

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03802448.9

[51] Int. Cl.

*C07K 16/28 (2006.01)*  
*A61K 39/395 (2006.01)*  
*G01N 33/68 (2006.01)*  
*A61P 35/00 (2006.01)*  
*A61P 17/06 (2006.01)*  
*A01K 67/027 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2008 年 8 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 100410275C

[51] Int. Cl. (续)

*C12N 15/00 (2006.01)*

*C12N 15/20 (2006.01)*

*C12N 5/12 (2006.01)*

[22] 申请日 2003.1.20 [21] 申请号 03802448.9

[30] 优先权

[32] 2002. 1. 18 [33] FR [31] 0200653

[32] 2002. 1. 18 [33] FR [31] 0200654

[32] 2002. 5. 7 [33] FR [31] 0205753

[86] 国际申请 PCT/FR2003/000178 2003. 1. 20

[87] 国际公布 WO2003/059951 法 2003. 7. 24

[85] 进入国家阶段日期 2004. 7. 19

[73] 专利权人 皮埃尔法布雷医药公司

地址 法国布洛涅 - 比扬古

[72] 发明人 L·格奇 N·科尔瓦亚 O·莱热

[56] 参考文献

WO 9640210 A 1996. 12. 19

Antitumor Effects of Doxorubicin in Combination with Anti - Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies. J. BASELGA et al. JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, Vol. 85 No. 16. 1993

审查员 杨振宇

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 程伟

权利要求书 4 页 说明书 93 页 附图 31 页

[54] 发明名称

新的抗 IGF - IR 抗体及其应用

[57] 摘要

本发明涉及能够与人胰岛素样生长因子 I 受体 IGF - IR 特异结合, 特别是鼠源、嵌合和人源化的单克隆抗体, 以及编码这些抗体的氨基酸和核酸序列。本发明还涉及应用这些抗体作为过度表达 IGF - IR 的癌症或任何与所述受体过度表达有关的病理状况的预防和/或治疗癌症的药物, 以及用于诊断与 IGF - IR 受体过度表达有关的试剂盒。发明进一步包括这种抗体与抗 EGFR 抗体和/或化合物和/或抗癌剂或毒素共轭药剂联合的产物和/或组合物, 及其预防和/或治疗某些癌症的应用。

1. 一种分离的抗体，或其功能片段之一，所述的抗体或其所述片段之一能够与人胰岛素样生长因子 I 受体 IGF-IR 结合，其特征是它含有包括至少三个序列为 SEQ ID No. 2、4 和 6 的序列的互补决定区 CDRs 的轻链，而且其特征是含有包括至少三个序列为 SEQ ID No. 8、10 和 12 的序列的 CDRs 的重链。

2. 如权利要求 1 所要求的抗体或其功能片段之一，所述的抗体或其所述片段之一能够与人胰岛素样生长因子 I 受体 IGF-IR 结合，能够抑制其配基 IGF1 和/或 IGF2 的自然附着，和/或能特异地抑制所述 IGF-IR 受体的酪氨酸激酶活性。

3. 如权利要求 1 所要求的抗体或其功能片段之一，其特征是它不以显著的方式与人胰岛素受体 IR 附着。

4. 如权利要求 1 至 3 之一所要求的抗体，其特征是所述的功能片段选自 Fv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、scFv、scFv-Fc。

5. 能够分泌如权利要求 1 至 3 之一所要求的抗体的鼠杂交瘤。

6. 如权利要求 5 所要求的鼠杂交瘤，其于 2001 年 9 月 19 日存放在 CNCM，巴黎的法国巴斯德学院，编号 1-2717。

7. 一种抗体或其功能片段之一，其特征是所述的抗体由权利要求 6 所要求的杂交瘤分泌。

8. 如权利要求 1 所要求的抗体或其功能片段之一，其特征是所述的抗体含有一个包括氨基酸序列 SEQ ID No. 54 的轻链序列，和它含有一个包括氨基酸序列 SEQ ID No. 69 的重链序列。

9. 如权利要求 8 所要求的抗体或其功能片段之一，其特征是所述的抗体是嵌合抗体，而且含有来自与鼠不同种属的抗体轻链和重链恒定区。

10. 如权利要求 9 所要求的嵌合抗体或其功能片段之一，其特征是所述的不同种属是人。

11. 如权利要求 10 所要求的嵌合抗体或其功能片段之一，其特征是来自人抗体的轻链和重链恒定区分别是  $\kappa$  和  $\gamma$ -1、 $\gamma$ -2 或  $\gamma$ -4 区。

12. 如权利要求 1 所要求的抗体或其功能片段之一，其特征是所述的抗体是人源化抗体，包含一个轻链和/或一个重链，其中所述轻链和/或重链的骨架节段 FR1 至 FR4 分别来自人抗体轻链和/或重链的骨架节段 FR1 至 FR4。

13. 如权利要求 12 所要求的人源化抗体或其功能片段之一，其特征是所述的抗体含有一个轻链，它包括氨基酸序列 SEQ ID No. 61 或 65，和其特征是含有一个重链，它包括氨基酸序列 SEQ ID No. 75、79 或 83。

14. 如权利要求 13 所要求的人源化抗体或其功能片段之一，其特征是所述的抗体包含包括氨基酸序列 SEQ ID No. 65 的轻链，并含有包括氨基酸序

列 SEQ ID No. 79 或 83 的重链。

15. 如权利要求 14 所要求的人源化抗体或其功能片段之一，其特征是所述的抗体的重链的氨基酸序列是 SEQ ID No. 83。

16. 一种分离的核酸，其特征是它选自下列核酸：

a) 编码如权利要求 1 至 4 和 7 至 14 之一所要求的抗体或其功能片段之一的核酸，DNA 或 RNA；

b) 如 a) 所定义的核酸的互补核酸；和

c) 包含序列 SEQ ID No. 1、3、5、7、9 和 11 的 CDRs 的核酸。

17. 含有如权利要求 16 所要求的核酸的载体。

18. 含如权利要求 17 所要求的载体的宿主细胞。

19. 产生如权利要求 1 至 4 和 7 至 14 所要求的抗体或其功能片段之一的过程，其特征是包括以下阶段：

a) 在培养基和合适的条件下培养如权利要求 18 所要求的细胞；和

b) 回收所述的抗体或其功能片段之一，它的产生是从培养基或所述培养的细胞开始。

20. 如权利要求 1 至 4、7 至 14 之一所要求的抗体或其功能片段之一在制备药物组合物中的用途。

21. 含有一种化合物作为有效成分的组合，该化合物由如权利要求 1 至 4 和 7 至 14 之一所要求的抗体或其功能片段之一组成。

22. 如权利要求 21 所要求的组合，其特征是含有第二个化合物，后者选自能够特异地抑制 EGF 与人表皮生长因子受体 EGFR 的附着、和/或能够特异地抑制所述 EGFR 受体酪氨酸激酶活性的化合物。

23. 如权利要求 22 所要求的组合，其特征是所述的第二个化合物选自分离的抗 EGFR 抗体，或其功能片段，能够通过竞争 EGF 与 EGFR 的附着而产生抑制作用。

24. 如权利要求 23 所要求的组合，其特征是所述的抗 EGFR 抗体选自单克隆、嵌合或人源化的抗 EGFR 抗体，或其功能片段。

25. 如权利要求 23 或 24 任一条所要求的组合，其特征是所述的抗 EGFR 抗体的功能片段选自片段 Fv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、scFv-Fc。

26. 如权利要求 23 所要求的组合，其特征是所述的抗 EGFR 抗体是鼠单克隆抗体 225、其鼠-人嵌合衍生物 C225、或来自此抗体 225 的人源化抗体。

27. 如权利要求 21 所要求的组合，其特征是它还含有细胞毒性/细胞生长抑制剂和/或 IGF-1 受体和/或 EGF 受体各自的酪氨酸激酶活性抑制剂，作为同时、单独或连续使用的联合产物。

28. 如权利要求 27 所要求的组合，其特征是所述的细胞毒性 / 细胞

生长抑制剂选自与 DNA 相互作用的药剂、抗代谢物、拓扑异构酶 I 或 II 抑制剂、或纺锤体抑制剂或稳定剂或任何能用于化疗的药剂。

29. 如权利要求 27 所要求的组合物,其特征是所述的细胞毒性/细胞生长抑制剂与所述组合物的至少一个成分化学性偶联以同时使用。

30. 如权利要求 28 所要求的组合物,其特征是所述的细胞毒性/细胞生长抑制剂选自纺锤体抑制剂或稳定剂。

31. 如权利要求 30 所要求的组合物,其特征是所述的细胞毒性/细胞生长抑制剂是长春瑞宾、长春氟宁或长春新碱。

32. 如权利要求 27 所要求的组合物,其特征是所述的 IGF-1 和/或 EGF 受体各自的酪氨酸激酶活性抑制剂选自衍生的天然药剂、二苯胺酞酰亚胺、吡唑基或吡咯吡啶嘧啶或喹唑啉。

33. 如权利要求 21 所要求的组合物,其特征是它还含有另一个针对 HER2/neu 受体细胞外结构区的抗体化合物,作为同时、单独或连续使用的联合产物,准备用于预防和治疗癌症。

34. 如权利要求 33 所要求的组合物,其特征是所述的针对 HER2/neu 受体细胞外结构区的抗体是贺赛汀或其功能片段之一。

35. 如权利要求 21 所要求的组合物,其特征是所述抗体的至少之一或其功能片段之一与细胞毒素和/或放射性元素共扼。

36. 如权利要求 21 至 35 之一所要求的组合物在制备药物组合物中的用途。

37. 如权利要求 1 至 4、7 至 14 之一所要求的抗体或其功能片段之一,和/或权利要求 21 至 35 之任一所述的组合物在制备用于预防或治疗疾病的药物中的用途,其特征是所述疾病与 IGF-IR 和/或 EGFR 受体的过度表达和/或异常活化有关,和/或与由 IGF1 或 IGF2 与 IGF-IR 的相互作用和/或 EGF 与 EGFR 的相互作用介导的信号转导通路的过度活化有关。

38. 如权利要求 37 所要求的用途,其特征是所述药物的使用不诱导或仅轻微诱导与胰岛素受体 IR 抑制有关的继发效应。

39. 如权利要求 37 或 38 所要求的用途,其特征是所述药物用于抑制正常细胞向具有肿瘤特征细胞的转化。

40. 如权利要求 39 所要求的用途,其特征是所述具有肿瘤特征细胞是 IGF 依赖性的细胞。

41. 如权利要求 39 所要求的用途,其特征是所述具有肿瘤特征细胞是 IGF1-和/或 IGF2 依赖性的和/或 EGF 依赖性的和/或 HER2/neu 依赖性的细胞。

42. 如权利要求 37 或 38 所要求的用途,其特征是所述药物用于抑制肿瘤细胞的生长和/或增殖。

43. 如权利要求 42 所要求的用途,其特征是所述肿瘤细胞是 IGF 依赖

性的细胞。

44. 如权利要求 42 所要求的用途，其特征是所述肿瘤细胞是 IGF1-和/或 IGF2-依赖性和/或 EGF 依赖性和/或 HER2/neu 依赖性的细胞。

45. 如权利要求 37 或 38 所要求的用途，其特征是所述的药物用于预防或治疗癌症。

46. 如权利要求 45 所要求的用途，其特征是所述的癌症选自前列腺癌、骨肉瘤、肺癌、乳腺癌、子宫内膜癌或结肠癌。

47. 如权利要求 37 或 38 所要求的用途，其特征是所述药物用于预防或治疗牛皮癣。

48. 体外检测生物标本中 IGF-IR 和/或 EGFR 受体的过度表达或表达下调的方法，其特征是所述的生物标本与权利要求 1 至 4、7 至 14 中之一所要求的抗体接触。

49. 如权利要求 48 所要求的方法，所述抗体可被标记。

50. 实施疾病诊断方法的试剂盒或装置，所述疾病由 IGF-IR 和/或 EGFR 受体过度表达或表达下调而诱导，或进行一个过程以检测和/或定量生物标本中 IGF-IR 和/或 EGFR 受体的过度表达或表达下调，其特征是所述试剂盒或装置含有下列元件：

如权利要求 1 至 4、7 至 14 之一所要求的抗体或其功能片段之一。

51. 如权利要求 50 所述的试剂盒或装置，所述受体为过度表达。

52. 如权利要求 50 所要求的试剂盒或装置，其进一步包括用于形成有助于免疫反应的介质的试剂。

53. 如权利要求 50 或 52 所要求的试剂盒或装置，其进一步包括显示由免疫反应产生的 IGF-IR/抗体和/或 EGFR/抗体复合物的试剂。

54. 如权利要求 1 至 4、7 至 14 之一所要求的抗体或其功能片段之一在制备药物中的用途，其特征是所述药物特异地将生物学活性化合物靶向至表达或过度表达 IGF-IR 和/或 EGFR 受体的细胞上。

## 新的抗 IGF-IR 抗体及其应用

本发明涉及能够与人胰岛素样生长因子 I 受体 IGF-IR 特异结合, 和/或能够特异地抑制所述 IGF-IR 受体的酪氨酸激酶活性的新的抗体, 特别是鼠源、嵌合和人源化的单克隆抗体, 以及编码这些抗体的氨基酸和核酸序列。同样本发明包括应用这些抗体作为过度表达 IGF-IR 的癌症或任何与所述受体过度表达有关的病理状况的预防和/或治疗性药物, 以及在与 IGF-IR 受体过度表达有关的疾病的诊断过程或试剂盒中使用。最后, 发明包括了这种抗体与抗 EGFR 抗体和/或化合物和/或抗癌剂或毒素共轭药剂联合的产物和/或组合物, 及其预防和/或治疗某些癌症的应用。

称为 IGF-IR 的胰岛素样生长因子 I 受体是具有酪氨酸激酶活性的受体, 与胰岛素受体 IR 具有 70% 的同源性。IGF-IR 是分子量大约为 350,000 的糖蛋白。它是杂-四聚受体, 每一半均由二硫键桥接, 由一个细胞外  $\alpha$ -亚单位和跨膜  $\beta$ -亚单位构成(见图 1)。IGF-IR 以很高的亲和力( $K_d \approx 1 \text{ nM}$ )与 IGF I 和 IGFII 结合, 但同样能够以 100 至不到 1000 倍的亲和力与胰岛素结合。相反地, 尽管 IGF 仅能与胰岛素受体以低于 100 倍的亲和力结合, IR 与胰岛素以很高的亲和力结合。尽管同源性较弱的区带分别与位于  $\alpha$ -亚单位和  $\beta$ -亚单位的 C 末端部分上的富含半胱氨酸的区域有关, IGF-IR 和 IR 的酪氨酸激酶结构区具有很高的序列同源性。在  $\alpha$ -亚单位上观察到的序列差异位于配体的结合区带中, 因此对于 IGF 和胰岛素, 分别是 IGF-IR 和 IR 相对亲和力的根源。B-亚单位 C 末端部分的差异引起了两种受体信号传导通路的分歧; IGF-IR 介导有丝分裂、分化和抗凋亡效应, 而 IR 的活化主要参与代谢通路水平上的效应(Baserga 等人, *Biochim. Biophys. Acta*, 1332: F105-126, 1997; Baserga R., *Exp. Cell. Res.*, 253:1-6, 1999)。

细胞质酪氨酸激酶蛋白是通过配体与受体的细胞外结构区结合而被活化。激酶的活化又涉及不同细胞内底物的刺激, 包括 IRS-1、IRS-2、Shc 和 Grb 10 (Peruzzi F. 等人, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 125:166-173, 1999)。IGF-IR 的两个主要底物是 IRS 和 Shc, 它们通过激活大量下游效应器而介导与 IGF 与其受体附着有关的大多数生长和分化效应(图 2)。因此底物的可利用性决定了与 IGF-IR 活化有关的最终生物学效应。当 IRS-1 占优势时, 细胞趋向于增殖和转化。当 Shc 占优势时, 细胞趋向于分化(Valentinis B. 等人, *J. Biol. Chem.* 274:12423-12430, 1999)。看起来涉及抗凋亡效应的通路主要是磷脂酰肌醇 3-激酶(PI 3-激酶)通路(Prisco M. 等, *Horm. Metab. Res.*, 31:80-89, 1999; Peruzzi F. 等人, *J. Cancer*

Res. Clin. Oncol., 125:166-173, 1999)。

IGF 系统在癌症发生中的作用成为最近十年中深入研究的主题。这种兴趣是基于以下的发现，即除了促有丝分裂和抗凋亡特性外，IGF-IR 似乎是建立和维持转化表现型所需要的。实际上，已经很详细地了解 IGF-IR 的过度表达或结构性活化在绝大多数细胞中可引起细胞的生长，而不依赖于无胎牛血清培养基的支持，并在裸鼠中形成肿瘤。这本身并不是一种独特的特性，因为过度表达基因的大多数产物可转化细胞，包括很多生长因子的受体。但是，清楚证明 IGF-IR 在转化作用中扮演的主要地位的重要发现显示，IGF-IR 编码基因被灭活的 R 细胞对通常能够转化细胞的不同药剂的转化作用完全没有反应，这些药剂如牛乳头状瘤病毒 E5 蛋白、过度表达的 EGFR 或 PDGFR、SV40 的 T 抗原、活化的 ras 或这后两种因子的联合(Sell C. 等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90: 11217-11221, 1993; Sell C. 等人, Mol. Cell. Biol., 14:3604-3612, 1994; Morrione A. J., Virol., 69:5300-5303, 1995; Coppola D. 等人, Mol. Cell. Biol., 14:4588-4595, 1994; DeAngelis T 等人, J. Cell. Physiol., 164:214-221, 1995)。

IGF-IR 在大量的肿瘤和肿瘤细胞系中表达，IGF 通过其与 IGF-IR 的附着而增强肿瘤的生长。其他赞成 IGF-IR 在癌症发生中地位的说法来自采用针对受体的鼠单克隆抗体或采用 IGF-IR 的功能失活物的研究。事实上，针对 IGF-IR 的鼠单克隆抗体抑制大量的培养细胞系的增殖和体内肿瘤细胞的生长(Arteaga C. 等人, Cancer Res., 49:6237-6241, 1989; Liet al., Biochem. Biophys. Res. Com., 196:92-98, 1993; Zia F 等人, J. Cell. Biol., 24:269-275, 1996; Scotlandi K 等人, Cancer Res., 58:4127-4131, 1998)。而且在 Jiang 等人的工作中已经显示(Oncogene, 18:6071-6077, 1999) IGF-IR 的功能失活物能够抑制肿瘤的增殖。

本发明的目的是能够获得鼠单克隆抗体，优选嵌合的或人源化的抗体，它能够特异地识别 IGF-IR，并具有很高的亲合力。这种抗体与胰岛素上的 IR 受体将很少作用或根本不起作用。在体外其附着将能够抑制表达 IGF-IR 的肿瘤的生长，主要是与 IGF1/IGF-IR 和 IGF2/IGF-IR 相互作用的过程中活化的信号转导通路发生作用。在体内这种抗体在所有类型表达 IGF-IR 的肿瘤上都将是具有活性的，这些肿瘤包括雌激素依赖性乳腺肿瘤和前列腺肿瘤，它们不是目前可获得的抗 IGF-IR 单克隆抗体(书写为 MAb 或 MAB)可以作用的。实际上， $\alpha$  IR3 是指 IGF-IR 的结构区，可在体外完全抑制雌激素依赖性乳腺肿瘤的生长(MCF-7)，但对相应的体内模型却没有效果(Arteaga C. 等人, J. Clin. Invest. 84:1418-1423, 1989)。相同的方式，来自鼠单克隆 1H7 的 scFv-Fc 片段在乳腺肿瘤 MCF-7 上仅有微弱的活性，在雄激素非依赖性前列腺肿瘤上完全是无活性的(Li S. L. 等人, Cancer Immunol. Immunother., 49:243-252, 2000)。

发明者以一种令人惊讶的方式证明了一种嵌合抗体(记为 C7C10)和两种人源化抗体，分别称为 h7C10 人源化型 1 和 h7C10 人源化型 2，鼠单克隆抗体 7c10 的

衍生物，可识别 IGF-IR，并对应于上述的所有标准，也就是说，不识别胰岛素上的受体，体外可阻断诱导的 IGF1 和/或 IGF2 增殖，但同样在体内可抑制不同的表达 IGF-IR 的肿瘤的生长，其中有骨肉瘤和非小细胞肺肿瘤，更特别的是雌激素依赖性乳腺肿瘤 MCF-7 和雄激素非依赖性前列腺肿瘤 DU-145。同样以令人惊讶的方式，体内抗体 7c10 抑制肿瘤 MCF-7 细胞生长的强度与他莫西芬所观察到的结果是可以相对比的，甚至是明显优于后者，他莫西芬是治疗雌激素依赖性乳腺肿瘤中的一个参考化合物。而且，已经显示这些抗体可抑制 IGF-IR 和 IRS1 的  $\beta$  链的酪氨酸的磷酸化，受体的第一个底物。而且，同样也已经明确的是这些抗体可引起所述受体的内化及其降解，这与通常天然配体所观察的是相反的，后者可使受体在细胞表面上迅速再循环。通过其肽和核酸序列，特别是决定其与 IGF-IR 互补性 (CDR) 的区域的序列已经可能来定性这些抗体。

因此，根据第一个实施例，本发明的一个主题是分离的抗体，或其功能片段之一，所述的抗体或其片段之一能特异与人胰岛素样生长因子 I 受体结合，如果需要，更优选能抑制 IGF-IR 的配体 IGF1 和/或 IGF2 的自然附着和/或，能够特异地抑制所述 IGF-IR 受体的酪氨酸激酶活性，该抗体或其片段的特征是它所包含的轻链含有选自氨基酸序列 SEQ ID No2, 4 或 6 的 CDR 的至少一个互补决定区 CDR，或至少一个在序列最优排列后与序列 SEQ ID NO 2、4 或 6 具有至少 80%，优选 85%，90%，95% 和 98% 同一性的 CDR，或者特征是含有的重链含有选自氨基酸序列 SEQ ID NO 8、10、12 的 CDR 的至少一个 CDR，或至少一个在序列最优排列后与序列 SEQ ID NO 8、10 和 12 具有至少 80%，优选 85%，90%，95% 和 98% 同一性的 CDR。

在本发明描述中，术语“结合”和“附着”具有相同的含义，可互换。

在本发明描述中，术语多肽、多肽序列、附着于抗体化合物或其序列的肽和蛋白是可以互换的。

在此必须理解的是发明不涉及天然形式的抗体，也就是说，它们并不处在其自然环境下，但它们已经能被分离或通过从天然来源中纯化获得，或通过基因重组获得，或通过化学合成，然后它们将如进一步要描述的那样可含有非天然的氨基酸。

通过 CDR 区或 CDR，要指出的是如 Rabat 等人所定义的免疫球蛋白的重链和轻链的超变区 (Rabat 等人, Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, 和后续的版本)。存在 3 个重链 CDR 和 3 个轻链 CDR。根据情况，在此术语 CDR 或 CDR 用来表示这些区域之一或几个，或甚至全部这些区域，它们含有结合作用所需要的大多数氨基酸残基，所述结合作用是通过抗体与抗原或它识别的抗原决定簇的亲合力实现的。

就本发明而言，通过两条核酸或氨基酸序列之间的“同一性百分比”，要指

出的是在最佳排列(最优排列)后获得的,要比较的两条序列之间的核苷酸或相同氨基酸残基的百分比,这个比例是纯统计学数字,要随机分布的两条序列之间的差异和在其整个长度上。两条核酸或氨基酸序列之间序列的比较一般是通过在以最优方式排列后比较这些序列来进行的,所述的比较能够通过片段或通过“比较窗”来执行。除了人工操作以外,比较所需要的序列最优排列可通过 Smith 和 Waterman(1981)的局部同源性算法[Ad. App. Math. 2:482], Neddleman 和 Wunsch (1970)的局部同源性算法[J. Mol. Biol. 48: 443], Pearson 和 Lipman (1988)的相似性搜索法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444],采用这些算法的计算机软件(Wisconsin Genetics 软件包中的 GAP, BESTFIT, FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, 或通过 BLAST N 或 BLAST P 比较软件)来执行。

两条核酸或氨基酸序列之间同一性的百分比可通过比较以最优方式排列的两条序列来确定,其中要比较的核酸或氨基酸序列可根据两条序列之间的这些最优排列的参考序列可含有一些添加和缺失。同一性百分比的计算可通过确定相同位点的数目,对于此位点两条序列之间核酸或氨基酸残基是相同的,通过在比较窗中将此相同位点的数目除位点的总数,将获得的结果乘 100,获得两条序列之间的同一性百分比。

