

## 人 TNF $\alpha$ 单克隆抗体、其 PEG 化纳米颗粒及其应用

### 技术领域

本发明涉及生物技术及医药领域，具体涉及抗人 TNF $\alpha$  单抗及其 PEG 化纳米颗粒及其应用。

### 背景技术

自身免疫性疾病是继癌症和心血管疾病的第三大类疾病。类风湿性关节炎（RA）是最常见的自身免疫病之一，我国类风湿关节炎患病率约为 0.32-0.36%，在 60 岁以上人群发病率高达 30%~40%。面对每人每年几十万元的进口药物治疗费用，患者往往只能长期忍受痛苦的化学治疗，却又收效甚微。

RA 的患病人群多，用药量大，使其治疗性药物的市场巨大，2005 年全球市场达到 60 亿美元。目前临床治疗 RA 的方案很多，首选用大剂量非甾体抗炎药可控制症状，如无效，则临床首选氨甲蝶呤等免疫抑制药治疗。约四分之一的患者首次发病后经及时治疗可终生不再复发，约二分之一的患者经治疗后症状暂时得以缓解，但仍会反复发作，部分最终发展为关节功能障碍；约四分之一的患者对目前所有的常规治疗均无效。

肿瘤坏死因子- $\alpha$ （TNF- $\alpha$ ）是类风湿性关节炎病变过程中起主要作用的细胞因子，实验和临床结果均证实 TNF 是治疗该病的适合靶点。国外对 RA 的发病机理进行了充分的研究，发现肿瘤坏死因子（Tumor Necrosis Factor alpha, TNF- $\alpha$ ）在该疾病的病理进程中起十分关键的作用，患者或动物模型病变关节腔内的 TNF 水平异常升高。TNF $\alpha$ 和 TNF $\beta$ 是哺乳动物细胞中的一类同源分泌型蛋白质，它们相互之间具有很高的同源性，二者都可以对许多细胞类型造成多方面的影响。这两种蛋白都可以通过与细胞膜上的受体作用而影响细胞的生物学功能。肿瘤坏死因子 TNF $\alpha$ 能够引起肿瘤组织出血坏死并具有多方面功能。成熟分子由 157 个氨基酸组成，含有两个二硫键，没有糖基化位点。其前体为 233 个氨基酸组成的多肽，N-端 76 个氨基酸组成的多肽不是信号肽，它可以把前体固定在细胞膜上，使成熟的分泌型保留在细胞膜上。前体的成熟 mRNA 长度为 1.7kb。在体内主要由单核巨噬细胞产生。

针对 TNF- $\alpha$  的抑制剂成为迄今为止最为成功的 RA 治疗药物。代表药物如



Wyeth/Amgen 公司 Enbrel(etanercept), Johnson & Johnson, Schering Plough/Centocor 公司 Remicade(infliximab), Cambridge Antibody Technology/Abbott 的 Humira(adalimumab)。Enbrel 为 Amgen 公司开发的制剂, 是 TNF- $\alpha$  受体和 Fc 的融合蛋白, 不仅对风湿性关节炎有非常不错的疗效, 且对牛皮癣及牛皮癣型关节炎也有明显的治疗作用, 同时在促进脊椎炎愈合的研究上, Enbrel 也进入了二期临床。2004 年销售额是 25 亿美元, 预计 2008 年可达 34 亿美元。Remicade 是一种人鼠嵌合性的抗 TNF- $\alpha$  单克隆抗体, 可特异性结合可溶性及膜结合型 TNF- $\alpha$ , 其适应症包括 Crohn' 病, 风湿性关节炎(RA), 重症强直性脊柱炎(AS)。在 2003 年和 2004 年全球销售额分别是 22.7 亿和 28.9 亿美元, 是生物医药领域的“重磅炸弹”。2002 年 12 月 Abbott 公司的 Humira 成为第一个获准用于减轻成人中到重度活动期 RA 的体征和症状及抑制关节结构损伤进展的全人单克隆抗体。由于是全人抗体, 避免了 Remicade 会产生免疫反应的缺点。Humira 与 Remicade 及 Enbrel 相比的另一个优势是给药方法的便利上。Humira 每月只需注射两次, 而 Remicade 和 Enbrel 必须每周注射两次。Humira 市场占有率正逐年提高, 2003 年和 2004 年的销售额分别是 2.8 亿和 8.5 亿美元。

