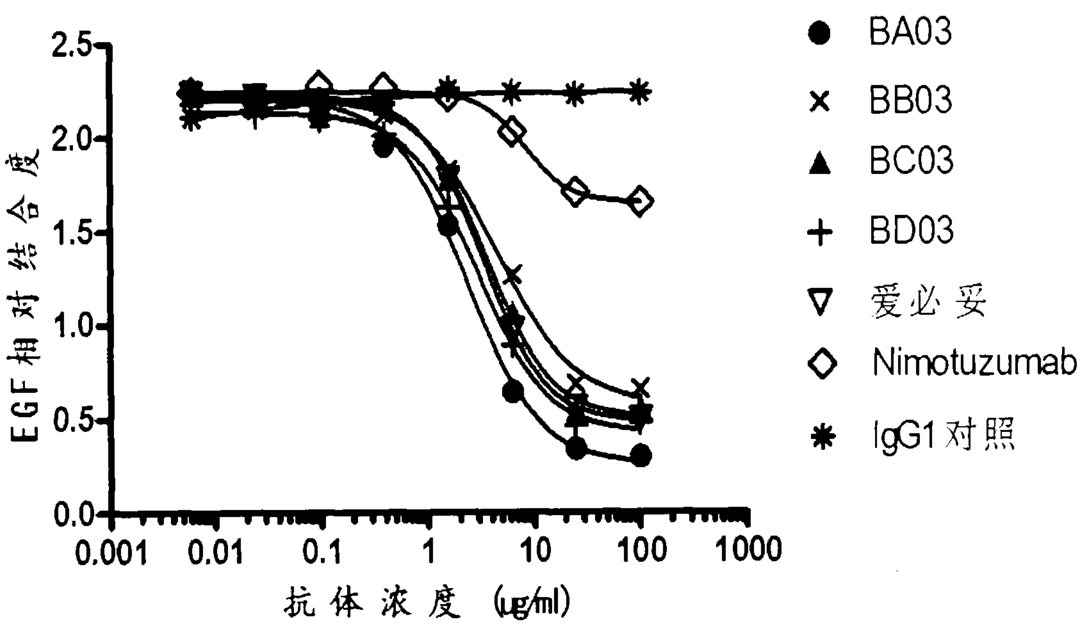
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
EGF相对结合度
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度 (μg/ml)
BA03
BB03
BC03
BD03
爱必妥
Nimotuzumab
IgG1 对照

图 2

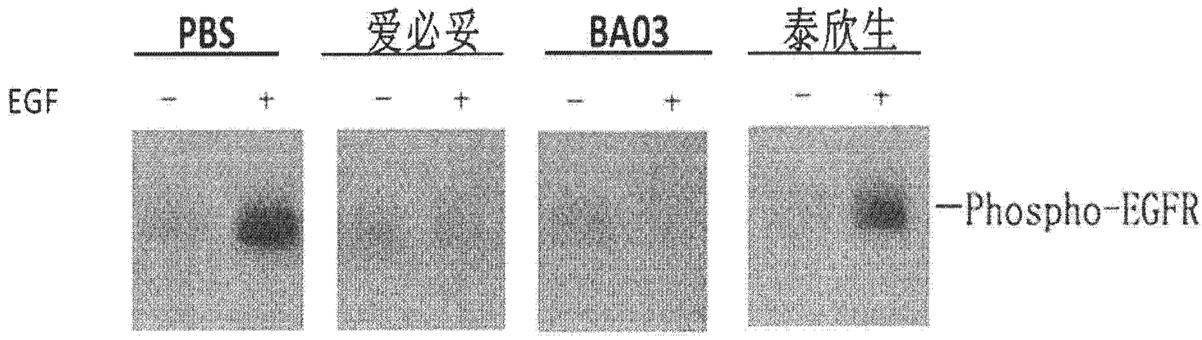
PBS
爱必妥
BA03
泰欣生
EGF
− +
− +
− +
− +
Phospho-EGFR

图 3

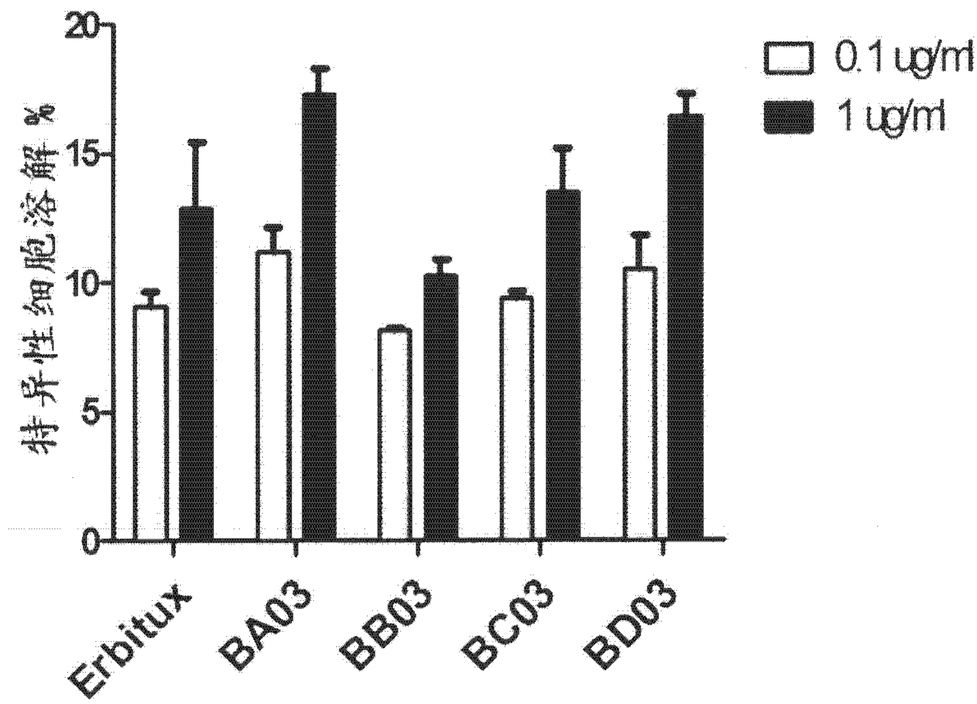
特异性细胞溶解%
20
15
10
5
0
0.1 ug/ml
1 ug/ml
Erbitux
BA03
BB03
BC03
BD03