例如,可使用 BLAST 程序,“BLAST 2 序列”(Tatusova 等人,“Blast 2 序列——一种新的比较蛋白和核酸序列的新工具”, FEMS Microbiol Lett. 174:247-250),它在站点<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>上可获得,参数使用缺省参数(特别是参数“开放间隙补偿”:5,和“扩展间隙补偿”:2;选择的矩阵,是例如,程序所建议的“BLOSUM 62”),要比较的两条序列之间的同一性百分比通过程序直接计算。

对与参考氨基酸序列具有至少 80%,优选 85%,90%,95%和 98%同一性的氨基酸序列,就参考序列而言,优选那些具有某些修饰作用,特别是缺失,添加或取代至少一个氨基酸,截断或延伸的序列。在一个或多个连续或非连续氨基酸取代的情况下,取代作用优选被取代的氨基酸由“等效”的氨基酸替换。在此“等效氨基酸”的表述是指能被基本结构的氨基酸之一取代,但实质上不影响相应抗体生物学活性的任何氨基酸,这将在后面详述,特别是在实例中。

这些等效氨基酸可根据其与它们替换的氨基酸的结构同源性,或根据能被实施的不同抗体之间生物学活性对比试验的结果来确定。

通过实例,要注意能进行而不引起相应修饰的抗体的生物学活性发生复杂的修饰作用的取代作用的可能性。因此可能用缬氨酸替换亮氨酸,谷氨酸替换天冬氨酸,天冬酰胺替换谷氨酰胺,赖氨酸替换精氨酸等,在相同条件下相反的取代作用自然也是可行的。

根据本发明的抗体优选特异的单克隆抗体,特别是鼠,嵌合或人源化来源的,

可根据本领域专业技术人员所熟知的标准方法获得。

通常，对于单克隆抗体或其功能片段的制备，特别是鼠源性的，可能要提到特别是在手册“抗体”(Harlow 和 Lane, 抗体: 实验室手册, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, 726 页, 1988)中所描述的技术或 Kohler 和 Milstein 所描述的来自杂交瘤的制备技术(Nature, 256:495-497, 1975)。

根据本发明单克隆抗体的获得，例如可来自 IGF-IR 受体或含有根据本发明由所述单克隆抗体特异识别的抗原决定簇的其片段之一免疫的动物细胞。所述的 IGF-IR 受体，或其所述片段之一，根据通常的工作方法，可特别地通过基因重组产生，由包含在编码 IGF-IR 受体的 cDNA 序列中的核酸序列起始，或通过肽合成产生，由 IGF-IR 受体的肽序列中包含的氨基酸序列起始。

例如，根据本发明，单克隆抗体可在亲和柱上被纯化，柱上以前已经固定了 IGF-IR 受体或其片段之一，根据本发明该片段含有由所述单克隆抗体特异识别的抗原决定簇。更特殊的是，所述单克隆抗体可通过蛋白 A 和/或 G 层析纯化，然后进行或不进行离子交换层析，主要是为了消除残留的蛋白污染物以及 DNA 和 LPS，由于二聚体或其他多聚体的存在，其本身在 Sepharose 凝胶上进行或不进行排除层析以消除潜在的聚集物。以更为优选的方式，整体这些技术可同时使用或连续使用。

根据本发明，嵌合或人源化抗体也包括在抗体中。

对于嵌合抗体，要指出的是抗体含有来自指定物种抗体的天然可变区(轻链和重链)，以及与所述指定物种不同的物种抗体的轻链和重链恒定区。

根据本发明抗体或其嵌合型片段可采用基因重组技术来制备。例如，嵌合抗体可通过克隆重组 DNA 而产生，该 DNA 含有一个启动子，和编码根据本发明的非人、特别是鼠源单克隆抗体可变区的序列，和编码人抗体恒定区的序列。由这样一种重组基因编码的发明的嵌合抗体，例如，将是一个鼠-人的嵌合体，这种抗体的特异性由来自鼠 DNA 的可变区确定，其同种型则由来自人 DNA 的恒定区确定。对于制备嵌合抗体的方法，例如可能是指 Verhoeyn 等人的文章(BioEssays, 8:74, 1988)。

对于人源化抗体，要指出的是抗体含有来自非人来源抗体的 CDR 区，抗体分子的其他部分来自一个(或几个)人抗体。而且，骨架片段的一些残基(称为 FR)可被修饰以保留结合的亲和力(Jones 等人, Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeyn 等人, Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann 等人, Nature, 332:323-327, 1988)。

根据本发明人源化抗体或其片段可通过本领域专业技术人员已知的技术来制备(例如，在 Singer 等人, J. Immun. 150:2844-2857, 1992; Mountain 等人, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10: 1-142, 1992; 或 Bebbington 等人, Bio/Technology, 10:169-175, 1992 等文章中所描述的)。根据本发明这些人源化

抗体优选用于体外诊断方法中，或体内预防和/或治疗性的处理。

对于根据本发明的功能性片段，要特别指出的是抗体片段，如 Fv, scFv (单链为 sc), Fab, F(ab')<sub>2</sub> > Fab', scFv-Fc 片段或双抗体，或任何可通过化学修饰作用增加半衰期的片段，如添加聚(烯基)乙二醇如聚(乙烯)乙二醇(“PEGylation”) (pegylated 片段称为 Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')<sub>2</sub>-PEG 或 Fab'-PEG) (对聚(乙烯)乙二醇为“PEG”)，或掺入进一个脂质体，根据本发明所述的片段具有至少一个序列 SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10 或 12 的特征性 CDR，特别是因为这样能够以普通的方式发挥它所来源的抗体的部分活性，如特别是识别和结合 IGF-IR 受体的能力，如果需要，可抑制 IGF-IR 受体的活性。

优选地，所述的功能片段将组成或含有它所来源抗体的重或轻可变链的部分序列，就 IGF-IR 受体而言，所述的部分序列足以保持与它所来源抗体相同的结合特异性，足够的亲合力，优选至少等于它所来源抗体的 1/100，更优选的是至少 1/10。

这样一种功能性片段将含有它所来源抗体的最小 5 个氨基酸，优选 10, 15, 25, 50 和 100 个连续氨基酸序列。

优选地，这些功能片段是 Fv, scFv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab'), scFv-Fc 型片段或一个完整体，后者通常与它所来源的抗体具有相同的结合特异性。根据本发明，发明的抗体片段可从如上所述的抗体通过如酶消化的方法，如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶和/或通过化学还原切断二硫键而获得。另一种方式是，本发明中包含的抗体片段可通过本领域专业技术人员所熟知的基因重组技术获得，或通过肽合成，使用例如自动肽合成仪，如由 Applied Biosystems 等公司供应的仪器。

以更优选的方式，发明包含抗体，或其功能片段，根据本发明，特别是通过基因重组或化学合成获得的嵌合或人源化抗体。

在一个优选的实施例中，发明的主题是一种抗体或其功能片段之一，根据本发明，其特征是它含有一条重链，含有序列 SEQ ID NO12 的一个 CDR，或在最优排列后与序列 SEQ ID NO 12 具有至少 80%同一性的序列。

在六个短的 CDR 序列中，重链(CDRH3)的第三个 CDR 具有更大的大小可变性(根本上是由于赋予其的基因排列机制获得更大的多样性)。尽管最长的大小已知为 26，但可短至 2 个氨基酸。从功能上说，CDRH3 在决定抗体的特异性中具有重要的地位(Segal 等人, PNAS, 71:4298-4302, 1974; Amit 等人, Science, 233:747-753, 1986; Chothia 等人, J. Mol. Biol., 196:901-917, 1987; Chothia 等人, Nature, 342:877-883, 1989; Caton 等人, J. Immunol., 144:1965, 1968, 1990; Sharon 等人, PNAS, 87:4814-4817, 1990; Sharon 等人, J. Immunol., 144:4863-4869, 1990; Rabat 等人, J. Immunol., 147:1709-1719, 1991)。

已知 CDR 的氨基酸中仅有很少比例能参与构建抗体的结合位点，但这些残基必须保持非常特殊的三维构型。

以更优选的方式, 本发明涉及一种抗体或其功能片段之一, 根据本发明其特征是它含有一条重链, 含有序列 SEQ ID NO 8, 10 和 12 中的三个 CDR 或三个 CDR 中的至少两个, 或在最优排列后分别与序列 SEQ ID NO 8, 10 和 12 具有至少 80% 同一性的序列中的三个 CDR 或三个 CDR 中的至少两个。

同样在一个优选的实施例中, 本发明的主题是一种抗体或其功能片段之一, 根据本发明, 其特征是它含有一条轻链, 含有选自序列 SEQ ID NO 2, 4 或 6 中 CDR 的至少一个 CDR, 或一个 CDR, 其序列经最优排列后与序列 SEQ ID NO 2, 4 或 6 具有至少 80% 同一性。

在一个更优选的实施例中, 发明的主题是一种抗体或其功能片段之一, 其特征是它含有一条轻链, 含有序列 SEQ ID NO 2, 4 和 6 中的三个 CDR 或三个 CDR 中的至少两个, 或在最优排列后分别与序列 SEQ ID NO 2, 4 和 6 具有至少 80% 同一性的序列中的三个 CDR 或三个 CDR 中的至少两个。

以更优选的方式, 根据本发明的抗体或其功能片段之一的特征是它含有一条重链, 含有序列 SEQ ID NO 8, 10 和 12 中的三个 CDR, 或在最优排列后分别与序列 SEQ ID NO 8, 10 和 12 具有至少 80% 同一性的序列中的三个 CDR, 而且它含有一条轻链, 含有序列 SEQ ID NO 2, 4 和 6 中的三个 CDR, 或在最优排列后分别与序列 SEQ ID NO 2, 4 和 6 具有至少 80% 同一性的序列中的三个 CDR。

根据另一个方面, 本发明的一个主题是一种抗体或其功能片段之一, 根据本发明其特征是它不能附着或它不能以显著的方式附着于人胰岛素受体 IR。

以一种优选的方式, 根据本发明所述的功能片段将选自片段 Fv, scFv, Fab, (Fab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc 或双抗体, 或任何通过化学修饰可增加半衰期的功能片段, 特别是通过 PEGylation, 或掺入进脂质体中。

根据本发明的另一个方面, 本发明涉及能够分泌一种单克隆抗体的鼠杂交瘤, 特别是鼠源性杂交瘤如 Centre National de Culture De Microorganismes (CNCM, National Center of Microorganism Culture) (Institut Pasteur, Paris, France) 在 2001 年 9 月 19 日存放的, 序号 1-2717。

在此称为 7C10 的单克隆抗体, 或其功能片段之一, 其特征是所述抗体由 2001 年 9 月 19 日在 CNCM 存放, 序号为 1-2717 的杂交瘤分泌, 当然它也是本发明的一部分。

在一个特殊的实施例中, 本发明涉及一种鼠抗体, 或其功能片段之一, 根据本发明, 其特征是所述抗体含有一条轻链的序列, 后者包含氨基酸序列 SEQ ID NO:54, 或在最优排列后与序列 SEQ ID NO:54 具有至少 80% 同一性的序列, 或/和它含有一条重链序列, 后者包含氨基酸序列 SEQ ID NO:69, 或在最优排列后与 SEQ ID NO:69 具有至少 80% 同一性的序列。

同样根据一个特殊的方面, 本发明涉及一种嵌合抗体, 或其功能片段之一, 根据本发明, 其特征是所述抗体进一步含有来自与鼠不同物种, 特别是人抗体的

轻链和重链恒定区，优选地来自人抗体的轻链和重链恒定区分别是  $\kappa$  和  $\gamma$ -1,  $\gamma$ -2 或  $\gamma$ -4 区。

同样根据一个特殊的方面，本发明涉及人源化抗体或其功能片段之一，根据本发明，其特征是所述抗体包含一条轻链和/或一条重链，其中所述轻链和/或重链的骨架节段 FR1 至 FR4 (such as defined below in examples 12 and 13, in tables 5 and 6) 分别来自人抗体轻链和/或重链骨架节段 FR1 至 FR4。

根据一个优选的实施例，人源化抗体或其功能片段之一，根据本发明，其特征是所述人源化抗体含有一条轻链，它含有氨基酸序列 SEQ ID NO:61 或 65，或在最优排列后与序列 SEQ ID NO:61 或 65 具有至少 80% 同一性的序列，或/和，它含有一条重链，它含有氨基酸序列 SEQ ID NO 75, 79 或 83，或在最优排列后与序列 SEQ ID NO:75, 79 或 83 具有至少 80% 同一性的序列。

优选地，人源化抗体，或其功能片段之一，根据本发明，其特征是所述人源化抗体含有一条轻链，它包含氨基酸序列 SEQ ID NO 65，并因此含有一条重链序列，它包含氨基酸序列 SEQ ID NO 79 或 83，优选 SEQ ID NO83。

根据一个新的方面，本发明涉及一种分离的核酸，其特征是它选自下面的核酸：

- a) 根据本发明，编码一种抗体或其功能片段之一的核酸，DNA 或 RNA；
- b) 如在 a) 中定义的核酸的互补核酸；和
- c) 在极度严格性条件下能够与核酸序列 SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9 或 11 中的至少一个 CDR 杂交的至少 18 个核苷酸的核酸，或在最优排列后与序列 SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9 或 11 具有至少 80%，优选 85%，90%，95% 和 98% 同一性的序列。

对于核酸，核酸或核酸序列，多聚核苷酸，寡核苷酸，多聚核苷酸序列，核苷酸序列，这些将在本发明中普遍使用的术语，要指出的是核苷酸的准确连接，可使要确定核酸的片段或区域含有或不含有非天然的核酸，正好能够对应于一个双链的 DNA，单链 DNA 作为所述 DNA 的转录产物，其中核苷酸可被修饰或未被修饰。

在此也必须理解的是本发明与自然染色体环境中的核苷酸序列无关，也就是说自然状态下序列。它与已经被分离和/或纯化的序列有关，也就是说它们已经直接或间接被选择，例如通过拷贝，它们的环境已经至少部分被改变。因此同样在此要指出的是通过，例如宿主细胞的基因重组获得，或通过化学合成获得的分离核酸。

对于在最优排列后与参考序列具有至少 80%，优选 85%，90%，95% 和 98% 的同一性百分比的序列，要指出的是就参考核苷酸序列而言，核苷酸序列具有某些修饰，如缺失，截断，延伸，嵌合融合和/或取代，特别是点取代。优选与下列序列有关，其中的序列编码与参考序列相同的氨基酸序列，这与基因代码的简并性有关，或能够特异与参考序列杂交的互补序列，优选在高度严格性条件下，特别是如下所述的情况下。

在高度严格性条件下的杂交的含义是以这种方式选择的温度条件和离子强度可维持互补 DNA 的两个片段之间进行杂交。通过图解说明，为了确定上述多聚核苷酸片段所进行的杂交步骤中的高严格性条件可很方便地采用下列的条件。

DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交以两个步骤进行：(1) 在含有 5 x SSC (1 x SSC 相当于 0.15 M NaCl + 0.015 M 柠檬酸钠溶液)，50% 甲酰胺，7% 十二烷基硫酸钠 (SDS)，10 x Denhardt's, 5% 硫酸葡聚糖和 1% 鲑鱼精 DNA 的磷酸盐缓冲液 (20 mM, pH 7.5) 中 42° C 预杂交 3 小时；(2) 根据探针的大小在一个温度下 (也就是，对于探针大小 > 100 个核苷酸的，42° C) 实际杂交 20 小时，然后在 20° C 2 x SSC + 2% SDS 中冲洗 20 分钟 2 次，在 20° C 0.1 x SSC + 0.1% SDS 中冲洗 20 分钟 1 次。对于探针大小 > 100 个核苷酸，最后一次冲洗在 60° C, 0.1 x SSC + 0.1% SDS 中进行 30 分钟。对于上述已确定大小的多聚核苷酸的高严格性杂交条件可由本领域专业技术人员根据 Sambrook 等人 (1989, 分子克隆：实验室手册，第二版, Cold Spring Harbor) 的教授，对更大或更小的寡核苷酸进行修改。

发明同样涉及含有依照本发明的核酸的载体。

发明的目标特别是克隆和/或表达载体，它们含有依照本发明的核苷酸序列。

根据本发明载体优选含有在已确定的宿主细胞中允许核苷酸序列表达和/或分泌的元件。因此载体必须含有一个启动子，启动和终止翻译的信号，以及适当的转录调节区。必须能以稳定的方式在宿主细胞中保留，可选择性地含有特殊的信号，它引导已翻译蛋白的分泌。本领域专业技术人员可选择这些不同的元件并进行优化作为宿主细胞所使用的一种功能。为了达到这种效应，根据本发明的核苷酸序列在选择的宿主中插入进自主复制载体中，或是选择宿主的整合载体。

通过本领域专业技术人员所使用的常规方法可制备这些载体，得到的克隆可通过标准的方法导入进合适的宿主中，如通过 lipofection, 电穿孔, 热休克, 或化学方法。

根据本发明的载体，例如是质粒或病毒来源的载体。它们可用于转化宿主细胞以便克隆或表达依照本发明的核苷酸序列。

本发明同样包括由依照本发明的载体转化的宿主细胞，或含有载体的宿主细胞。

可以从原核或真核系统中选择宿主细胞，例如细菌细胞，以及酵母细胞或动物细胞，特别是哺乳动物细胞。同样可能使用昆虫细胞或植物细胞。

发明同样与动物有关系，除人类以外，该动物含有至少一种根据本发明被转化的细胞。

根据另一个方面，本发明的一个主题是产生抗体或其功能片段之一的过程，根据本发明其特征是它含有下面的阶段：

- a) 根据本发明在一种培养基和适当的培养条件下培养宿主细胞；和
- b) 回收由培养基或所述培养细胞开始产生的所述抗体，或其功能片段之

一。

根据本发明转化的细胞可用于制备依照本发明的重组多肽的过程中。制备根据本发明的重组形式的多肽的过程包含在本发明中，其特征是应用了一种载体和/或由根据本发明的一种载体转化的细胞。优选由根据本发明的载体转化的细胞在一定条件下进行培养，该条件可表达所述多肽和回收所述的重组肽。

如已经描述的那样，宿主细胞可从原核或真核系统中选择。特别是，又可能鉴定依照本发明的核苷酸序列，促进其在这样一种原核或真核系统中的分泌。根据本发明携带这样一种序列的载体因此可很方便地用于要分泌的重组蛋白的生产中。实际上，这些目的重组蛋白的纯化可被促进，因为存在这样的现实，即它们存在于细胞培养上清液中，而不是存在于宿主细胞内部。

也可能通过化学合成制备依照本发明的多肽。这样一种制备过程同样是发明的主题。本领域专业技术人员了解化学合成的过程，例如应用固相的技术(特别见 Steward 等人, 1984, 固相肽合成, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 第二版, (1984))或采用部分固相的技术, 通过浓缩片段或在溶液中进行经典的合成。由化学合成获得并能包含相应的非天然氨基酸的多肽同样也包括在本发明中。

能由依照本发明的过程获得的抗体或其功能片段之一同样包括在本发明中。

根据第二个实施例，本发明与依照本发明的一种抗体有关，如上进一步所述，而且其特征是能特异地与人表皮生长因子受体 EGFR 结合和/或能特异地抑制所述 EGFR 受体的酪氨酸激酶活性。

通常，生长因子是小的蛋白参与正常细胞增殖和分化的调节中。这些生长因子中的一些在启动和维持细胞转化过程中具有重要地位，能作为自分泌或旁分泌因子。除了上面进一步所述的 IGF1，对于表皮生长因子也特别是这种情况，似乎可特殊地参与至肿瘤表现型的出现，肿瘤的进展和产生转移。

EGF 和 IGF1 通过其各自受体的介导而发挥其作用，这些受体在此称为 EGFR 和 IGF-IR。它与具有酪氨酸激酶活性的两种膜受体有关，据称其过度表达发生在大量癌症中。但必须注意的是这两种受体的相互作用并不清楚，对于这种关系许多研究队伍进行的研究就这两种受体的协同关系得出了相反的结果。

对于前列腺肿瘤细胞进行的研究显示，抗 EGFR 单克隆抗体(在此称为“MAB”或“Mab”)对自分泌环 EGF/EGFR 的阻断作用是通过 DU145 细胞完全丧失对 IGF1 的反应表现出来的(Connolly J.M. 和 Rose D.P., Prostate, Apr. 24(4):167-75, 1994; Putz T. 等人, Cancer Res., Jan. 1, 59(1):227-33, 1999)。这些结果表明阻断 EGF 受体足以完全抑制由两种受体(EGFR 和 IGF-IR)活化所产生的转化信号。另一方面，其他研究(Pietrzkowski 等人, Cell Growth Differ, Apr., 3(4):199-205, 1992; Coppola 等人, Mol Cell Biol., Jul., 14 (7) : 4588-95, 1994)显示 EGFR 的过度表达需要功能性 IGF-IR 的存在以发挥其有丝分裂和转化体的潜力，尽管 IGF-IR 就其一部分而言，并不需要功能性 EGFR 的存在以介导这种

作用。这两个系列的研究与倾向于阻断 IGF-IR，同时影响两种受体的策略更为一致。

以一种令人惊讶的方式，发明者首先证明了同时抑制 IGF1 和/或 IGF2 与 IGF-IR 受体的附着以及 EGF 与 EGFR 受体的附着可使这两种作用产生明显的协同效应，获得的这两种作用在携带表达这两种受体的肿瘤的裸鼠体内可抑制肿瘤生长。能够解释协同效应的更可能的假设之一是两个生长因子 EGF 和 IGF1(和/或 IGF2) 本身在正常细胞转化为具有肿瘤特征的细胞和/或在某些肿瘤的肿瘤细胞的生长和/或增殖过程中是协同作用的，特别是对于那些过度表达两种受体 EGFR 和 IGF-IR 和/或由这两种受体介导的转导信号过度活化，特别是在这些受体的酪氨酸激酶活性水平上的肿瘤。

根据此实施例的一个优选的方面，发明与如上进一步所述的抗体有关，其特征是它含有一种双特异性的抗体，含有一个第二基序，可特异地抑制 EGF 与 EGFR 的附着和/或特异地抑制所述 EGFR 受体的酪氨酸激酶活性。

术语“第二基序”在上面要指出的特别是一条氨基酸序列，含有能够与 EGFR 特异结合的片段，特别是抗 EGFR 抗体可变链的 CDR 区，或具有足够长度以发挥这种特异结合作用的这种 CDR 区的片段之一，或抗 EGFR 抗体的几个 CDR 区。

双特异性或双功能性抗体形成了第二代单克隆抗体，其中两个不同的可变区组合在同一个分子中(Hollinger 和 Bohlen, 1999, *Cancer and metastasis rev.* 18: 411-419)。它们的应用已经证明了在诊断领域和治疗领域，它们都能恢复新的效应器功能，或能靶向肿瘤细胞表面上的几个分子。这些抗体可通过化学方法(Glennie MJ 等人, 1987 *J. Immunol.* 139, 2367-2375; Repp R. 等人, 1995 *J. Hemat.* 377-382)或体细胞方法(Staerz U.D. 和 Bevan M. J. 1986 *PNAS* 83, 1453-1457; Suresh M. R. 等人, 1986 *Method Enzymol.* 121: 210-228)获得，但同样可优选通过基因工程技术，该技术可强制进行异二聚化，因此可加速所寻找的抗体的纯化过程(Merchand 等人, 1998 *Nature Biotech.* 16:677-681)。

这些双特异性抗体可构建为整个 IgG、双特异性 Fab' 2、Fab' PEG 或完整体或其他的双特异性 scFv，但同样可构建为四价的双特异性抗体或对于每个靶向抗原存在两个附着位点(Park 等人, 2000 *Mol. Immunol.* 37 (18):1123-30)或如上进一步所述的其片段。

除了产生和应用双特异性抗体较产生两个特异性抗体要简便得多所获得经济方面的优势以外，使用这种双特异性抗体的优势是减少了治疗的毒性。这是因为使用双特异性抗体可使循环抗体的总量和因此产生的可能毒性减少。

在本发明的一个优选实施例中，双特异性抗体是一个二价或四价的抗体。

实际上，使用四价双特异性抗体的兴趣在于它较二价抗体有更强的亲合力，因为对于每个靶标存在两个附着位点，在本发明中分别是 IGF-IR 和 EGFR。

与选择上述抗 IGF-IR 抗体的功能片段相似的方式，所述的第二基序选自片

段 Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv, scFv-Fc 和完整体, 或任何其半衰期已经被增加的形式, 如 pegylated 片段如 Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')<sub>2</sub>-PEG 或 Fab'-PEG。根据本发明的一个更优选的方面, 所述的第二个抗 EGFR 基序可来自鼠单克隆抗体 225, 其鼠-人嵌合衍生物 C225, 或这种抗体 225 衍生的人源化抗体。