这三个代表药物的疗效均比较确定, 并且随着大规模临床试验的不断开展, 除 RA 以外的克隆氏病、强直性脊柱炎、银屑病等其他自身免疫病也相继成为新的适应症, 使其市场更加庞大。这些生物产品的特异性高, 靶向性好使其副作用较其他同类药物明显降低, 逐渐地与甲氨蝶呤合用作为 RA 的一线用药, 并增强它们对目前中至重度的风湿性疾病等其他自身免疫病市场的渗透。目前处于开发末期阶段的新药主要有 UCB/Celltech 公司的 CDP-870 (PEG 化人源化抗 TNF 抗体 Fab 片段) 和 CDP571 (人源化抗 TNF 单抗), Bristol-Myers Squibb 公司的 CTLA4lg (Abatacept), Roche 公司的 Rituxan 和 MRA 等。其中进展最迅速的是 CDP-870, 目前已经进入临床 III 期, 预计 CDP-870 于 2006 年底进入市场, CDP-870 应用大肠杆菌进行生产, 使其成本降低至其他 TNF 抑制剂药物的四分之一。

虽然现有的 TNF 抗体类药物被认为较其它任何药物的效果都好, 但它们也存在很大的缺点。第一, 它们均来自哺乳动物细胞表达和纯化, 由于表达水平较低和生产能力有限远远不能满足市场的需求, 即便是 Amgen 斥资 5 亿美金创建了全球最大的 20,000 升细胞培养生物反应器, 这一问题依然存在(据 2004 年美国 biopharma 报告); 第二, 这些抗体的高昂成本使很大一部分患者被拒之门外, 据估计, 常规应用 Enbrel、Remicade 和 Humira 治疗 RA 一年的费用分别是 11400、14200 和 16776 美金, 且需反复使用(据 2004 年美国 biopharma 报告); 第三, 这些抗体所携带的 Fc 段具有结合补体和 ADCC 等活性, 体内应用会导致表



达 TNF 的细胞的凋亡，会产生一系列副作用；第四，Remicade 是人鼠嵌合性单抗，含有 1/3 的鼠源蛋白成分，连续注射可以在 10% 以上的病人中激发人抗鼠源蛋白抗体反应或人抗嵌合蛋白抗体反应，影响治疗效果并可能导致严重的不良反应。即将上市的 CDP870 是 PEG 化人源化抗 TNF 抗体 Fab 段[17]，其鼠源蛋白成分下降到 10%，但仍然有免疫原性。而 Humir 的可变区的氨基酸序列和相应的 DNA 序列来自于 CAT 公司开发的人源抗体库，其 Fc 片段的编码区来自人的 IgG1。由此可见，该产品的可变区序列并非直接来自人，而是来自起源于人 B 细胞的抗体库。

此外，虽然人类免疫系统能够产生种类极其庞大的抗体，但是人或全人抗体技术却遇到了瓶颈：人体内产生特异性抗体的前体细胞丰度很低，即使在抗体阳性的个体中，能够产生特异性抗体的前体细胞也远远低于人杂交瘤技术所需要的能够产生特异性抗体细胞数量。因此，分离、纯化和富集特异性分泌抗体的 B 细胞成为建立全人抗体平台的关键技术之一。

## 发明内容

本发明建立了可以将能够分泌抗体的目的 B 细胞分离、纯化、富集和增殖的技术。B 细胞亚克隆后所分泌抗体的特异性可以通过 ELISPOT、ELISA 等手段进行筛选和鉴定。从单克隆培养的细胞株中获取目的抗体的基因序列，用以构建原核或真核表达载体，表达后即可重建抗体的活性。本发明既是利用该平台从类风湿关节炎病人体的 B 细胞中获得抗人 TNF $\alpha$  单克隆抗体，原核表达 Fab 和 scFv 小分子抗体，发酵、纯化后，采用聚乙二醇化（PEG 化）和纳米技术等方法体外改造和修饰，在保持其抗 TNF 活性的同时，使之更适合体内应用。

本发明一方面公开了一种抗人 TNF $\alpha$  单克隆抗体，其轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO:3，重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:4，优选的，上述抗体被 PEG 化。

本发明第二方面，公开了上述抗人 TNF $\alpha$  单克隆抗体的 Fab 抗体。优选的，上述 Fab 抗体被 PEG 化。

本发明第三方面提供了一种 PEG 化抗人 TNF $\alpha$  单克隆抗体纳米颗粒，为偶联上述 PEG 化抗人 TNF $\alpha$  单克隆抗体或其 Fab 抗体的纳米颗粒。

本发明第四方面，公开了上述 PEG 化抗人 TNF $\alpha$  单克隆抗体纳米颗粒的制备方法，包括下列步骤：



- 1) 人 TNF $\alpha$  单克隆抗体或其 Fab 抗体的表达及纯化;
- 2) 人 TNF $\alpha$  单克隆抗体或其 Fab 抗体的 PEG 化;
- 3) PEG 化的人 TNF $\alpha$  单克隆抗体或其 Fab 抗体与纳米颗粒的偶联。

