



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102443061 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 09

(21) 申请号 201110260511. 3

G01N 33/53(2006. 01)

(22) 申请日 2005. 10. 14

G01N 33/574(2006. 01)

(62) 分案原申请数据

200510113739. 4 2005. 10. 14

(71) 申请人 英国希尔斯生物分子有限责任公司

地址 英国阿克斯布里奇

(72) 发明人 柳红

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 刘健

(51) Int. Cl.

C07K 16/18(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 41/00(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 7 页

(54) 发明名称

高功能抗体生物合成

(57) 摘要

高功能抗体生物合成，本发明提供了一种筛选重组抗体的新方法。该方法运用一反复循环过程：“基因库多样化→蛋白表达→功能筛选”，直至获得满意的抗体为止。在进行抗体表达时，一多用途的多肽序列(Tag)连接在抗体的C端。该多肽序列可将单链抗体(scFv)形成二聚体(scFv)₂，进一步加强抗体的亲和力。该多肽序列也可作抗体的标记、纯化及检测之用。采用该方法，我们成功地获得了一些抗CEA的单链抗体。其中一抗体可直接发展为诊断、治疗试剂。这些抗体将提供有用的CDRs库，通过序列重组产生所需的高活性CEA抗体。

1. 抗 CEA 的重组抗体, 其亲和力高于 $10^{-8}M$, 并且含有以下任何重链 CDRs 和轻链 CDRs 组合

重链

CDR1	CDR2	CDR3
TFTGYY	WINPNSGGTNYAQKFQG	SVNGDSVPY
TFTGYY	WINPNSGGTNYAQKFQG	GLWDYYY
TFTGYY	WINPNSGGTNYAQKFQG	DLNNWNYYYY
TFTGHY	GGVSSGALTAYNTALQS	SFITIFGVVII HYYY
TFTGYY	WINPNSGGRNYAQKFQG	DLNNWNYYYY
FSLTKY	WINPNSGGTNYAQKFQG	DLNNWNYYYY
AFSTYG	VIWYDGSNKYYADSVKG	EIAG
SFTTSW	IIYPGDSDTRYSPSFQG	QSSGWW
SFTTSW	IIYPGDSDTRYSPSFQG	QSSGWW
YSFTSY	IIYPGDSDTQY	QAGMLSP

轻链

CDR1	CDR2	CDR3
GGNNIGSKSVH	DDSDRPS	QVWDSSSD
GGNNIGSKSVH	DDSDRPS	QPFDSLNG
GGNNIGSKSVH	DDSDRPQ	KVWDSSSD
GGHDIGSKSVH	GDSDRPS	ASYQSTYSG
GGNNIGSKSVH	ATTDRAS	QVWDSSSD
TGSSSNIGAGHDVH	GNSNRPS	QSYDSSLSG
SGSSSNIGGNAYVG	GDSDRPS	AAWDDTLHG
TGSSSNIGAGHDVH	GNSNRPS	QSYDSSLSG
TGSSSDVGAGHDVH	GNSNRPS	QPFDSLNG
TGSSSTTGAGYDVH	GNNNRPS	QSYDNTLSG

2. 根据权利要求 1 的抗体, 所述抗体对 CEA 具有高亲和力, 并且含有含有任何重链 CDR1、CDR2、CDR3 及轻链 CDR1、CDR2、CDR3 的重新自由组合。

3. 根据权利要求 1 或 2 的抗体, 所述抗体对 CEA 具有高亲和力, 专一性的重组抗体, 其构架来源于人源抗体构架。

4. 根据权利要求 1-3 任一项的抗体, 所述抗体对 CEA 具有高亲和力, 专一性的重组抗体仅含有重链。

5. 根据权利要求 1-4 任一项的抗体, 所述抗体对 CEA 具有高亲和力, 专一性的重组抗体包括发生在 CDRs 区或者在抗体构架区的任何突变体。

6. 根据权利要求 1-5 任一项的抗体, 所述抗体对 CEA 具有高亲和力, 专一性的重组抗体的大量制备是通过任何蛋白表达方法进行的。

7. 根据权利要求 1-6 任一项的抗体, 其中重组抗体可连接任何抗肿瘤试剂或可检测的标记试剂。

8. 根据权利要求 1-7 任一项的抗体, 其中重组抗体可用于诊断体内或体外 CEA 含量试剂中的一种基本成分, 检测的样品包括人类样品或肿瘤组织样品。
9. 根据权利要求 1-8 任一项的抗体, 其中重组抗体可作为治疗癌症的药物。
10. 根据权利要求 8 的抗体, 其中重组抗体用于 ELISA、斑点印迹法、蛋白芯片、免疫沉淀和体内检测。
11. 根据权利要求 8 的抗体, 其中重组抗体用于肿瘤组织的定位诊断及用于抗体指导的外科手术。
12. 根据权利要求 8 的抗体, 其中重组抗体片断用于与不同凝集素合用, 检测诊断特定癌症病人或癌症手术后病人。
13. 根据权利要求 1-6 任一项的抗体, 其中抗 CEA 的重组抗体用于基因诊断及治疗。

高功能抗体生物合成

[0001] 本申请是申请号为“200510113739.4”，发明名称为“高功能抗体生物合成”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种制备抗体或其他蛋白质分子的方法。

背景技术

[0003] 近几年的研究表明抗体可用作诊断和治疗包括癌症在内的各种疾病^[1]。通过化学或者生物修饰，抗体还可用作为癌症的检测、诊断试剂^[1]。作为疾病诊断、治疗试剂抗体必需具备下列条件：(1) 诊断及治疗的抗体必须具有高亲和力、专一性，无交叉反应；(2) 用作治疗试剂的抗体不能引起体内免疫反应；(3) 用作体内的诊断及治疗抗体必须在37℃的生理条件下不失活、不降解、无沉淀反应^[2]。

[0004] 然而，从动物中获得抗体很难达到上述标准。通过动物途径获得人源抗体则难度更高，过程非常复杂。生物技术通过在体外筛选抗体可避免使用动物，使有效获得达到上述标准的抗体成为可能。重组DNA技术还可进一步开发重组序列，从而产生动物所不能产生的高功能高活性分子。由于避免使用动物，人源抗体也可以很容易获得。此外，生物技术在体外可以设计和控制筛选条件，从而产生所需抗体。例如，可用高温筛选结构稳定的抗体。目前，常用体外生物筛选技术包括：噬菌体显承^[3]、细胞表面显承^[4,5]及核糖体显承^[6]。

[0005] 基因库的大小是决定能否产生高功能高活性分子的主要因素之一。基因库越大，多样性越大，则获得高功能高活性分子的概率也越大^[7]。目前的显承技术通常使用固定的基因库，即便是无细胞的核糖体显承技术，其基因库最大也只能达到 10^{13-14} 分子。这一基因库大小只能任意变化10个残基($(32)^{10} = 10^{14}$)。使用固定基因库的另一缺点是：如果基因库不含有高功能高活性分子，无论使用什么样的显承技术也很难得到满意的抗体。改进办法是模拟自然进化，建立一个动态基因库，使有效的连续变异和功能筛选同时进行。