仍根据另一个方面, 本发明的一个主题是抗体或其功能片段之一, 根据本发明作为一种药物, 优选如上所确定的人源化抗体。抗体, 对于本发明余下的描述, 必须被理解为抗 IGF-IR 抗体以及双特异性抗 IGF-IR/EGFR 抗体。

同样发明与一种药学组合物有关, 作为有效成分它含有的一种化合物, 根据本发明包括一种抗体, 或其功能片段之一, 优选与一种赋形剂和/或药学可接受的载体混合。

仍然根据另一个实施例, 本发明同样与一种药学组合物有关, 如上面进一步所描述的, 它含有一个第二化合物, 选自能特异抑制 EGF 与人表皮生长因子受体 EGFR 附着和/或能特异抑制所述 EGFR 受体的酪氨酸激酶活性的化合物。

在本发明的一个优选的方面, 所述第二化合物选自分离的抗 EGFR 抗体, 或其功能片段, 能通过竞争作用抑制 EGF 与 EGFR 的附着。更特别的是, 所述的抗 EGFR 抗体选自单克隆, 嵌合或人源化抗 EGFR 抗体, 或其功能片段。更为特别的是, 所述的抗 EGFR 抗体的功能片段选自片段 Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc 或完整体, 或任何其半衰期已被增加的片段, 如 pegylated 片段。所述的抗体以一种更为优选的方式可含有鼠单克隆抗体 225, 其鼠-人嵌合衍生物 C225(也称为 IMC-C225)或由这个抗体 225 衍生的人源化抗体。

本发明的另一个补充实施例含有如上所述的一种组合物, 为了作为一种组合产物同时, 单独或相继使用, 它可含有一种细胞毒/细胞生长抑制剂和/或 IGF-I 和/或 EGF 受体各自的酪氨酸激酶活性抑制剂。

“同时使用”可理解为依照本发明的组合物的两种化合物以单一和相同的药物形式给药。

“单独使用”可理解为依照本发明的组合物的两个化合物同时以不同的药物形式给药。

“相继使用”可理解为依照本发明的组合物的两个化合物每个都以不同的药物形式相继给药。

依照本发明的组合物以普通的形式可很大程度上的增加治疗癌症的效率。换言之, 依照本发明抗 IGF-IR 抗体的治疗效应可以一种意想不到的方式通过给予一种细胞毒性剂而实现。依照本发明的一种组合物随后所产生的另一个主要优势是有可能使用有效成分的有效剂量更低, 可使出现第二效应的危险性得到避免或减少, 特别是细胞毒性剂的作用。

另外, 依照本发明这种组合物可使所期望的治疗效应更快速的达到。

在一个特别优选的实施例中, 依照本发明作为一种组合产物的所述组合物的

特征是所述的细胞毒/细胞生长抑制剂选自与 DNA 相互作用的药剂, 抗代谢物, 拓扑异构酶 I 或 II 抑制剂, 或纺锤体抑制剂或稳定剂或其他任何能用于化疗中的药剂。对于前面所述每种类型的细胞毒性剂, 这样的细胞毒/细胞生长抑制剂, 例如可在 VIDAL 2001 版中引用, 所在的页面专门针对附加在癌学和血液学一栏“细胞毒素类”中的化合物, 就本文而言, 这些引用的细胞毒化合物在此引用作为优选的细胞毒性剂。

在一个特别优选的实施例中, 依照本法且作为一种组合产物的所述组合物的特征是所述的细胞毒性剂可与所述抗体化学性偶联以便同时使用。

在一个特别优选的实施例中, 依照本发明所述的组合物的特征是所述的细胞毒/细胞生长抑制剂选自纺锤体抑制剂或稳定剂, 优选长春瑞宾和/或长春氟宁和/或长春新碱。

为了加速所述细胞毒性剂和所述的依照本发明的抗体之间的偶联, 特别有可能在要被偶联的两个化合物之间导入间隔分子, 如聚(烯基)乙二醇, 象聚乙二醇或氨基酸, 在另一个实施例中, 使用所述细胞毒性剂的活性衍生物, 它已经被引入了一些功能, 能与依照本发明的所述抗体反应。这些偶联技术对于本领域专业技术人员是熟知的, 在这里的描述中并没有被扩展。

在另一个优选的实施例中, 所述 IGF-I 和/或 EGF 受体酪氨酸激酶活性抑制剂选自衍生的天然药剂, 二苯胺酞酰亚胺, 吡唑-或吡咯吡啶嘧啶或喹唑啉。这样的抑制剂对于本领域的专业技术人员是熟知的, 并在文献中有所描述 (Ciardiello F., Drugs 2000, Suppl. 1, 25-32)。

EGFR 的其他抑制剂, 没有任何限制, 可含有抗 EGFR 单克隆抗体 C225 和 22Mab (ImClone Systems Incorporated), ABX-EGF (Abgenix/Cell Genesys), EMD-7200 (Merck KgaA) 或化合物 ZD-1834, ZD-1838 和 ZD-1839 (AstraZeneca), PKI-166 (Novartis), PKI-166/CGP-75166 (Novartis), PTK 787 (Novartis), CP 701 (Cephalon), 来氟米物 (Pharmacia/Sugen), CI-1033 (Warner-Lambert Parke-Davis), CI-1033/PD 183, 805 (Warner-Lambert Parke-Davis), CL-387, 785 (Wyeth-Ayerst), BBR-1611 (Boehringer Mannheim GmbH/Roche), Naamidine A (Bristol-Myers Squibb), RC-3940-II (Pharmacia), BIBX-1382 (Boehringer Ingelheim), OLX-103 (Merck & Co), VRCTC-310 (Ventech Research), EGF 融合毒素 (Seragen Inc.), DAB-389 (Seragen/Lilgand), ZM-252808 (Imperial Cancer Research Fund), RG-50864 (INSERM), LFM-A12 (Parker Hughes Cancer Center), WHI-P97 (Parker Hughes Cancer Center), GW-282974 (Glaxo), KT-8391 (Kyowa Hakko) 或“EGFR 疫苗” (York Medical/Centro de Immunologia Molecular)。

仍然根据发明的另一个实施例, 如上所述的组合物同样含有另一个抗体化合物, 针对 HER2/neu 受体的细胞外结构区, 作为同时, 单独或连续使用的一种组合产物, 打算用于预防和治疗癌症, 特别是过度表达所述 HER2/neu 受体和受体

IGF-IR 和/或 EGFR 的癌症，如特别是乳腺癌。

参考文献可特别的参照 Albanell 等人(J. of the National Cancer Institute, 93(24) :1830-1831, 2001)和 Lu 等人(J. of the National Cancer Institute, 93(24):1852-1857, 2001)的出版物，证实了在将一种抗 HER2/neu 抗体与依照本发明的一种抗 IGF-IR 抗体进行组合方面的出人意料的关注。

以一种特殊的方式，依照本发明的组合物的所述抗 HER2/neu 抗体是一种称为 Trastuzumab (也称为 Herceptin)的抗体。

发明在另一个方面涉及一种组合物，其特征是至少一个所述抗体，或其功能片段之一，与一种细胞毒素和/或一种放射性元素交联在一起。

优选地，所述毒素或所述放射性元素能够抑制表达 IGF-IR 和/或 EGFR 受体的细胞的至少一种细胞活性，更优选的方式是能防止所述细胞的生长或增殖，特别是完全使所述细胞失活。

也优选的是，所述的毒素是肠细菌毒素，特别是绿脓假单胞菌外毒素 A。

用于治疗的优选与抗体交联的放射性元素(或放射性同位素)是能释放  $\gamma$  射线的放射线同位素，优选碘<sup>131</sup>，钪<sup>45</sup>，金<sup>198</sup>，钷<sup>100</sup>，铜<sup>67</sup>，铋<sup>213</sup>和铯<sup>211</sup>。可释放  $\beta$  和  $\alpha$  射线的放射性同位素同样可用于治疗。

对于与依照本发明的至少一种抗体，或其功能片段之一交联的毒素或放射性元素，要指出的是任何可使所述毒素或所述放射性元素与所述至少一种抗体，特别是通过两种化合物之间的共价偶联进行结合的方式，可以引入或不引入连接分子。

在可使交联物的所有或部分成分以化学(共价)，静电或非共价方式结合的试剂中，特别要提到苯醌，碳化二亚胺，更特殊的是 EDC(1-乙基-3-[3-二甲基-氨丙基]-碳化二亚胺氢氯化物)，二马来酰胺，二硫代双硝基苯甲酸(DTNB)，N-琥珀酰亚胺酰 S-乙酰硫代乙酸盐(SATA)，具有一个或多个可与紫外线(U.V.)反应的苯叠氨基的交联剂，优选 N-[4-(叠氮水杨酰氨基)丁基-3'-(2'-吡啶二硫代)-丙酰胺(APDP)，N-琥珀酰亚胺酰 3-(2-吡啶二硫代)丙酸盐(SPDP)，6-胍基-烟酰胺(HYNIC)。

偶联的另一种形式，特别是对于放射性元素，可以使用双功能离子螯合剂。

在这些螯合物中，可能要提到来自 EDTA(乙二胺四乙酸)或 DTPA(二乙撑三胺五乙酸)的螯合物，已经被开发用来结合金属，特别是放射活性金属，合免疫球蛋白。因此 DTPA 及其衍生物可由碳链上不同的基团取代以便增加配体-金属复合体的稳定性合刚性(Krejcarek 等人, (1977); Brechbiel 等人, (1991); Gansow (1991); US 专利 4 831 175)。

例如二乙撑三胺五乙酸(DTPA)及其衍生物，已经被广泛用于医药合生物学中很长时间了，以游离形式或与金属离子复合体的形式，其非常明显的特征是可与金属离子形成稳定的螯合物，并可与治疗或诊断目的的蛋白偶联，如在癌症治疗

中开发放射免疫交联剂所使用的抗体 (Meases 等人, (1984); Gansow 等人, (1990))。

同样优选地, 依照本发明形成所述交联物的所述至少乙种抗体选自其功能片段, 特别是其 Fc 部分的截断片段, 如 scFv 片段。

而且本发明包括使用依照本发明的组合物制备一种药物。

更特殊地, 根据另一个实施例, 发明与使用一种抗体或其功能片段, 和/或一种组合物来制备一种准备用来防止或治疗疾病的药物有关, 该疾病是由 IGF-IR 和/或 EGFR 受体的过度表达和/或异常活化诱导的, 和/或与由 IGF-1 或 IGF-2 与 IGF-IR 和/或 EGF 与 EGFR 和/或 HER2/neu 相互作用介导的信号转导通路的过度活化有关。

优选地, 依照本发明所述的应用, 其特征是使用所述的药物并不诱导或仅轻微诱导第二效应, 与胰岛素受体 IR 的抑制有关, 也就是说, IR 受体与其天然配体的相互作用的抑制是由于所述药物的存在, 特别是通过所述药物与 IR 附着所形成的竞争性抑制。

而且本发明包括使用一种抗体, 或其功能片段之一, 优选人源化, 和/或依照本发明制备一种药物的组合物, 该药物是准备用来抑制正常细胞转化为具有肿瘤特征的细胞, 优选 IGF 依赖性的, 特别是 IGF1-和/或 IGF2-依赖性和/或 EGF-依赖性和/或 HER2/neu-依赖性的细胞。

同样本发明涉及使用一种抗体, 或其功能片段之一, 优选人源化, 和/或依照本发明制备一种药物的组合物, 该药物是用来抑制肿瘤细胞的生长和/或增殖, 优选 IGF-依赖性, 特别是 IGF1-和/或 IGF2-依赖性和/或 EGF-依赖性和/或雌激素依赖性, 和/或 HER2/neu-依赖性的细胞。

总体上, 本发明的主题是使用一种抗体或其功能片段之一, 优选人源化, 和/或依照本发明的一种组合物, 来制备准备用来防止或治疗癌症的一种药物, 优选表达 IGF-IR 和/或 EGFR 的癌症, 和/或优选由 IGF-1 或 IGF-2 与 IGF-IR 和/或 EGF 与 EGFR 相互作用介导的信号转导通路的过度活化有关的癌症, 例如 IRS1 的过度表达。

同样本发明的主题是使用一种抗体, 或其功能片段之一, 优选人源化, 和/或依照本发明的一种组合物, 来制备准备用来防止或治疗干癣的一种药物, 干癣的表皮过度增殖与 IGF-IR 和/或 EGFR 的表达或过度表达, 和/或与由 IGF-IR 与其天然配体和/或 EGFR 与其天然配体相互作用介导的信号转导通路的过度活化有关 (Wraight C. J. 等人, Nat. Biotechnol., 2000, 18 (5) :521-526. 胰岛素样生长因子 I 受体反义寡核苷酸对干癣表皮过度增殖的逆转)。

在要防止或治疗的癌症中, 优选前列腺癌, 骨肉瘤, 肺癌, 乳腺癌, 子宫内膜肿瘤或结肠癌或任何其他过度表达 IGF-IR 的癌症。

仍然根据另一个方面, 本发明的一个主题是一种诊断方法, 优选在体外诊断

与 IGF-IR 和/或 EGFR 受体过度表达或表达下调, 优选过度表达有关的疾病, 从怀疑有 IGF-IR 和/或 EGFR 受体的异常存在的生物学标本开始, 其特征是所属的生物学标本与依照本发明的一种抗体, 或其功能片段之一有关, 如果需要, 所述的抗体可能是被标记的。

优选在所述诊断方法中与 IGF-IR 和/或 EGFR 受体的过度表达有关的所述疾病是癌症。

所述的抗体或其功能片段可以一种免疫交联物的形式存在, 或以标记抗体的形式存在以便获得可检测到和/或可定量的信号。

标记的抗体或依照本发明的其功能片段包括, 例如称为免疫交联物的抗体, 例如可与酶如过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\alpha$ -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖淀粉酶、碳酸酐酶、乙酰胆碱酯酶、溶菌酶、苹果酸脱氢酶或葡萄糖-6-磷酸脱氢酶交联或被一种分子如生物素, digoxigenin 或 5-溴脱氧尿苷酸交联。同样荧光标记可与抗体或依照本发明的其功能片段交联, 特别包括荧光素和其衍生物, 荧光色素, 罗丹明和其衍生物, GFP(GFP 为“绿荧光蛋白”), dansyl, 伞形酮等。在这种交联物中, 发明的抗体或其功能片段可通过本领域专业技术人员已知的方法制备。它们可与酶偶联或与荧光标记直接偶联或通过一个间隔基团或连接基团如聚醛, 象戊二醛, 乙二胺四乙酸(EDTA), 二乙撑三胺五乙酸(DTPA)的中间体偶联, 或存在偶联剂如上面所述的那些治疗性交联剂。含有荧光素型标记的交联物可通过与异硫氰酸盐反应而制备。

同样其他的交联物包括化学发光标记如鲁米诺和 dioxetanes, 生物发光标记如虫荧光素酶和虫荧光素, 或其他的放射活性标记如碘<sup>123</sup>、碘<sup>125</sup>、碘<sup>126</sup>、碘<sup>131</sup>、溴<sup>77</sup>、钨<sup>99m</sup>、铟<sup>111</sup>、铟<sup>113m</sup>、镓<sup>67</sup>、镓<sup>68</sup>、钨<sup>95</sup>、钨<sup>97</sup>、钨<sup>103</sup>、钨<sup>105</sup>、汞<sup>107</sup>、汞<sup>203</sup>、铯<sup>99m</sup>、铯<sup>101</sup>、铯<sup>105</sup>、钷<sup>47</sup>、碲<sup>121a</sup>、碲<sup>122a</sup>、碲<sup>125a</sup>、铊<sup>165</sup>、铊<sup>167</sup>、铊<sup>168</sup>、氟<sup>18</sup>、钷<sup>199</sup>、碘<sup>131</sup>。本领域专业技术人员已知的将治疗性放射性同位素与抗体直接或通过上面提到的一种螯合剂如 EDTA, DTPA 偶联的方法可用于在诊断中使用的放射性元素。同样可能要提到用 Na[<sup>1125</sup>I]通过氯胺 T 法[Hunter W.M. 和 Greenwood F.C. (1962) Nature 194:495]或用钨<sup>99m</sup>通过 Crockford 等人的技术(US 专利 4 424 200)或如 Hnatowich (US 专利 4 479 930)所述经 DTPA 被附着等进行标记。

因此, 抗体或依照本发明的其功能片段, 可用于检测和/或定量 IGF-IR 和/或 EGFR 受体在生物学标本中的过度表达或表达下调的过程中, 其特征是它包括下列的步骤:

- a) 将生物标本与抗体或依照本发明的其功能片段之一接触, 和
- b) 证明可能形成的 IGF-IR 和/或 EGFR/抗体复合体。

在一个特殊的实施例中, 抗体或依照本发明的其功能片段, 可用于在一个生物标本中检测和/或定量 IGF-IR 和/或 EGFR 受体的过程, 以监测预防和/或治疗 IGF-和/或 EGF 依赖性癌症或干癣的功效。

更普遍的，抗体或依照本发明的其功能片段，可很方便地用于下面的任何情况中，其中 IGF-IR 和/或 EGFR 受体的表达必须可以可定性和/或可定量的方式观察。

优选地，生物标本可通过生物体液，如血清，全血，细胞，组织标本或人的活组织检查获得。

可使用任何步骤或常规试验，以便进行这样一种检测和/或用药。所述的试验可以是一种竞争或夹心试验，或任何本领域专业技术人员已知的试验，依靠形成一种抗体-抗原型免疫复合体。根据本发明应用后，抗体或其功能片段之一可被固定或标记。这种固定可在本领域专业技术人员已知的多种支持物上进行。这些支持物可特别地包括玻璃，聚苯乙烯，聚丙烯，聚乙烯，葡聚糖，尼龙或天然的或修饰的细胞。这些支持物可以是可溶性的或不溶性的。

通过实例，根据 ELISA 技术，一种优选的方法可通过免疫荧光，或放射免疫测定 (RIA) 技术或相同的技术开始进行免疫酶过程。

因此，本发明同样包括实施诊断疾病的方法，或实施在一种生物标本中检测和/或定量 EGF-IR 和/或 EGFR 受体过度表达或表达下调的过程所需的试剂盒或装置，所述疾病由 IGF-IR 和/或 EGFR 受体的过度表达或表达下调诱导，优选过度表达所述受体，其特征是所述的试剂盒或装置包含下列的元件：

- a) 根据本发明的一种抗体或其功能片段；
- b) 可选择的是，可形成有利于免疫学反应的介质的试剂；
- c) 可选择的是，能证明由免疫学反应产生的 IGF-IR 和/或 EGFR/抗体复合体的试剂。

而且发明涉及使用一种组合物作为依照本发明的一种组合产物，以制备准备用来防止或治疗癌症的药物，特别是所述细胞毒性剂或所述的抗 HER2/neu 抗体通常用于处方中的癌症，特别是肿瘤细胞表达或过度表达 IGF-IR 和/或 EGFR 受体的癌症。

发明的一个主题同样是使用依照本发明的一种抗体来制备准备用来将一种生物活性化合物特异靶向表达或过度表达 IGF-IR 和/或 EGFR 受体的细胞的药物。

在此要说明的生物活性化合物是指任何能够调节，特别是抑制细胞活性，特别是其生长，其增殖，转录或基因翻译的化合物。

本发明的一个主题也是一种体内诊断试剂，含有根据本发明的一种抗体，或其功能片段之一，优选标记的，特别是放射标记的，及其在医学影像中的应用，特别是检测与细胞表达或过度表达 IGF-IR 和/或 EGFR 受体有关的癌症。

发明同样涉及作为一种组合产物的组合物或依照本发明作为一种药物的抗 IGF-IR 和/或 EGFR/毒素交联物或放射性元素。

优选地，作为组合产物的所述组合物或依照本发明的所述交联物将与一种赋形剂和/或一种药学可接受的载体混合在一起。

在本发明中，药学可接受的载体是指可进入药学组合物中的一种化合物或化合物的组合，没有令人反感的第二反应，例如可促进活性化合物的给药，增加其寿命和/或在体内的功效。这些药学可接受的载体是本领域专业技术人员所熟知的，并可根据所选择的活性化合物的给药方式和功能特性而改变的。

优选，这些化合物以全身的途径给药，特别是通过静脉内途径，肌肉内，真皮内，腹膜内或皮下途径，或通过口服途径。以一个更优选的方式，含有依照本发明的抗体的组合物以顺序的方式给药数次。

其给药的方式，剂量和最佳药物学形式可根据标准来确定，一般要考虑所制定的治疗措施适合患者，例如，患者的年龄或体重，其一般状况的严重性，对治疗和明显的第二效应的耐受性。

本发明的其他特征和优势将在实例和图表的继续描述中出现，其图例在下面表述。

#### 附图描述

图 1: IGF-IR 的图示。

图 2: 在 IGF 附着的过程中 IGF-IR 介导的信号转导图。

图 3A, 3B 和 3C: 单克隆抗体 7C10 识别 MCF-7 细胞表面上的天然 IGF-IR。

对于这个实验，MCF-7 细胞与 7C10 抗体或阴性对照抗体孵育，在荧光抗某种属的二抗的辅助下回收。标记在 FACS 上读数。第一个直方图(图 3A)单独对应于 MCF-7 细胞。在第二个直方图(图 3B)中，无阴影的曲线对应于对照同型鼠抗体的非特异性标记。在第三个直方图(图 3C)中，无阴影的曲线显示了 MAS7C10 对 IGF-IR 的识别。

图 4A, 4B 和 4C: 分别表达 IGF-IR 或 IR 的 Sf9 昆虫细胞的标记。

图 4A 显示了非转染细胞单独的标记(1)或用对照的分别识别 IGF-IR(2)或 IR(3)市售单克隆抗体标记的细胞。在图 4B, 唯一表达 IGF-IR 的 Sf9 细胞用  $\alpha$  IR3 (2)或抗 IR(3)标记，峰(1)代表单一细胞。在图 4C 中，唯一表达 IR 的 Sf9 用抗 IR(3)或  $\alpha$  IR3 (2)标记，峰(1)代表单一细胞。

图 5: 7C10 抗体对 IGR-I 诱导的 MCF-7 细胞增殖的抑制效应。

在存在或不存在要检测的 MAB 情况下，在增加 IGF1 浓度的情况下孵育 MCF-7 细胞。细胞的增殖通过 3H 胸苷掺入来评价。市售抗体  $\alpha$  IR3 用作试验的阳性对照。7G3 是鼠抗 IGF-IR IgG1，对增殖没有活性，用作对照的同型。

图 6A, 6B 和 6C:

- 图 6A: 单克隆抗体 7C10 对裸鼠中 MCF-7 肿瘤生长的体内效应;

- 图 6B 和 6C: 分别来自 Arteaga 等人(J. Clin. Invest., 84, 1418-1423, 1989)和 Li 等人(Cancer Immunol. Immunother., 49, 243-252)发表文章中的图表，图 6B 显示了鼠  $\alpha$  IR3 的效应(同样注明为  $\alpha$  IR3)和图 6C 显示了来自 1H7

的重组 scFv-Fc 对肿瘤生长的效应。

图 7: MAb7C10 效应和他莫西芬对体内肿瘤 MCF-7 生长的对比研究。

图 8A, 8B 和 8C: 鼠抗体 7C10 在体内肿瘤细胞的不同异种移植模型中的抗肿瘤活性研究。

图 8A 显示了骨肉瘤模型 SK-ES-1 中获得的结果, 图 8B 与一种前列腺雄激素非依赖性肿瘤 DU-145 有关, 图 8C 与肺非小细胞肿瘤模型 A549 有关。在这三种模型中, 每周两次腹腔内以 250  $\mu$ g/次用药/鼠的速率给药治疗。曲线 7G3, EC2 和 9G4 分别对应每个模型中用作试验对照同型的三种鼠 IgG1。

图 9: MAb7C10 与新霉酰胺(长春瑞宾)抗肿瘤效应的对比以及两种化合物在体内对细胞系 A549 生长的协同作用的研究。

图 10: MAb  $\alpha$  IR3, 7C10 和 1H7 对 IGF-2 诱导的 MCF-7 细胞增殖活性的比较。

图 11: 比较鼠 7C10 和嵌合 C7C10 MAb 对体外 IGF1 诱导的 MCF-7 细胞增殖的抑制作用。抗体 9G4 是用作试验对照同型的鼠 IgG1。

图 12: 7C10 和 h7C10MAb(人源化 1, 在此记为 7H2HM) 对体外 IGF1 诱导的 MCF-7 细胞增殖模型的效应比较。

图 13: 7C10 和 h7C10 MAb(人源化 1, 在此记为 7H2KM) 对 IGF1 诱导的信号转导的效应。第一行点对应于由抗磷酸酪氨酸抗体所显示的免疫沉淀的  $\beta$  链的磷酸化, 是来自在 IGF1 单独存在下或 IGF1 与要检测的多种抗体混合的情况下孵育的细胞中。9G4 和 hIgG1 分别是 7C10 和 h7C10(同样记为 7H2HM) 的对照同型。第二行点对应于  $\beta$  链的显示, 显示所有孔中沉淀的量均完全相等。