较佳的, 上述抗人 TNF $\alpha$  单克隆抗体或其 Fab 抗体经大肠杆菌表达。

本发明还进一步对 PEG 化抗人 TNF $\alpha$  单克隆抗体纳米颗粒制备的最佳条件进行了优化, 包括粒径、包封率、Z-电位等的测定, 体外活性、释药特性考察等, 并且通过体外活性测定和动物实验研究了该纳米颗粒在动物体内的治疗有效性。

本发明第五方面, 公开了上述抗人 TNF $\alpha$  单克隆抗体及其 Fab 抗体、PEG 化的抗人 TNF $\alpha$  单克隆抗体及其 Fab 抗体, 以及 PEG 化抗人 TNF $\alpha$  单克隆抗体纳米颗粒在制备治疗自身免疫性疾病的药物如类风湿性关节炎药物中的应用。

本发明应用了人人杂交瘤技术结合噬菌体展示以及计算机辅助的结构分析设计等手段, 自主研发了抗 TNF 全人抗体序列, 使免疫原性降低到最低; 应用大肠杆菌表达系统表达 Fab 和 scFv 小分子抗体, 使生产成本大大降低, 并且没有补体结合和 ADCC 等效应引发的副作用; 采用纳米粒子制备技术, 表面改性技术以及与小分子抗体桥联等技术, 达到在体内减轻纳米载药颗粒与血清成分的相互作用, 减小其被内皮系统吞噬的概率, 延长在血液循环系统中的时间, 同时又实现在体内缓释的目的, 避免了小分子抗体半衰期短的缺点, 在保持其抗 TNF 活性的同时, 使之更适合体内应用。

## 具体实施方式

以下列举具体实施例进一步阐述本发明, 应理解, 实施例并非用于限制本发明的保护范围。

### 实施例 1 分泌抗人 TNF $\alpha$ 抗体的 B 细胞的获得

取活动性类风湿关节炎病人外周血 5 毫升, 用淋巴细胞分离液分离白细胞, 进行培养, 根据 ELISA 结果鉴定阳性克隆。

#### 1. 选择血样

为了获得分泌抗人 TNF $\alpha$  的人 B 细胞, 首先用人 TNF $\alpha$  (购自深圳晶美公司) 常规包被 96 孔板, 每孔用该蛋白 250ng, 包被过夜。然后, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 小时, 奶粉用 pH7.2



PBS 配制。洗涤后，加入不同病人血清 100 微升，室温温育 1 小时。然后加入过氧化物酶标记的羊抗人 IgG，室温放置 1 小时。洗涤至少 5 遍后，加入含 TMD 或其他显色剂，室温或 37 度处理 20 分钟。最后，加入终止液。加入的过氧化物显色底物加入 10 分钟后，用 50 $\mu$ l 1N 的硫酸终止反应，读取 450nm 光密度值。选取阳性且 OD 值高的血清作为获选血样。

## 2. 人 B-细胞的分离

将获选血样用 PBS (pH 7.2, 50 mM) 稀释，叠加在 Ficoll 分离液层上（通常每 50ml 分离管用 20ml Ficoll 溶液）。血液悬浮液 4 $^{\circ}$ C，3000rpm，离心 30 分钟。随后，收集主要包括外周血单核细胞 (PBMC, peripheral blood mononuclear cell) 的顶层溶液，置于新试管中。将 PBMC 用 PBS (pH 7.2, 50 mM) 充分洗涤，至少充分洗涤三次。细胞计数。

### 人 B 细胞的富集

在 PBMC 中，有人 B 细胞的多个克隆，它们之前已暴露于各种免疫原中。从获得的 PBMC 混合物中可筛选出特异的 B 细胞克隆。此处采用了 bio panning 法，该方法被证实为一种高效的方法，每单位血可获得  $4 \times 10^6$  个细胞。

bio pinning 法：用每孔 2 $\mu$ g 肿瘤坏死因子包被 24 孔板 (GREINER, GERMANY)，4  $^{\circ}$ C 过夜或 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。去 TNF 上清，在已包被的 24 孔板上每孔加 2ml 分离的 PBMC，37  $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。富集分泌抗 TNF 抗体的 B 细胞，详细步骤如下：

- 1) 500  $\mu$ l TRIS-HCL (pH 9.5) 溶液，其中兔抗人 IgG 5  $\mu$ g/ml，包被 24 孔板 (NUNC)，4  $^{\circ}$ C 过夜。
- 2) 第二天，将前述 PBMC 用 10% FBS-RPMI-1640 培养基于 37  $^{\circ}$ C 悬浮，CO<sub>2</sub>5%，在 75ml 的培养瓶中培养 2 小时。
- 3) 24 孔板去上清，用含 5% 胎牛血清 (FBS, fetal bovine serum) 的 PBS (pH 7.2, 50 mM) 洗涤一次。在去掉单核细胞后，经洗涤的富集细胞置于前述 24 孔板中，4 $^{\circ}$ C 1 小时，间歇搅拌。
- 4) 随后，孔中附着的细胞显微检测。去悬浮细胞。
- 5) 用 5% FBS-RPMI-1640 培养基洗去悬浮细胞后，将附着细胞从孔中洗下，收集。
- 6) 显微镜计数并调整细胞数。