发明概述

[0007] 本发明提供了一种制备抗体或其他蛋白质分子的方法，包括以下步骤：

[0008] (a) 建立DNA文库；

[0009] (b) 表达所述DNA文库为可溶、游离蛋白质；

[0010] (c) 基于所述蛋白质的功能，筛选具有结合活性的单克隆菌或一小组克隆分子，获得其编码功能蛋白质的DNA；

[0011] (d) 对上述(c)中获得的不同的DNA分子序列进行重组、重排和突变以产生新DNA序列；

[0012] (e) 从(d)中新产生的新DNA序列与来自(c)中的不同DNA分子进行混合；

[0013] 重复(b)到(e)，直到获得理想的活性蛋白质。

[0014] 特别是，本发明涉及

[0015] 1. 使用以下步骤获得抗体(或其他蛋白质分子)：

- [0016] a) 建立 DNA 文库。
- [0017] b) 表达 DNA 文库为可溶、游离蛋白质。
- [0018] c) 基于蛋白功能,筛选具有结合功能 (Binding activity) 的单克隆菌或一小组克隆分子,获得其编码功能蛋白质的 DNA
- [0019] d) 对上述 (c) 中获得的不同的 DNA 分子序列进行的重组、重排和突变以产生新 DNA 序列。
- [0020] e) 从 (d) 中新产生的新 DNA 序列与来自 (c) 中的不同 DNA 分子进行混合。
- [0021] f) 重复 (b) 到 (e),直到获得理想 (满意) 的活性蛋白质。
- [0022] 2. 根据方面 1a(方面 1 第 a 项,以下采用相同规则), DNA 文库可以是独立的 PCR 片断或插入到表达质粒,基因文库编码完整蛋白分子或者部分蛋白质区域。
- [0023] 3. 根据方面 1a 和 2,基因文库的多样性可以是来源于自然序列、人造序列或者两者 (自然和人造序列) 的混合。
- [0024] 4. 根据方面 2 和 3,基因文库可以是编码单链抗体 (scFv)。其多样性或者来自天然文库或者来自赋予了免疫性文库或者是两者的结合。基因库资源可以是来自任何动物,包括人源或者动物或人与动物的混合。优先选择应是用人源抗体构架与不同来源的 CDRs 混合而制备的基因库。
- [0025] 5. 根据方面 1b,基因的表达或者在大肠杆菌中进行,或者在无细胞体系中进行。采用无细胞体系进行表达时,DNA(质粒或PCR片断)可以是单一分子也可以是一小组分子,例如 :50-100 不同分子。
- [0026] 6. 根据方面 1c,进行功能筛选时,可使用菌落滤膜筛选法 (colony filter screening),或 ELI SA,或斑点印迹法 (dot blotting),或蛋白芯片 (protein array),或这些方法的联合使用。筛选中活性的检测可在确定的条件下进行,如 :采用升温、添加变性剂、改变培养时间、抑制剂等。
- [0027] 7. 根据方面 1d,在功能筛选所获得 DNA 分子中进行序列的重组 (recombination) 和重排 (shuffling) 时,可以通过 PCR,或 PCR 相关技术,或其他分子生物学方法,或这些方法的联合使用来完成。基因突变也可以通过定点突变 (site-directed) 或者是随机突变 (random mutation) 引入。
- [0028] 8. 根据方面 1b,供于本文涉及的基因表达体系可以是 E. coli,或者是无细胞体系,或者是其他异源宿主。
- [0029] 9. 根据方面 1b,表达的蛋白质或者是单体,或者是二聚体 (包括共价键连接或非共价键连接的二聚体)。
- [0030] 10. 根据方面 1b,蛋白质为重组抗体。
- [0031] 11. 根据方面 9,表达的蛋白质可携带供检测或者纯化蛋白的标记。
- [0032] 12. 根据方面 11,标记物可以是一种多肽。在表达过程中,标记物可能与蛋白质形成融合体。该多肽也可被化学基团标记。
- [0033] 13. 根据方面 9,形成二聚体共价联接可通过位于蛋白质 N 末端或 C 末端或内部的一个或多个半胱氨酸残基联接。
- [0034] 14. 根据方面 9,二聚体形成可以是通过蛋白质结构域 (domain) 或蛋白质序列 (sequence) 的非共价键连接形成的。

- [0035] 15. 根据方面 9, 二聚体形成可以是通过交联试剂实现。
- [0036] 16. 根据方面 11-12, 其多肽标记序列为 (H)7LGGC, 优先选择连接于蛋白质的 C 末端。
- [0037] 17. 抗 CEA (carcinoembryonic antigen) 的重组抗体, 其亲和力大于 108M-1, 含有表 1 中例举任何重链 CDRs 和轻链 CDRs 组合。
- [0038] 18. 根据方面 17, 对 CEA 具有高亲和力, 专一性的重组抗体含有表 1 任何重链的 CDR1, CDR2, CDR3 及轻链 CDR1, CDR2, CDR3 的重新自由组合 (random recombination of CDRs)。
- [0039] 19. 根据方面 17-18, 对 CEA 具有高亲和力, 专一性的重组抗体, 其构架来源于人源抗体构架。
- [0040] 20. 根据方面 17-19, 对 CEA 具有高亲和力, 专一性的重组抗体仅含有重链。
- [0041] 21. 根据方面 17-20, 对 CEA 具有高亲和力, 专一性的重组抗体包括发生在 CDRs 区或者在抗体构架区的任何突变体。
- [0042] 22. 根据方面 17-21, 对 CEA 具有高亲和力, 专一性的重组抗体的大量制备可通过任何蛋白表达方法。
- [0043] 23. 根据方面 17-22, 其重组抗体可连接任何抗肿瘤试剂或可检测的标记试剂 (如放射性标记试剂、化学发光试剂、荧光剂或者酶标试剂等)。
- [0044] 24. 根据方面 17-23, 其重组抗体可用于诊断体内或体外 CEA 含量试剂中的一种基本成分, 检测的样品包括人类样品或肿瘤组织样品。
- [0045] 25. 根据方面 17-24, 其重组抗体可作为治疗癌症的药物。
- [0046] 26. 根据方面 24, 其重组抗体用于诊断试剂包括 (但不局限于) 以下方式: ELISA, protein micro-arrays, dot blot, immuno-precipitation 和 in vivo detection。
- [0047] 27. 根据方面 24, 其重组抗体用于体内诊断包括 (但不局限于) 肿瘤组织的定位诊断及用于抗体指导的外科手术。
- [0048] 28. 根据方面 24, 其重组抗体片断用于诊断试剂包括 (但不局限于) 与不同凝集素合用, 检测诊断特定癌症病人或癌症手术后病人。
- [0049] 29. 根据方面 17-22, 抗 CEA 的重组抗体用于基因诊断及治疗。
- [0050] 附图简述
- [0051] 图 1 是本发明方法原理基本图示。
- [0052] 图 2 表明了 ELISA 结果。其显示不同大肠杆菌菌株表达的抗体对 CEA 的结合功能。数字表示不同大肠杆菌菌株。PC 表示 CEA 抗体正对照。
- [0053] 图 3 表明了重组抗体 717 的 ELISA 结果。
- [0054] 图 4 表明了重组抗体 636 的表达及 ELISA 分析。 (a) Western blot 采用辣根过氧化物酶 - 抗多聚组氨酸酶联抗体检测从大肠杆菌 (E. coli) 中表达释放重组抗体 636。 (b) ELISA 表明重组抗体 636 的专一性。
- [0055] 图 5 表明了重组抗体二聚体的形成。聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 及 Western 印迹分析重组抗体单体或二聚体的生成。 (a) 细胞间质 (periplasm) 样品用 DTT 处理; (b) 细胞间质 (periplasm) 样品没用 DTT 处理。箭头分别为单体和二聚体蛋白带。
- [0056] 图 6 表明了竞争性 ELISA 分析。虚线表示 50% 抑制率的 CEA 浓度范 (1ng/ml)。

