



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107522785 A

(43)申请公布日 2017. 12. 29

(21)申请号 201610460704.6

C12N 15/06(2006.01)

(22)申请日 2016.06.22

(71)申请人 北京大学

地址 100871 北京市海淀区颐和园路5号

(72)发明人 沈丽 刘旭杰 王凡

(74)专利代理机构 济南鼎信专利商标代理事务
所(普通合伙) 37245

代理人 彭成

(51) Int. Cl.

C07K 16/32(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

C12N 5/20(2006.01)

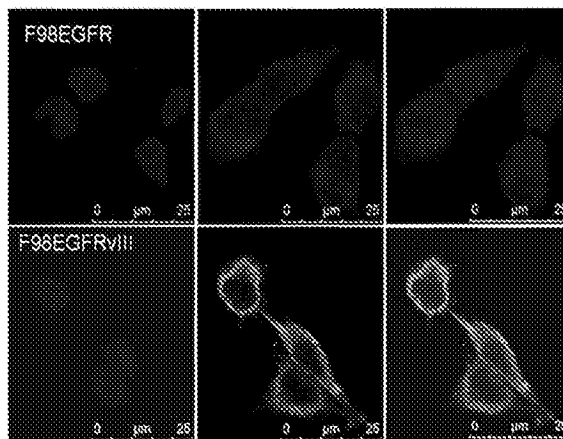
权利要求书1页 说明书10页 附图10页

(54)发明名称

抗EGFR突变体III单克隆抗体、制备方法及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种抗EGFR突变体III单克隆抗体,该抗EGFR突变体III单克隆抗体的V_H链的互补区CDR具有选自下组的CDR氨基酸序列:SEQ ID NO 1所示的CDR1,SEQ ID NO 2所示的CDR2,SEQ ID NO 3所示的CDR3。本发明的抗EGFR突变体III单克隆抗体,通过实验验证其与野生型EGFR无交叉反应,免疫印迹和免疫荧光实验表明该抗EGFR突变体III单克隆抗体具有很高的特异性和很高敏感性,可以准确检测肿瘤细胞系以及肿瘤组织中EGFR突变体III的表达情况,可很好的用于肿瘤组织(细胞)EGFRvIII的检测,可广泛应用于肿瘤细胞的检测和治疗领域。



1. 一种抗EGFR突变体III单克隆抗体,其特征在于,该抗EGFR突变体III单克隆抗体的V_H链的互补区CDR具有选自下组的CDR氨基酸序列:SEQ ID NO 1所示的CDR1,SEQ ID NO 2所示的CDR2,SEQ ID NO3所示的CDR3;该抗EGFR突变体III单克隆抗体的V_L链的氨基酸序列为SEQ ID NO 4所示。
2. 根据权利要求1所述的抗EGFR突变体III单克隆抗体,其特征在于,所述抗EGFR突变体III单克隆抗体蛋白的分子量为150KD。
3. 根据权利要求1所述的抗EGFR突变体III单克隆抗体,其特征在于,所述抗EGFR突变体III单克隆抗体为IgG2a亚型。
4. 根据权利要求1所述的抗EGFR突变体III单克隆抗体,其特征在于,所述抗EGFR突变体III单克隆抗体与野生型EGFR无交叉反应。
5. 根据权利要求1所述的抗EGFR突变体III单克隆抗体,其特征在于,所述抗EGFR突变体III单克隆抗体的免疫抗原为氨基酸多肽序列为SEQ ID NO5、SEQ ID NO6、SEQ ID NO7与蛋白KLH偶联得到的;所述氨基酸多肽的纯度大于90%。
6. 一种具有权利要求1所述的抗EGFR突变体III单克隆抗体的V_H链的互补区CDR和V_L链氨基酸序列的衍生物。
7. 权利要求1至权利要求6中任一项所述的抗EGFR突变体III单克隆抗体在制备治疗乳腺癌、恶性胶质瘤、肝癌、胃癌、结肠癌、肺癌、卵巢癌的药物中的应用。
8. 权利要求1至权利要求6中任一项所述的抗EGFR突变体III单克隆抗体在制备检测恶性肿瘤的免疫检测试剂盒中的应用。
9. 一种分泌权利要求1所述的抗EGFR突变体III单克隆抗体的杂交瘤细胞系。
10. 一种制备权利要求9所述的杂交瘤细胞系的方法,其特征在于包括以下步骤:
 - 步骤A:构建免疫抗原,将序列分别为SEQ ID NO5、SEQ ID NO6、SEQ ID NO7的氨基酸多肽与载体蛋白KLH偶联,获得免疫抗原;
 - 步骤B:将所述免疫抗原与福氏完全佐剂混合,分点皮下注射三只Ba1b/c小鼠,每只Ba1b/c小鼠每次注射量为80-120μg;
 - 步骤C:将所述免疫抗原与福氏不完全佐剂的乳化液,在进行细胞融合前3天,经腹腔注射三只Ba1b/c小鼠含100-200ug抗原的生理盐水溶液;
 - 步骤D:取免疫小鼠的尾血进行间接ELISA法检测,确定其中一只Ba1b/c脾细胞为备选的杂交瘤细胞制备;
 - 步骤E:将所述脾细胞与SP2/0细胞按10:1的比例以500g/L的PEG4000进行融合,用HAT培养液选择培养、筛选杂交瘤细胞株;
 - 步骤F:重复所述步骤E,筛选得到稳定分泌所述抗EGFR突变体III的四株单克隆抗体杂交瘤细胞系;
 - 步骤G:对所述四株杂交瘤细胞系所得的单克隆抗体进行效价检测,选取信号最强的杂交瘤细胞系;
 - 步骤H:将所述步骤G中得到的杂交瘤细胞系传代培养,得到可以持续稳定分泌抗EGFRvIII的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

抗EGFR突变体III单克隆抗体、制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体领域,特别是涉及抗EGFR突变体III(EGFRvIII)的单克隆抗体、制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 表皮生长因子受体(EGFR)是一个由原癌基因c-(erbB)-1编码的相对分子质量为170 000的跨膜糖蛋白。它是erbB受体酪氨酸激酶家族成员之一,具有受体酪氨酸激酶的活性。该家族包括:EGFR或人类EGF相关受体(HER)-1(erbB-1)、HER2(neu或erbB2)、HER3(erbB3)和HER4(erbB-4),均定位于细胞膜上。人EGFR基因位于第7号染色体p13~q22区,全长200kb,由28个外显子组成,编码1186个氨基酸。EGFRvIII则是由EGFR基因内5'端外显子2~7发生缺失型变异而产生。

[0003] EGFRvIII缺失801个碱基对,对应于EGFR胞外段6~273位氨基酸,并在断端融合处产生了一个甘氨酸。EGFR包括胞外段、跨膜区和胞内段。胞外段由I、II、III、IV四个区组成。EGFRvIII缺失了胞外I区和II区的大部分,丧失了与配体的结合位点,因而不具备与配体结合的能力。

[0004] 到目前为止,EGFRvIII在27%~50%的乳腺癌、将近61%的恶性胶质瘤、39%的肺癌以及73%的卵巢癌中均被检测到,而在多种正常组织中未检测到,如乳腺、小肠、肾、睾丸、肺、脑、肝、皮肤、末梢神经、淋巴结、卵巢、骨髓、脾、子宫内膜和胎盘。在如此多的肿瘤中检测到EGFRvIII的高表达,表明EGFRvIII在致瘤过程中起重要作用,其表达与肿瘤细胞致瘤性的提高有着密切的关系。

[0005] 目前,市场上尚无商品化的靶向EGFRvIII的小鼠单克隆抗体出售,兔多克隆抗体的特异性比较差,且由于多克隆抗体和单克隆抗体的制备方法以及免疫抗原的设计等因素,文献报道的和市场上已有的商品化的抗EGFRvIII的抗体均不同程度上与野生的EGFR存在交叉反应,抗EGFRvIII的抗体的特异性差,测得结果的准确性差。亟待进一步开发新的与野生的EGFR不存在交叉反应的抗体。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种抗EGFR突变体III单克隆抗体,该单克隆抗体的应用以及该单克隆抗体的方法,该单克隆抗体的特异性好,与野生型EGFR无交叉反应。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明一种抗EGFR突变体III单克隆抗体,该抗EGFR突变体III单克隆抗体的V_H链的互补区CDR具有选自下组的CDR氨基酸序列:

[0008] SEQ ID NO 1所示的CDR1,SEQ ID NO 2所示的CDR2,SEQ ID NO3所示的CDR3;

[0009] 该抗EGFR突变体III单克隆抗体的V_L链的氨基酸序列为SEQ ID NO 4所示。

[0010] 所述抗EGFR突变体III单克隆抗体蛋白的分子量为150KD。

[0011] 所述抗EGFR突变体III单克隆抗体为IgG2a亚型。

[0012] 所述抗EGFR突变体III单克隆抗体与野生型EGFR无交叉反应。

- [0013] 所述抗EGFR突变体III单克隆抗体的免疫抗原为氨基酸多肽序列为SEQ ID N05、SEQ ID N06、SEQ ID N07与蛋白KLH偶联得到的；
- [0014] 所述氨基酸多肽的纯度大于90%。
- [0015] 本发明提供一种具有上述所述的抗EGFR突变体III单克隆抗体的V_H链的互补区CDR和V_L链氨基酸序列的衍生物。
- [0016] 本发明还提供抗EGFR突变体III单克隆抗体在制备治疗乳腺癌、恶性胶质瘤、肺癌、卵巢癌的药物中的应用。
- [0017] 所述的抗EGFR突变体III单克隆抗体在制备检测恶性肿瘤的免疫检测试剂盒中的应用。
- [0018] 本发明提供一种分泌所述的抗EGFR突变体III单克隆抗体的杂交瘤细胞系。
- [0019] 本发明提供一种制备所述的杂交瘤细胞系的方法,其包括以下步骤:
- [0020] 步骤A:构建免疫抗原,将序列分别为SEQ ID N05、SEQ ID N06、SEQ ID N07的氨基酸多肽与载体蛋白KLH偶联,获得免疫抗原;
- [0021] 步骤B:将所述免疫抗原与福氏完全佐剂混合,分点皮下注射三只Balb/c小鼠,每只Balb/c小鼠每次注射量为80-120μg;
- [0022] 步骤C:将所述免疫抗原与福氏不完全佐剂的乳化液,在进行细胞融合前3天,经腹腔注射三只Balb/c小鼠含100-200ug抗原的生理盐水溶液;
- [0023] 步骤D:取免疫小鼠的尾血进行间接ELISA法检测,确定其中一只Balb/c脾细胞为备选的杂交瘤细胞制备;
- [0024] 步骤E:将所述脾细胞与SP2/0细胞按10:1的比例以500g/L的PEG4000进行融合,用HAT培养液选择培养、筛选杂交瘤细胞株;
- [0025] 步骤F:重复所述步骤E,筛选得到稳定分泌所述抗EGFR突变体III的四株单克隆抗体杂交瘤细胞系;
- [0026] 步骤G:对所述四株杂交瘤细胞系所得的单克隆抗体进行效价检测,选取信号最强的杂交瘤细胞系;
- [0027] 步骤H:将所述步骤G中得到的杂交瘤细胞系传代培养,得到可以持续稳定分泌抗EGFRvIII的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。
- [0028] 本发明的抗EGFR突变体III单克隆抗体,通过实验验证其与野生型EGFR无交叉反应,免疫印迹和免疫荧光实验表明该抗EGFR突变体III单克隆抗体具有很高的特异性和很高敏感性,可以准确检测肿瘤细胞系以及肿瘤组织中EGFR突变体III(EGFRvIII)的表达情况,可很好的用于肿瘤组织(细胞)EGFRvIII的检测,可广泛应用于肿瘤细胞的检测和治疗领域。
- [0029] 下面通过附图和实施例,对本发明的技术方案做进一步的详细描述。

附图说明

- [0030] 上述仅是本发明技术方案的概述,为了能够更清楚了解本发明,以下结合附图与具体实施方式对本发明作进一步的详细说明。
- [0031] 下面结合附图和具体实施方式对本发明做进一步详细说明。
- [0032] 图1为本发明的抗EGFRvIII单克隆抗体的SDS-PAGE电泳图;

- [0033] 图2为本发明的抗EGFRvIII单克隆抗体的免疫球蛋白亚类鉴定图；
- [0034] 图3为本发明的抗EGFRvIII单克隆抗体的western-blot图；
- [0035] 图4为现有的靶向EGFRvIII的兔源多克隆抗体的免疫荧光实验结果图；
- [0036] 图5为本发明的本发明的抗EGFRvIII的单克隆抗体的免疫荧光实验结果图；
- [0037] 图6为本发明的人星形胶质细胞瘤II期抗EGFRvIII的单克隆抗体免疫组织化学染色结果图；
- [0038] 图7为本发明的人肝细胞肝癌III期抗EGFRvIII的单克隆抗体免疫组织化学染色结果图；
- [0039] 图8为本发明的人浆液性乳头状卵巢癌IIc期抗EGFRvIII的单克隆抗体免疫组织化学染色结果图；
- [0040] 图9为本发明的人低分化胃腺癌IIIa期抗EGFRvIII的单克隆抗体免疫组织化学染色结果图；
- [0041] 图10为本发明的人乳腺浸润性导管癌IIIb期抗EGFRvIII的单克隆抗体免疫组织化学染色结果图；
- [0042] 图11为本发明的人结肠黏液癌IIIc期抗EGFRvIII的单克隆抗体免疫组织化学染色结果图；
- [0043] 图12为本发明的人低分化肺腺癌Ib期抗EGFRvIII的单克隆抗体免疫组织化学染色结果图。

具体实施方式

[0044] 本发明的抗EGFR突变体III单克隆抗体,EGFR突变体III即EGFRvIII表皮生长因子受体III型突变体,该抗EGFR突变体III单克隆抗体的V_H链的互补区CDR具有选自下组的CDR氨基酸序列:SEQ ID NO1所示的CDR1,SEQ ID NO2所示的CDR2,SEQ ID NO3所示的CDR3。该抗EGFR突变体III单克隆抗体的V_L链的氨基酸序列如SEQ ID NO 4所示,SEQ ID NO4:

[0045]

PKFLLVSPGDRVTITCKASQSVSNDVDWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFITSTVQAEDLA
VYFCQQDYSSPWTFGGGTKLEIK。

[0046] 本发明的抗EGFR突变体III单克隆抗体是以EGFR突变体III(EGFRvIII)为目标,以三条氨基酸多肽(SEQ ID NO 5、SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 7)与载体蛋白偶联作为免疫原,通过免疫小鼠获得,其中载体蛋白为蛋白KLH。抗EGFR突变体III单克隆抗体蛋白的分子量为150KD。

[0047] 表一 本发明的抗原的三条氨基酸多肽序列

[0048]

| 编号 | 氨基酸序列 |
|-------------|---------------|
| SEQ ID NO 5 | LEEKKGNYVVDHC |
| SEQ ID NO 6 | EKKGNYVVDHC |
| SEQ ID NO7 | KKGNYVVDHC |

[0049] 本发明提供具有抗EGFR突变体III单克隆抗体的V_H链的互补区CDR和V_L链氨基酸序列的衍生物。

[0050] 本发明还提供一种纯化的核酸分子,其组成为能够编码本发明抗EGFR突变体III的单克隆抗体的重链或者轻链或者抗原结合部分的核酸序列。进一步得,本发明还提供含有该核酸序列的载体,该载体优化为含有包括可以联系到该核酸分子的表达调控序列。本发明提供一种含有该核酸分子的宿主细胞。本发明还提供一种产生抗EGFR突变体III的单克隆抗体的细胞株。

[0051] 本发明的分泌抗EGFR突变体III单克隆抗体的杂交瘤细胞系,该杂交瘤细胞系的具体构建过程如下:

[0052] 实施例1、本发明的杂交瘤细胞系的建立

[0053] 步骤一、实验材料准备:

[0054] 1、免疫原:以EGFRvIII为靶目标,采用化学合成的方式制备三条氨基酸多肽,其中三条氨基酸多肽的序列分别为SEQ ID NO5:LEEKKGNYVVTDHC;SEQ ID NO6:EKKGNVYVTDHC;SEQ ID NO7:KKGNYVVTDHC。每条氨基酸多肽的纯度要求大于90%,三条多肽与KLH偶联制备成免疫原。

[0055] 2、培养基:DMEM培养基购于Hyclone公司;HAT、HT选择培养基、降植烷购于sigma公司。

[0056] 3、实验动物:三只Balb/c小鼠分别编号为:1#、2#、3#,均为8-12周龄,雌性,SPF级动物培养。

[0057] 4、其他材料:福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂购于Sigma公司;PEG4000购于Fluka公司;HRP-山羊抗小鼠IgG抗体购于Jackson Immune公司;其余试剂均为国产分析纯产品。

[0058] 步骤二、动物免疫

[0059] 1)基础免疫:将抗原与福氏完全佐剂等体积混合并充分乳化,分点皮下注射,每只Balb/c小鼠每次注射量为80-120 μ g,较佳的为100 μ g。

[0060] 2)加强免疫:加强免疫采用抗原与福氏不完全佐剂的乳化液。在进行细胞融合前3天,经腹腔注射含100-200 μ g抗原的生理盐水溶液,较佳的为150 μ g抗原的生理盐水溶液。

[0061] 3)尾血检测:取免疫小鼠的尾血进行间接ELISA法检测。间接ELISA法的操作步骤如下:各取三条多肽100ng的包板,以三只免疫后的小鼠的尾血作为一抗进行孵育,之后每孔加1:2000HRP-山羊抗小鼠IgG 100 μ l,最后测定450nm OD值。

[0062] 结果:以2#免疫小鼠的尾血作为一抗对所有的三条多肽反应的450nmOD读值为最高。因此选用2#免疫小鼠的脾细胞进行杂交瘤细胞的制备。

[0063] 步骤三、杂交瘤细胞的制备

[0064] 按常规方法收集小鼠的脾细胞与SP2/0细胞按20:1至5:1的比例以400-600g/L的PEG4000进行融合。小鼠的脾细胞与SP2/0细胞的比例,较佳的为10:1,PEG4000较佳的浓度为500g/L。用HAT培养液选择培养,融合后10~15天,取上清采用间接ELISA法筛选分泌抗抗原的杂交瘤细胞株。对所得阳性克隆杂交瘤细胞株采用有限稀释法进行亚克隆。间接ELISA法的操作步骤如下:各取三条多肽100ng的包板,用免疫小鼠尾血1:2000作为阳性对照,无克隆生长的培养基上清和正常小鼠血清作为阴性对照,每孔加1:2000HRP-山羊抗小鼠IgG 100 μ l,最后测定450nm OD值。凡OD₄₅₀值大于阴性对照2倍以上者,即可初步判定为阳性克隆。

[0065] 步骤四、杂交瘤细胞系的建立

[0066] 重复步骤2,进行2次细胞融合,经过4次亚克隆和间接ELISA筛选,得到4株稳定分泌抗EGFR突变体III(EGFRvIII)的单克隆抗体的杂交瘤细胞系,四株单克隆抗体杂交瘤细胞系的编号分别:4G1、4D12、7C7、1G8。

[0067] 步骤五、应用上述杂交瘤细胞系所得单抗的效价检测

[0068] 1)细胞培养液上清效价测定:间接ELISA法检测上述杂交瘤细胞培养上清效价为:1:50000~1:100000。其中以4G1的信号最强。

[0069] 2)小鼠腹水效价测定:间接ELISA法检测上述杂交瘤细胞制备的腹水效价为:1:500000~1:1000000。其中以4G1的信号最强。

[0070] 步骤六、杂交瘤细胞系的传代培养

[0071] 将上述杂交瘤细胞系在含有10%胎牛血清的DMEM培养基中继续进行培养、传代,培养到10代后,杂交瘤细胞系仍然能够生长良好、稳定传代,培养液上清效价仍然可以达到1:10000以上。本发明所得杂交瘤细胞系能够稳定传代,可以持续、稳定分泌抗EGFRvIII的单克隆抗体。

[0072] 获得产生所需的单克隆抗体的杂交瘤细胞后,将一部分杂交瘤细胞保存。保存方法如下:准备材料,细胞:取对数生长期的细胞;10%二甲基亚砷保护液(二甲基亚砷能损坏滤器,而又被高压所破坏,所以不能过滤或高压消毒。其本身就是毒品,无菌):含10%二甲基亚砷、20%灭活胎牛血清,70%RPMI-1640液;20%FBS-1640培养液:含青霉素100U/ml,链霉素100μg/ml;灭菌的2ml安瓶等。

[0073] 2、操作方法,(1)去掉细胞培养瓶中的旧的培养液,加入10%FBS-1640液,使细胞悬浮。(2)1000rpm/min离心10min,去上清。细胞沉淀用10%二甲基亚砷保护液制成悬液,使成 1.0×10^7 细胞/ml。(3)取样,台盼兰染色,计数活细胞,应在95%以上。(4)用注射器将细胞分装安瓶,每瓶0.5ml~1.0ml,熔封安瓶。(5)放4℃×2h。(6)放液氮罐气态部分(-70℃)15h。(7)转入液氮部分。

[0074] 实施例2本发明的抗EGFRvIII的单克隆抗体的制备

[0075] 选择成年BALB/c小鼠,腹腔接种降植烷,每只小鼠0.5ml。7-10天后腹腔接种编号为4G1的杂交瘤细胞,每只小鼠 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个。间隔5天后,待腹部明显膨大,以手触摸时,皮肤有紧张感,即可用9号针头采集腹水。

[0076] 将腹水离心(13000rpm/min 30分钟),除去细胞成分和其他的沉淀物,收集上清。用Protein G-Sepharose CL-4B进行纯化,上柱液为20mM的PBS缓冲液,柱层析洗脱液为:pH=2.7,20mM的甘氨酸缓冲液,得到抗EGFRvIII的单克隆抗体。

[0077] 实施例3本发明的抗EGFRvIII的单克隆抗体的检测

[0078] 请配合参阅图1所示,本发明的抗EGFRvIII的单克隆抗体非变性非还原胶SDS-PAGE电泳结果,通过非变性非还原胶电泳得知,4G1单克隆抗体中只有150KD大小的蛋白,无其它的杂蛋白。

[0079] 其中,M是蛋白分子量标准(kDa),4G1为本发明获得的抗EGFRvIII单克隆抗体,通过SDS-PAGE电泳鉴定,本发明的抗EGFRvIII单克隆抗体的纯度在在95%以上

[0080] 实施例4本发明的单克隆抗体IgG亚型鉴定

[0081] 请配合参阅图2所示,本发明采用间接ELISA法,使用抗小鼠各种Ig亚型的抗体鉴定上述杂交瘤细胞产生的抗体的Ig亚型,通过抗体亚型鉴定,本发明的抗EGFRvIII单克隆

抗体4G1抗体属于IgG2a亚型。

[0082] 实施例5本发明的单克隆抗体的western-blot鉴定

[0083] 请配合参阅图3所示,本发明的单克隆抗体western-blot鉴定结果,通过western-blot鉴定,4G1单克隆抗体特异性地与EGFRvIII蛋白结合,且与野生型EGFR无交叉反应。

[0084] 其中,M是是蛋白分子量标准(kDa)。F98npEGFRvIII、F98两种细胞分别是EGFRvIII蛋白表达阳性和阴性的褐鼠脑胶质瘤细胞系,其均购自美国模式培养物集存库(ATCC)。UM-22B是表达野生型EGFR阳性,EGFRvIII蛋白阴性的人头颈癌细胞系,其是获赠于美国密歇根大学。