图 14: cDNA (SEQ ID No. 48) 序列, 其互补链 (SEQ ID No. 50) 序列, 及其翻译的氨基酸 (SEQ ID No. 49) 序列, 用引物 MKV-1 和 MKC 从鼠杂交瘤 7C10 扩增的 PCR 片段的序列, 该引物编码引导肽的 3' 末端和 7C10VL。

图 15: cDNA (SEQ ID No. 51) 序列, 其互补链 (SEQ ID No. 53) 序列和其翻译的氨基酸 (SEQ ID No. 52) 序列, 用引物 MHV-12 和 MHC-1 和 MHV-8 和 MHC-1 从鼠杂交瘤 7C10 扩增的 PCR 片段的序列, 所述引物编码引导肽的 3' 末端和 7C10VH。

图 16: 通过嵌合抗体 7C10 识别 IGF-1 受体, 同样称为 C7C10 (cos7 转染细胞培养物的上清液)。

图 17: 鼠 7C10 VL (SEQ ID No. 54) 的氨基酸序列与具有最大序列同源性的其他鼠抗体单位的比较。

氨基酸的编号方式采用 Kabat 等人 (1991) 的方法。框架区 (CDR 外侧) 的残基, 在 7C10VL 和 Kabat 鼠亚组 II (SEQ ID No. 57) 之间有差异, 被加上下划线。圆点表示在这个位置上与 7C10VL 的序列比较残基是相同的。DRB1-4.3 (SEQ ID No. 55) 代表了抗人鼠抗体 MHC II 类 B 链 (在 Kabat 数据库中的记录号为 N011794) 的轻链序列。C94-5B11' CL (SEQ ID No. 56) 代表了鼠抗体的轻链序列 (Kabat 数据库中的记录号为 P019314)。

图 18: 比较鼠 7C10 VL (SEQ ID No. 54) 的氨基酸序列与属于 Kabat 人亚组 II (SEQ ID No. 60) 并具有最大序列同源性的人轻链单位。

氨基酸序列被排列, 并与鼠 7C10VL 的序列相比较。圆点表示在这个位置上与 7C10VL 的序列比较残基是相同的。GM607 (SEQ ID No. 58) 代表由人淋巴瘤细胞系 GM607 分泌的  $\kappa$  轻链的序列 (Klobeck 等人, *Nucleic Acids Res.*, 12:6995-7006, 1984a 和 Klobeck 等人, *Nature*, 309:73-76, 1984b, Kabat 数据库中的记录编号为 N011606)。DPK15/A19 (SEQ ID No. 59) 代表人 V 胚细胞系  $\kappa$  II 的序列。

图 19: 比较鼠 7C10 (SEQ ID No. 54) 轻链 (VL), 人抗体 CM607 (SEQ ID No. 58) 和人源化 7C10 1 和 2 (SEQ ID Nos. 61 and 65) 的两种形式的可变区氨基酸序列。

氨基酸序列被排列, 并与鼠 7C10 VL 相比较。圆点表示在这个位置上与 7C10 VL 的序列相比较残基是相同的。GM607 代表由人淋巴瘤细胞系 GM607 分泌的  $\kappa$  轻链的序列 (Klobeck 等人, 1984a 和 1984b, Kabat 数据库中的记录编号为 N011606)。

图 20: cDNA 序列 (SEQ ID No. 62), 其互补链序列 (SEQ ID No. 64) 和其翻译的氨基酸序列 (SEQ ID No. 63), 由引导肽和 7C10 VL 人源化形式 1 重新组装编码所构建的基因序列。

图 21: cDNA 序列 (SEQ ID No. 66), 其互补链序列 (SEQ ID No. 68) 和其翻译的氨基酸序列 (SEQ ID No. 67), 由引导肽和 7C10 VL 的人源化形式 2 重新组装编码所构建的基因序列。

图 22: 比较鼠 7C10 VH (SEQ ID No. 69) 的氨基酸序列与属于 Kabat 鼠亚组 I (A), 并具有最大序列同源性的人鼠重链的序列。

氨基酸的编号方式采用 Kabat 等人 (1991) 的方法。框架区 (CDR 外侧) 的残基, 在 7C10VH 和 Kabat 鼠亚组 I (A) 之间有差异, 被加上下划线。圆点表示在这个位置上与鼠 7C10VH 的序列比较残基是相同的。AN03' CL (SEQ ID No. 70) 代表了鼠抗体 (在 Kabat 数据库中的记录号为 P001289) 的重链序列。

图 23: 比较鼠 7C10 VH (SEQ ID No. 69) 的氨基酸序列与属于 Kabat 鼠亚组 II (SEQ ID No. 72), 并具有最大序列同源性的人重链的序列。

加了下划线的残基是 Chothia 等人 (1989) 所确定的典型结构的一部分。圆点表示在这个位置上与鼠 7C10VH 序列比较残基是相同的。

人 VH FUR1' CL (SEQ ID No. 73) 代表了自体免疫来源的人抗核纤层蛋白 B 抗体 IgM/K 的重链序列 (Marietta 等人, *Arthritis and Rheumatism*, 36:1315-1324, 1993, Kabat 中的记录编号为: N020619)。人 germline (SEQ ID No. 74) 代表人 germinal 系 4.22 VH IV 的序列 (Sanz 等人, *EMBO. J.* 8:3741-3748, 1989)。

图 24: 比较鼠 7C10 (SEQ ID No. 69) 重链 (VH) 的可变区氨基酸序列和由 CDR 嫁接人源化 VH 1, 2 和 3 (分别为 SEQ ID Nos. 75, 79 和 83) 三种人源化形式的氨

核酸序列。

残基的编号方式与 Kabat 方法对应。序列被排列，并与鼠 7C10 VH 进行比较。圆点表示在这个位置上与鼠 7C10 VH 的序列相比较残基是相同的。

图 25: cDNA 序列(SEQ ID No. 76)，其互补链序列(SEQ ID No. 78)和其翻译的氨基酸序列(SEQ ID No. 77)，由引导肽和 7C10 VH 的人源化形式 1 重新组装编码所构建的基因序列。

图 26: cDNA 序列(SEQ ID No. 80)，其互补链序列(SEQ ID No. 82)和其翻译的氨基酸序列(SEQ ID No. 81)，由引导肽和 7C10 VH 的人源化形式 2 重新组装编码所构建的基因序列。

图 27: cDNA 序列(SEQ ID No. 84)，其互补链序列(SEQ ID No. 86)和其翻译的氨基酸序列(SEQ ID No. 85)，由引导肽和 7C10 VH 的人源化形式 3 重新组装编码所构建的基因序列。

图 28: 在 ELISA 中比较嵌合抗体 7C10(称为“C7C10”)和其人源化形式 1(7C10 hum1)对 IGF-1 受体的识别活性。

图 29: 在 ELISA 中对 7C10 抗体轻链的人源化形式 1 和 2 识别 IGF-1 受体活性的影响。

图 30: 在 ELISA 中比较嵌合抗体 7C10 和与人源化的 7C10 VL2 组合的重链的三种人源化形式(7C10 hum 1, 2 和 3)的 IGF-1 受体识别活性。

图 31: 7C10 抗体在常位模型 A549 中的抗肿瘤活性。

图 32A, 32B, 32C 和 32D: 在抗体 7H2HM(分别为图表 32C 和 32D)存在下在 4 小时中培养的 A549 和 MCF-7 细胞水平上观察到的 ADCC 的研究。抗体 h4D5 用作细胞 A549 和 MCF-7(分别为图表 32A 和 32B)的平行试验阳性对照。

图 33A, 33B 和 33C: 抗体 7C10 和 7H2HM 对 MCF-7 细胞的细胞循环的效应。

图 33A 代表了在缺少 IGF1 的情况下, G0/G1, S 和 G2/M 期中 MCF-7 细胞的比例, 表示为所观察到的总 MCF-7 细胞的显著百分比。

图 33B 代表了存在 IGF-1 的情况下 G0/G1, S 和 G2/M 期中 MCF-7 细胞的比例, 表示为所观察到的总 MCF-7 细胞的百分比。

与缺少 IGF1(“0”)的对照标本相比较的图表中表明有化合物的存在下, 图 33C 代表了在 S (■)和 G2/M (□)期 MCF-7 细胞的比例, 表示为所观察到的总 MCF-7 细胞的百分比。

图 34A 和 34B: 抗体 7C10 和 7H2HM 对体外 A549 细胞生长(图 34A)和体内 MCF-7 细胞生长(图 34B)的效应比较。

图 35A 和 35B: 与对照标本比较, 抗体 7H2HM 与新霉酰胺(NA)组合在模型 A549 中的体内协同作用的研究。图 35A 代表了种植的肿瘤体积的进展, 从治疗开始和经过大约 50 天, 作为治疗的函数(图 35A)。图 35B 代表了与大约 48 天相比, 这种进展以一种特殊的方式所获得的结果。在这个图表中, 抗体 7C10 所获得的结果已

经通过比较被引入(星号\*)对应于对照组/组(7C10 + Na)或对照组/组(7H2HM + Na)以 t-检验进行的比较)。

图 36: 抗体 7C10 和 7H2HM 对凋亡效应的研究。

数字表明抗体 7C10 和 7H2HM 可增强阿霉素的效应(阿霉素 2  $\mu$ g/ml)。

图 37A 至 37D: 通过在 FACS 上的标记证明 A549 细胞上 EGFR 和 IGF-IR 的存在。

图 38: 共同给予 MAB 7C10 和 225 对肿瘤 A549 体内生长的效应。

图 39: 共同给予 MAB 7C10 和 225 对用 A549 细胞同位种植小鼠生存的效应。

图 40A 和 40B: 证明 MAB 7C10 和 7H2HM 可抑制 IGF-IR 和 IRS-1  $\beta$  链的酪氨酸磷酸化。

图 41: 证明 MAB 7C10 和 7H2HM 对 IGF-IR 内化的诱导。

图 42A 至 42C: 证明 MAB7C10 和 7H2HM 对 IGF-IR 的降解。

#### 实例 1 鼠单克隆抗体(MAb)的产生和选择

目标是产生特异针对 IGF-IR 的 MAb, 不识别 IR, 设想的方案包括 6 个筛选阶段。它包括:

用重组 IGF-IR 免疫小鼠, 以便产生杂交瘤,

- 通过 ELISA 对培养上清液筛选可用来免疫的重组蛋白, 通过 ELISA 检测所有阳性的杂交瘤上清液, 在 MCF-7 肿瘤细胞表面上过度表达天然受体, 根据分别表达 IGF-IR 或 IR 的杆状病毒感染的昆虫细胞上 IGF-IR 和 IR 的差别识别, 评价在两个首次筛选中均阳性的杂交瘤上清液,

- 证实在此期选择的抗体能够在体外抑制 IGF1 所诱导的 MCF-7 细胞增殖,

- 根据对肿瘤 MCF-7 生长的影响, 保证所保留的候选物在裸鼠中的体内活性。

所有这些不同的阶段和获得的结果将简要地在下面的实例 1 中进行描述。

对于免疫阶段, 小鼠通过皮下途径用 8  $\mu$ g 重组 IGF-IR 注射两次。在雌性大鼠细胞与小鼠骨髓瘤 Sp20Ag14 融合前 3 天, 小鼠通过静脉注射 3  $\mu$ g 重组受体刺激小鼠。融合后 14 天, 杂交瘤的上清液通过 ELISA 在用 IGF-IR 敏化的板上进行筛选。保留发现上清液阳性的杂交瘤, 在被 FACScan 进行检测前进行扩增以证实产生的抗体同样能够识别天然的 IGF-IR。为了做到这一点, 来自过度表达 IGF-IR 的雌激素依赖的乳腺肿瘤的 MCF-7 细胞用在 ELISA 选择的杂交瘤产生的每种培养上清液孵育。在细胞表面上的天然/MAb 受体复合体通过与一种荧光色素偶联的第二抗种属抗体所识别。图 3A 至 3C 显示了用杂交瘤 7C10(图 3C)上清液获得的类型与单独标记的细胞十二抗(图 3A)或与用对照同型(图 3B)标记的细胞比较的直方图。

在选择阶段, 仅有同时识别重组受体和天然受体, 分泌 MAb 的杂交瘤可被选

择和克隆。产生由这些杂交瘤分泌的 MAb，然后在被 FACScan 检测之前，根据上述的方法，在表达 IGF-IR 或 IR 的 Sf9 昆虫细胞上纯化，以便去除同时识别两种受体的杂交瘤。图 4A 显示了直方图 1, 2, 3 的总体回收情况，这些直方图分别对应未感染的细胞+二抗(1)， $\alpha$  IR3 标记的未感染细胞+二抗(2)和抗 IR 抗体+二抗标记的未感染细胞(3)。第一个结果良好地显示了在这些未感染昆虫细胞表面上缺少可检测到的 IGF-IR 和 IR。图 4B 显示了通过表达 IGF-IR 的杆状病毒对感染细胞的标记。在第二个图中， $\alpha$  IR3 用作阳性对照，可如所预期的那样可良好地标记细胞(峰 2)，而抗 IR (峰 3)则叠加在单一细胞的峰上。最后，在图 4C 中，显示如所预期的，抗 IR 可很好地标记表达 IR 的 Sf9 细胞(峰 3)，但以一种意外的方式，在文献中所述的对 IGF-IR 有特异性的  $\alpha$  IR3 似乎同样可识别 IR(峰 2)。

在第三个筛选系统中获得的结果在表中进行总结，显示了一种 MAb: 7C10 的产生，满足了识别 IGF-IR，不识别 IR 的标准。Mab 7C10 的同种分型显示它涉及一种 IgG1。

表 1: MAb 7C10 对表达 IGF-IR 或 IR 的 Sf9 昆虫细胞的比较反应性

	MFI		
	(平均荧光强度)		
	未感染的细胞	IGF1R +细胞	IR +细胞
细胞	8	8	7
抗 IR	4.6	9	91
抗 IGF-IR ( $\alpha$ IR3)	9	35	32
EC2	8	13	11
抗鼠 FITC	4.3	9	13
超培养培养基	9	10	11
15B9	7.5	25	77.8
9F5D	8	41	40
13G5	7.8	37	24
7C10	8.6	49	13

供选择 MAb 的两个最后的筛选物在于证实后者能够抑制 IGF-1 在体外和体内诱导的 MCF-7 细胞系的细胞增殖。

对于体外选择，接种 MCF-7 细胞，无胎牛血清，然后在 IGF-1 浓度渐增（从 1 至 50 ng/ml）、存在或不存在加至终浓度 10  $\mu$ g/ml 的待测 7C10 抗体的条件下孵育。在此实验中，引用市售  $\alpha$  IR3 Mab 作为阳性对照，7C3 Mab(与 7C10 并行分离，对天然受体弱识别(在 FACS 上 MFI 为 50，相比 Mab 7C10 为 200))作为同型对照。通过以下用  $\beta$  计数器检测掺入含氘胸腺嘧啶核苷的细胞来评估细胞增殖。结果表述为增殖指数。数据呈现在图 5 中，显示 IGF1 能够以剂量依赖的方式刺激 MCF-7 细胞的增殖。用作阳性对照的 Mab  $\alpha$  IR3 完全地抑制 IGF-1 诱导的 MCF-7 细胞的

增殖。以同样的方式，MAb 7C10 显著地抑制 IGF-1 诱导的 MCF-7 细胞的生长。最后，如所预期的，用作同型对照的 MAb 7G3 很好地证明是对 MCF-7 细胞的体外肿瘤细胞生长没有影响。

在已建立的肿瘤模型中进行体内选择。为此，裸鼠接受皮下植入缓释雌激素，这对鼠模型中得到肿瘤是不可缺少的。雌激素植入 24 小时后， $5 \times 10^6$  MCF-7 细胞被皮下接种在小鼠右腹侧。此细胞接种 5 天后，肿瘤可测量，并随机形成 6 只小鼠的批次。每周对小鼠进行两次处理，在 5 至 6 周的时间内，以  $250 \mu\text{g}/\text{次}/\text{小鼠}$  的剂量。在对照组，小鼠以与同型对照鼠同样的方式处理。结果呈现于图 6A，显示抗体 7C10 对肿瘤生长产生非常显著的抑制作用。如果对照可获得关于  $\alpha$  IR3 的数据，此活性是特别意外的， $\alpha$  IR3 通常在 IGF1 受体结构区中被用作参照，已知对雌激素依赖肿瘤的活体内生长没有任何作用（见图 6B）。以同样的方式，与用来自鼠 MAb 1H7 的重组抗体 scFv-Fc 获得的结果相比（见图 6C），MAb 7C10 对 MCF-7 细胞的活体生长的抑制作用更有效。

## 实例 2. 7C10 和他莫西芬对 MCF-7 肿瘤活体生长效应的比较

为了确定抗体 7C10 对雌激素依赖乳腺癌治疗的有效性，将 7C10 和他莫西芬做了比较，而他莫西芬是当前用于治疗有局部和/或转移的进展乳腺癌以及预防复发的药物（见 VIDAL 2000, 1975-1976 页）。

在激素依赖的乳腺癌中，雌激素受体（ER）表达和 IGF-IR 表达存在着显著的相关关系（Surmacz E 等人，*Breast Cancer Res Treat*, Feb, 47 (3): 255-267, 1998）。此外，雌激素（E2）为了刺激细胞增殖似乎可与 IGF1（有时写作 IGF-I 或者 IGF1）一道起协同作用。已经显示 E2 治疗可以使 IGF-IR mRNA 及其蛋白质表达水平升高近 10 倍（Lee AV 等人，*Mol Endocrinol*, May, 13 (5): 787-796, 1999），具体表现为 IGF-IR 的磷酸化显著增加。另外，E2 能明显刺激 IRS-1（胰岛素受体底物-1 的缩写）的表达，而 IRS-1 是磷酸化 IGF-IR 的底物之一。

许多年来，他莫西芬广泛用于 E2 依赖乳腺癌患者的激素疗法（Forbes JF, *Semin Oncol*, Feb, 24 (1st Suppl 1): S1-5-S1-19, 1997）。他莫西芬和雌二醇竞争并抑制雌二醇对其受体的附着（Jordan V. C., *Breast Cancer Res. Treat.*, 31 (1): 41-52, 1994）。另外，他莫西芬还可通过抑制 IGF-IR 的表达和磷酸化来抑制 IGF-IR 依赖的增殖（Guvakova M. A. 等人，*Cancer Res.*, July 1, 57 (13): 2606-2610, 1997）。这些资料作为一个整体似乎指明了 IGF-IR 是 E2/ER 相互作用诱导的增殖过程中的一个重要介质。

长期使用他莫西芬还能显著增加子宫内膜肿瘤发生的危险（Fisher 等人，*J. National Cancer Institute*, 86, 7: 527-537, 1994; VIDAL 2000, 1975-1976）及 E2 非依赖性乳腺癌的间接复发（Li C. I. 等人，*J. Natl. Cancer Inst.*, July 4, 93 (13): 1008-1013, 2001）。于是在这种情形下利用 MCF-7 模型做了 7C10 抗

体和他莫西芬体内抗肿瘤效应的比较研究，以便明确其在与 IGF-IR 相关的 ER 增殖中的活性。为此， $7 \times 10^6$  MCF-7 细胞皮下种植于裸鼠，24 小时后植入长久释放的雌二醇颗粒（0.72 mg/片，释放超过 60 天），这是建立任何人类 E2 依赖性肿瘤动物模型必不可少的。细胞种植 5 天后测量肿瘤大小，并将小鼠分成 6 组，分别做如下处理：1) 腹膜内注射 7C10 抗体，剂量为 250  $\mu$ g/只，每周两次；2) 腹膜内注射 10  $\mu$ g 他莫西芬 PBS 液，内含 3% 羟丙烷基纤维素（HPC）；或者 3) 溶解他莫西芬的溶剂（羟丙烷基纤维素）。他莫西芬每天注射，持续 4 周，周末除外。接受类似单抗 7C10 处理的小鼠每天注射含 3% HPC 的 PBS。先前已经有一项研究证实单独注射溶剂对肿瘤生长没有影响。

图 7 结果显示单抗 7C10 能显著抑制肿瘤 MCF-7 的生长（星号\*对应于对照组/7C10 组以 t 检验的比较），而且 7C10 抗体似乎比他莫西芬抑制肿瘤生长更有效（圆圈° 对应于他莫西芬组/7C10 组以 t 检验的比较），提示这种单抗治疗可能替代他莫西芬治疗。

### 实例 3. 单抗 7C10 体内抗不同来源人体肿瘤活性的实证

#### a) 抗体 7C10 在三种肿瘤模型上的体内活性

为了归纳对其他表达 IGF1 受体肿瘤的活性，7C10 抗体分别在雄激素非依赖性的前列腺肿瘤模型 DU145（也写作 DU-145）、SKES-1 骨肉瘤模型以及肺非小细胞肿瘤模型 A549 上做了测试。实验方案与前述 MCF-7 的设计可比，结果（图 8A~8C）显示此单抗在这三种肿瘤模型上有明显的活性。前列腺肿瘤模型上观察到的活性特别引人关注，因为单抗 1H7 的单链 scFv 对雄激素非依赖性的前列腺肿瘤模型并无作用（Li 等人，2000）。

#### b) 抗体 7C10 在同位移植肿瘤模型 A549 上的体内活性

前述的传统的异种移植模型不能进行肿瘤转移的药物研究，因为皮下种植的肿瘤仍然局限于注射部位，因而不能如实人体的实际情况。为了在一个更接近实际情形的模型上评价我们的抗体，我们将 A549 细胞植入胸膜内。此模型（Clin. Cancer Res. 2000 Jan; 6 (1): 297-304 有详细描述）就可用于肿瘤转移研究，接近人体上观察到的肿瘤转移，如纵隔、肺、心以及脊柱的转移。实验中， $10^6$  A549 细胞注入雌性裸鼠胸膜内，7 天后，22 只裸鼠分成两批：一批接受 500  $\mu$ g/只的攻击剂量，然后每周两次 250  $\mu$ g 的 7C10 治疗；另一批依照同样的设计用同种型 9G4 抗体治疗。图 31 显示单抗 7C10 治疗的小鼠存活率显著提高，表明此抗体对肿瘤转移有作用。

### 实例 4. 体内单抗 7C10 和新霉酰胺的比较以及两种疗法共用的效果

新霉酰胺是一种在肺非小细胞肿瘤和乳腺转移肿瘤治疗中需要的化疗化合物。我们在 A549 肿瘤模型上做了有关 7C10 抗体和新霉酰胺的比较及这两种产品可能有的相互协同作用的研究。在实验中,  $5 \cdot 10^6$  A549 细胞被皮下移植到小鼠的右侧腹部, 5 天后测量肿瘤大小并开始单抗和/或新霉酰胺的治疗。抗体剂量始终为  $250 \mu\text{g}/\text{次}/\text{鼠}$ , 一周两次, 腹膜内注射。至于新霉酰胺, 腹膜内注射小鼠所能承受的最大剂量或者  $10 \text{ mg}/\text{kg}$ 。这种治疗每隔 7 天进行一次, 共 3 次, 共同治疗时两种产品注射前再混合。

图 9 的结果显示抗体 7C10 令人惊异地与传统的新霉酰胺治疗在这种模型中一样起作用, 同样于第 72 天在 7 只小鼠中的 5 只身上(无可测出的肿瘤)也观察到两种产品显著的协同作用。

#### 实例 5. 体外抑制 IGF2 诱发 MCF-7 肿瘤生长的研究

正如上面指出的, 许多肿瘤都过表达 IGF-IR, 尤其在大部分乳腺和结肠肿瘤中, 增殖信号是通过 IGF2 (有时写作 IGF-II 或 IGFII) 转给此受体的。所以, 确保单抗 7C10 同样可以体外抑制 IGF2 诱导的 MCF-7 肿瘤增长是非常必要的。为此, 细胞接种于 96 孔板中, 去除胎牛血清并加入在培养基中为终浓度的  $200 \text{ ng IGF2}/\text{ml}$  进行刺激(加或不加浓度为  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  的待测单抗)。图 10 的结果显示如同 IGF1 一样, IGF2 显著刺激 MCF-7 细胞的生长, 而加入用作对照的同种型 9G4 抗体则没有刺激作用。正如 De Leon 等人描述的 (Growth Factors, 6: 327-334, 1992) 一样, 在加入单抗  $\alpha \text{ IR3}$  的过程中没有观察到任何效应。另一方面, 单抗 7C10 完全抑制了 IGF2 诱发的生长, 其活性显著高于 1H7。