## 3. 饲养细胞的准备

人 B 细胞体外增殖的微环境是必需的。在此建立的人 B 细胞增殖微环境最初由人骨髓基质细胞层和/或鼠腹腔渗出细胞组成，包括巨噬细胞及树突状细胞。分离的人源或鼠源的饲养细胞形成独特的单层细胞，能够产生包括造血因子在内的多种生长因子，维持人 B 细胞的增



# 说明书

殖及分化。由人或鼠的巨噬细胞及树突状细胞构成的饲养细胞初始浓度为  $3 \times 10^5$  个/ml, 37 °C 培养。用 RPMI-1640 (含 10% 胎牛血清, 每升 100 单位青霉素及 100  $\mu$ g 链霉素) 培养基, CO<sub>2</sub> 5%, 培养细胞至细胞汇集达 80—90%。

## 4. EBV (慢性伯基特淋巴瘤病毒) 转化和长期培养

用 RPMI-1640 (含 10% FBS, 每升 100 单位青霉素及 100  $\mu$ g 链霉素) 培养基, 在 96 孔板中, 让饲养细胞长满单层。在生长了单层饲养细胞的孔中加入 B 细胞。加入 B 细胞的量约为每孔 3-5 个细胞, 每孔含 200  $\mu$ l 完全培养基, 37 °C 共同培养, 同时, 将 100  $\mu$ l 来自 B958 细胞 (购自重庆医科大学病理生理教研室) 上清的 EBV 加入含有单层饲养细胞的 24 微孔板中。每 4 天, 将孔中的一半上清替换成新鲜的完全培养基, 培养 2 天后, 显微镜下 B 细胞菌落形态可见。

## 5. 抗体—反应 ELISA 筛选

用 ELISA 检测抗 TNF $\alpha$  IgG 的分泌。对经 EBV 永生法转化的人 B 细胞培养液上清的样品进行筛选。其中, 选择具有最好的结合能力的阳性克隆, 且为 IgG1。

### 实施例 2 抗人 TNF $\alpha$ 抗体基因的获得

取实施例 1 获得的阳性克隆细胞 5000-10000 个, 用 Trizol (GIBCO) 分离总 RNA, 用 MMLV 反转录酶 (Promega 公司产品) 以获取 cDNA。上述操作均按照厂家说明书进行。用下述引物和条件进行 PCR, 所用扩增酶为 ClonTech 的 Pfu 以确保扩增过程中减少可能的突变。

轻链上游引物: GACATCGAGCTGACCCAGTC (SEQ ID NO:7)

轻链下游引物: CTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC (SEQ ID NO:8)

重链上游引物: GAGGTGCAGCTGGTGGAGTC (SEQ ID NO:9)

重链下游引物: CTAGCATGTGTGAGTTTTGTCACAAG (SEQ ID NO:10)

PCR 条件:

#### a) 反应体系的组成:

成分	数量 ( $\mu$ l)
10X PCR 反应缓冲液	5
25 mM Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5
Pfu DNA 聚合酶 (5 单位/微升)	1
上游引物、下游引物 (2 微克/	各 1 微升, 共计 25 微



# 说明书

微升)	升
cDNA	1.5 $\mu$ l
灭菌三蒸水	至 50 微升

## b) 反应条件:

预变性: 94 度 2 分钟

主循环: 94 度 1 分钟, 55 度 1 分钟, 72 度 3 分钟。

循环数: 20

后延伸: 72 度 5 分钟

PCR 过程在 PROGENE Genium 热循环仪上进行。

## c) 电泳鉴定与胶回收

按照上述条件进行 PCR。完毕后将产物在 1%琼脂糖凝胶电泳上进行鉴定, 两个 PCR 的产物分别为 650bp 和 670bp 左右, 与理论大小相符。用 Promega 公司的胶回收试剂盒回收该片段, 操作按照厂家的说明书进行, 各得 DNA 约 2 微克。

## 克隆与测序:

上述产物常规克隆到 pUC57, 鉴定出正确克隆后进行测序。克隆方法采用 MBI 公司试剂盒, 操作按照说明书进行。对阳性克隆进行测序, 结果显示, 该两个克隆分别为人 IgG1 抗体的重链和轻链可变区的编码基因。测序结果如下:

V2L	ATGGACATGCGGGTTCCAGCCCAGCTTCTCGGACTTCTGCTGTTGTGGCTGCGCGGAGCACGGTGC GAAATT GTGCTCACACAGTCACCAGACTTTCAGTCTGTCACCCCTAAGGAGAAAGTGACCATCACTTGCAGGGCCTCT CAGTTCGTCGGCTATAGTATCCACTGGTACCAGCAGAAACCCGATCAGTCCCCTAAACTGCTGATCAAGTAC GCCTCTGAATCAAGGTCAGGTGTCGCCAGTCGATTTTCTGGATCAGGATCTGGTACCGACTTCACCCTCACC ATCAATAGCTTGGAGGCCGAGGACGCTGCTACCTACTACTGCCAACAAAGCCACAGCTGGCACTTTACTTTT GGCCAGGGGACCAAGCTTGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT GAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGC
-----	--



# 说明书

	<p style="margin: 0;">GAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGATTTCAGAT CCGTTAACGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTTCGTGACACATGCGGCCCGTGATATCTACGT ATGATCAGCCTCGAGGGCCACGCGTAA (SEQ ID NO: 1)</p>
V2H	<p style="margin: 0;">ATGGAGTTCGGACTCAGTTGGCTGTTCCCTGGTGGCCATCCTGAAGGGTGTGCAGTGTGAAGTCC AGCTGGTCGAGAGCGGTGGCGGGCTGGTGCAACCCGGTGGATCACTGCGGCTCAGCTGCGCTGC TAGTGGCTTTCCCTTCTCTAACCCTGGATGAATTGGGTCCGGCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTG GAGTGGTGGGTGAGATCAGGAGTAAGTCTATGAACTCCGCCACACACTATGCTGAAAGCGTGA AAGGGCGCTTCACAATCTCTAGAGACGATTCAAAGAACTCTCTGTACCTGCAGATGAACAGTCT GAAAACAGAGGACACCGCTGTGTATTACTGTGCTCGGAACTACTACGGTTCAACTTACGACCAC TGGGGCCAAGGTACACTGGTCACCGTCTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC TGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC CCGGTGTCCCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTC CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTCCCCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCCTACCGTCCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT</p>





# 说明书

CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAT GA (SEQ ID NO: 2)
--

其编码的多肽氨基酸序列分别为：

2L	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQFVGYSIHVYQQKPDQSPKLLIK YASESRSGVPSRFSGSGGTDFLTINSLEAEDAATYYCQQSHSWHFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC ( SEQ ID NO: 3)
2H	MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNHWMNWVRQAPGKLEWVGEIR SKSMNSATHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARNYYGSTYDHWGQGLVTVSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 4)

## 实施例 3 抗人 TNF $\alpha$ 抗体的制备

### 1. 人 IgG1 重链 Fc 片段编码序列的获得

为了进行全长抗体的基因表达，我们合成了人 IgG1 的重链 Fc 序列，以便构成完整的抗人 TNF $\alpha$  抗体基因。根据文献，人 IgG1 重链 Fc 片段的 DNA 编码序列如下：

人 IgG1 Fc 片段的 DNA 序列(5'  $\rightarrow$ 3' ) (SEQ ID NO: 5)

ACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACC  
CTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC



# 说明书

TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG  
GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC  
CCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC  
CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG  
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCCCCTTCTTCCTC  
TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG  
CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

上述序列根据常规基因合成方法合成。

## 2. 全长抗人TNF单抗基因及表达产物的获得

把上述 Fc 片段与重链可变区编码区按照常规 Overlapping PCR 方法进行拼接。拼接后的重链全长片段长度为：1424bp。此片段为全长的重链编码区。

SEQ ID NO: 6

ATGGAGTTCGGACTCAGTTGGCTGTTCCCTGGTGGCCATCCTGAAGGGTGTGCAGTGTGAAGTCCAGCTGGTCGAGAGC  
GGTGGCGGGCTGGTGCAACCCGGTGGATCACTGCGGCTCAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTTCCCTTCTCTAACCCTGG  
ATGAATTGGGTCCGGCAGGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGGTGGGTGAGATCAGGAGTAAGTCTATGAACTCCGCC  
ACACACTATGCTGAAAGCGTAAAGGGCGCTTACAATCTCTAGAGACGATTCAAAGAACTCTCTGTACCTGCAGATG  
AACAGTCTGAAAACAGAGGACACCGCTGTGTATTACTGTGCTCGGAACTACTACGGTTCAACTTACGACCACTGGGGC  
CAAGGTACACTGGTCACCGTCTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGC  
ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCA  
GGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG  
ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC  
AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG  
TCAGTCTTCCCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG  
GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG  
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC  
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG  
CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTG  
GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAG



CCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG  
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT  
AAAACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC  
ACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC  
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT  
GTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCC  
CTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCA  
TCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG  
GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCCCTTCTTC  
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT  
CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATAG

上述重链的全长编码区 (SEQ ID NO: 6) 和轻链前述编码区 (SEQ ID NO: 1) 分别克隆到 pOptiVec (Invitrogen 公司产品) 载体上, 按照常规方法 (参考文献: Yves Durocher, Sylvie Perret and Amine Kamen, 2002, High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells, Nucleic Acid Research, 2002, 30(2) :E9) 转染 CHO 细胞。