CEA 的分子量为 180,000Da。

[0057] 图 7 表明了重组抗体 96 对 CEA 抗原的灵敏性检测 (ELISA)。(a) 抗体 96 浓度稀释 ;(b) CEA 抗原稀释。

[0058] 发明详述

[0059] 本发明基于动态基因库及连续功能筛选原理,描述了一新的筛选高亲和力、专一性抗体的方法。该方法重复进行“基因库序列不断多样化→蛋白表达→功能筛选”,直到获得满意的抗体。具体描述如下。

[0060] 第一周期循环的抗体基因库 (G1),可将自然抗体或人工合成的 CDRs 区域库源组建在一个或者多个固定的抗体框架上。然后表达基因库。最后使用特定抗原筛选出有活性的抗体分子。第二周期循环抗体基因库 (G2),将由第一周期循环所获得 DNA (编码具有结合抗原的抗体分子) 来组成,通过 PCR 将其 CDRs 区域进行重新组合产生新的重新组合的分子。重新组合的分子然后再与没有组合的分子以一定比例组合 (例如 1 : 1),形成第二循环的抗体基因库 (G2)。基因库 (G2) 又经过基因表达,使用同样的抗原进行功能筛选,获得具有活性的抗体分子,用于第三周期循环。周期循环将继续重复,直到获得具有满意功能的抗体分子为止 (见图 1)。

[0061] 我们使用抗原 CEA,已获得了一些高活性抗 CEA 的重组抗体,证明了上述途径的可行性和有效性 (见下)。

[0062] 本发明与现有的显承技术有明显的不同之处:第一,没有使用固定的基因库。每一循环基因库里都含有重新组合的分子,而且重新组合的分子来源于具有特定抗原结合功能的特定序列。换句话说,基因序列重组在每一循环均有发生,产生重组的基因序列源来自于上一循环中所筛选的具有活性的分子。第二,在进行功能筛选时,产生的抗体是可溶、自由的,没有以任何形式与其他载体结合。而现有的显承技术,抗体必须和其他载体直接连接在一起。

[0063] 建立起始基因库 (G1) 首选的途径之一是:使用人源抗体框架^[9],在该框架上建立 CDRs 库。该 CDRs 库可以是人源,也可以是其他动物或者人源与其他动物的混合物。CDRs 库也可以是来源于免疫后的动物 (包括人源)。抗体表达一般使用大肠杆菌,也可使用无细胞蛋白表达体系。如果使用大肠杆菌表达抗体,其功能筛选使用膜滤菌落筛选方法 (见材料与方法)。如果使用无细胞表达体系,则首先筛选小群体分子 (例如,50-100 基因分子),然后,有活性的群体继续分离 (10-20 分子),直到获得单一分子。

[0064] 最后筛选获得的分子可在其 C 端连接一多肽序列 HHHHHHHLGGC。通过 C 端的半胱氨酸残基,可以让单链抗体分子形成二聚体。二聚体的形成可增加抗体接合抗原的能力,也可以使单一的 H7-tag 变成双倍的 H7-tag (即:HHHHHHHLGGC-CGGLHHHHHH),从而增加检测灵敏性。另外, C 端的半胱氨酸也可用作抗体标记,使抗体成为体内、体外诊断试剂 (同位素自显影) 包括用于抗体指导的外科手术,或成为抗体药物试剂。

[0065] 我们采用本发明获得了一些抗 CEA 的单链抗体。其中一抗体可直接发展为诊断、治疗试剂。这些抗体将提供有用的 CDRs 库,通过序列重组产生所需的高活性抗 CEA 抗体。

[0066] CEA 系 Carcinoembryonic antigen (癌胎抗原) 的缩写,该抗原已被学术界确认为一种与肿瘤相关的生物标记,可作为肿瘤诊断及治疗的相关抗原^[10-15]。最初学术界认为该抗原是一种表达仅存在于胎盘组织中的蛋白,但是现在研究已经证实 CEA 能在几种正常成

人表皮组织中表达,包括结肠、胃、舌、食道、子宫、汗腺和前列腺等器官。但在正常的表皮组织中,CEA 仅出现在细胞的前表面,且极少进入血液循环。例如,健康成人的粪便中每日 CEA 排泄量为 50-70mg,而血液中 CEA 含量小于 10ng/ml。相反,在肿瘤细胞中,CEA 可存在于整个肿瘤细胞中,并参与血液循环。所以,检测血液中 CEA 含量可作为癌症病人诊断指标。

具体实施方式

[0067] 材料与方法

[0068] PCR 引物设计与 mRNA

[0069] 制备扩增人源抗体可变区所需的 PCR 引物,见^[9];制备扩增山羊抗体可变区所需 PCR 引物,见^[16];制备扩增大鼠抗体可变区所需的 PCR 引物,见^[17]。人源抗体的基本库取材于美国 Clontech 公司的 mRNA 文库,人源 CDRs(互补决定域)通过 RT-PCR(逆转录酶 PCR)技术从 Clontech 的 mRNA 文库中扩增获得。山羊的 CDRs 通过 RT-PCR 技术从一癌胚抗原(CEA)免疫的山羊的 mRNA 文库中获得。大鼠的 CDRs 通过 RT-PCR 技术从 CEA 免疫的大鼠的 mRNA 文库中获得。CEA 抗原从美国 Scripps 实验室购得。

[0070] PCR 和 PCR Shuffling

[0071] 应用上述 PCR 引物并通过标准的 PCR 和 RT-PCR 技术可实现抗体序列的扩增,PCR Shuffling 依照一种改进的“DNA 片段引物”方法进行,见^[18]。简言之,编码 CDR1、CDR2、CDR3 多样性的 PCR 片断均可作为与寡核苷酸一端连接的引物使用。经 30 轮 PCR 后,通过琼脂糖电泳分析 PCR 产品,对目标 PCR 凝胶带进行切割和洗脱。

[0072] 膜滤菌落筛选^[19]

[0073] 将 PCR 片断与表达型载体连接并转入大肠杆菌细胞中。接种后,琼脂平板在 37℃ 下过夜培养。然后将亲水性的第一张 PVDF 膜轻放于长有细菌菌落的平板表面,使细菌菌落转移到 PVDF 膜(微孔型 GVWP,孔径 0.22μm)上。然后将第二张疏水性 PVDF 转移膜(Immobilion P,Milli-pore Corp)先用 3ug/ml 捕获抗原溶液包被,再用含 3% BSA 的 PBS 溶液封阻后浸入 2xTY 液体培养基中(该培养基含有 1mM IPTG 和 50-100ug/ml 氨苄青霉素)。等将第二张润湿后的膜放置于含有 1mM IPTG 和 100ug/ml 的氨苄青霉素的新鲜琼脂平板表面后,再将第一张含有细菌菌落的 PVDF 膜放置于第二张膜的表面,使菌落面向上。这叠膜在环境温度为 25-30 摄氏度条件下过夜培养。培养后,带有菌落的第一张膜被移至新鲜琼脂平板培养基上,放置于 4 摄氏度储存,作为备用细菌。将第二张膜从琼脂平板表面移出,立即用含 0.1% 吐温 20 的 PBS 缓冲液洗涤 3 次(每次 10 分钟),然后用酶联抗体检测法检测重组抗体。即用该膜与辣根过氧化物酶(酶联)抗多聚组氨酸抗体(HRP-coupled anti-(His)6tag antibody, Sigma, 英国)。使用时,先用含有 1% BSA 的 PBS 溶液以 1:2500 稀释,温育 1 小时。经 3 次清洗后,该膜通过一种化学发光试剂(Pierce, 英国)进行检测。