图 4

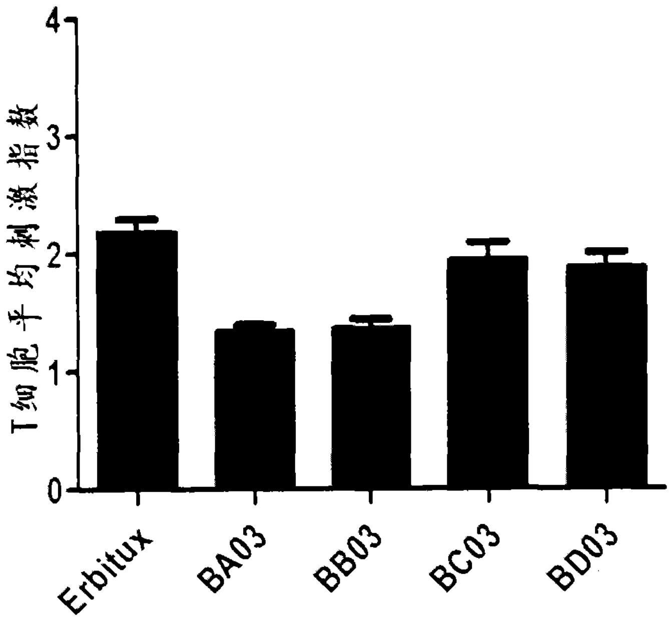
T细胞平均刺激指数
0
1
2
3
4
Erbitux
BA03
BB03
BC03
BD03

图 5

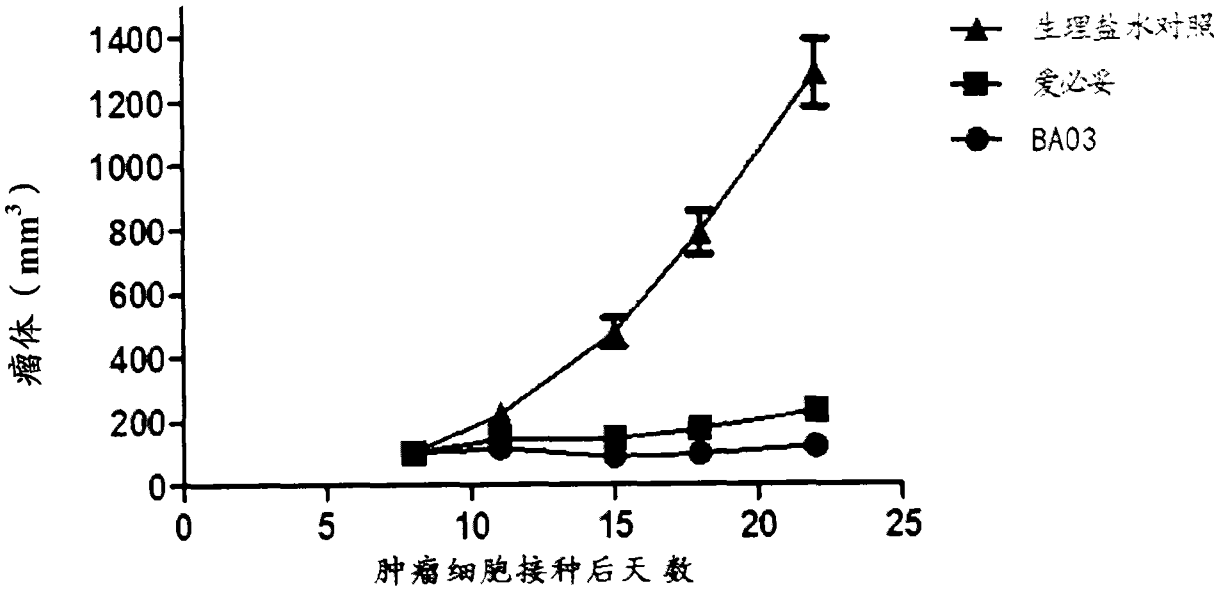
瘤体（mm³）
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
肿瘤细胞接种后天数
生理盐水对照
爱必妥
BA03

图 6