### 3. CHO细胞的转染与筛选

本研究采用脂质体法 (LipoFemine 2000, Invitrogen) 对 CHO 细胞进行转染, 转染试剂盒购自 Invitrogene 公司, 转染时分别取上述纯化的分别带有重链和轻链的质粒 100 微克作为 DNA 样品对 CHO 细胞进行转染, 转染操作程序按照厂家的说明书进行。

转染后的CHO细胞经连续3个月的氨甲喋呤 (MTX) 筛选, 其浓度从 0.05 $\mu$ M到 10 $\mu$ M, 每两周增加一次浓度, 每次MTX的用量约为前一次的2倍, 具体视细胞生长情况而定。细胞培养按照常规进行, 培养基为: 15%胎牛血清 (Gibco) +RPM1640/DEME。于 37 度 5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。然后按照常规极度稀释法进行单克隆化。应用ELISA方法分别检测其抗体的表达量, 总共得到 87 个克隆。

### 4. 基因表达水平的研究

经 ELISA 上述部分克隆的表达强度进行了研究, 数据显示, 通过 MTX 筛选, 获得了明显



提高的抗体表达量。

根据表达量，确定具有较好的生长特性和表达量的克隆作为继续研究的对象。

将上述的表达细胞株培养后用 Protein A-Sepharose 进行亲和层析，获得纯度达 90% 以上的抗体蛋白。

## 实施例 4 抗人 TNF $\alpha$ -Fab 的克隆与表达

10 $\mu$ g 上述 DNA 片段 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 按照常规方法克隆到 pCOM3H 载体 (Wu SC, Lin YJ, Chou JW, Lin CW. 2004, Construction and characterization of a Fab recombinant protein for Japanese encephalitis virus neutralization. Vaccine. 25;23(2):163-71) 上，电转化 5ml 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (来自 New England Biolabs 或者 Takara) 细胞后，产物在 IPTG/X-gal 平板上进行初步筛选鉴定，取 20 个菌斑接种于含有氨苄青霉素的液体 LB 培养基进行扩增，IPTG 诱导后进行 ELISA 鉴定后，进行小量 Fab 抗体制备，b. 制备的 Fab 抗体以 L929 细胞 (ECACC 85011425) 进行保护性试验，发现 Fab 抗体具有很好的保护作用。

## 实施例 5 抗人 TNF $\alpha$ 单克隆抗体及其 Fab 抗体的 PEG 化和纳米化

将实施例 3 和 4 获得的抗人 TNF $\alpha$  单克隆抗体及其 Fab 抗体 PEG 化，Fab 的 PEG 化和纯化方法参照 AP Champman 等 [参考文献: Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half life. Nature Biotech. V17 1999 August, Page 780-783] 的方法进行，获得 PEG 化的抗人 TNF $\alpha$  单克隆抗体及其 Fab 抗体。进一步再将上述 PEG 化的抗体偶联至纳米载体表面，获得 PEG 化抗人 TNF $\alpha$  单克隆抗体及其 Fab 抗体的纳米颗粒。

## 实施例 6 PEG 化抗人 TNF $\alpha$ 单克隆抗体纳米颗粒保护人 TNF $\alpha$ 攻击小鼠试验

### 1. 初步摸索 TNF $\alpha$ 致死剂量:

试剂、材料: 人 TNF $\alpha$  , Balb/c 小鼠 8 只

试验方法: alb/c 小鼠 8 只随机分为四组 (2 只/组), 经尾静脉/腹腔给予人 TNF $\alpha$  100 $\mu$ g/鼠、30 $\mu$ g/鼠、10 $\mu$ g/鼠、0 $\mu$ g/鼠, 一周内观察小鼠情况: 死亡, 毛发光泽, 便溺等, 并记录死亡时间。

### 2. 细化摸索致死剂量人 TNF $\alpha$ :

试验方法: Balb/c 小鼠 15 只随机分为 3 组, 根据上次实验小鼠全部死亡的剂量, 设计 2 个剂量组 100/50, 30/15、10/5 $\mu$ g/鼠, 经静脉/腹腔给予特定剂量的人 TNF



$\alpha$ ，一周内观察小鼠情况：死亡，毛发光泽，便溺等，记录死亡时间。

### 3. PEG 化抗人 TNF $\alpha$ 单克隆抗体纳米颗粒保护小鼠致死剂量人 TNF $\alpha$ 攻击

试验方法: Balb/c 小鼠 100 只随机分为 9 组(10 只/组); 经尾静脉/腹腔分别给予 HAI278B 20mg/kg、10mg/kg、5mg/kg、1mg/kg; 经尾静脉/腹腔分别给予 Humira 20mg/kg、10mg/kg、5mg/kg、1mg/kg、0mg/kg; 2hr 后, 经尾静脉/腹腔给予致死剂量人 TNF $\alpha$  (已经预实验确定); 一周内观察小鼠情况: 死亡, 毛发光泽, 便溺等; 记录死亡时间。