[0085] 实施例6本发明的抗EGFRvIII的单克隆抗体与现有的EGFRvIII的兔源多克隆抗体的免疫荧光实验

[0086] 请配合参阅图4和图5所示,如图4所示,市场上的靶向EGFRvIII的兔源多克隆抗体的免疫荧光实验,该靶向EGFRvIII的兔源多克隆抗体的特异性较差,该靶向EGFRvIII的兔源多克隆抗体除能够结合EGFRvIII外,亦能结合野生型F98EGFR。该靶向EGFRvIII的兔源多克隆抗体与野生型F98EGFR存在交叉反应。

[0087] 如图5所示,本发明的抗EGFRvIII的单克隆抗体具有良好的靶标特异性,其只与EGFRvIII结合,且不和野生型F98EGFR结合,该抗EGFRvIII的单克隆抗体与野生型F98EGFR无交叉反应。因此,本发明的抗EGFRvIII的单克隆抗体的特异性好,可以很好的特异性的与EGFRvIII结合。

[0088] 实施例6人星形胶质细胞瘤免疫组化染色检测实验

[0089] 请配合参阅图6所示,采用本发明的抗EGFRvIII的单克隆抗体对临床病理标本的组织芯片进行免疫组织化学染色,在人星形胶质细胞瘤II期抗EGFRvIII的单克隆抗体免疫组织化学染色结果图中,可见细胞质A中表达EGFRvIII。

[0090] 实施例7人肝细胞肝癌免疫组化染色检测实验

[0091] 请配合参阅图7所示,利用本发明的抗EGFRvIII的单克隆抗体进行免疫组合实验,在人肝细胞肝癌III期抗EGFRvIII的单克隆抗体免疫组织化学染色结果图中,可见细胞质B中表达EGFRvIII。

[0092] 实施例8人浆液性乳头状卵巢癌免疫组化染色检测实验

[0093] 请配合参阅图8所示,利用本发明的抗EGFRvIII的单克隆抗体进行实验,在人浆液性乳头状卵巢癌IIc期抗EGFRvIII的单克隆抗体免疫组织化学染色结果图中,可见细胞质C中表达EGFRvIII。

[0094] 实施例9人低分化胃腺癌免疫组化染色检测实验

[0095] 请配合参阅图9所示,利用本发明的抗EGFRvIII的单克隆抗体进行实验,在人低分化胃腺癌IIIa期抗EGFRvIII的单克隆抗体免疫组织化学染色结果图,可见细胞质D中表达EGFRvIII。

[0096] 实施例10人乳腺浸润性导管癌免疫组化染色检测实验

[0097] 请配合参阅图10所示,采用本发明的抗EGFRvIII的单克隆抗体进行实验,在人乳腺浸润性导管癌IIIb期抗EGFRvIII的单克隆抗体免疫组织化学染色结果图中,可见细胞质E中表达EGFRvIII。

[0098] 实施例11人结肠黏液癌免疫组化染色检测实验

[0099] 请配合参阅图11所示,采用本发明的抗EGFRvIII的单克隆抗体进行实验,在人结肠黏液癌IIIc期抗EGFRvIII的单克隆抗体免疫组织化学染色结果图中,可见细胞质F中表达EGFRvIII。

[0100] 实施例12人低分化肺腺癌免疫组化染色检测实验

[0101] 请配合参阅图12所示,利用本发明的抗EGFRvIII的单克隆抗体进行实验,在人低分化肺腺癌Ib期抗EGFRvIII的单克隆抗体免疫组织化学染色结果图中,可见细胞质G中表达EGFRvIII。

[0102] 本发明的抗EGFR突变体III单克隆抗体在制备检测恶性肿瘤的免疫检测试剂盒中的应用,通过以上实施例可以看出,本发明的抗EGFR突变体III单克隆抗体在检测人星形胶质细胞瘤、人肝细胞肝癌、人浆液性乳头状卵巢癌、人低分化胃腺癌、人乳腺浸润性导管癌、人结肠黏液癌、人低分化肺腺癌中具有很好的特异性,检测结果准确。此外,本发明的抗EGFR突变体III单克隆抗体在制备治疗乳腺癌、恶性胶质瘤、肝癌、肺癌、胃癌、结肠癌、卵巢癌的药物中的应用。

[0103] 本发明能够提供一种癌症诊断的方法(例如,肺癌,非小细胞肺癌,肝癌,结直肠癌,乳头状甲状腺癌,胰腺癌,食道癌,前列腺癌,卵巢癌,胶质瘤,乳腺癌,胃癌),其主要步骤包括:用本发明抗EGFR突变体III单克隆抗体接触来自于检测目标的生物学样本;检测抗体或者其部分与样本是否结合;如果抗EGFR突变体III抗体与样本存在结合则表明被检测对象是癌症,或者存在发展成癌症的风险。

[0104] 本发明的抗EGFR突变体III单克隆抗体,通过实验验证其与野生型EGFR没有交叉反应,免疫印迹和免疫荧光实验表明该抗EGFR突变体III单克隆抗体具有很高的特异性和很高敏感性,可以准确检测肿瘤细胞系以及肿瘤组织中EGFR突变体III(EGFRvIII)的表达情况,可很好的用于肿瘤组织(细胞)EGFRvIII的检测,在评价肿瘤的恶性程度中将会得到广泛应用。

[0105] 以上所述,仅是本发明的部分实施例而已,并非对本发明作任何形式上的限制,本领域技术人员利用上述揭示的技术内容做出些许简单修改、等同变化或修饰,均落在本发明的保护范围内。

序列表

<110> 北京大学

<120> EGFR 突变体 III 单克隆抗体、制备方法及其应用

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<223> 重链 CDR1

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp Ile His

1 5 10

[0106]

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<223> 重链 CDR2

<400> 2

Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Glu

1 5 10 15

Asn

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<223> 重链 CDR3

<400> 3

Gly Thr Arg Gly Phe Ala Tyr

1 5

<210> 4

<211> 100

<212> PRT

<213> 人工序列

<223> 轻链

<400> 4

Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Pro Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

1 5 10 15

[0107] Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys

20 25 30

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr

35 40 45

Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe

50 55 60

Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe

65 70 75 80

Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

85 90 95

Leu Glu Ile Lys

100

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 5

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Cys

1 5 10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

[0108]