[0074] ELISA

[0075] 用 100ul CEA 抗原包被 ELISA 微量滴定板孔,除特殊情况,CEA 浓度一般为 0.5ug/ml。将滴定板放置于 4 摄氏度过夜包被后,用 1% BSA 的 PBS 溶液封阻。加入从大肠杆菌周质中提取并经 Ni⁺柱层析(Qiagen, 英国)纯化制得的抗 CEA 的抗体(scFv),在室温或在 37℃ 下培养 1 小时后,用含 0.05% Tween20 的 PBS 洗涤液洗板 3 次,将 1:2500 稀释后的辣根过氧化物酶-抗多聚组氨酸酶联抗体(Sigma, 英国)加入滴定板孔中,室温 1 小时

后,加入 100u1 的 ELISA 显色剂 (Sigma, 英国)。在 450nm 发射滤光器下读数。进行竞争性 ELISA 反应时,以不同浓度游离的 CEA 作为抑制剂,抑制重组抗体和与微量板上包埋的 CEA 抗原进行的结合反应。

[0076] 实施例

[0077] 实施例 1 抗 CEA 的重组抗体的筛选

[0078] 采用由 3 条人源重链 (VH1、VH3、VH5) 和一条山羊重链 VH 组成的基本构架来构建重组抗体可变区的最初 PCR 基因文库 (G1), 这些重链构架再与人的轻链 V3 连接作为结合单元。不同动物源的 CDRs 库则是通过 PCR shuffling 技术引入。该 PCR 基因库被克隆到携带有 Pe1B 前导序列和自行设计的多聚组氨酸标记的表达载体中。然后将该载体转入大肠杆菌 *E. coli* 中并置于琼脂平板上生长, 然后将 *E. coli* 菌落转移到 PVDF 滤膜上。使用膜滤菌落筛选方法, 检测从大肠杆菌 *E. coli* 中释放的重组抗体。挑选阳性菌落, 提取其 DNA 作为下一步 PCR 扩增制备 CDRs 库。三轮循环后, 以奶粉为对照, 采用 CEA 抗原结合的 ELISA 方法分析阳性。图 2 表明一些重组抗体与 CEA 有特异性结合。所有与 CEA 结合的克隆菌被测序。CDRs 序列结果见表 1。其中几个重组抗体的抗原结性质也进行了 ELISA 分析, 确定其 CEA 抗原的专一结合, 结果见图 3 和图 4。

[0079] 实施例 2 重组抗体二聚体 $(scFv)_2$ 的形成

[0080] 为了方便于大肠杆菌周质中重组抗体二聚体 $(scFv)_2$ 的形成, 我们在抗体 C 末端引入半胱氨酸残基。同时, 为了方便于检测重组抗体的生成, 多聚组氨酸 (His)6 也被引入。我们用 western blotting 法来检测所重组抗体在 *E. coli* 的表达及生成形式 (即单体或二聚体)。重组抗体 (96scFv) 在大肠杆菌中表达后, 提取其细胞间质 (periplasm), 然后用含有或不含二硫苏糖醇 (DTT) 的点样缓冲液 (loading buffer) 分别处理周质提取物。样品经聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳后转移到 PVDF 膜 (Immobilion P) 上, 接著采用辣根过氧化物酶 - 抗多聚组氨酸酶联抗体检测。分析表明, 当样品用 DTT 处理后, 只显示一条预期单体带, 而没有被 DTT 处理的样品则产生两条蛋白质带, 分别为单体和二聚体蛋白带 (见图 5)。这一结果表明: 重组抗体 scFv 通过 C- 端的半胱氨酸残基形成共价二硫键, 产生抗体二聚体 $(scFv)_2$ 。

[0081] 实施例 3 重组抗体亲和力、特异性和稳定性的测定

[0082] 来自 *E. coli* 细胞间质的重组抗体 96 经 Ni^{+} 亲和层析法纯化后, 以游离 CEA 抗原为抑制剂, 采用竞争性 ELISA 分析方法检测此抗体对 CEA 抗原的亲和力。如果以 50% 抑制率的 CEA 浓度表示抗体亲和力高低, 该抑制曲线表明重组抗体 96 具有小于 0.001nM 浓度的表观亲和力 ($10^{-12}M$) (图 6)。我们也通过蛋白质印迹 (western blotting) 方法测定了已知含量的 96scFv 抗体与 CEA 抗原的结合曲线 (见图 7a)。该结果也表明重组抗体 96 与 CEA 抗原的亲和力小于 0.01nM。重组抗体 96 的特异性也通过检测抗体 96 与一系列不同的普通蛋白质的结合情况来确定, 如与 BSA、奶粉、KLH 等的蛋白作为对照。结果显示: 抗体 96 与上述对照蛋白质均无交叉反应。抗体 96 的稳定性实验是采用在提高温度条件下的 ELISA 方法来测定的, 结果表明: 该抗体在 37℃ 条件下至少 3 小时内没有明显结合力下降。再则, 我们也观察到: 当用 PBS 溶液适当对尿素可溶但无活性抗体 (inclusion bodies) 进行稀释, 可观察到抗体 96 很快恢复或折叠成具有结合 CEA 活性的抗体。这一容易复性事实也证明了该抗体的稳定性。

[0083] 实施例 4 重组抗体 96 对 CEA 抗原的灵敏性检测

[0084] 采用 ELISA 方法测定不同浓度的 CEA(50ng、25ng、12.5ng、6ng、3ng) 与 96ScFv 抗体的亲和力, 检测表明 96scFv 抗体识别含量低于 3ngCEA 抗原 (见图 7b)。表明该抗体对 CEA 的浓度检测非常灵敏。

[0085] 表 1. 不同区域 CDRs 序列

[0086] 重链 (V_H)

[0087]

克隆	CDR1	CDR2	CDR3
3	TFTGYY	WINPNSGGTNYAQKFQG	SVNGDSVPY
15	TFTGYY	WINPNSGGTNYAQKFQG	GLWDYYY
32	TFTGYY	WINPNSGGTNYAQKFQG	DLNNWNYYYY
96	TFTGHY	GGVSSGALTAYNTALQS	SFITIFGVVIIHYYY
168	TFTGYY	WINPNSGGRNYAQKFQG	DLNNWNYYYY
717	FSLTKY	WINPNSGGTNYAQKFQG	DLNNWNYYYY
520	AFSTYG	VIWYDGSNKYYADSVKG	EIAG
291	SFTTSW	IIYPGDSDTRYSPSFQG	QSSGWY
774	SFTTSW	IIYPGDSDTRYSPSFQG	QSSGWY
636	YSFTSY	IIYPGDSDTQY	QAGMLSP

[0088] 轻链 (V_L)

[0089]