结果表明: PEG 化抗人 TNF $\alpha$  单克隆抗体纳米颗粒可有效保护人 TNF $\alpha$  的攻击, 小鼠死亡率得到明显下降。



## 一、化工领域技术资料准备的说明

**(一) 以产品为主：**技术/产品创新主要是基于化学产品，则申请时应考虑提供：

- 1、本专利的应用领域（即本专利直接所属或直接应用的具体技术领域）；
- 2、本专利的任务是什么，或要解决的技术问题是什么？
- 3、已有技术/产品的不足：即说明与本专利的内容最相似的技术/产品，需要说明已有技术/产品的结构式/分子量/配方等，以及已知功能及应用，尤其指出该已有技术/产品存在的缺点或不足之处。如有引用文献，需要说明出处。
- 4、本专利的内容：应说明本专利达到目的或解决问题的技术手段。如果应当描述产品的结构/配方，制备方法，应用，原理。说明技术优化的思路。
- 5、本专利的效果：即新化学产品的用途。
- 6、附图与说明：与发明有关的试验结果，方法流程图等等图解，附图中如涉及多个产品同时检验的情况，请用中文说明各个条带表示什么内容。
- 7、本专利的具体实施例：对照附图，说明本专利的具体试验例子，必须有相应的技术参数、数据，及具体实验条件，如是产品，则需要产品的制备、鉴定、应用实施例，要说明有益效果，可以提供对比数据为好。

**(二) 以方法或工艺为主：**技术/产品创新主要是基于方法或工艺，则申请时应考虑提供：

- 1、本专利的应用领域（即本专利直接所属或直接应用的具体技术领域）；
- 2、本专利的任务是什么，或要解决的技术问题是什么？
- 3、已有技术/产品的不足：即说明与本专利的内容最相似的方法/工艺。对于方法，需要说明已有方法的主要思路、步骤、效果，尤其指出该方法在解决本专利目的上的缺点或不足之处。对于工艺，需要说明已有工艺的主要原理及工艺步骤、工艺条件、原料，尤其指出该工艺存在的缺点或不足之处。如有引用文献，需要说明出处；如有参照产品，指出其规格、厂家。
- 4、本专利的内容：应说明本专利达到目的或解决问题的技术手段。对于方法，应当说明本方法的主要思路、步骤。对于工艺，应当说明工艺步骤、工艺条件、使用原料，如可能需说明工艺原理。说明技术优化的思路。

5、本专利的效果：有益效果可以由运算效率提高、降低能耗、产率提高、精度提高、工序简化、控制方便，以及有用性能的出现等方面反映出来。

6、附图与说明：如有必要可以给出工艺流程图。

7、本专利的具体实施例：说明本专利的具体试验例子，必须有相应的技术参数、数据。数据说明可以采用图表形式。说明有益效果，以提供对比数据为好。

**(三) 以装置或设备为主：**技术/产品创新主要是基于装置或设备，则申请时应提供：

1、本专利的应用领域（即本专利直接所属或直接应用的具体技术领域）：

2、本专利的任务是什么，或要解决的技术问题是什么？

3、已有技术/产品的不足：即说明与本专利的内容最相似的技术/产品，需要说明已有技术/产品的主要结构及原理，尤其指出该已有技术/产品存在的缺点或不足之处。如有引用文献，需要说明出处；如有参考产品，指出其型号、厂家。

4、本专利的内容：应说明本专利达到目的或解决问题的技术手段。如果涉及装置或设备，应当描述装置或设备的机械构成，尤其说明各组成部分之间的相互关系，例如形状、位置、连接关系、相互作用原理，创新点对于装置或设备的作用。说明技术优化的思路。

5、本专利的效果：有益效果可以由产率、质量、精度和效率的提高，能耗、原材料、工序的节省，加工、操作、控制、使用的简便，环境污染的治理或者根治，以及有用性能的出现等方面反映出来。