<400> 6

Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Cys

1 5 10

<210>7

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Cys

1 5 10

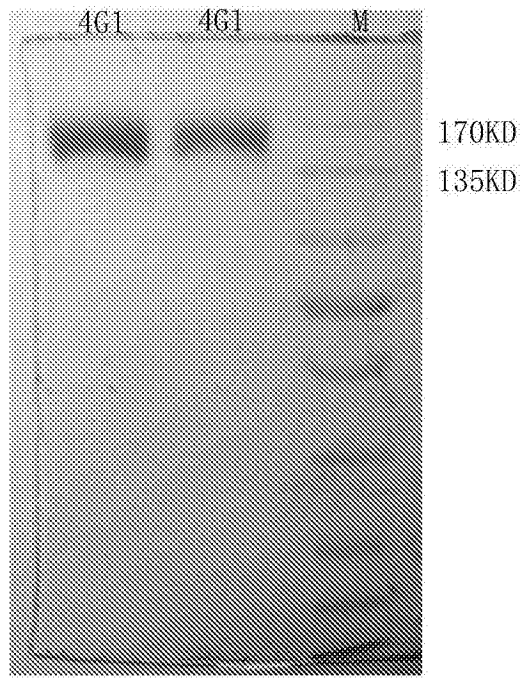


图1

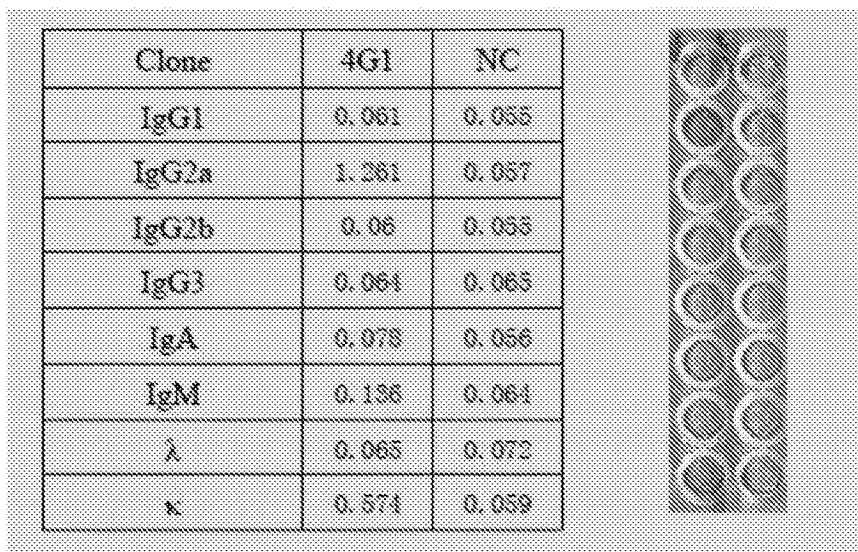


图2

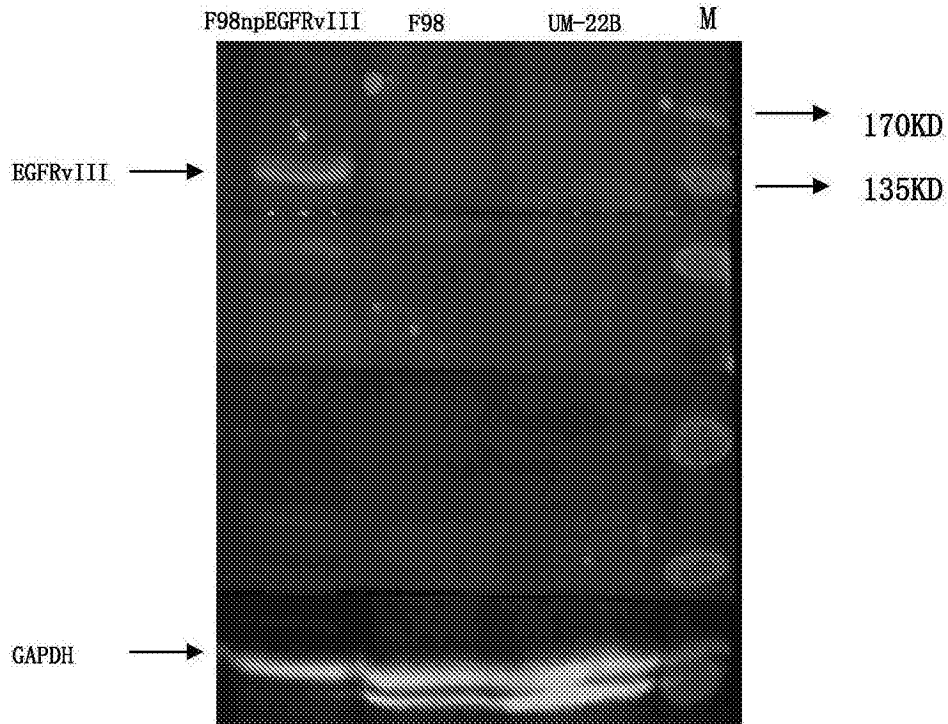


图3

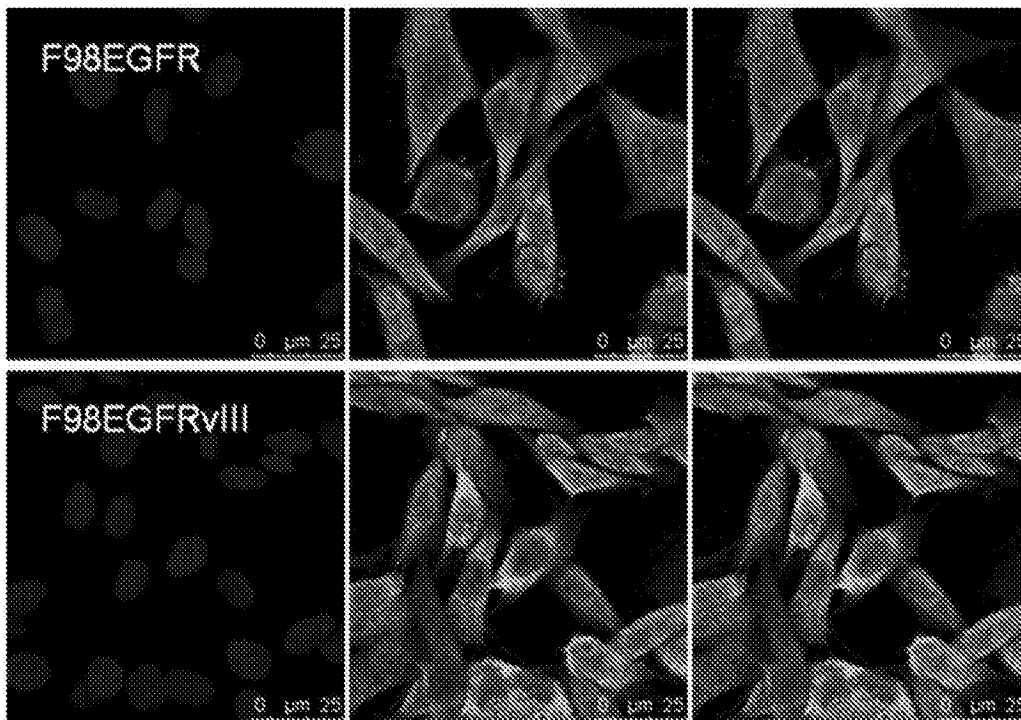


图4