克隆	CDR1	CDR2	CDR3
3	GGNNIGSKSVH	DDSDRPS	QVWDSSSD
15	GGNNIGSKSVH	DDSDRPS	QPFDSLNG
32	GGNNIGSKSVH	DDSDRPQ	KVWDSSSD
96	GGHDIGSKSVH	GDSDRPS	ASYQSTYSG
168	GGNNIGSKSVH	ATTDRAS	QVWDSSSD
717	TGSSSNIGAGHDVH	GNSNRPS	QSYDSSLG

520	SGSSSNIGGNAYVG	GDSDRPS	AAWDDTLHG
291	TGSSSNIGAGHDVH	GNSNRPS	QSYDSSL SG
774	TGSSSDVGAGHDVH	GNSNRPS	QPFDS SLNG
636	TGSSSTTGAGYDVH	GNNRPS	QSYDNTLSG

[0090] 参考文献

- [0091] 1. Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nature Review Cancer.* 1, 118–129 (2001).
- [0092] 2. **Wörn** A, Plückthun A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J. Mol. Biol.* 305, 989–1010 (2001).
- [0093] 3. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phageantibodies : filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552–554 (1990)
- [0094] 4. Shusta EV, VanAntwerp J, Wittrup, KD. Biosynthetic polypeptide libraries. *Curr Opin Biotechnol.* 10, 117–122 (1999).
- [0095] 5. Georgiou G, Stathopoulos, C, Daugherty, PS, et al. Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms : from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nat Biotechnol.* 15, 29–34 (1997).
- [0096] 6. He M, Taussig M. J. Ribosome display : Cell-free protein display technology. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics.* 1, 204–212 (2002).
- [0097] 7. Ling MM Large antibody display libraries for isolation of high affinity antibodies. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 6, 421–432 (2003)
- [0098] 8. Goldenberg D M. (1992) Cancer imaging with CEA antibodies : historical and current perspectives. *The International Journal of Biological Markers* 7, 183–188.
- [0099] 9. Knappik A, Ge L, Honegger A et al., (2000) Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol.* 296, 57–86.
- [0100] 10. Ledermann J A, Recent RHJ, Massof C, Kelly AMB, Adam T & Bagshawe K D (1991) A phase--I study of repeated therapy with radiolabelled antibody to carcinoembryonic antigen using intermittent or continuous administration of cyclosporin A to suppress the immune response, *Int. J. Cancer.* 47, 659–664.
- [0101] 11. Pedley R B, Dale R, Boden J A, Begent R H J, Keep P A Green A J (1989). The effect of second antibody clearance on the distribution and dosimetry of radiolabelled anti-CEA antibody in a human colonic tumour xenograft model. *Int. J. Cancer.* 43, 713–318.
- [0102] 12. Pedley R B, Boden J A, Boden R, Dale R, Begent R H (1993) Comparative

radioimmunotherapy using intact or F(ab')₂ fragment s of ¹³¹Ianti-CEA antibody in a colonic xenograft model. Br. J. Cancer. 68, 69-73.

[0103] 13. Ledermann J A, Begent R H J, Bagshawe K D, Riggs S J, Searle F, Glaser M G, Green A J, Dale R G. (1988) Repeated antitumour antibody therapy in man with suppression of the host response by Cyclosporin A. Br. J. Cancer 58, 654.

[0104] 14. Boxer GM, Begent R H J, Kelly AM B, Southall P J, Blair S B, Theodorou N A, Dawson P M, Ledermann J A. (1992) Factors influencing variability of localisation of antibodies to carcinoembryonic antigen(CEA) in patients with colorectal carcinoma--implications for radiimmunotherapy. Br. J. Cancer. 65, 825-831.

[0105] 15. Blair S D, Theodorou N A, Begent R H J et al (1990). Comparison of anti-fetal colonic microvillus and anti-CEAantibodies in peroperative radioimmunolocalisation of colorectal cancer, Br. J. Cancer, 61, 891.

[0106] 16. Dufour, V. , Nau, F (1997) Genomic organisation of the sheep immunoglobulin J_H segments and their contribution to heavy chain variable region diversity. Immunogenetics 46, 283-292

[0107] 17. Kabat, E. A. , Wu, T. T. , Perry, H. M. , Gottesman, K. S. , Foeller, C (1991). Sequences of proteins of immunological interest. 5th ed. US Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD

[0108] 18. Sharker, G and Sommer, S. S (1990) The 'megaprimer' method of site-directed mutagenesis. Biotechniques 8, 404-407

[0109] 19. Skerra, A. , Dreher, ML and Winter, G (1991) Filter screening of antibody Fab fragment secreted from individual bacterial colonies. Anal. Biochem 196, 151-155