#### 实例 6. 嵌合 7C10 (C7C10) 和人源化 7C10 (h7C10) 的生物学活性

##### a) 7C10/C7C10 和 7C10/h7C10 的体外作用在 MCF-7 模型上的比较

如上所述, 在 MCF-7 模型上测试了嵌合形式的 7C10 抗体及纯化的人源化形式 1 的抗体(此处写作 7H2HM)。图 11 和 12 的结果分别显示出这两种形式的抗体很完美地保留了其抑制 IGF1 诱导的 MCF-7 肿瘤生长的特性。

##### b) 单抗 7C10 和 h7C10 在 IGF1 附着其受体后所诱发的信号转导过程的比较效应

体外实验中对 IGF1 诱导的 MCF-7 细胞系生长的抑制活性应该是单抗 7C10 结合 IGF1 受体过程中抑制 IGF1 介导的信号转导的转化。为证实这个假说, MCF-7 细胞在有或没有待测抗体存在的条件下和 IGF1 或不和 IGF1 共同孵育。经过短暂的孵育后, 溶解细胞, 免疫沉淀  $\beta$  链, 并借助抗磷酸酪氨酸激酶抗体评估此亚单位的磷酸化。图 13 的实验结果显示 7C10 或 h7C10 附着后显著抑制了 IGF-IR  $\beta$  亚单位的磷酸化, 与无关鼠抗体(9G4)或人抗体(实验方案中写作 IgG1)相反。

##### c) 7H2HM 抗体介入的 ADCC 机制

b)段所述信号转导的抑制是7C10和7H2HM抗体发挥生物学活性的主要机制,然而,在应用于人体时,IgG1的同种型7H2HM抗体可能通过ADCC(抗体依赖的细胞毒性)类型的机制引发细胞的溶解。为了证实此观点,来自人类供体的外周血NK(自然杀伤)细胞置于A549或预先和 $10\mu\text{g}$ 7H2HM抗体共同孵育4小时(每 $5\times 10^5$ 个细胞)并标记了 $^{51}\text{Cr}$ ( $50\mu\text{g}$ )的MCF-7细胞中。在本实验中,贺赛汀(herceptin)(图32A和32B中写作h4D5)作为实验的阳性对照。正如预期的那样,图32A至图32D的结果显示贺赛汀在A549和MCF-7两种细胞上都引发了明显的ADCC(分别见图32A和32B)。同样地,7H2HM亦可在A549细胞引发ADCC(见图32C),但此现象发生的幅度小于MCF-7细胞(见图32D)。

#### d) 抗体7C10和7H2HM对细胞周期的效应

体外实验观察到的MCF-7细胞生长抑制应能透过对细胞周期的效应而表现出来。为了回答这个问题,我们将 $4\times 10^5$ MCF-7细胞接种于6孔板,24小时后去除小牛血清,在有或无被测试抗体的条件下加入IGF1。经过24小时的孵育,收获细胞用于细胞周期的研究。图33B显示了有IGF1对进入细胞周期以及MCF-7细胞生长的效应和无IGF1对进入细胞周期以及MCF-7细胞生长的效应(见图33A)。加入生长因子后,可观察到G0/G1期的显著下降(从88.2%降至56.3%)而S期(从7.8%升至31%)和G2/M期(从4%升至12.7%)因此升高。加入抗体7C10和7H2HM(见图33C)过程中,可见进入细胞周期的进程明显受到抑制,其中要注意的是鼠源性抗体及其人源化类似物对细胞周期具有可相比的活性。作为阳性对照, $\alpha$ IR3在实验中的活性较7C10和7H2HM稍差,而对照同种型9G4抗体对细胞周期无影响。

#### e) A549体内模型上抗体7C10和7H2HM的比较活性

为了证实人源性抗体7H2HM的体内活性,我们将7H2HM和单抗7C10在肺非小细胞肿瘤模型A549上做了比较,除了将每周两次、每次剂量 $250\mu\text{g}$ 改为 $125\mu\text{g}$ 外,其余实验严格按上面的方案进行,因为大量的7H2HM抗体未利用。抗体9G4作为单抗7C10的同型对照,一无关的人免疫球蛋白同种型IgG1(以下称为HIgG1)用作人源化抗体7H2HM的对照。

图34A显示9G4与HIgG1的对照曲线没有明显差异,而鼠单抗7C10则如愿抑制了肿瘤的生长,至于人源化抗体7H2HM的活性强度与其鼠源性抗体完全一致。此结果连同前面体外实验观察到的现象提示人源化并未改变抗体的特性。另一方面,在小鼠异种移植模型中,人源化抗体的活性似乎固有地与信号转导的抑制机制联系在一起,于是,如果ADCC效应在裸鼠肿瘤生长抑制的过程中起作用,那么,应该可以观察到鼠源性和人源化抗体活性上的差异。

如所预期的,在MCF-7乳腺癌模型所做的同样的体内实验就显示抗体7H2HM在抑制体内肿瘤生长方面完全可与鼠源性抗体7C10媲美(图34B)。

#### f) 7H2HM和新霉酰胺之间协同作用的实证

重复实例4所提供的实验方案以期重获7C10及其人源化抗体7H2HM的结果。

图 35A 和 35B 的结果显示, 在有 7C10 的情况下, 人源化抗体和 7H2HM 和新霉酰胺之间有明显的协同效应。

g) 抗体 7C10 和 7H2HM 对 MCF-7 细胞体外凋亡的效应

如前所述, 在细胞表面过表达时 IGF-IR 可提供针对凋亡的保护。此外, 前述的实例也表明抗体 7C10 和 7H2HM 具有作为化疗活性化合物的潜力。为了测试抗体 7C10 和 7H2HM 诱导凋亡的能力并部分解释其与化疗药物的潜在协同作用, 我们对 MCF-7 细胞在有无阿霉素(可致体外细胞系凋亡的药剂)的条件下进行了实验。在实验中, MCF-7 细胞以  $2 \times 10^4/\text{cm}^2$  接种于平皿内并在无酚红的 10%胎牛血清(FCS) RPMI 培养基中培养 24 小时, 然后 PBS 洗两次, 再放回无 FCS 的培养基中培养。在加入  $10 \mu\text{g/ml}$  抗体之前允许有  $37^\circ\text{C}$ 、10 分钟的适应时间, 再  $37^\circ\text{C}$  培养 10 分钟, 将重组的 IGF-1 (Sigma) 加入培养基(终浓度  $50\text{ng/ml}$ )。细胞再次置于  $37^\circ\text{C}$ , 1 小时, 使抗体和 IGF-I 吸附。最后, 培养基中加入阿霉素(Sigma), 浓度  $2 \mu\text{g/ml}$ , 细胞继续  $37^\circ\text{C}$  孵育 24 小时。

$10 \mu\text{g/ml}$  新霉酰胺亦做同样的处理。

在用 annexin V-FITC (20 分钟,  $4^\circ\text{C}$ ) 和 DAPI ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) 标记后, 借助流式细胞术分析细胞的活力。死细胞百分率通过标记的 Annexin+/DAPI+集落计算。抗体 5C2 用作同型对照。

图 36 的结果显示阿霉素诱发了 8%的 MCF-7 细胞凋亡。当细胞经抗体 7C10 和阿霉素共同处理后可见细胞死亡明显增加。相同的效应亦见于抗体 7H2HM。抗体和新霉酰胺共用时也能观察到相同形式的结果。

### 实例 7. 编码单克隆抗体(MAb) 7C10 重和轻链可变区的基因的克隆策略

使用 TRI REAGENT™ (按照供应商提供的使用说明书, SIGMA, T9424) 从  $10^7$  的分泌抗体 7C10 的杂交瘤细胞中抽提总 RNA。借助 Amersham-Pharmacia 的'第一链 cDNA 合成'试剂盒(#27-9621-01, 按照供应商提供的使用说明书), 合成第一个 cDNA 链。对于二个链, 用试剂盒中含有的寡核苷酸 Not I-d(T)18 进行激发反应。

由此获得的 cDNA:mRNA 杂交体被用来通过 PCR 扩增编码 Mab 7C10 重和轻链的基因。通过使用对小鼠免疫球蛋白重和轻( $\kappa$ )链特异的寡核苷酸联合进行 PCR。对应于 5' 端的引物在对应于信号肽的区域内杂交(表 2 为重链, 表 3 为轻链)。这些引物是从数据库中的大量小鼠抗体序列中搜集的(Jones S.T. 等人, Bio/Technology 9:88-89, 1991)。对应于 3' 端的引物在重链恒定区内杂交(亚类 IgG1 的 CH1 区, 距 V-C 连接不远, 表 4 的 MHC-1 引物)和轻链( $\kappa$  区, 距 V-C 连接不远, 表 4 的 MKC 引物)。

表 2: 小鼠免疫球蛋白重链可变区(MHV) 5' 区的寡核苷酸引物("小鼠可变重链"~"MHV")

MHV-1: 5' ATGAAATGCAGCTGGGTCATSTTCTT 3' (SEQ ID No. 13)  
 MHV-2: 5' ATGGGATGGAGCTRATCATSYTCTT 3' (SEQ ID No. 14)  
 MHV-3: 5' ATGAAGWTGTGGTTAAACTGGGTTTT 3' (SEQ ID No. 15)  
 MHV-4: 5' ATGRACHTTGGGYTCAGCTTGRT 3' (SEQ ID No. 16)  
 MHV-5: 5' ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTT 3' (SEQ ID No. 17)  
 MHV-6: 5' ATGGCTGTCYTRGSGCTRCTCTTCTG 3' (SEQ ID No. 18)  
 MHV-7: 5' ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT 3' (SEQ ID No. 19)  
 MHV-8: 5' ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG 3' (SEQ ID No. 20)  
 MHV-9: 5' ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATT 3' (SEQ ID No. 21)  
 MHV-10: 5' ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCCT 3' (SEQ ID No. 22)  
 MHV-11: 5' ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG 3' (SEQ ID No. 23)  
 MHV-12: 5' ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCT 3' (SEQ ID No. 24)  
 NB KEY: R=A/G, Y=T/C, W=A/T, K=T/G, M=A/C, S=C/G.

表 3: 小鼠免疫球蛋白  $\kappa$  (轻)链可变区(MKV)5'区的寡核苷酸引物("小鼠可变  $\kappa$ " "MKV")

MKV-1: 5' ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT 3' (SEQ ID No. 25)  
 MKV-2: 5' ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGT 3' (SEQ ID No. 26)  
 MKV-3: 5' ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCT 3' (SEQ ID No. 27)  
 MKV-4: 5' ATGAGGRCCCTGCTCAGWTTYTTGG 3' (SEQ ID No. 28)  
 MKV-5: 5' ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTT 3' (SEQ ID No. 29)  
 MKV-5A: 5' ATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT 3' (SEQ ID No. 30)  
 MKV-6: 5' ATGAGGTKCYTYGYSAGYTYCTGRG 3' (SEQ ID No. 31)  
 MKV-7: 5' ATGGGCNTCAAGATGGAGTCACA 3' (SEQ ID No. 32)  
 MKV-8: 5' ATGTGGGGAYCTKTTTTYCMTTTTTCAAT 3' (SEQ ID No. 33)  
 MKV-9: 5' ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTT 3' (SEQ ID No. 34)  
 MKV-10: 5' ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTC 3' (SEQ ID No. 35)  
 MKV-11: 5' ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTT 3' (SEQ ID No. 36)  
 MKV-12A: 5' ATGRAGTYWCAGACCCAGGTCTTYRT 3' (SEQ ID No. 37)  
 MKV-12B: 5' ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTGT 3' (SEQ ID No. 38)  
 MKV-13: 5' ATGGATTCACAGGCCAGGTTCTTAT 3' (SEQ ID No. 39)  
 NB KEY: R=A/G, Y=T/C, W=A/T, K=T/G, M=A/C, S=C/G.

表 4: 小鼠  $V_H$  和  $V_L$  基因 3'端的寡核苷酸引物  
轻链(MKC):

5' ACTGGATGGTGGGAAGATGG 3' (SEQ ID No. 40)

小鼠  $\kappa$  区的恒定区:

```

A D A A P T V S I F P P S S (SEQ ID No. 41)
GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA TCC AGT (SEQ ID No. 42)
      || ||| ||| ||| ||| ||| |||
(MKC) CC ATC TTC CCA CCA TCC AGT (SEQ ID No. 43)

```

#### 重链(MHC-1)

```
5' CCAAGTGGATAGACAGATG 3' (SEQ ID No. 44)
```

小鼠  $\gamma$ -1(IgG1 亚类)的 CH1 区:

```

A K T T P P S V Y P L (SEQ ID No. 46)
GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT CCA CTG (SEQ ID No. 45)
      || ||| ||| ||| ||| ||| |||
(MHC-1) CCC CCA TCT GTC TAT CCA CTG (SEQ ID No. 47)

```

#### 实例 8. 克隆自鼠杂交瘤 7C10 的免疫球蛋白序列

遵循前述的扩增策略，对应于重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 的 PCR 产物用 pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems (Promega) 进行克隆。对 7C10 VL 而言，PCR 产物经 MKC 连同 MKV1 与 MKV2 引物扩增得到，而 7C10 VH 则需用 MHC-1 连同 MHV8 和 MHV12 引物扩增 PCR 产物。PCR 产物的全序列测定显示轻链有两处不同而重链只有一处。

##### a) 从寡核苷酸 MKV1 分离出的可变区

所得 DNA 序列具有功能性免疫球蛋白可变区的特征，因此推测是 7C10 VL 的编码基因，其 DNA (SEQ ID Nos. 48 和 50) 和氨基酸 (SEQ ID No. 49) 的 cDNA 序列见图 14。

##### b) 从寡核苷酸 MKV2 分离出的可变区

此轻链编码基因来自于异常 mRNA 转录物，该转录物存在于所有用于生产 7C10 杂交瘤的鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0ag14 中的原始 MOPC-21 肿瘤的标准融合伴侣中。该序列包含了一种 V、J 基因异常重组的方式 (四个碱基缺失致使读框中有一处改变) 以及 23 位胱氨酸-酪氨酸的突变。这些改变提示此轻链可能没有功能，尽管可以转录为 mRNA。假轻链的 DNA 序列没有给出。

##### c) 从寡核苷酸 MHV8 和 MHV12 分离出的可变区

除了寡核苷酸自身编码的序列之外，用 MHV8 和 MHV12 扩增得到的 DNA 序列完全一样。这种序列是一种功能性重链的新的编码序列，被推定为单抗 7C10 的 VH。编码 7C10 VH 的 cDNA 的 DNA (SEQ ID Nos. 51 和 53) 及氨基酸 (SEQ ID No. 52) 序列见图 15。

### 实例 9. 鼠-人嵌合基因的构建

构建嵌合抗体 7C10, 使鼠 7C10 的 VL 和 VH 分别联接到人恒定区  $\kappa$  (kappa) 和  $\gamma$  (gamma)-1 区。寡核苷酸用于修饰 7C10 的 VL 和 VH 编码 DNA 的侧翼序列 5' 与 3' 端, 使其能够克隆入载体进行哺乳动物细胞的表达。表达载体使用强启动子 HCMV, 以使嵌合抗体 7C10 重链和轻链有效转录。另一方面, 这些载体同样含有 SV40 的复制起始点, 使 DNA 高效复制并在 cos 细胞中瞬时表达。

### 实例 10 嵌合抗体 7C10 IGF-1 受体识别活性的表达和评估

两个包含嵌合抗体 7C10 编码 DNA 的质粒共转染 cos-7 细胞 (ATCC 编号 CRL-1651) 用于研究重组抗体的瞬时表达。孵育 72 小时后移去培养基, 离心去除细胞碎片, 用 ELISA 技术分析人 IgG1 抗体的产生 (见实例 16) 及其识别 IGF-1 受体的活性 (见实例 17)。

人 IgG1/Kappa 浓度用 ELISA 方法检测, 结果显示嵌合抗体 7C10 在 cos-7 细胞中的表达浓度介于 300~500 ng/mm, 与大多数抗体测得的数据具有可比性。

IGF-1 受体的识别采用 ELISA 试验, 结果显示嵌合抗体特异地识别受体, 且相对亲和力很好 (见图 3A, 3B 和 3C)。这为 7C10 抗体正确的 VH 和 VL 基因鉴定提供了功能上的证据。另外, 这种 7C10 的嵌合形式看来对人源化抗体亲和力的评估是一个不可缺少的工具。

### 实例 11. 鼠抗体 7C10 可变区的分子建模

为协助并改良经所谓“CDR 嫁接”实现人源化的过程, 基于 1AY1 重链和 2PCP 轻链的 X 射线结晶衍射获得的结构, 我们构建了一个鼠抗体 7C10 VL 和 VH 区的分子模型。

### 实例 12. 抗体 7C10 轻链可变区 (7C10 VL) 经 CDR 嫁接的人源化过程

#### a) 7C10 VL 氨基酸序列与所有已知鼠序列的比较

作为经 CDR 嫁接而人源化过程的一项预备步骤, 7C10 VL 的氨基酸序列和 Kabat 数据库中所有的鼠 VL 序列进行了比较 (数据库的互联网地址是: [ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/database/kabat/fasta\\_format/](ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/database/kabat/fasta_format/), 最后更新于 1999 年)。7C10 VL 经 Kabat 等人鉴定为  $\kappa$  轻链 II 亚组 (见 *Sequences of proteins of immunological interest* 第五版, NIH publication No. 91-3242, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, 1991)。序列同一性高达 95% 的鼠单克隆抗体轻链可变区 (VL) 已经鉴定 (DRB1-4.3 (SEQ ID No. 55): 95%, C94-5B11' CL (SEQ ID No. 56): 95%, 见图 17)。为确定 7C10 VL 序列中的非寻常氨基酸残基, 7C10 VL 氨基酸序列 (SEQ ID No. 54) 和 Kabat 定义的鼠  $\kappa$  轻链 II 亚组的共有序列 (SEQ ID No. 57) 进行了排列 (见图 17)。

在 Kabat 定义的 3 号位置, 通常出现在  $\kappa$  轻链 II 亚组 (71%) 的缬氨酸 (V) 被亮氨酸 (L) 取代。此处的亮氨酸并非罕见, 比如 DR31-4.3 和 C94-5B11' CL 就

是如此。根据构建的分子模型，此氨基酸似乎并无特殊功能。因此，其保守性在人源化过程中可不必考虑。

在 Kabat 定义的 7 号位置，通常出现在  $\kappa$  轻链 II 亚组 (66%) 的苏氨酸 (T) 被异亮氨酸 (I) 取代。此处的异亮氨酸相对地较为罕见，因为在所有已知的鼠 VL 序列中仅仅发现了 15 次而在人 VL 序列中一次都没有发现过。分子模型显示此处的残基 (17) 指向分子的表面，但并不与 CDR 接触 (最近处的 CDR 残基应是 Kabat 42 位精氨酸)。另外，17 位残基似乎也不太可能直接接触抗原。因此，其保守性在人源化过程中可不必考虑，至少不是首先要考虑的。

在 Kabat 定义的 77 号位置，通常出现在  $\kappa$  轻链 II 亚组 (95.5%) 的精氨酸 (R) 被丝氨酸 (S) 取代。此处的丝氨酸并非罕见。

#### b) 7C10 VL 的氨基酸序列与所有已知人 VL 序列的比较

为了确定“CDR 嫁接”的最佳候选序列，我们搜索了可能与 7C10 VL 具有最大同源性的源自人的  $\kappa$  (Kappa) 型 VL 区，最后还比较了鼠 7C10 $\kappa$  (Kappa) 型 VL 的氨基酸序列和所有 Kabat 数据库中的人  $\kappa$  (Kappa) VL 序列。鼠 7C10 VL 和 Kabat (1991) 等定义的人 II 亚组  $\kappa$  (Kappa) 型 VL 区有最大的序列同源性。源自人单克隆抗体的 VH 区在构成可变区的 112 个氨基酸中具有高达 75.9% 的序列同一性 (GM607 (SEQ ID No. 58)，见图 18)。一个源自人胚细胞系的序列 DPK15/A19 (SEQ ID No. 59) 也得以鉴定，序列和 GM607 (Klobeck 等人，1984) 相比有 76% 的同一性 (见图 18)。由此，GM607 序列被选定为鼠 7C10 VL 对人 CDR 的受位序列 (根据 Kabat 的定义)。通过比较 GM607 序列和人 II 亚组的共有序列 (SEQ ID No. 60) (图 18)，没有发现框架区 (Rch) 有什么特别的氨基酸残基，同样的事实再次指明 GM607 是进行 CDR 嫁接的很好的候选位置。

#### c) 人源化的 7C10 VL

人源化的下一步是把鼠 7C10 VL CDR 与筛选出来的人轻链框架区 (Rch) 即 GM607 (Klobeck 等人，1984) 连接起来。在这一步骤里，鼠 7C10 Fv 区的分子模型对于选择保守的氨基酸残基特别有用，保守的序列既能在维持抗体分子三维结构方面 (CDR 的规范结构，VH/VL 界面，等等) 起到一定作用又能结合抗原分子。在框架区内，鼠 (7C10 VL) 和人 (GM607) 氨基酸的每一处差异都进行了小心翼翼的检查 (见表 5)。另外，鼠 7C10 VL 序列里经鉴定的某些特别的氨基酸残基 (见实施例 12. a) 在必要时也都予以考虑。

第一种 7C10 VL 经“CDR 嫁接”人源化的形式 (human 1) 只是将 GM607 框架区 (Rch) 的一个残基改变，即 Rch 1 中的第 2 位残基缬氨酸 (按 Kabat 命名)，它实际上参与了 7C10 VL CDR 1 规范结构的构成，因而可能在维持 CDR 1 环的正确构型方面起关键作用，所以此缬氨酸在人源化时依然保留在同样的位置上 (见表 5 和图 19 的氨基酸序列 (SEQ ID No. 61) 和图 20 的 DNA 序列 (SEQ ID Nos. 62 和 64)，以及构成此肽信号的氨基酸序列 (SEQ ID No. 63)。

第二种 7C10 VL 经“CDR 嫁接”人源化的形式 (human 2) 没有在人轻链 GM607 Rch 内做任何改变, 框架区里所有的残基均来自人, 包括第 2 位替换鼠 7C10 VL 缬氨酸至人异亮氨酸的突变 (见于人轻链 GM607 的相同位置 (见表 5 和图 19 的氨基酸序列 (SEQ ID No. 65) 和图 21 的 DNA 序列 (SEQ ID Nos. 66 和 68), 以及构成此肽信号的氨基酸序列 (SEQ ID No. 67) )。这种形式是完全彻底的人源化 (当然 CDR 本身要除外), 因为框架区内所有的氨基酸残基都来自人轻链 GM607。

表 5: 氨基酸序列排列, 引导改型的人 7C10 V<sub>L</sub> 区设计

kabat	#	FR 或 CDR	小鼠轻链 7C10	人胚细胞系 DPK15/A19	GM 607	改型的人	改型的人 7C10 2	注释
1	1	FR1	D	D	D	D	D	
2	2		V*	I*	I*	V*	I*	Cano LI 4 (16) 微调带
3	3		L	V	V	V	V	
4	4		M	M	M	M	M	微调带
5	5		T	T	T	T	T	
6	6		Q	Q	Q	Q	Q	
7	7		I	S	S	S	S	
8	8		P	P	P	P	P	
9	9		L	L	L	L	L	
10	10		S	S	S	S	S	
11	11		L	L	L	L	L	
12	12		P	P	P	p	P	
13	13		V	V	V	V	V	
14	14		S	T	T	T	T	
15	15		L	P	P	P	P	
16	16		G	G	G	G	G	
17	17		D	E	E	E	E	
18	18		Q	P	P	P	P	
19	19		A	A	A	A	A	
20	20		S	S	S	S	S	
21	21		I	I	I	I	I	
22	22		s	S	S	S	S	
23	23	FR1	c	c	C	C	C	
24	24	CDR1	R	R	R	R	R	
25	25		S*	S*	S*	S*	S*	Cano LI 4
26	26		s	S	s	S	S	
27	27		Q	Q	Q	Q	Q	