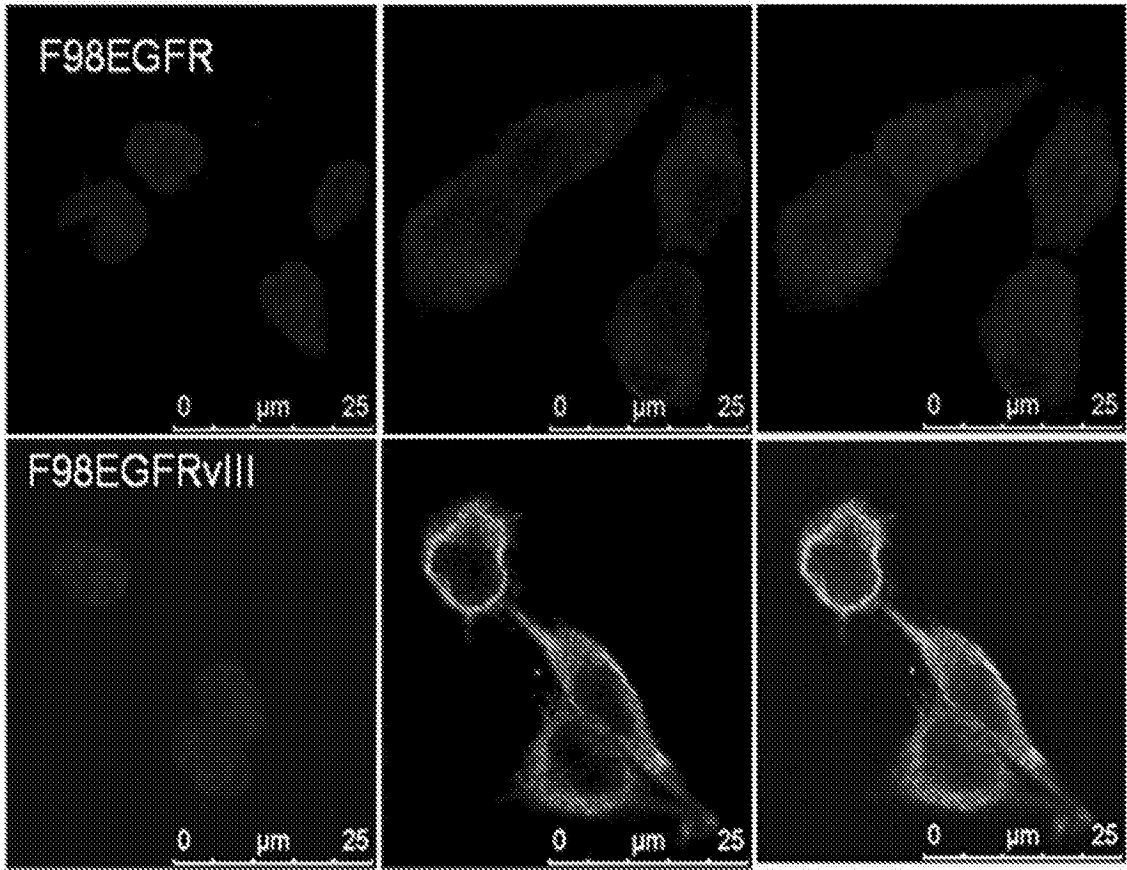


图5

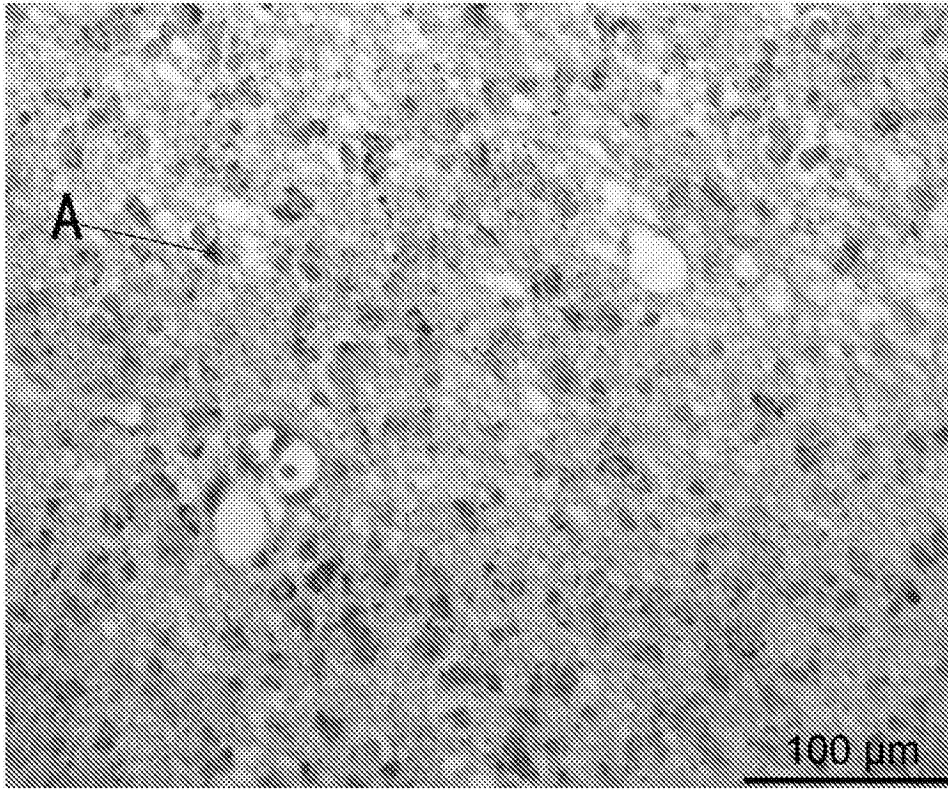


图6

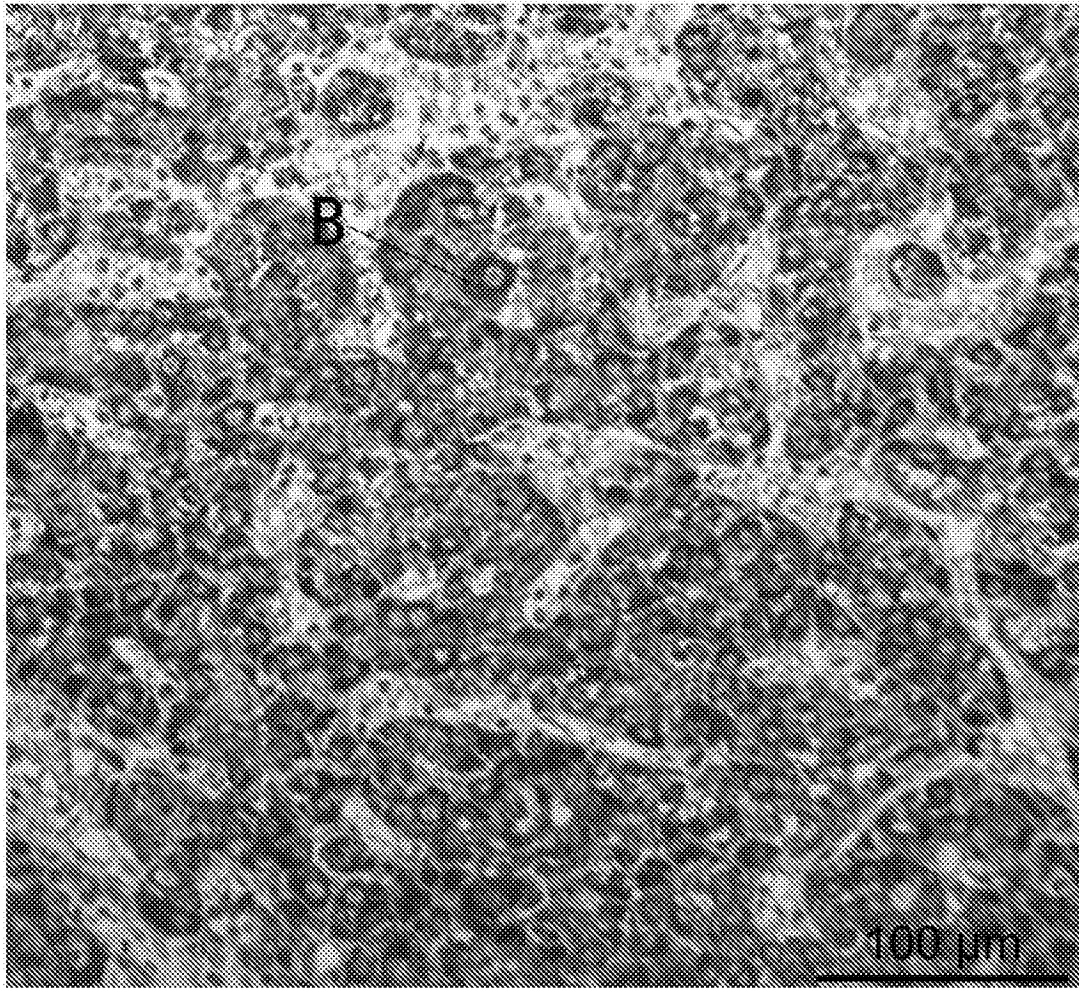


图7

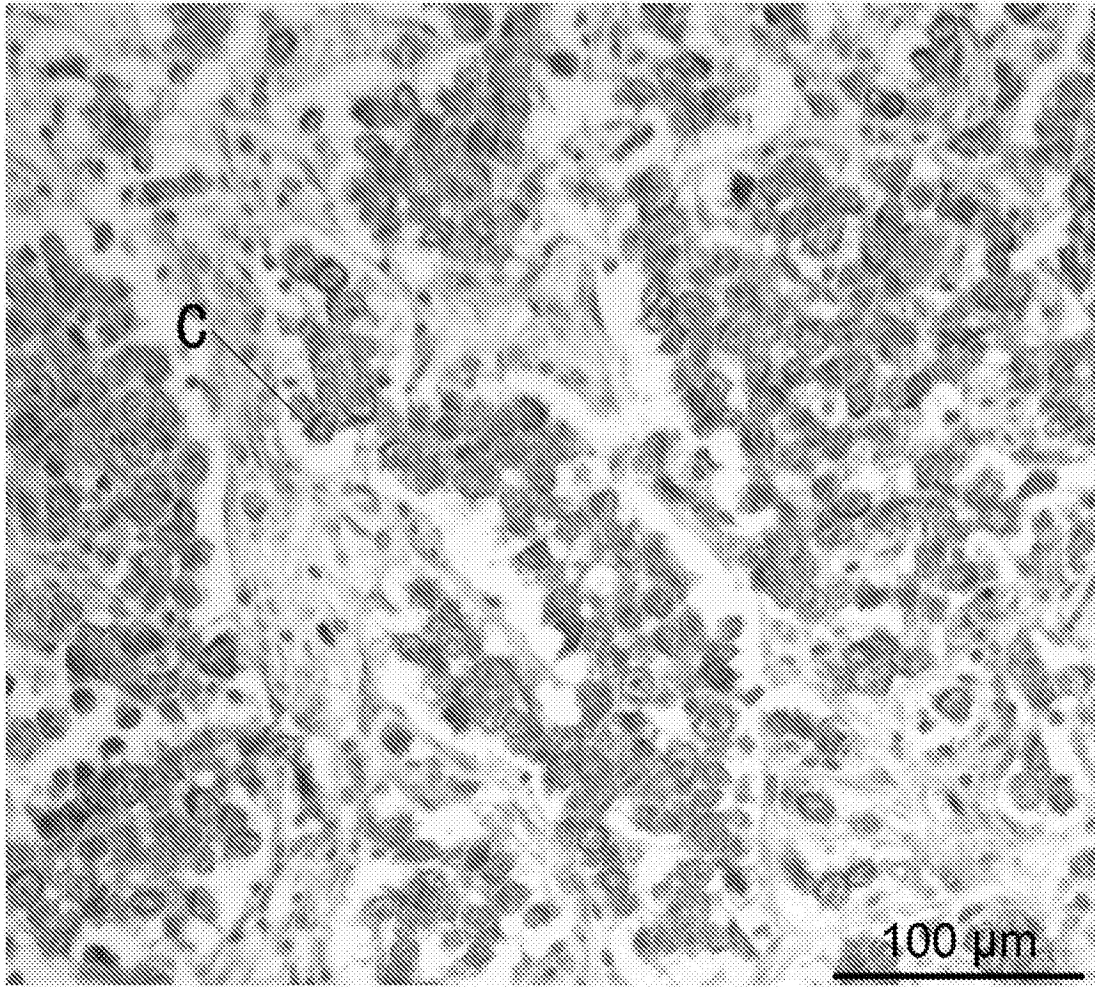


图8