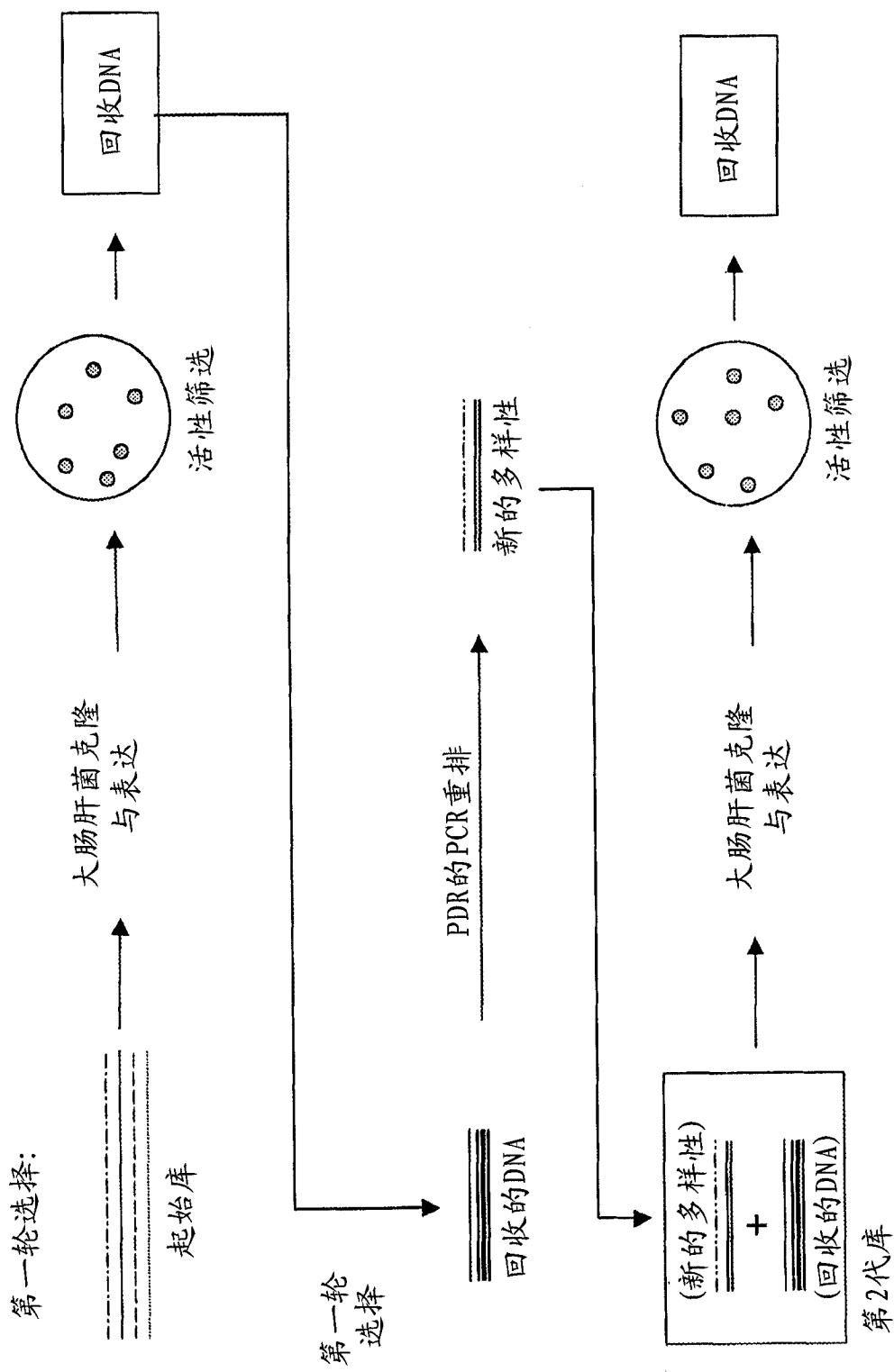


图 1：本发明方法原理基本图解

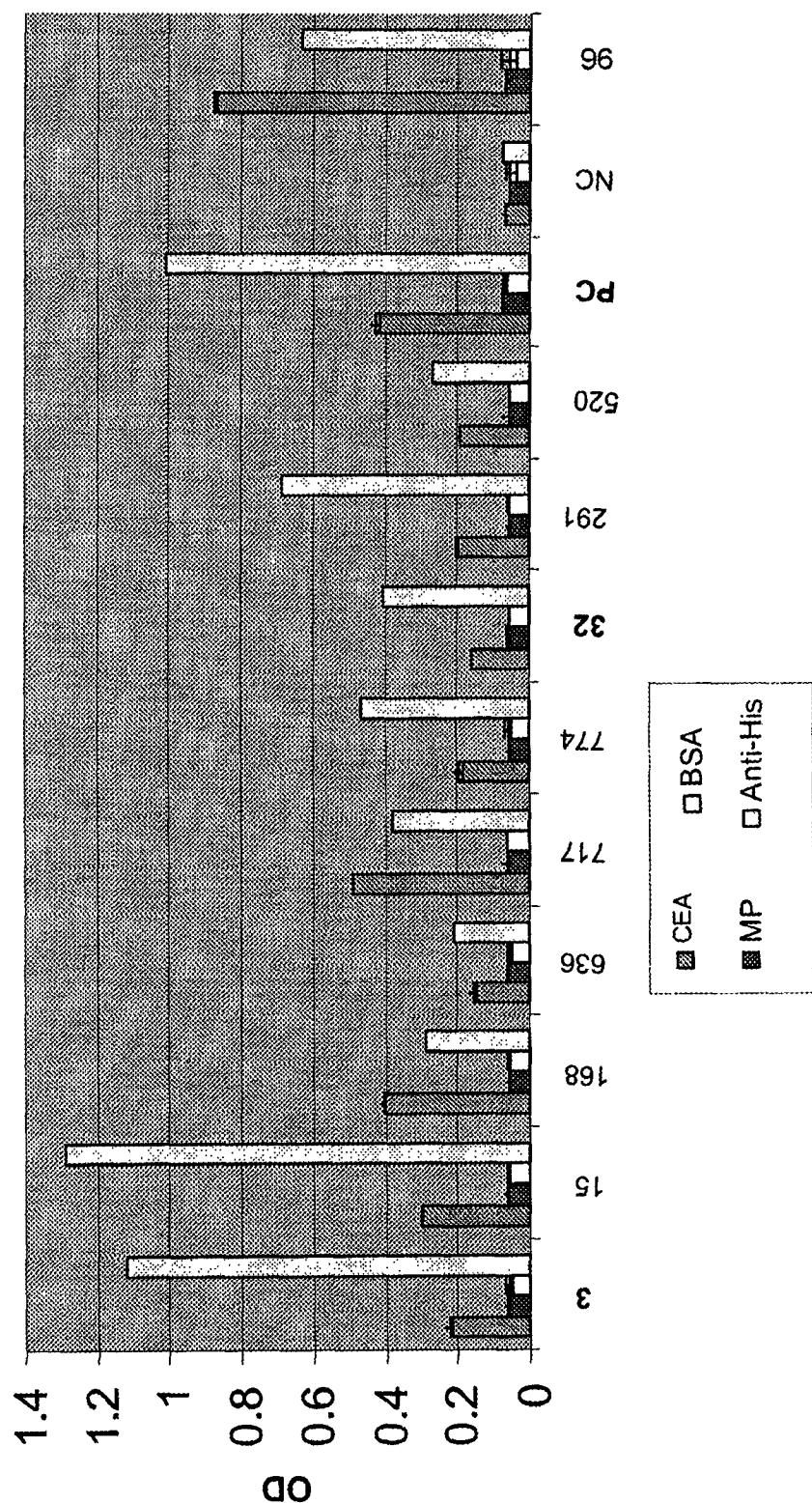


图 2 :ELISA 结果

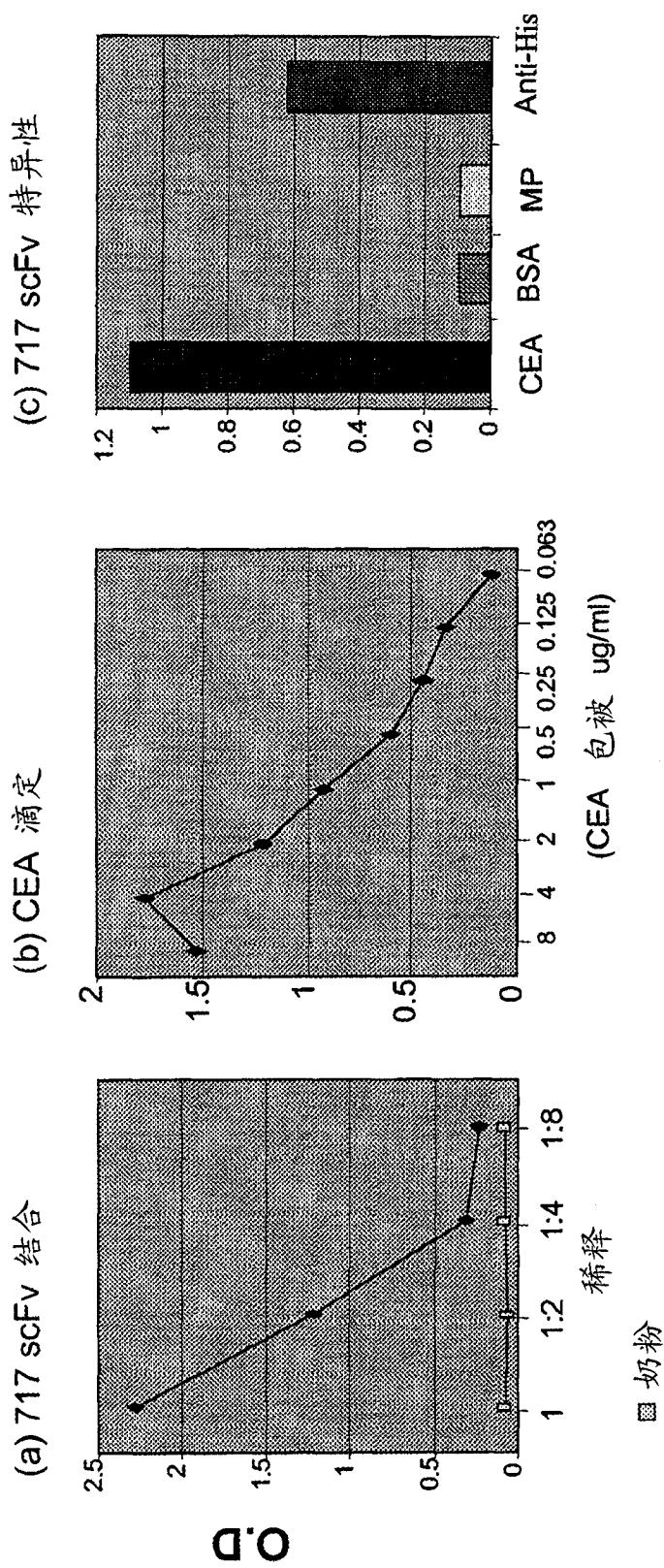


图 3 : 重组抗体 717 的 ELISA 结果

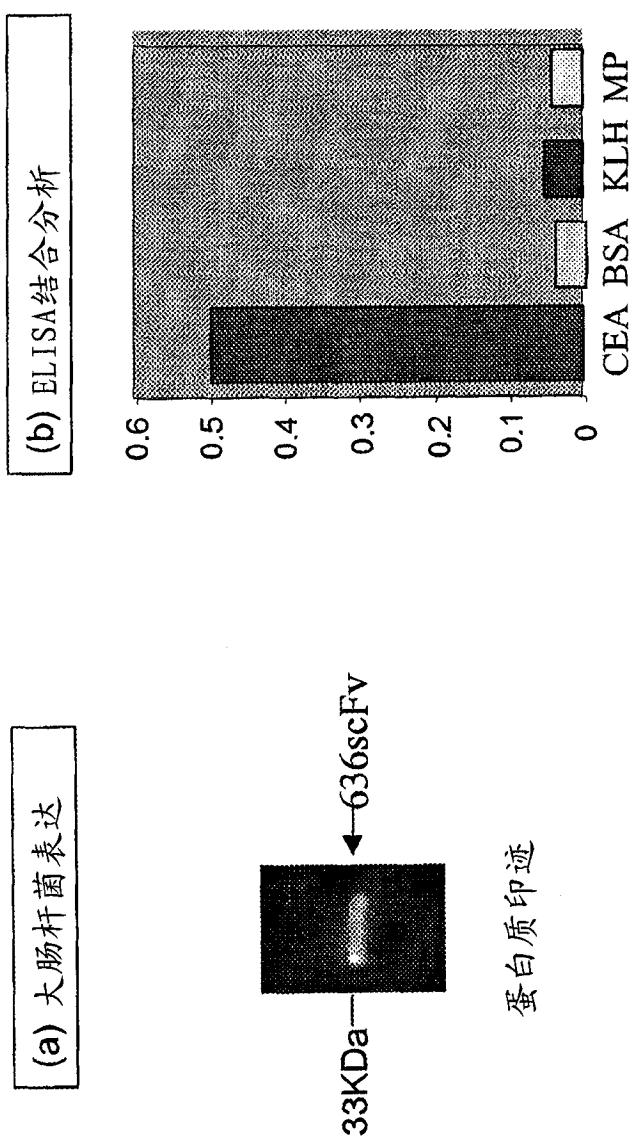


图 4: 重组抗体 636 的表达及 ELISA 分析

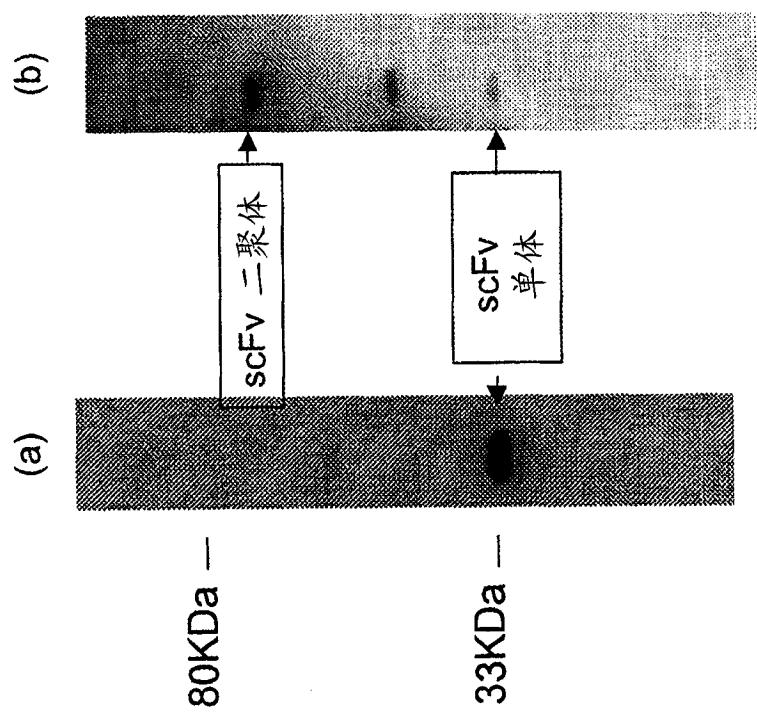


图 5 : 重组抗体二聚体的形成