27A	28		s	S	s	S	S	
27B	29		I*	L*	L*	i*	i*	Cano LI 4
27C	30		V	L	L	i	I	
27D	31		H	H	H	H	H	
27E	32		S	S	S	S	S	
28	33		N	N	N	N	N	
29	34		G	G	G	G	G	
30	35		N	Y	Y	n	N	
31	36		T	N	N	t	T	
32	37		Y	Y	Y	Y	Y	
33	38		L*	L*	L*	L*	L*	Cano LI 4
34	39	CDR1	Q	D	D	q	Q	
35	40	FR2	W	W	W	W	W	微调带
36	41		Y	Y	Y	Y	Y	VH/VL 内 微调带
37	42		L	L	L	L	L	
38	43		Q	Q	Q	Q	Q	VL/VH 内
39	44		K	K	K	K	K	
40	45		P	P	P	p	P	
41	46		G	G	G	G	G	
42	47		Q	Q	Q	Q	Q	
43	48		S	S	S	S	S	
44	49		P	P	P	P	P	VL/VH 内
45	50		K	Q	Q	Q	Q	
46	51		L	L	L	L	L	VL/VH 内 微调带
47	52		L	L	L	L	L	微调带
48	53		I	I	I	I*	I*	Cano L2 1 (7) 微调带
49	54	FR2	Y	Y	Y	Y	Y	微调带
50	55	CDR2	K	L	L	k	K	
51	56		V*	G*	G*	V*	V*	Cano L2 1 (7)
52	57		S*	S*	S*	S*	S*	Cano L2 1 (7)
53	58		N	N	N	N	N	
54	59		R	R	R	R	R	
55	60		L	A	A	l	L	
56	61	CDR2	Y	S	S	Y	Y	

57	62	FR3	G	G	G	G	G	
58	63		V	V	V	V	V	
59	64		p	P	P	P	P	
60	65		D	D	D	D	D	
61	66		R	R	R	R	R	
62	67		F	F	F	F	F	
63	68		S	S	S	S	S	
64	69		G*	G*	G*	G*	G*	Cano L2 1 (7) 微调带
65	70		S	S	s	S	S	
66	71		G	G	G	G	G	微调带
67	72		S	S	S	S	S	
68	73		G	G	G	G	G	微调带
69	74		T	T	T	T	T	微调带
70	75		D	D	D	D	D	
71	76		F*	F*	F*	F*	F*	Cario LI 4 (16) 微调带
72	77		T	T	T	T	T	
73	78		L	L	L	L	L	
74	79		K	K	K	K	K	
75	80		I	I	I	I	I	
76	81		S	S	S	S	S	
77	82		S	R	R	R	R	
78	83		v	v	v	v	v	
79	84		E	E	E	E	E	
80	85		A	A	A	A	A	
81	86		E	E	E	E	E	
82	87		D	D	D	D	D	
83	88		L	V	V	V	V	
84	89		G	G	G	G	G	
85	90		V	V	V	V	V	
86	91		Y	Y	Y	Y	Y	
87	92		Y	Y	Y	Y	Y	VL/VH 内
88	93	FR3	C	C	C	C	C	
89	94	CDR3	F	M	M	f	F	VL/VH 内
90	95		Q*	Q*	Q*	Q*	Q*	Cano L3 1 (9)
91	96		G	A	A	g	G	VL/VH 内
92	97		S	L	L	s	S	
93	98		H	Q	Q	h	H	

94	99		V	T	T	V	V	
95	10		P*	p*	P*	P*	P*	Cano L3 1
96	10		W		Q	w	W	VL/VH 内
97	10	CDR3	T		T	T	T	
98	10	FR4	F		F	F	F	VL/V 内 (+) 微调带
	3							
gg	10		G		G	G	G	
100	10		G		Q	Q	Q	
101	10		G		G	G	G	
102	10		T		T	T	T	
103	10		K		K	K	K	
104	10		L		V	V	V	
105	11		E		E	E	E	
106	11		I		I	I	I	
107	11	FR4	K		K	K	K	

图例：第 1 栏(Kabat)表明根据 Kabat 等人(1991)的氨基酸残基位置；第 2 栏(#)表明氨基酸残基在正常序列中的位置；第 3 栏(FR 或 CDR)为容易地确定骨架片段(FR1、FR2、FR3 和 FR4)和 CDR 片段(CDR1、CDR2 和 CDR3) (“互补性决定区”的“CDR”)而制，具有 3 个 CDRs 分隔 4 个 FRs；第 4 栏(小鼠轻链 7C10)表示小鼠抗体 7C10 VL 区的氨基酸序列(SEQ ID No. 54)；第 5 栏(人胚细胞系 DPK15/A19)表示胚细胞系  $\kappa$  II 人 V 轻链的氨基酸序列(SEQ ID No. 59)；第 6 栏(GM607)表示人抗体 GM607 VL 区的氨基酸序列(SEQ ID No. 58)；第 7 和第 8 栏(改型的人 7C10 1 和 2)表示人源化的 1 和 2 抗体 7C10 VL 的氨基酸序列(分别为 SEQ ID Nos. 61 和 65)。“\*”表示为如 Chothia 等人所定义的 CDR 环的正规结构部分(Nature, 342, 877-883, 1989)。

### 实例 13. 通过抗体 7C10 重链(7C10 VH)可变区的 CDR 嫁接进行人源化的步骤

#### a) 7C10 VH 氨基酸序列与所有已知小鼠 VH 序列的比较

作为通过 CDR 嫁接进行人源化的预备阶段，首先将 7C10 VH 的氨基酸序列与 Kabat 数据库(Internet address: ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/database/kabat/fasta\_format/, 最后数据更新日期从 1999)中存在的所有小鼠 VH 序列比较。因此 7C10 VH 被确定为属于 Kabat 等人(1991)所定义的重链亚群 I(A)。确定了具有高达 90.5% 序列同一性的小鼠单克隆抗体 VH 区(AN03' CL (SEQ ID No. 70)，见图 22)。为了要确定 7C10 VH 序列中非普通残基，我们将 7C10 VH 的氨基酸序列(SEQ ID No. 69)与 Kabat 所定义的小鼠重链亚群 I(A)的共有序列(SEQ ID No. 71)进行了排列对比(见图 22)。

残基 17(Kabat's 编号方式)，亚群 I(A)共有序列是 Thr，7C10 VH 中是 Ser，

定位在有关恒定区界面的分子表面上。此残基看起来是不重要的。

残基 27 (Kabat's 编号方式), 亚群 I(A) 共有序列是 Asp, 7C10 VH 中是 Tyr, 是 CDR 1 正则残基。在此位置的 Tyr 并不罕见, 对维持 CDR 1 的良好构型可能是关键的。

残基 84 (Kabat's 编号方式), 亚群 I(A) 共有序列是 Thr, 7C10 VH 中是 Asn。Asn 在小鼠 VH 被发现 93 次, 在人 VH 中发现 3 次。按照分子模型, 它是远离抗体结合部位的表面残基。

氨基酸的编号方式是 Kabat 等人的方式 (1991)。在 7C10 VH 和 Rabat 小鼠亚群 I(A) 间不同的框架区中 (除了 CDRs) 的残基被加下划线。AN03' CL 表示小鼠抗体重链的序列 (在 Kabat 数据库中的记录号是 P001289)。

#### b) 7C10 VH 氨基酸序列与所有已知人 VH 序列的比较

为了确定“CDR 嫁接”的最佳人源候选者, 考虑与 7C10 VH 具有最大可能同一性的人源 VH 区。为此, 小鼠 7C10 VH 的氨基酸序列与 Kabat 数据库中存在的所有人 VH 序列比较。如 Kabat 等人 (1991) 所定义的, 小鼠 7C10 VH 与亚群 II 的人 VH 区具有最大的序列同一性。人源单克隆抗体的 VH 区被确定在可变基因 (也就是说除了 CDRs 和 J 区) 编码的全部 98 个氨基酸范围内, 具有高达 67.3% 的序列同一性 (人 VH FUR1' CL (SEQ ID No. 73, 见图 23)。按照与 VH FUR1' CL 同样的标准还确定, 人源胚细胞系 4.22 VH IV (Sanz 等人, 1989) 具有 68.4% 的序列同一性 (人胚细胞系 (SEQ ID No. 74), 见图 23)。由胚细胞系 4.22 VH IV 编码的序列被选择作为能够接受鼠 7C10 VH 而非 VH FUR1' CL 的 CDRs (按照 Kabat 的定义) 的人序列, 因为在比较 4.22 VH IV 和 VH FUR1' CL 序列与人亚群 II (人 Kabat sg II (SEQ ID No. 72), 见图 23 和表 6) 的共有序列时, 尽管在 VH FUR1' CL 编码的序列中确定存在两个非典型的残基 (按照 Kabat 的命名法, 分别是 81 和 82A 位置上的 Gln 和 Arg), 但在 4.22 VH IV 框架区 (Rch) 内没有鉴定到非典型的残基存在。

#### c) 7C10 VH 的人源化形式

以下人源化过程的阶段包括连接小鼠 7C10 VH 的 CDRs 到人胚细胞系 4.22 VH IV 的框架区 (Rch) 上 (Sanz 等人, 1989)。在此阶段, 小鼠 7C10 Fv 区的分子模型在选择要保留的小鼠残基中特别地有用, 保留的残基能够在保持分子的立体结构 (CDRs 正规结构, VH/VL 界面, 等) 或与抗原结合 (属于抗体结合部位) 中起作用。在 Rchs 中, 小鼠 (7C10 VH) 和人 (4.2.2 VH IV) 氨基酸之间的每一个差异被认真地检查 (见表 6)。此外, 如果需要考虑已被确定的小鼠 7C10 VH 序列中的特殊残基 (见实例 8. a)。

在通过“CDR 嫁接”人源化的第一种形式 7C10 VH, 人源化 1 中, 在 4.22 VH IV 框架区 (Rch) 内进行了 4 个改变 (见表 6, 图 24 是氨基酸序列 (SEQ ID No. 75), 图 25 是 DNA 序列 (SEQ ID Nos. 76 和 78), 以及组成肽信号的氨基酸序列 (SEQ ID No. 77))。这 4 个改变涉及:

- 位于 Rch1 的残基 30(Kabat's 命名法)。此残基实际上进入 7C10 VH CDR1 的结构组合物中(如 Chothia 等人所定义的, 1989), 并因此对维持此环的正确构造可能是关键的。在小鼠序列 7C10 VH 中存在于此位置的 Thr 因此保留在人源化形式的相同位置上。

- 位于 Rch2 的残基 48(Kabat's 命名法)。此残基接近 CDRs, 尽管按照分子模型不直接与后者接触, 但能够影响其最终构造。在小鼠序列 7C10 VH 中存在于此位置的蛋氨酸因此保留在人源化形式 1 的相同位置上。

- 位于 Rch3 的残基 67(Kabat's 命名法)。此残基接近 CDRs, 按照分子模型能够接触 CDR2 中的赖氨酸 60(Kabat's 命名法)。在小鼠序列 7C10 VH 中存在于此位置的异亮氨酸因此保留在人源化形式 1 的此位置上。

- 位于 Rch3 的残基 71(Kabat's 命名法)。此残基是 CDR2 正规结构的一部分, 因此对维持此环的正确构造应当是关键的。在小鼠序列 7C10 VH 中存在于此位置的精氨酸因此保留在人源化形式 1 的此位置上。

在通过“CDR 嫁接”人源化的第二种形式 7C10 VH, 人源化 2 中, 在 4.22 VH IV 框架区(Rch)内进行了 2 个改变。这 2 个改变涉及已经在人源化形式 1 中描述的残基 30 和 71(Kabat's 命名法)(见表 6, 图 24 是氨基酸序列(SEQ ID No. 79), 图 26 是 DNA 序列(SEQ ID Nos. 80 和 82), 以及组成肽信号的氨基酸序列(SEQ ID No. 81))。

在通过“CDR 嫁接”人源化的第三种形式 7C10 VH, 人源化 3 中, 没有对 4.22 VH IV 的框架区(Rch)进行改变。Rchs 的所有残基因此即是人源残基, 包括已经保留的残基 30、48、67 和 71(Kabat's 命名法)(见表 6, 图 24 是氨基酸序列(SEQ ID No. 83), 图 27 是 DNA 序列(SEQ ID Nos. 84 和 86), 以及组成肽信号的氨基酸序列(SEQ ID No. 85))。因此, 此人源化的形式 3 是完全人源化的(当然, 除了如 Kabat 所定义的 CDRs 本身以外), 因为所有的 Rchs 残基是由胚细胞系 4.22 VH IV 的 VH 基因编码的。

表 6: 氨基酸序列排列, 引导改型的人 7C10 V<sub>H</sub>区设计

Kabat	FR 或 CDR	小鼠重链 7C10	胚细胞系 422 VM IV	人 FUR1/CL VB	改造的人 7C10 H 1	改造的人 7C10 H 2	改造的人 7C10 H 3	注释
1	FR1	D	Q	Q	Q	Q	Q	
2		V	V	V	V	V	V	微调整
3		Q	Q	Q	Q	Q	Q	
4		L	L	L	L	L	L	
5		Q	Q	Q	Q	Q	Q	
6		E	E	E	E	E	E	
7		S	S	S	S	S	S	
8		G	G	G	G	G	G	
9		P	P	P	P	P	P	
10		G	G	G	G	G	G	
11		L	L	L	L	L	L	
12		V	V	V	V	V	V	
13		K	K	K	K	K	K	
14		P	P	P	P	P	P	
15		S	S	S	S	S	S	
16		Q	E	E	E	E	E	
17		S	T	T	T	T	T	
18		L	L	L	L	L	L	
19		S	S	S	S	S	S	
20		L	L	L	L	L	L	
21		T	T	T	T	T	T	
22		C	C	C	C	C	C	
23		S	T	T	T	T	T	
24		V	V	V	V <sup>a</sup>	V <sup>a</sup>	V <sup>a</sup>	正规的 H1 2(6)

25		T	S	S	S	S	S	
26		G <sup>a</sup>	正规的 H1 2(6)					
27		V <sup>a</sup>	正规的 H1 2(6) 微调整					
28		S	S	S	S	S	S	微调整
29		I <sup>a</sup>	正规的 H1 2(6) 微调整					
30	FR1	T	S	S	I	T	S	靠近CDR <sub>1</sub> 的微调整
31	CDR1	G	S	S	R	G	R	
32		G	G	G	G	G	G	
33		Y	Y	Y	Y	Y	Y	
34		L	Y	Y	I	L	I	
35		W <sup>a</sup>	正规的 H1 2(6) VH/VL 界面					
35A	CDR1	N	G	G	S	N	S	
36	FR2	W	W	W	W	W	W	
37		I	I	I	I	I	I	VH/VL 界面
38		R	R	R	R	R	R	
39		Q	Q	Q	Q	Q	Q	VH/VL 界面
40		F	F	F	F	F	F	
41		P	P	P	P	P	P	
42		Q	G	G	G	G	G	
43		N	K	K	K	K	K	
44		K	G	G	G	G	G	
45		L	L	L	L	L	L	VH/VL 界面 (+)
46		E	E	E	E	E	E	
47		W	W	W	W	W	W	界面 微调整
48		M	I	I	M	I	I	靠近CDR <sub>2</sub> 的微调整
49	FR2	G	G	G	G	G	G	微调整

50	CDR2	Y	S	S	y	Y	y	检测音
51		I	I	M	I	I	I	
52		S	Y	F	s	S	s	
53		Y	H	M	y	Y	y	
54		D	E	E	d	D	d	
55		G <sup>*</sup>	正规的 H2 I(16)					
56		T	S	S	t	T	t	
57		N	T	S	n	N	n	
58		N	Y	Y	n	N	n	
59		Y	Y	Y	y	Y	y	
60		K	N	N	k	K	k	
61		P	P	P	p	P	p	
62		S	S	S	s	S	s	
63		L	L	L	l	L	l	
64		K	K	K	k	K	k	
65	CDR2	D	S	S	d	D	d	
66	FR3	R	R	R	r	R	r	
67	/	I	V	V	i	V	v	靠近CDR <sub>2</sub> 的检测音
68		S	T	T	s	T	t	
69		I	I	I	i	I	i	检测音
70		T	S	S	t	T	t	
71	/	R <sup>*</sup>	V <sup>*</sup>	V <sup>*</sup>	r <sup>*</sup>	r <sup>*</sup>	v <sup>*</sup>	正规的 H2 I(16) 检测音
72		D	D	D	d	D	d	
73		T	T	T	t	T	t	检测音
74		S	S	S	s	S	s	
75		K	K	K	k	K	k	
76		N	N	N	n	N	n	
77		Q	Q	Q	q	Q	q	
78		F	F	F	f	F	f	检测音
79		F	S	S	f	S	s	
80		L	L	L	l	L	l	

81		K	K	Q	k	K	K	
82		L	L	L	l	L	L	
82A		N	S	R	s	S	S	
82B		S	S	S	s	S	S	
82C		V	V	V	v	V	V	
83		T	T	T	t	T	T	
84		N	A	A	n	A	A	
85		E	A	A	e	A	A	
86		D	D	D	d	D	D	
87		T	T	T	t	T	T	
88		A	A	A	a	A	A	
89		Y	V	V	y	V	V	
90		Y	Y	Y	y	Y	Y	
91		Y	Y	Y	y	Y	Y	VH/VL 界面
92		C	C	C	c	C	C	
93	/	A	A	A	a	A	A	VH/VL 界面 检测音
94	FR3	R <sup>*</sup>	正规的 H1 M(6) 检测音					
95	CDR3	Y		G	y	Y	Y	VH/VL 界面
96	/	G		R	g	R	R	
97	/	R		Y	r	Y	Y	
98	/	V		C	v	V	V	
99	/	F		S	f	S	S	
100				S				
100A				T				
100B				S				
100C				C				
100D				N				
100E				W				
100K		F		P	f	P	P	VH/VL 界面 (+)
101		D		D	d	D	D	
102	CDR3	Y		P	y	Y	Y	

103	FR4	W		W	W	W	W	VH/VL 界面 (+) 氨基酸
104		G		G	G	G	G	
105		Q		Q	Q	Q	Q	
106		G		G	G	G	G	
107		T		T	T	T	T	
108		T		L	L	L	L	
109		L		V	V	V	V	
110		T		T	T	T	T	
111		V		V	V	V	V	
112		S		S	S	S	S	
113	FR4	S		S	S	S	S	

图例：第 1 栏(Kabat) 表明根据 Kabat 等人(1991)的氨基酸残基位置；第 2 栏(FR 或 CDR) 为容易地确定骨架节段(FR1、FR2、FR3 和 FR4)和 CDR 节段(CDR1、CDR2 和 CDR3)而制，具有 3 个 CDRs 分隔的 4 个 FRs；第 3 栏(小鼠重链 7C10)表示小鼠抗体 7C10 V<sub>H</sub>区的氨基酸序列 (SEQ ID No. 69)；第 4 栏(胚细胞系 4.22 VH IV)表示基因 4.22 VH IV 的氨基酸序列(Sanz 等人, 1989) (SEQ ID No. 74)；第 5 栏(人 FUR1'CL VH, kabat 记录号 N020619)表示人源 IgMK 抗核纤层蛋白 B 的氨基酸序列 (SEQ ID No. 73) [lacuna] (Mariette 等人, 1993)；第 6、7 和 8 栏(改型的人 7C10 1、2 和 3)表示改型的人 7C10 V<sub>H</sub>区的氨基酸序列，分别是形式 1 (SEQ ID No. 75)、2 (SEQ ID No. 79) 和 3 (SEQ ID No. 83)。“\*”表示如 Chothia 等人所定义的 CDR 环正规结构部分(1989)。

#### 实例 14. 通过装配寡核苷酸构建编码 7C10 VL 和 VH 人源化形式 1 的基因

##### a) 原理

编码人源化可变区的基因(引导肽+VH 可变区 VDJ 或 VK 可变区 VJ)通过在用抗生物素蛋白链菌素包被的磁珠上进行固相装配而合成。由于在两个序列中存在 KpnI 限制性位点，并且几乎位于基因长度的一半(对于 VL 和 VH 基因 5' 端分别位于 200 和 245 号核苷酸)，因此编码人源化 7C10 VH(445 个碱基对)和人源化 7C10 VL(433 个碱基对)的基因是通过融合两个 DNA 片段来构建的。融合在一起的两个片段本身通过装配技术组合，包括使用磷酸化寡核苷酸(大约 30-35 mer)以在延长期间重叠的方式两两杂交(一个寡聚正义和其它反义，同一性大约为 50%)。第一个在 5' 位置生物素化的寡核苷酸附着在磁珠上，然后逐个加入磷酸化寡核苷酸对。通过 T4 DNA 连接酶在并列的磷酸化寡核苷酸之间产生磷酸二酯键。

由此重新合成的基因可以直接地克隆(通过用与选择的表达载体相适应的限制性酶消化)或通过 PCR 扩增以获得更多的物质作为通过酶消化定向克隆的准备。然后，由此通过重新装配构建的基因序列通过 DNA 自动测序证实。

##### b) 重新装配技术的实验方案

浓度被调节到 100 μM 的在 5' 位置磷酸化或在 5' 位置生物素化的寡核苷酸从 MWG Biotech 订购(见表 7 用于构建人源化 7C10 VL 的寡核苷酸序列，和表 8 用于构建人源化 7C10 VH)。寡核苷酸按照表 9 描述的计划成对杂交(克分子数相等的正义寡聚和反义寡聚混合物，500 pmol，在 T4 DNA 连接酶缓冲液中被加热至 95° C 5 分钟，然后在工作台上使其冷却至室温)。

第一个生物素化的寡核苷酸附着在用抗生物素蛋白链菌素包被的磁珠上 (Dyna 微珠 M-280 抗生物素蛋白链菌素, Dynal 产品编号 112-05)。为此, 500 pmol 的生物素化寡核苷酸的 15 mM NaCl 溶液加入 50  $\mu$ l 轻轻倒出的微珠中(使用磁容器), 微珠预先用 100  $\mu$ l TE 1X 缓冲液(Tris-EDTA 100X 缓冲液: 1M Tris-HCl, pH 8, 0.1M EDTA, Sigma T-9285)冲洗两次。37° C 孵育 15min 后, 用冲洗缓冲液(10mM Tris-HCl pH 7.6, 10mM EDTA 和 50mM NaCl)冲洗微珠两次, 然后逐个添加杂交的寡聚核苷酸对。在每次新添加寡核苷酸对时, 加热混合物至 95° C 5min, 然后在工作台上使其冷却至室温。一旦达到室温, 加入 2  $\mu$ l 的 10U/ $\mu$ l T4 DNA 连接酶 (Biolabs), 混合物在 37° C 孵育 20min。然后冲洗微珠(冲洗缓冲液), 接着加入后续寡核苷酸对。

最后未配对的寡聚体(反义)以下面的方式装配。5  $\mu$ l 寡聚体(500 pmol)和 43  $\mu$ l T4 DNA 连接酶缓冲液加入轻轻倒出的微珠上, 然后加热混合物至 95° C 5min, 并在工作台上使其冷却至室温。一旦达到室温, 加入 2  $\mu$ l 的 T4 DNA 连接酶(Biolabs), 并在 37° C 孵育混合物 20min。然后用冲洗缓冲液冲洗微珠两次, 再用 TE 1X 缓冲液冲洗两次。

然后, 在进行基因重新装配的克隆和测序之前, 微珠可被 4° C 保存。

表 7: 用于通过重新装配构建人源化 7C10 VL 1 的寡核苷酸 DNA 序列

引导 MluI. 生物素	5'-GTCAGAACGCGTGCCGCC	(SEQ ID No. 87)
7C10Lresh. 1 正义	5'-ACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT	(SEQ ID No. 88)
7C10Lresh. 2 正义	5'-GATGTTCTGGTTTCTGCTTCCAGCAGTGATG	(SEQ ID No. 89)
7C10Lresh. 3 正义	5'-TTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC	(SHQ ID No. 90)
7C10Lresh. 4 正义	5'-GTCACCCCTGGAGAGCCGGCTCCATCTCCTG	(SEQ ID No. 91)
7C10Lresh. 5 正义	5'-CAGGTCTAGTCAGACCATTATACATAGTAATG	(SEQ ID No. 92)
7C10Lresh. 6 正义	5'-GAAACACCTATTTGGAATGGTACCTGCAGA	(SEQ ID No. 93)
7C10Lresh. 7 反义	5'-GGCAACTTCATGGTGGCGGCACGCGTTCGAC	(SEQ ID No. 94)
7C10Lresh. 8 反义	5'-GAAACCAGAACATCAGCACCAACAGCCTAACA	(SEQ ID No. 95)
7C10Lresh. 9 反义	5'-CTGAGTCATCACAACATCACTGCTGGAAGCAG	(SEQ ID No. 96)
7C10Lresh. 10 反义	5'-TCTCCAGGGGTGACGGGCAGGAGAGTGGAGA	(SEQ ID No. 97)
7C10Lresh. 11 反义	5'-TCTGACTAGACCTGCAGGAGATGGAGGCCGGC	(SEQ ID No. 98)
7C10Lresh. 12 反义	5'-AAATAGGTGTTTCCATTACTATGTACAATGC	(SEQ ID No. 99)
7C10Lresh. 13 正义	5'-CAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATAAA	(SEQ ID No. 100)
7C10Lresh. 14 正义	5'-GTTTCTAATCGGCTTTATGGGGTCCCTGACAG	(SEQ LD No. 101)
7C10Lresh. 15 正义	5'-GTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTA	(SEQ ID No. 102)
7C10Lresh. 16 正义	5'-CACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGAT	(SEQ [D No 103]
7C10Lresh. 17 正义	5'-GTTGGGGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCAACA	(SEQ ID No. 104)
7C10Lresh. 18 正义	5'-TGTTCCGTGGACGTTCCGCCAAGGGACCATIGG	(SEQ ID Nn. 105)
7C10Lresh. 19 正义	5'-TGGAAATCAAACGTGAGTGGATCCTCTGCG	(SEQ ID No. 106)
7C10Lresh. KpnIREV	5'-TCTGCAGGTACCATTGC	(SEQ ID No. 107)