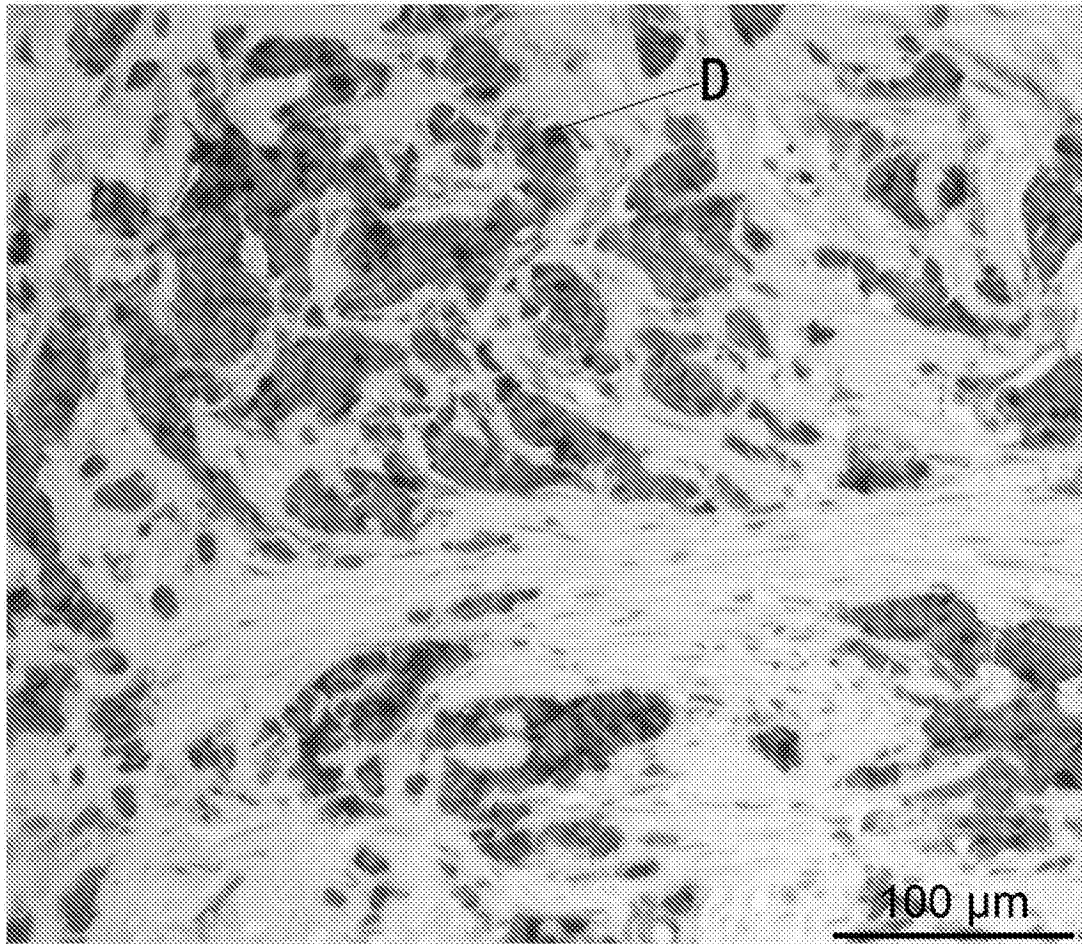


图9

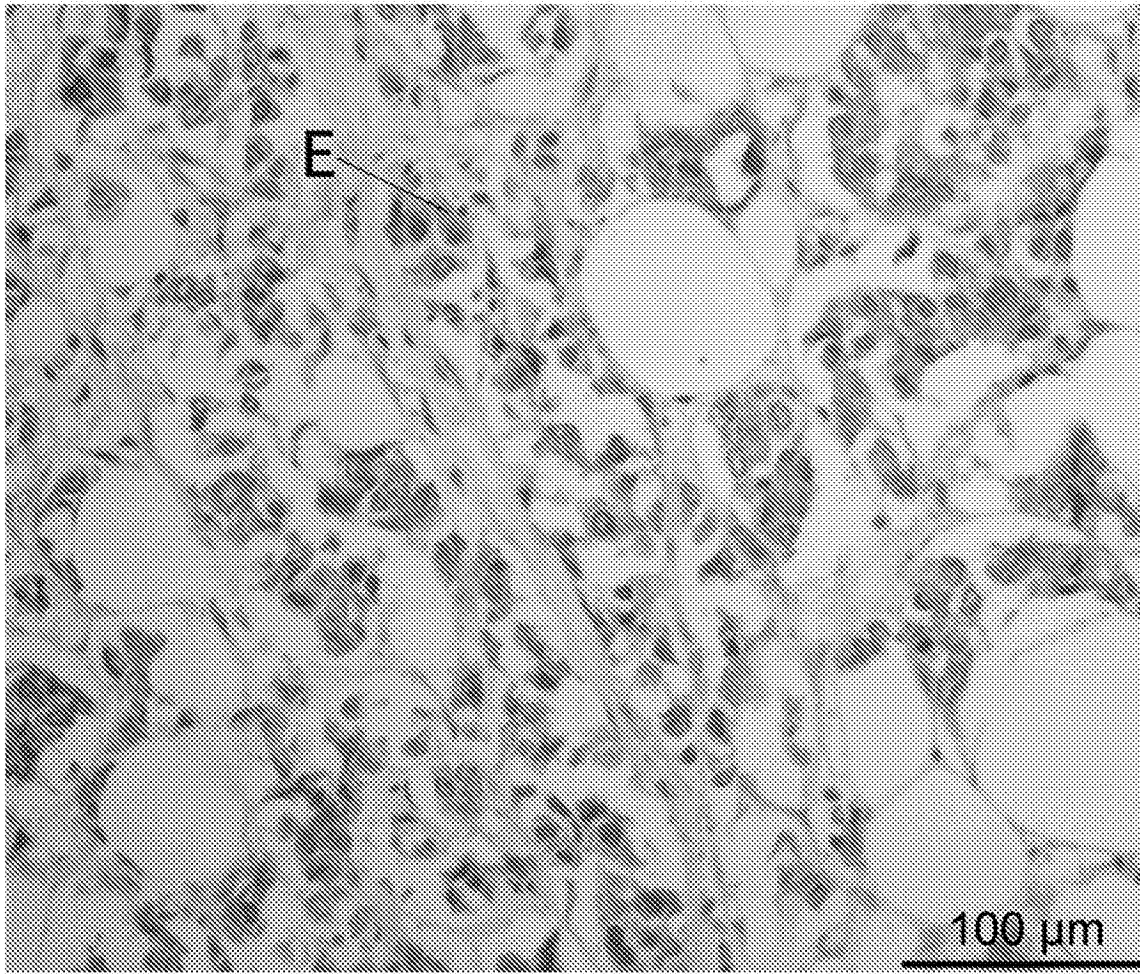


图10

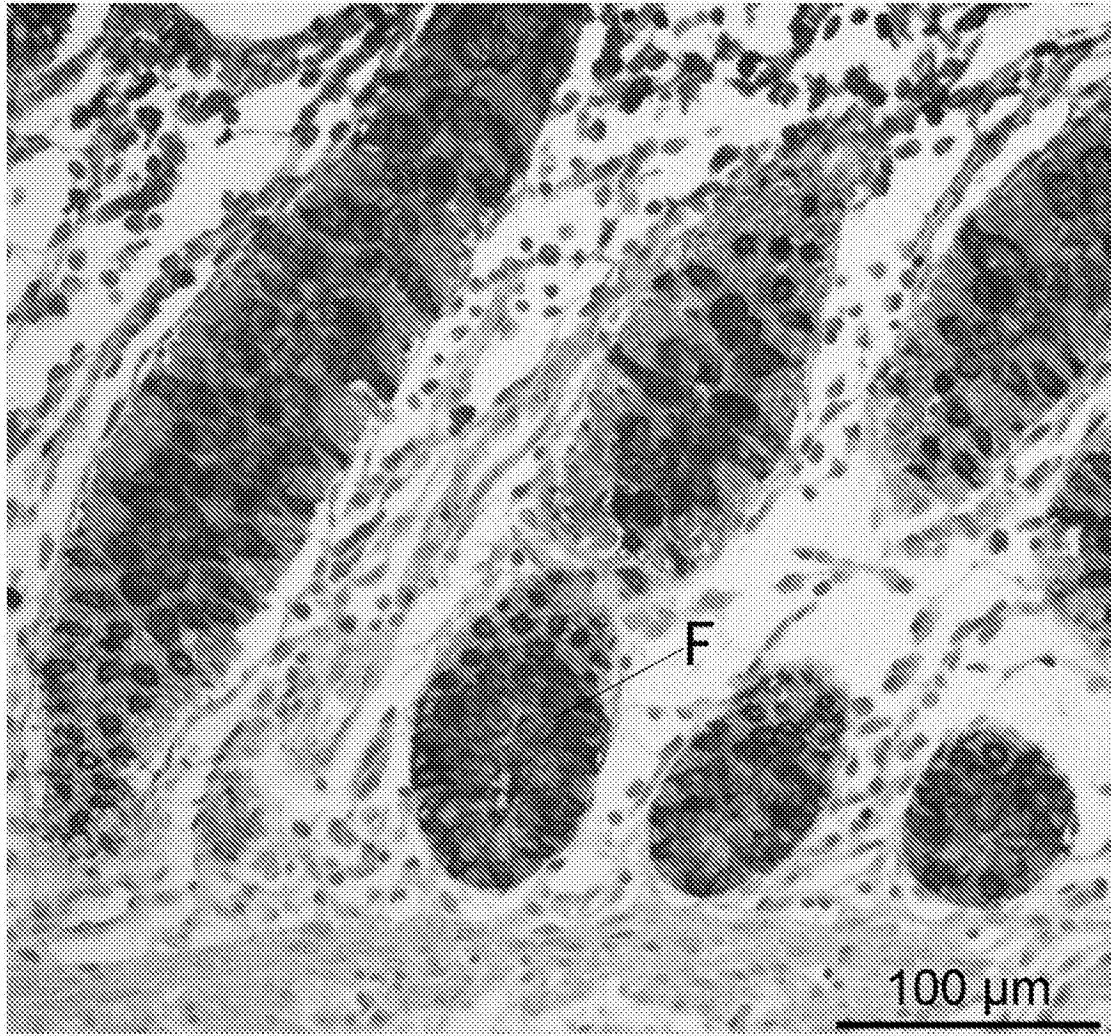


图11

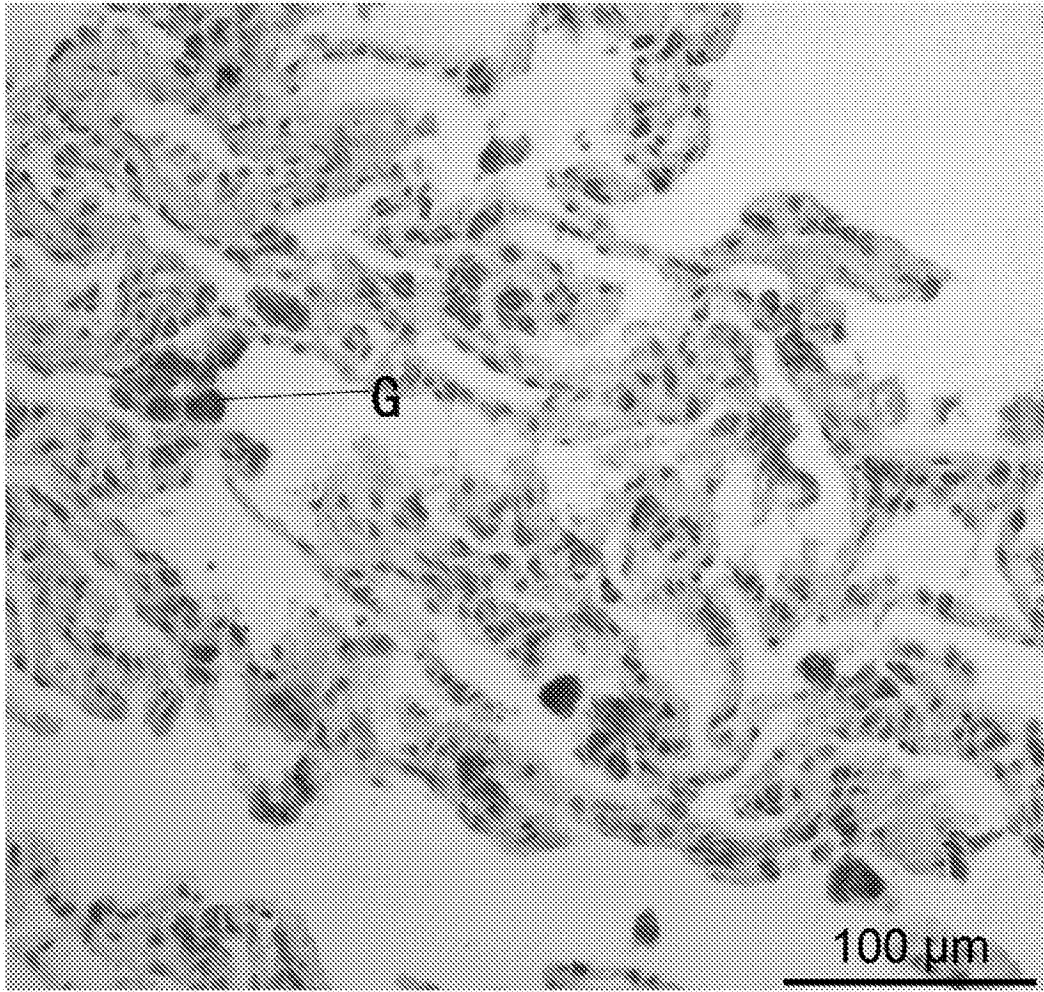


图12