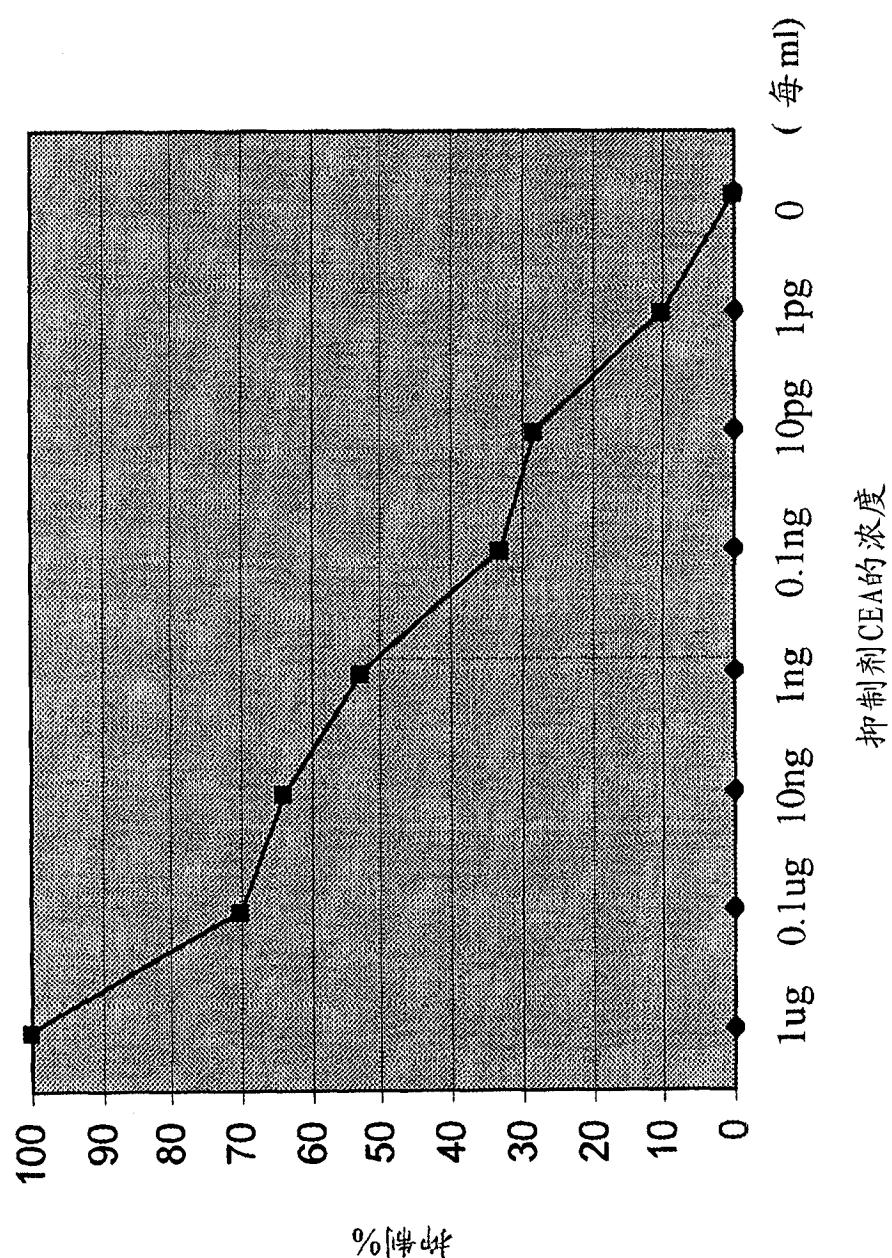
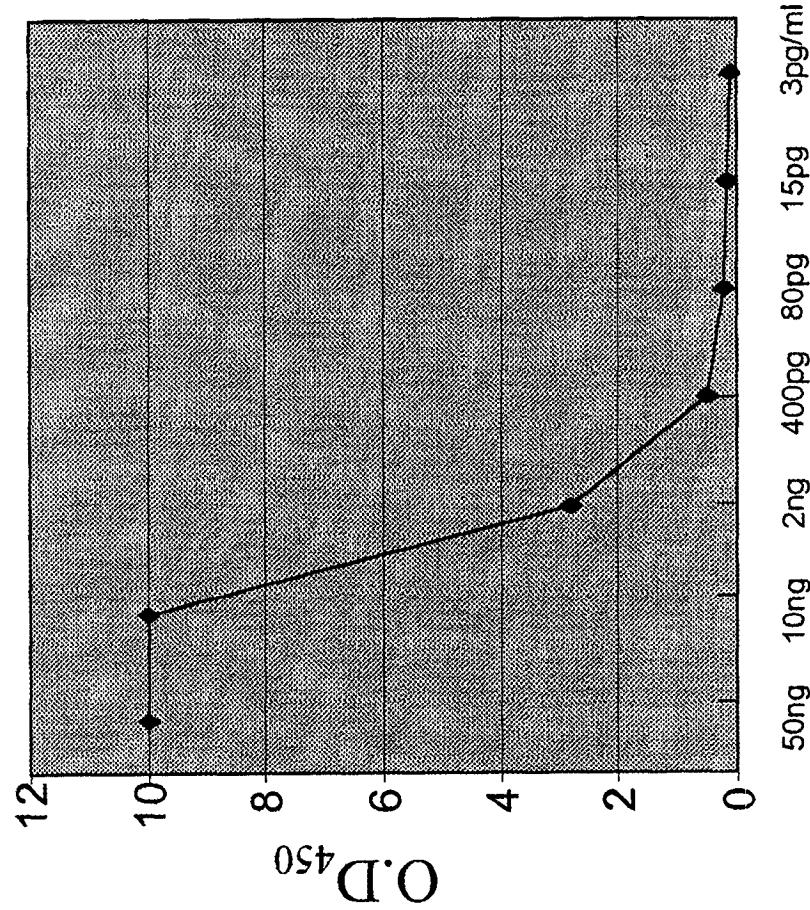


图 6 : 竞争性 ELIST 分析

(a) 96scFv 的稀释



(b) 96scFv 的结合灵敏性

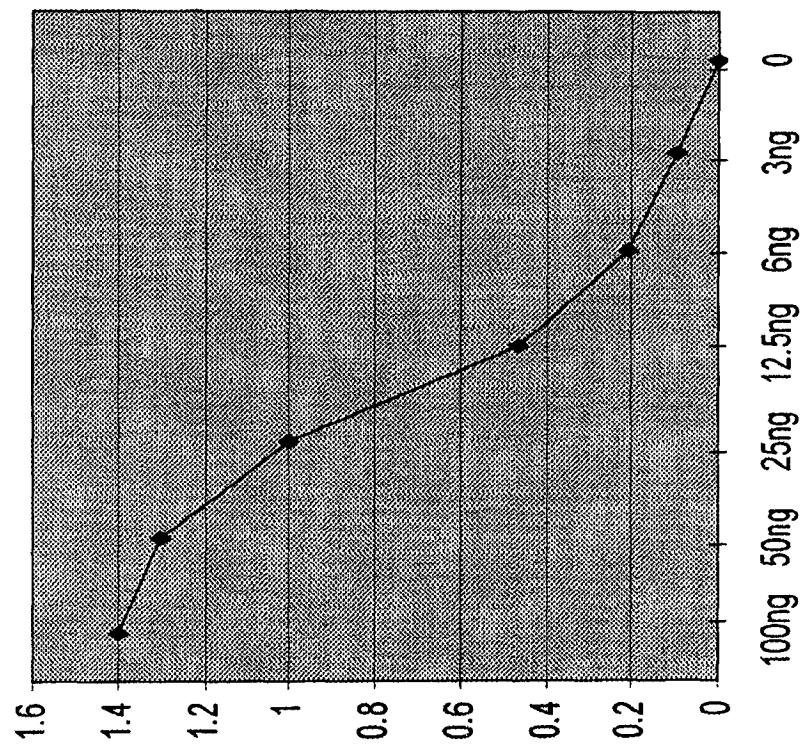


图 7 :结合曲线

专利名称(译)	高功能抗体生物合成		
公开(公告)号	CN102443061A	公开(公告)日	2012-05-09
申请号	CN201110260511.3	申请日	2005-10-14
[标]发明人	柳红		
发明人	柳红		
IPC分类号	C07K16/18 A61K39/395 A61P35/00 A61P41/00 G01N33/53 G01N33/574		
代理人(译)	刘健		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

高功能抗体生物合成，本发明提供了一种筛选重组抗体的新方法。该方法运用一反复循环过程：“基因库多样化→蛋白表达→功能筛选”，直至获得满意的抗体为止。在进行抗体表达时，一多用途的多肽序列(Tag)连接在抗体的C端。该多肽序列可将单链抗体(scFv)形成二聚体(scFv)2，进一步加强抗体的亲和力。该多肽序列也可作抗体的标记、纯化及检测之用。采用该方法，我们成功地获得了一些抗CEA的单链抗体。其中一抗体可直接发展为诊断、治疗试剂。这些抗体将提供有用的CDRs库，通过序列重组产生所需的高活性CEA抗体。