7C10Lresh. KpnI 生物素	5'-TGCAATGGTACCTGCAGAAGC	(SEQ ID No. 108)
7C10Lresh. 20 反义	5'-AGACTGCCCTCSGCTTCTGCAGGTACCATTGCA	(SEQ ID No. 109)
7C10Lresh. 21 反义	5'-CGATTAGAACTTTATAGATCAGGAGCTGTGG	(SEQ ID No. 110)
7C10Lresh. 22 反义	5'-TGCCACTGAACCTGTGAGGGACCCATAAAGC	(SEQ ID No. 111)
7C10Lresh. 23 反义	5'-GATTTTCAGTGTAATAATCTGTGCCTGATCCAC	(SEQ ID No. 112)
7C10Lresh. 24 反义	5'-TAA/kCCCCAACATCCTCAGCCTCCACTCTGCT	(SEQ ID No. 113)
7C10Lresh. 25 反义	5'-TCCACGGAACATGTGAACCTTGAiVAGCAGTAA	(SEQ ID No. 114)
7C10Lresh. 26 反义	5'-TTTGATTCCACCTTGGTCCCTTGGCCGAAC	(SEQ ID No. 115)
7C10Lresh. BamHI 反义	5'-CGCAGAGGATCCACTCACG	(SEQ ID No. 116)

表 8: 用于通过重新装配构建人源化 7C10 VH 1 的寡核苷酸 DNA 序列

引导 MluI. 生物素	5'-GTCAGAACGCGTGCCGCC	(SEQ ID No. 117)
7C10Hresh. 1 正义	5' -ACCA' I' GAAAGT' f TGAGICTG' rrGTACCTCTTgfl.	(SEQ ID No. 118)
7C10Hresh. 2 正义	5' -CAGCCATTCTGGTATCCTGTCTCAGGTGCAGCT	(SEQ ID No. 119)
7C10Hresh. 3 正义	5' -TCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTG/JiGCCTTCG	(SEQ ID No. 120)
7C10Hresh. 4 正义	5' -GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTC' 1' CTGGT	(SEQ ID No. 121)
7C10Hresh. 5 正义	5' -TACTCCATCACCGGTGGTTATTTATGGKACTGG	(SEQ ID No. 122)
7C10Hresh. 6 正义	5' -ATACGGCAGCCCCAGGGAAGGACTGCAGTGG	(SEQ ID No. 123)
7C10Hresh. 7 正义	5' -ATGGGGTATATCAGCTACGACGGTACCAATAAC	(SEQ ID No. 124)
7C10Hresh. 8 反义	5' -TCAACTTTTCATGGTGGCGGCACCCGTTCTGAC	(SEQ ID No. 125)
7C10Hresh. 9 反义	5' -ATACCAGGAATGGCTGTCAAGAGGTACAACAGAC	(SEQ ID No. 126)
7C10Hresh. 10 反义	5' -TGGGCCCAGCTCCTGAAGCTGCACCTGAGACAGG	(SEQ ID No. 127)
7C10Hresh. 11 反义	5' -TGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTACCAGTCC	(SEQ ID No. 128)
7C10Hresh. 12 反义	5' -CCACCGGTGATGGAGTAACCAGAGACAGTGCAGG	(SEQ ID No. 129)
7C10Hresh. 13 反义	5' -CCCTGGGGGCTGCCGTATCCAGTCCATJiaATAA	(SEQ ID No. 130)
7C10Hresh. 14 反义	5' -TAGCTGATATACCCATCCACTCCAGTCCCTT	(SEQ ID No. 131)
7C10Hresh. KpnIREV	5' -GTTATTGGTACCGTCG	(SEQ ID No. 132)
7C10Hresh. KpnI 生物素	5' -TACGACGGTACCAATAACTAC	(SEQ ID No. 133)
7C10Hresh. 15 正义	5' -AAACCCTCCCTCAAGGATCGAATCACCATATC	(SEQ ID No. 134)
7C10Hresh. 16 正义	5' -ACGTGACACGTCC. IAGAACCAGTTCTCCCTGA	(SEQ ID No. 135)
7C10Hresh. 17 正义	5' -AGCTGAGCTCTGTGACCGCTCGGACACTGCA	(SEQ ID No. 136)
7C10Hresh. 18 正义	5' -GTCTATTACTCTGCGAGATACGGTAGGGTCTT	(SEQ ID No. 137)
7C10Hresh. 19 正义	5' -CTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA	(SEQ ID No. 138)
7C10Hresh. 20 正义	5' -CCGTCTCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCG	(SEQ ID No. 139)
7C10Hresh. 21 反义	5' -AGGGAGGGTTTGTAGTTATTGGTACCGTCGTA	(SEQ ID No. 140)
7C10Hresh. 22 反义	5' -JiCGTGTACAGTGATATGGTGATTTCGATCCTTG	(SEQ ID No. 141)
7C10Hresh. 23 反义	5' -AGAGCTCAGCTTCAGGGAG. AACTGGTTCTTGG	(SEQ ID No. 142)
7C10Hresh. 24 反义	5' -CAGTAATACACTGCAGTGTCCGCAGCGGTAC	(SEQ ID No. 143)
7C10Hresh. 25 反义	5' -ACTAGTCAWVGAAGACCCTACCGTATCTCGCA	(SEQ ID No. 144)
7C10Hresh. 26 反义	5' -CTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTGGCCCC	(SEQ ID No. 145)
7C10Hresh. BamHI 反义	5' -CGCAGA. GGATCCACTCAC	(SBQ ID No. 146)

表 9: 重新装配人源形式 7C10 VH 和 VL 编码基因的寡核苷酸配对方案

重新装配 7C10 VL 人源化 1 的 M1UI-KpnI 片段	重新装配 7C10 VL 人源化 1 的 KpnI-BamHI 片段
生物素化的寡聚引导子 M1UI 7C10 VL	生物素化的寡聚 7C10 L KpnI
寡聚对 1 和 7	寡聚对 13 和 20
寡聚对 2 和 8	寡聚对 14 和 21
寡聚对 3 和 9	寡聚对 15 和 22
寡聚对 4 和 10	寡聚对 16 和 23
寡聚对 5 和 11	寡聚对 17 和 24
寡聚对 6 和 12	寡聚对 18 和 25
反义寡聚 7C10 VL KpnI	寡聚对 19 和 26
	反义寡聚 7C10 L BamHI
重新装配 7C10 VL 人源化 1 的 M1UI-KpnI 片段	重新装配 7C10 VL 人源化 1 的 KpnI
生物素化的寡聚引导子 M1UI 7C10 VH	生物素化的寡聚 7C10 H KpnI
寡聚对 1 和 8	寡聚对 15 和 21
寡聚对 2 和 9	寡聚对 16 和 22
寡聚对 3 和 10	寡聚对 17 和 23
寡聚对 4 和 11	寡聚对 18 和 24
寡聚对 5 和 12	寡聚对 19 和 25
寡聚对 6 和 13	寡聚对 20 和 26
寡聚对 7 和 14	反义寡聚 7C10 VH BamHI
反义寡聚 7C10 VH KpnI	

### 实例 15 通过定向诱变构建编码 7C10 VL 和 7C10 VH 人源化形式 2 以及 7C10 VH 人源化形式 3 的基因

7C10 VH 的人源化形式 2 是通过对人源化形式 1 的 48 和 67 残基(按照 Kabat's 命名法)进行定向诱变获得的。此定向诱变是在 QuikChange™ 系统 Stratagene 位点-定向诱变(试剂盒 #200518)的帮助下,按照厂商描述的方法实施的。构建分两个阶段进行,首先,形式 1 上的残基 48 在 7C10H 人源化 1QCM48 正义和反义引物对(见表 10)的帮助下突变,随后,这个在 48 位残基上突变的形式在 7C10H 人源化 1QCI67 正义和反义(见表 10)引物对的帮助下自身在 67 位残基上突变。

同样采用 QuikChange™ 系统,通过对人源化形式 2 的 30 和 71 残基(按照 Kabat's 命名法)进行位点定向的突变获得 7C10 VH 的人源化形式 3。此构建分两个阶段进行。首先,形式 2 上的残基 30 在 7C10H 人源化 QCT30 正义和反义引物(见

表 10)的帮助下进行突变。随后, 这个在残基 30 上突变的形式通过使用 7C10H 人源化 1V67QCR71 正义和反义引物对(见表 10)在残基 71 自身突变。

7C10 VL 人源化形式 2 通过采用 QuikChange™ 系统对形式 1 的残基 2(按照 Kabat's 命名法)进行位点定向突变而获得。形式 1 上的残基 2 是通过使用 7C10L 人源化 1QCV2 正义和反义(见表 10)引物对而突变的。

表 10 通过 stratagene QuikChange™ 系统进行定向诱变所使用的寡核苷酸列表

7C10H 正义	人源化 1QCT30.	5'-CTGGTACTCCATCAGCGGTGGTATTATG	(SEQ ID No. 147)
7C10H 反义	人源化 1QCT30.	5'-CATAAATACCACCGCTGATGGAGTACCAG	(SEQ ID No. 148)
7C10H 正义	人源化 1QCH48.	5'-GGGACTGGAGTGGATCGGGTATATCAGCTAC	(SEQ ID No. 149)
7C10H 反义	人源化 1QCH48.	5'-GTAGCTGATATACCGATCCACTCCAGTCCC	(SEQ ID No. 150)
7C10H 正义	人源化 1QC167.	5'-TC CCTCAAGGATCGAGTCACCATA7CAGG7G	(SEQ ID No. 151)
7C10L 反义	人源化 1QC167.	5'-CACGTGATATGGTGACTCGATCCCTTGAGGGA	(SEQ ID No. 152)
7C10H 正义	人源化 1V67QCR71.	5'-GATCCAGTCACCATATCAGTGGACACGGTCCAAGAA CCAG	(SEQ ID No. 153)
7C10H 反义	人源化 1V67QCR71.	5'-CTGGTCTTGGACGTGTCCATGATATGGTGACTC GATC	(SEQ ID No. 154)
7C10L 正义	人源化 1QCV2.	5'-GCTTCCAGCAGTGATATTGTGATGACTCAGT	(SEQ ID No. 155)
7C10L 反义	人源化 1QCV2.	5'-ACTGAGTCATCACATATCACTGCTGGAAGC	(SEQ ID No. 156)

#### 实例 16. 电穿孔转染 cos7 细胞

含有嵌合或抗体 7C10 人源形式的轻、重链的哺乳动物表达载体在 cos7 细胞里做了重组 7C10 抗体瞬时表达的测试。DNA 借助 BioRad 仪器 (Gene Pulsar) 经电穿孔导入 cos 细胞。载体 DNA (每个载体 10 μg) 加入 0.8 ml 浓度为  $1 \times 10^7$  /ml 悬浮于 PBS 缓冲液的 cos 细胞 (无  $\text{Ca}^{++}$  和  $\text{Mg}^{++}$ ), 加载 1900 伏特和 25 微法的脉冲。转染的 cos 细胞随后加到 8 ml 含 5% 小牛血清的 DMEM 培养液中 37°C 孵育 72 小时。收集上清, 离心去除细胞碎片, 最后用 ELISA 检测重组 IgG1/人 K 型抗体 7C10 的浓度。

#### 实例 17. 检测 cos 转染子培养上清中重组 IgG1/人 κ 型抗体浓度的 ELISA 方法

cos7 细胞瞬时表达的培养上清需经 7C10 IgG1/人 K 型抗体的检测。为检测 IgG1/人 K 型免疫球蛋白, 用山羊抗人 IgG 的多克隆抗体 (特异性针对 γ 球蛋白的 Fc 段, Jackson Immuno-Research Laboratories Inc., #109-005-098) 包被 96 孔 ELISA 板 (Maxisorb, Nunc)。cos 细胞培养上清做系列稀释后加入包被的孔板。37°C 孵育 1 小时后洗涤, 加入过氧化物酶标记的山羊抗人 κ 型轻链的多克隆抗体 (HRP, Sigma, A-7164)。37°C 孵育 45 分钟, 洗涤, 加 TMB 底物 (KPL #50-76-04)。孵育 10 分钟, 加 1 M 硫酸终止反应, 在 450nm 处读取光密度值。用已知浓度的纯

化的人 IgG1/人 K 型免疫球蛋白 (Sigma, 1-3889) 作为标准参照抗体。

#### 实例 18. 测定 7C10 的人 IgG1/ $\kappa$ 型重组抗体识别 IGF-1 受体 (IGF-IR) 活性的 ELISA 方法

用一种 ELISA 方法测定 cos7 培养上清识别 IGF-1R 的能力。96 孔 ELISA 板 (Dynex Immulon 2HB) 用浓度为 0.31ng/ul 的 IGF-1R (人胰岛素样生长因子 I 的可溶性受体, R&D Systems, #391-GR) PBS 溶液包被, 100ul/孔, 4° C 孵育过夜。用含 0.05%Tween20 的 PBS 洗板, 加含 0.5%明胶的 PBS 溶液封闭, 37°C 孵育 1 小时。PBS 洗涤三次, 然后将预先用含 0.1%明胶和 0.05%Tween20 的 PBS 预先系列稀释的待测 cos 细胞培养上清样品加入板中。37°C 孵育 1 小时, 随后洗三次 (PBS 中含 0.05% Tween 20), 再加过氧化物酶 (HRP, Jackson Immune-Research Laboratories Inc., #109-035-098) 标记的抗-人 IgG 抗体 (特异性针对 Fc 段, 用含 0.1%明胶和 0.05% Tween 20 的 PBS 按 1:5000 稀释)。37°C 孵育 45 分钟, PBS 洗涤三次 (含 0.05% Tween 20), 加 TMB 底物 (KPL #50-76-04)。孵育 10 分钟, 加 1 M 硫酸终止反应, 在 450nm 处读取光密度值。

#### 实例 19 测定经“CDR 嫁接”不同形式人源化 7C10 抗体的对 IGF1-R 的识别活性

起先, 我们比较了嵌合的 7C10 轻、重链人源化样式 1 抗体对 IGF-1 受体的识别活性。图 28 显示了 ELISA 法测定 cos7 细胞培养上清识别 IGF-1R (见实例 18) 活性的结果, 其中的 IgG1/人 K 型抗体浓度 (见实例 17) 已经 ELISA 定量。经测试的四种重组抗体其滴定曲线重叠得非常完美, 表明它们对 IGF-1R 的相对亲和力很相似、接近。由此可以得出结论: 由组成人源化轻链 1 (框架区内有一个鼠源的氨基酸残基) 和人源化重链 1 (框架区内有四个鼠源的氨基酸残基) 的 7C10 人源化形式 1 特异地识别 IGF-1 受体, 且其亲和力非常类似于由鼠可变区构成的嵌合抗体。

随后, 我们考察了 7C10 的人源化轻链 (人源化形式 1 对人源化形式 2, 见图 19) 第 2 位氨基酸残基 (按照 Kabat 的命名) 对 IGF-1R 识别功能的影响。图 29 显示了 ELISA 法测定 cos7 细胞培养上清识别 IGF-1R (见实例 18) 活性的结果, 其中的 IgG1/人 K 型抗体浓度 (见实例 17) 已经 ELISA 定量。两种轻链的人源化形式 1 和 2 都成功地与人源化 7C10 VH1 相结合。两条滴定曲线相互重叠, 表明轻链第 2 位氨基酸残基的人源化突变 (形式 1 突变为缬氨酸, 形式 2 突变为异亮氨酸) 显然没有对识别 IGF1 受体的相对亲和力产生任何影响。7C10 轻链人源化形式 2 除 CDR 以外没有任何鼠的成分 (即完全的人源化), 是我们倾向的 7C10 VL 改造结果。

我们对完全人源化的 7C10 轻链 (人源化形式 2, 见上) 以及三种人源化的 7C10 重链都做了测试。图 30 显示了 ELISA 法测定 cos7 细胞培养上清识别 IGF-1R

活性的结果，其中的 IgG1/人 K 型抗体浓度（见实例 17）已经 ELISA 定量。滴定曲线非常相似，事实上与相应嵌合抗体的标准参照曲线重叠，表明当和人源化的 7C10 VL 2 连接后，7C10 VH 人源化的三种形式 1、2 和 3 对 IGF-1R 有完全一样的相对亲和力。尽管如此，其他 ELISA 平行测试的结果（未给出）却显示 71 位（Kabat 的命名）从精氨酸（鼠）到缬氨酸（人）的点突变与相应抗体对 IGF-1R 亲和力的轻微损失有关系，因此，有理由认为人源化的 7C10 VH 2 和 7C10 VH 1 对 IGF-1R 的相对亲和力是一样的。相比于人源化形式 1，形式 2 更可取，因为它仅有 2 个鼠氨基酸（30 和 71 位，见图 24）。形式 3 同样可取，因为它除了 CDR 以外没有任何鼠的成分，而且亲和力的损失似乎也及其微小。

总之，根据本发明看起来有两种改造的人源化 7C10 抗体特别可取：一种由人源化 7C10 VH 2（2 个保守的鼠氨基酸残基）和人源化 7C10 VL 2（无保守的鼠氨基酸残基）连接后组成，另一种由人源化 7C10 VH 3（无保守的鼠氨基酸残基）和人源化 7C10 VL 2（无保守的鼠氨基酸残基）连接后组成。最后这种形式是同时在轻链、重链中都没有鼠氨基酸残基出现的最后的人源化形式。

#### 实例 20. EGFR 和 IGF-1R 在 A549 细胞表面的表达

我们在荷非小细胞肺癌裸鼠（经皮下注射肺癌细胞系 A549 建立）身上同时使用分别针对 IGF-1R 和 EGFR 的两种单抗研究了它们的协同作用。

首先，为确保 A549 细胞在注射小鼠之前在细胞表面同时表达了 IGF-1R 和 EGFR 两种受体，我们分别用鼠 7C10 抗-IGF-1R 单抗（图 37B）和鼠 225 抗-EGFR 单抗（图 37D）标记 A549 细胞，然后行流式细胞术计数。为此，A549 细胞用含 10% 胎牛血清的 PBS 溶液 4℃ 封闭 30 分钟，洗涤后和目标抗体 4℃ 孵育 30 分钟，然后再洗三遍，加入 FITC（异硫氰酸荧光素）标记抗鼠二抗，孵育 30 分钟，最后在 FACS（荧光活化的细胞分选仪）上读取 520 nm（激发波长 488 nm）计数。

结果如图 37A~37D 所示：A549 细胞表面 EGF 受体和 IGF1 受体数目相当，分布均一。抗体标记的特异性经同种型抗体对照所证实（图 37C）。这些结果证实 A549 可作为细胞模型用于 IGF-1R 和 EGFR 两种受体相互协同、协作的研究。

#### 实例 21. 共用抗-IGF-1R 和抗-EGFR 单克隆抗体在裸鼠体内抗肿瘤治疗的协同作用

裸鼠皮下移植  $5 \times 10^6$  A549 细胞。5 天后测量肿瘤大小，肿瘤体积均一的裸鼠组成一批。从这一批裸鼠开始，每 6 只裸鼠随机产生一组。每只裸鼠将接受每周两次腹腔内单独注射 7C10 或 225 单抗的治疗，或者同时注射两种单抗，总剂量均为 250  $\mu$ g/鼠。单抗 9G4 作为实验的同型对照。

图 38 结果显示，单独注射抗体 7C10 或 225 能显著减缓肿瘤的生长。需要注意的是，这两种单抗对抗肿瘤的能力基本相当。同时使用两种单抗时可见明显的协同作用（每次做动力学 t 检验时  $p \leq 0.01$ ），这与以往文献报道不同，提示这两种受体在体内存在着协作，最适于肿瘤的生长；而且，阻断一种受体的作用并

不能完全抑制另一个受体介导的肿瘤生长，这也与以往文献报道不同。

#### 实例 22. 共用鼠单抗 7C10 和 225 在同位种植 A549 细胞的裸鼠中的抗肿瘤活性研究

用同位模型评价抗肿瘤活性对于研究肿瘤扩散的过程有特殊的重要性。为了评估分别针对 IGF-IR 和 EGFR 的抗体混合物的抗肿瘤活性， $10^6$  A549 细胞（非小细胞肺癌）种植于裸鼠胸腔内。注意，这种肿瘤细胞种植的后果和在人体上观察到的扩散过程是非常相似的，并能导致动物的死亡。图 39 显示单用抗体 225 和 7C10 可见存活率明显提高，两者效能彼此相当；令人惊讶的是，同时使用这两种抗体裸鼠存活率有相当程度的提高，提示这样的处理对肿瘤细胞的扩散有影响。

#### 实例 23. 7C10 和 7H2HM 抑制 IGF-IR 和 IRS-1 $\beta$ 链中酪氨酸的磷酸化

MCF7 细胞在 20 ml RPMI 培养基中培养 24 小时，细胞密度  $5 \times 10^4$  细胞/cm<sup>2</sup> (75 cm<sup>2</sup> 平板, COSTAR)，培养基中无酚红，但含 5mM 谷氨酰胺，青霉素/链霉素（浓度分别是 100 U/100  $\mu$ g/ml），以及 10%胎牛血清。PBS 洗涤三次，细胞在 RPMI 培养基中培养 12 小时，此时培养基不含酚红、胎牛血清，但仍含有 5mM 谷氨酰胺，青/链霉素，0.5  $\mu$ g/ml 牛血清白蛋白(Sigma A-8022)和 5  $\mu$ g/ml 转铁蛋白(Sigma T8158)。

为了激活，细胞先用封闭抗体 (10  $\mu$ g/ml) 37°C 孵育 2 分钟，然后加入 IGF-I (Sigma I3769, 50ng/ml) 额外孵育 2 分钟。随着吸出孵育培养基终止活化反应，并将平板置于冰上，然后给细胞加入 0.5 ml 裂解缓冲液 ((50 mM tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% 脱氧胆酸钠,) 再混合蛋白酶抑制剂 (每 50 ml 1 片, Boehringer Ref.: 1697 498) 和磷酸酶抑制剂 (Calbiochem Ref.: 524625 (1/100)) 进行裂解。刮下细胞，重获悬液，置于振荡器上 4°C 振荡 1.5 小时。溶液经 4°C 12000 rpm 离心 10 分钟，上清中的蛋白浓度由 BCA 试剂进行定量。

500  $\mu$ g 细胞裂解物蛋白与抗-IGF-IR (Santa Cruz Ref.: sc-713) 混合进行免疫沉淀，振荡器上 4°C 孵育 1.5 小时。加入蛋白 A-琼脂糖 (Boehringer Ref.: 1 134515) 收获免疫沉淀物，4°C 振荡器上孵育过夜。IRS-1 的免疫沉淀则用的是抗-IRS-1 抗体偶联的琼脂糖微珠 (Santa Cruz Ref.: 559Ac)。琼脂糖微珠用 1ml 裂解缓冲液洗两次，用洗涤缓冲液 1 (50 mM tris-HCl pH 7.5; 500 mM NaCl; 0.1 % Nonidet P40; 0.05% 脱氧胆酸钠 (Boehringer 1 332 597)，加有蛋白酶抑制剂与磷酸酶抑制剂) 洗两次，用洗涤缓冲液 2 (50 mM tris-HCl; 0.1% Nonidet P40; 0.05% 脱氧胆酸钠 (Boehringer Ref.: 1 332 597)，加有 1:100 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂) 洗一次。免疫沉淀物重悬于 Laemmli 缓冲液，加热至 100°C 5 分钟。上清进行聚丙烯酰胺 SDS 凝胶 (8% Novex EC6015) 电泳分析。蛋白转移至硝酸纤维素膜上进行免疫印迹：用 HRP 标记的抗-磷酸化酪氨酸抗体 (Upstate Biotechnology 4G10)，或者抗-IGF-IR 或抗-IRS-1  $\beta$  链 (Santa Cruz Ref.: sc 8038)，然后是 HRP 标记的抗-兔抗体。印迹采用化学发光 (Amersham RPN