6、附图与说明：装置或设备的图解，图应以机械制图的标准绘制，实用新型申请必须带附图。

7、本专利的具体实施例：对照附图，说明本专利的具体试验例子，必须有相应的技术参数、数据，如需要说明有益效果，可以提供对比数据为好。

## 二、生物医药领域技术资料准备的提纲

**(一) 专利申请以药物产品和用途为主：**产品创新主要是基于药物的活性成分或配方，则申请时应考虑提供：

1、本专利的应用领域（即本专利直接所属或直接应用的具体技术领域）：

- 2、本专利的任务是什么，或要解决的技术问题是什么？
- 3、已有技术/产品的不足：即说明与本专利的内容最相似的产品，需要说明已有药物产品的结构式/分子量/序列等，以及已知的功能及应用，尤其指出该已有药物产品存在的缺点或不足之处。对于药物配方，需要说明已有配方的组成成份、比例、成份性能、用途，尤其指出该配方在用途方面的缺点或不足之处。如有引用文献，需要说明出处；如有参照产品，指出其规格、厂家。
- 4、本专利的内容：应说明本专利达到目的或解决问题的技术手段。对于药物活性成分：应当描述该活性成分的名称及结构式/序列（包括各种官能基团、分子立体构型等），制备方法，应用，原理；并应当记载与发明要解决的技术问题相关的化学、物理性能参数（如各种定性或者定量数据和图谱等）。对于配方：应当说明配方组份、各组分可选择的范围、各组分的含量范围、各组份的性质，配方用途，如可能需说明配方制作工艺。说明技术优化的思路。  
对于新的药物化合物或者药物组合物，应当记载其具体的医药用途或者药理作用，同时还应当记载其有效量及使用方法。如果本领域技术人员无法根据现有技术预测发明能够实现所述医药用途、药理作用，则应当记载对于本领域技术人员来说，足以证明发明的技术方案可以解决预期要解决的技术问题或者达到预期的技术效果的实验室试验（包括动物实验）或者临床试验的定性或者定量数据。
- 5、本专利的效果：即新药物产品的用途，如用作制备治疗某类疾病的药或者诊断某类疾病等等。
- 6、附图与说明：与发明有关的试验结果，方法流程图等等图解，附图中如涉及多个产品同时检验的情况，请用中文说明各个条带表示什么内容。
- 7、本专利的具体实施例：对照附图，说明本专利的具体试验例子，必须有相应的技术参数、数据，及具体实验条件。如是药物化合物，则需要化合物的制备、鉴定、应用实施例，要说明有益效果，可以提供对比数据为好。

**（二）以方法或工艺为主：**技术/产品创新主要是基于药物产品的制备方法或工艺，则申请时应考虑提供：

- 1、本专利的应用领域（即本专利直接所属或直接应用的具体技术领域）：
- 2 本专利的任务是什么，或要解决的技术问题是什么？



- 3、已有技术/产品的不足：即说明与本专利的内容最相似的方法/工艺。对于方法，需要说明已有方法的主要思路、步骤、效果，尤其指出该方法在解决本专利目的上的缺点或不足之处。对于工艺，需要说明已有工艺的主要原理及工艺步骤、工艺条件、原料，尤其指出该工艺存在的缺点或不足之处。如有引用文献，需要说明出处；如有参照产品，指出其规格、厂家。
- 4、本专利的内容：应说明本专利达到目的或解决问题的技术手段。对于方法，应当说明本方法的主要思路、步骤。对于工艺，应当说明工艺步骤、工艺条件、使用原料，如可能需说明工艺原理。说明技术优化的思路。
- 5、本专利的效果：有益效果可以由运算效率提高、降低能耗、产率提高、精度提高、工序简化、控制方便，以及有用性能的出现等方面反映出来。
- 6、附图与说明：如有必要可以给出工艺流程图。
- 7、本专利的具体实施例：说明本专利的具体试验例子，必须有相应的技术参数、数据。数据说明可以采用图表形式。说明有益效果，以提供对比数据为好。

**(三) 以医疗器具为主：**技术/产品创新主要是基于医疗器具，则申请时应提供：

- 1、本专利的应用领域（即本专利直接所属或直接应用的具体技术领域）：
- 2、本专利的任务是什么，或要解决的技术问题是什么？
- 3、已有技术/产品的不足：即说明与本专利的内容最相似的产品，需要说明已有产品的主要结构及原理，尤其指出该已有产品存在的缺点或不足之处。如有引用文献，需要说明出处；如有参考产品，指出其型号、厂家。
- 4、本专利的内容：应说明本专利达到目的或解决问题的技术手段。如果涉及器械或设备，应当描述器械或设备的机械构成，尤其说明各组成部分之间的相互关系，例如形状、位置、连接关系、相互作用原理，创新点对于装置或设备的作用。说明技术优化的思路。
- 5、本专利的效果：有益效果可以由质量、精度和效率的提高，原材料、工序的节省，加工、操作、控制、使用的简便，以及有用性能的出现等方面反映出来。
- 6、附图与说明：器械或设备的图解，图应以机械制图的标准绘制，实用新型申请必须带附图。

7、本专利的具体实施例：对照附图，说明本专利的具体试验例子，必须有相应的技术参数、数据，如需要说明有益效果，可以提供对比数据为好。

更详细的信息，您可以咨询上海光华专利事务所化工医药部经理，许律师，  
021-51096606\*829; email:xyl@iprtop.com。

关于我们的情况，您可以浏览网页：<http://www.iprtop.com>