2209), Kodak X-mat AR 胶片上放射自显影。

图 40A 描述的是 MCF7 细胞未经刺激(0), 单独经 IGF-1(50 ng/ml) (0+IGF-1) 刺激, 或者结合了单抗或人源化抗-IGF-IR 抗体 (10  $\mu$ g/ml) 7C10, 1H7, 7H2HM。抗体 9G4 或 hIgG1 被用作阴性对照的鼠或人同种型免疫球蛋白 IgG1。IGF-IR 的  $\beta$  链经免疫沉淀后用磷酸化的抗-酪氨酸抗体进行印迹。结果显示单抗或人源化的抗-IGF-IR 抗体 7C10, 1H7 和 7H2HM 抗体抑制了 IGF-IR  $\beta$  链中酪氨酸的磷酸化。

图 40B 描述的是 MCF7 细胞未经刺激(0), 单独经 IGF-1(50 ng/ml) (0+IGF-1) 刺激, 或者结合了单抗或人源化抗-IGF-IR 抗体 (10  $\mu$ g/ml) 7C10, 1H7, 7H2HM。抗体 9G4 或 hIgG1 被用作阴性对照的鼠或人同种型免疫球蛋白 IgG1。IRS-1 经免疫沉淀后用磷酸化的抗酪氨酸抗体进行印迹。结果显示单抗 7C10, 7H2HM 和 1H7 抑制了 IRS-1 中酪氨酸的磷酸化。

#### 实例 24. 7C10 和 7H2HM 引发 IGF-IR 的内化

MCF7 和 A549 细胞用 10%胎牛血清 PBS (FACS 缓冲液) 悬浮至  $1.10^7$  细胞/ml。  $1.10^6$  细胞和 10  $\mu$ g/ml 单抗 (7C10, 7G3, 9G4) 或 20  $\mu$ g/ml 7H2HM 37°C 孵育 30 分钟。洗涤后, 细胞被生物素化的抗-IGF-IR 抗体 (单抗 12B1) 标记 (4°C 30 分钟), 然后是和链亲合素-488 alexa Fluor<sup>®</sup> 结合物 4°C 孵育 30 分钟。最后, 去除了细胞碎片的细胞经 FACScan (Becton-Dickinson, Enembogegem, Belgium) 用 Cellquest 软件进行分析。

图 41 显示 A549 细胞无染色 (第一个峰), 和 7C10 或 7H2HM 孵育后 (第二个峰), 以及和无关小鼠或大鼠 IgG1 孵育后 (第三个峰)。当细胞经 7C10 或 7H2HM 孵育处理后, 可见细胞表面 IGF-IR 表达的减少。

#### 实例 25. 7C10 和 7H2HM 诱发 IGF-IR 的降解

MCF-7 细胞在 15 ml 完全培养基培养 24 小时至  $10.10^4$  细胞/cm<sup>2</sup> (75 cm<sup>2</sup>, Costar), 细胞用 PBS 洗三次, 接着用无血清培养基孵育 12 小时。然后, 细胞单独用 25  $\mu$ g/ml 放线菌酮孵育, 或者和 10  $\mu$ g/ml 单抗 7C10、9G4、7G3, 或者 IGF-I (50 ng/ml) 孵育。在某些实验中, 细胞在和单抗孵育前需经 MG-132 (10  $\mu$ M, Calbiochem 474791) 37°C 处理 1 小时以抑制蛋白酶体的活性。孵育后洗涤, 然后加裂解缓冲液裂解细胞。20  $\mu$ g 蛋白经 8% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 再转移至硝酸纤维素膜上进行上述的 IGF-IR 的抗  $\beta$  链免疫印迹实验。

经由 Western 印迹所作的 IGF-IR 完整性分析 (图 42A) 显示 7C10 和 7H2HM 诱发了受体的降解, 而受体的天然配体并没有引起后者的降解。作为同种型抗体的对照, 无关抗体 9G4 也没有引起受体的降解。图 42B 显示受体降解被一个蛋白酶体抑制剂 MG132 (孵育 2 小时) 所抑制。

用人源化抗体 7H2HM 也获得了大体相当的实验结果 (图 42C)。

<110> 皮埃尔法布雷医药公司

<120>新的抗 IGF-IR 抗体及其应用

<130> 346 315 - CN

<150> PCT/FR 03/00 178

<151> 2003-01-20

<150> FR 02/00 653

<151> 2002-01-18

<150> FR 02/00 654

<151> 2002-01-18

<150> FR 02/05 753

<151> 2002-05-07

<160> 156

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 48

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(48)

<400> 1

aga	tct	agt	cag	agc	att	gta	cat	agt	aat	gga	aac	acc	tat	tta	caa	48
Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Gln	
1				5					10					15		

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 3

aaa	gtt	tcc	aac	cga	ctt	tat										
Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Leu	Tyr										

21

```

1                5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4
Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr
  1                5

<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(27)

<400> 5
ttt caa ggt tca cat gtt ccg tgg acg                27
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
  1                5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
  1                5

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(18)

<400> 7
ggt ggt tat tta tgg aac                18
Gly Gly Tyr Leu Trp Asn
  1                5

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8
Gly Gly Tyr Leu Trp Asn
  1                5

```

<210> 9  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(48)  
  
 <400> 9  
 tac ata agc tac gac ggt acc aat aac tac aaa cca tct ctc aaa gat 48  
 Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp  
   1                  5                  10                  15

<210> 10  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 10  
 Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp  
   1                  5                  10                  15

<210> 11  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(24)  
  
 <400> 11  
 tac ggt agg gtc ttc ttt gac tac 24  
 Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr  
   1                  5

<210> 12  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 12  
 Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr  
   1                  5

<210> 13  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 13  
 atgaaatgca gctgggtcat sttctt 26

---

<210> 14  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 14  
 atgggatgga gctratcat sytctt 26  
  
 <210> 15  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 15  
 atgaagwtgt ggtaaactg ggtttt 26  
  
 <210> 16  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 16  
 atgractttg ggytcagctt grt 23  
  
 <210> 17  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 17  
 atggactcca ggctcaattt agtttt 26  
  
 <210> 18  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 18  
 atggctgtcy trgsgctret cttctg 26  
  
 <210> 19  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 19  
 atggratgga gckggrtett tmtctt 26  
  
 <210> 20  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 20  
 atgagagtgc tgattctttt gtg 23

---

<210> 21  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 21  
atggmttggg tgtggamctt gctatt 26

<210> 22  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 22  
atgggcagac ttacattctc attcct 26

<210> 23  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 23  
atggattttg ggctgatttt ttttattg 28

<210> 24  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 24  
atgatggtgt taagtcttct gtacct 26

<210> 25  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 25  
atgaagttgc ctgtaggct gttggtgct 29

<210> 26  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 26  
atggagwcag acacactcct gytatgggt 29

<210> 27  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

---

<400> 27 atgagtgtgc tcactcaggt cct	23
<210> 28 <211> 26 <212> DNA <213> Mus musculus	
<400> 28 atgaggrccc ctgctcagwt tyttgg	26
<210> 29 <211> 29 <212> DNA <213> Mus musculus	
<400> 29 atggatttwc aggtgcagat twtcagctt	29
<210> 30 <211> 29 <212> DNA <213> Mus musculus	
<400> 30 atggatttwc argtgcagat twtcagctt	29
<210> 31 <211> 26 <212> DNA <213> Mus musculus	
<400> 31 atgaggtkcy ytgytsagyt yctgrg	26
<210> 32 <211> 23 <212> DNA <213> Mus musculus	
<400> 32 atgggcwtca agatggagtc aca	23
<210> 33 <211> 29 <212> DNA <213> Mus musculus	
<400> 33 atgtggggay ctktttycmm tttttcaat	29
<210> 34 <211> 24 <212> DNA	

---

<213> Mus musculus  
 <400> 34  
 atggttrtccw casctcagtt cctt 24  
  
 <210> 35  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 35  
 atgtatatat gtttggtgtc tatttc 26  
  
 <210> 36  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 36  
 atggaagccc cagctcaggt tctctt 26  
  
 <210> 37  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 37  
 atgragtywc agaccaggt cttyr 26  
  
 <210> 38  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 38  
 atggagacac attctcaggt ctttgt 26  
  
 <210> 39  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 39  
 atggattcac aggccaggt tcttat 26  
  
 <210> 40  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 40  
 actggatggt ggaagatgg 20  
  
 <210> 41

```

<211> 42
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(42)

<400> 41
gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca cca tcc agt      42
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
  1             5             10

<210> 42
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 42
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
  1             5             10

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 43
ccatcttccc accatccagt      20

<210> 44
<211> 18
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 44
ccagtgata gacagatg      18

<210> 45
<211> 33
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(33)

<400> 45
gcc aaa acg aca ccc cca tct gtc tat cca ctg      33
Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
  1             5             10

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

&lt;400&gt; 46

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu  
 1 5 10

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 47

cccccatctg tctatccaact g

21

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 438

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (28)..(393)

&lt;400&gt; 48

atgaagttgc ctgtaggct gttgggtg ctg atg ttc tgg att cct gct tcc aga 54  
 Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser Arg  
 1 5

agt gat gtt ttg atg acc caa att cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt 102  
 Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu  
 10 15 20 25

gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc att gta cat 150  
 Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His  
 30 35 40

agt aat gga aac acc tat tta caa tgg tac ctg cag aaa cca ggt cag 198  
 Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln  
 45 50 55

tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ctt tat ggg gtc 246  
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val  
 60 65 70

cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag 294  
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys  
 75 80 85

atc agc agc gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc ttt caa 342  
 Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln  
 90 95 100 105

ggg tca cat gtt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc 390  
 Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 110 115 120

aaa cgg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc ccaccatcca gt 438  
 Lys

<210> 49  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 49  
 Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln  
           1                  5                  10                  15  
 Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser  
                   20                  25                  30  
 Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu  
                   35                  40                  45  
 Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
           50                  55                  60  
 Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
           65                  70                  75                  80  
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu  
                   85                  90                  95  
 Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr  
                   100                  105                  110  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
           115                  120

<210> 50  
 <211> 438  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 50  
 tacttcaacg gacaatccga caaccacgac tacaagacct aaggacgaag gtcttcacta 60  
 caaaactact gggtttaagg tgagagggac ggacagtcag aacctctagt tcggaggtag 120  
 agaacgtcta gatcagttc gtaacatgta tcattacctt tgtggataaa tgttaccatg 180  
 gaogtctttg gtccagtcag aggtttcgag gactagatgt ttcaaagggt ggctgaaata 240  
 cccaggggtc tgtccaagtc accgtcacct agtccctgtc taaagtgtga gttctagtcg 300  
 tcgcacctcc gactcctaga ccctcaaata atgacgaaag ttccaagtgt acaaggcacc 360  
 tgcaagccac ctccgtggtt cgaccttag tttgcccgac tacgacgtgg ttgacatagg 420  
 tagaagggtg gtaggtca 438

<210> 51  
 <211> 438  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (25)..(405)

<400> 51  
 atgatggtgt taagtcttct gtac ctc ttg aca gcc att cct ggt atc ctg 51  
                   Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu  
                   1                  5

tct gat gta cag ctt cag gag tca gga cct ggc ctc gtg aaa cct tct 99  
 Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser  
 10 15 20 25

cag tct ctg tct ctc acc tgc tct gtc acc ggc tac tcc atc acc ggt 147  
 Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Gly  
 30 35 40

ggt tat tta tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg gag 195  
 Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu  
 45 50 55

tgg atg ggc tac ata agc tac gac ggt acc aat aac tac aaa cca tct 243  
 Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser  
 60 65 70

ctc aaa gat cga atc tcc atc act cgt gac aca tct aag aac cag ttt 291  
 Leu Lys Asp Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 75 80 85

ttc ctg aag ttg aat tct gtg act aat gaa gac aca gct aca tat tac 339  
 Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 90 95 100 105

tgt gca aga tac ggt agg gtc ttc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc 387  
 Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 110 115 120

act ctc aca gtc tcc tca gccaaaacga caccoccatc tgtctatcca ctg 438  
 Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 125

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 127

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 52

Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu  
 1 5 10 15

Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys  
 20 25 30

Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile  
 35 40 45

Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr  
 50 55 60

Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp Arg Ile Ser Ile  
 65 70 75 80

Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val  
 85 90 95

Thr Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val  
 100 105 110

Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 53  
 <211> 438  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 53  
 tactaccaca attcagaaga catggacaac tgtcggtaag gaccatagga cagactacat 60  
 gtcgaagtcc tcagtcctgg accggagcac tttggaagag tcagagacag agagtggacg 120  
 agacagtggc cgatgaggta gtggccacca ataaatacct tgacctaggc cgtcaaaggt 180  
 cctttgtttg acctcaccta cccgatgtat tcgatgctgc catggttatt gatgtttggt 240  
 agagagtttc tagcttagag gtagtgagca ctgtgtagat tcttggtcaa aaaggacttc 300  
 aacttaagac actgattact tctgtgtcga tgtataatga cacgttctat gccatcccag 360  
 aagaaactga tgaccccggg tccgtggtga gagtgtcaga ggagtcgggt ttgctgtggg 420  
 ggtagacaga taggtgac 438

<210> 54  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 54  
 Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95  
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 55  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 55  
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys  
 100 105 110

<210> 56  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 56  
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 57  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 57  
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 58  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 类人

<400> 58  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
 85 90 95  
 Leu Gln Thr Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 59  
 <211> 100  
 <212> PRT  
 <213> 类人

<400> 59  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

	85	90	95
--	----	----	----

Leu Gln Thr Pro  
100

<210> 60  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> 类人

<220>  
<221> 变体  
<222> (35)..(36)  
<223> Xaa = 任何氨基酸

<220>  
<221> 变体  
<222> (39)  
<223> Xaa = 任何氨基酸

<220>  
<221> 变体  
<222> (99)  
<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 60  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15  
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30  
Asp Gly Xaa Xaa Tyr Leu Xaa Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45  
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
50 55 60  
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80  
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
85 90 95  
Leu Gln Xaa Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 61  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> 类人

<400> 61  
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15  
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
20 25 30

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

<210> 62

<211> 433

<212> DNA

<213> 类人

<220>

<221> CDS

<222> (22)..(414)

<400> 62

gtcagaacgc gtgccgccac c atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg 51  
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu  
 1 5 10  
 atg ttc tgg ttt cct gct tcc agc agt gat gtt gtg atg act cag tct 99  
 Met Phe Trp Phe Pro Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser  
 15 20 25  
 cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc 147  
 Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys  
 30 35 40  
 agg tct agt cag agc att gta cat agt aat gga aac acc tat ttg caa 195  
 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln  
 45 50 55  
 tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct cca cag ctc ctg atc tat aaa 243  
 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys  
 60 65 70  
 gtt tct aat cgg ctt tat ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga 291  
 Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 75 80 85 90  
 tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat 339  
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp  
 95 100 105  
 gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt tca cat gtt ccg tgg acg ttc 387  
 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe  
 110 115 120  
 ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt gagtggatcc tctgcg 433  
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

125 130

<210> 63  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 <213> 类人

<400> 63  
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Phe Pro Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val  
 20 25 30  
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile  
 35 40 45  
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro  
 50 55 60  
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 85 90 95  
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys  
 100 105 110  
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val  
 115 120 125  
 Glu Ile Lys  
 130

<210> 64  
 <211> 433  
 <212> DNA  
 <213> 类人

<400> 64  
 cagtcttgcg cacggcgggtg gtacttcaac ggacaatccg acaaccacga ctacaagacc 60  
 aaaggacgaa ggtcgtcact acaacactac tgagtcagag gtgagagga cgggcagtgg 120  
 ggacctctcg gccggaggta gaggacgtcc agatcagtct cgtaacatgt atcattacct 180  
 ttgtggataa acgttaccat ggacgtcttc ggtcccgtca gaggtgtcga ggactagata 240  
 tttcaaagat tagccgaaat accccagga ctgtccaagt caccgtcacc tagtccgtgt 300  
 ctaaaatgtg acttttagtc gtctcacctc cgactcctac aaccccaaat aatgacgaaa 360  
 gttccaagtg tacaaggcac ctgcaagccg gttccctggt tccaccttta gtttgactc 420  
 acctaggaga cgc 433

<210> 65  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 类人

<220>

<223> 人工序列的描述：  
 寡核苷酸

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

<210> 66  
 <211> 433  
 <212> DNA  
 <213> 类人

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (22)..(414)

<400> 66  
 gtcagaacgc gtgccgccac c atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg 51  
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu  
 1 5 10  
 atg ttc tgg ttt cct gct tcc agc agt gat att gtg atg act cag tct 99  
 Met Phe Trp Phe Pro Ala Ser Ser Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser  
 15 20 25  
 cca ctg tcc ctg ccc gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc 147  
 Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys  
 30 35 40  
 agg tct agt cag agc att gta cat agt aat gga aac acc tat ttg caa 195  
 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln  
 45 50 55  
 tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct cca cag ctc ctg atc tat aaa 243  
 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys  
 60 65 70  
 gtt tct aat cgg ctt tat ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga 291  
 Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 75 80 85 90  
 tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat 339  
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp  
 95 100 105

ggt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt tca cat gtt ccg tgg acg ttc 387  
 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe  
                   110                                  115                                  120

ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt gaggatcc tctgcg 433  
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                   125                                  130

<210> 67  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 <213> 类人

<400> 67  
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Phe Pro Ala  
   1                                  5                                  10                                  15

Ser Ser Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val  
                   20                                  25                                  30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile  
                   35                                  40                                  45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro  
                   50                                  55                                  60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr  
   65                                  70                                  75                                  80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
                   85                                  90                                  95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys  
                   100                                  105                                  110

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val  
                   115                                  120                                  125

Glu Ile Lys  
   130

<210> 68  
 <211> 433  
 <212> DNA  
 <213> 类人

<400> 68  
 cagtcttgcg cacggcgggtg gtacttcaac ggacaatccg acaaccaaga ctacaagacc 60  
 aaaggacgaa ggtcgtcact acaacactac tgagtcagag gtgagagggg cgggcagtgg 120  
 ggacctctcg gccggaggtg gaggacgtcc agatcagctc cgtaacatgt atcattacct 180  
 ttgtggataa acgttaccat ggacgtcttc ggtcccgtca gaggtgtcga ggactagata 240  
 tttcaaagat tagccgaaat accccagggg ctgtccaagt caccgtcacc tagtccgtgt 300  
 ctaaaatgtg acttttagtc gtotcacctc cgactcctac aaccccaaat aatgacgaaa 360  
 gttccaagtg tacaaggcac ctgcaagccg gttccctggt tccaccttta gtttgactc 420  
 acctaggaga cgc 433

<210> 69  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 69  
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly  
 20 25 30  
 Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 Lys Asp Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110  
 Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 70  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

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

<210> 71  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 71  
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly  
 20 25 30  
 Tyr Trp Asn Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Gly Tyr Gly Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 72  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 类人

<400> 72  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Ile Gly Arg Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Xaa Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Leu Pro Gly Gly Tyr Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 73  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> 类人

<400> 73  
 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 Tyr Ser Ile Ser Ser Gly  
 20 25 30  
 Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Ile Gly Ser Met Phe His Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Arg Tyr Cys Ser Ser Thr Ser Cys Asn Trp Phe Asp Pro  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 74  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> 类人

<400> 74  
 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 Tyr Ser Ile Ser Ser Gly  
 20 25 30  
 Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Ile Gly Ser Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg

<210> 75

<211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 类人

<400> 75  
 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 Tyr Ser Ile Thr Gly Gly  
 20 25 30  
 Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 Lys Asp Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 76  
 <211> 445  
 <212> DNA  
 <213> 类人

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (22)..(426)

<400> 76  
 gtcagaacgc gtgccgccac c atg aaa gtg ttg agt ctg ttg tac ctc ttg 51  
 Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu  
 1 5 10  
 aca gcc att cct ggt atc ctg tct cag gtg cag ctt cag gag tcg ggc 99  
 Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly  
 15 20 25  
 cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc 147  
 Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val  
 30 35 40  
 tct ggt tac tcc atc acc ggt ggt tat tta tgg aac tgg ata cgg cag 195  
 Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln  
 45 50 55  
 ccc cca ggg aag gga ctg gag tgg atg ggg tat atc agc tac gac ggt 243  
 Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly  
 60 65 70  
 acc aat aac tac aaa ccc tcc ctc aag gat cga atc acc ata tca cgt 291

```

Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp Arg Ile Thr Ile Ser Arg
 75                               80                               85                               90

gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct 339
Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
                               95                               100                               105

gcg gac act gca gtg tat tac tgt gcg aga tac ggt agg gtc ttc ttt 387
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe
                               110                               115                               120

gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggtgagtgga 436
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                               125                               130

tcctctgcg 445

<210> 77
<211> 135
<212> PRT
<213> 类人

<400> 77
Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile
 1                               5                               10                               15

Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
                               20                               25                               30

Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
                               35                               40                               45

Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50                               55                               60

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro
 65                               70                               75                               80

Ser Leu Lys Asp Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
                               85                               90                               95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100                               105                               110

Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115                               120                               125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130

<210> 78
<211> 445
<212> DNA
<213> 类人

<400> 78
cagtcttgcg cacggcggtg gtactttcac aactcagaca acatggagaa ctgtcggtaa 60
ggaccatagg acagagtcca cgtcgaagtc ctcagcccg gtcctgacca cttcgggaagc 120
ctctgggaca gggagtggac gtgacagaga ccaatgaggt agtggccacc aataaatacc 180

```

```

ttgacctatg ccgtcggggg tcccttcctt gacctcacct accccatata gtcgatgctg 240
ccatgggtat tgatgtttgg gagggagttc ctagcttagt ggtatagtgc actgtgcagg 300
ttcttgggtca agagggactt cgactcgaga cactggcgac gcctgtgacg tcacataatg 360
acacgctcta tgccatccca gaagaaactg atgaccccgg tcccttggga ccagtggcag 420
aggagtccac tcacctagga gacgc 445

```

<210> 79  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> 类人

```

<400> 79
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 Tyr Ser Ile Thr Gly Gly
                20                25                30
Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
                35                40                45
Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu
  50                55                60
Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
  65                70                75                80
Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                90                95
Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
  100                105                110
Val Thr Val Ser Ser
  115

```

<210> 80  
<211> 445  
<212> DNA  
<213> 类人

<220>  
<221> CDS  
<222> (22)..(426)

```

<400> 80
gtcagaacgc gtgccgccac c atg aaa gtg ttg agt ctg ttg tac ctc ttg 51
                        Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu
                        1                5                10
aca gcc att cct ggt atc ctg tct cag gtg cag ctt cag gag tcg ggc 99
Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly
                15                20                25
cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc 147
Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val
                30                35                40

```

```

tot ggt tac tcc atc acc ggt ggt tat tta tgg aac tgg ata cgg cag 195
Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln
      45                      50                      55

ccc cca ggg aag gga ctg gag tgg atc ggg tat atc agc tac gac ggt 243
Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly
      60                      65                      70

acc aat aac tac aaa ccc tcc ctc aag gat cga gtc acc ata tca cgt 291
Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg
      75                      80                      85                      90

gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct 339
Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
      95                      100                      105

gcg gac act gca gtg tat tac tgt gcg aga tac ggt agg gtc ttc ttt 387
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe
      110                      115                      120

gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggtgagtgga 436
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      125                      130

tcctctgcg 445

<210> 81
<211> 135
<212> PRT
<213> 类人

<400> 81
Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile
  1                      5                      10                      15

Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
      20                      25                      30

Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
      35                      40                      45

Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
  50                      55                      60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro
  65                      70                      75                      80

Ser Leu Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
      85                      90                      95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
      100                      105                      110

Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
      115                      120                      125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      130

```

<210> 82  
 <211> 445  
 <212> DNA  
 <213> 类人

<400> 82  
 cagtcttgcg cacggcggtg gtactttcac aactcagaca acatggagaa ctgtcggtaa 60  
 ggaccatagg acagagtcca cgtcgaagtc ctcagcccgg gtcctgacca cttcgggaagc 120  
 ctctgggaca gggagtggac gtgacagaga ccaatgaggt agtcgccacc aataaatacc 180  
 ttgacctatg ccgtcggggg tcccttcctt gacctcacct agcccatata gtcgatgctg 240  
 ccatggttat tgatgtttgg gagggagttc ctatgctcagt ggtatagtgc actgtgcagg 300  
 ttcttggtca agagggactt cgactcgaga cactggcgac gcctgtgacg tcacataatg 360  
 acacgctcta tgccatccca gaagaaactg atgaccccgg tcccttggga ccagtggcag 420  
 aggagtccac tcacctagga gacgc 445

<210> 83  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 类人

<400> 83  
 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 Tyr Ser Ile Ser Gly Gly  
 20 25 30  
 Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 84  
 <211> 445  
 <212> DNA  
 <213> 类人

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (22)..(426)

<400> 84  
 gtcagaacgc gtgccgccac c atg aaa gtg ttg agt ctg ttg tac ctc ttg 51  
 Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu  
 1 5 10

aca gcc att cct ggt atc ctg tct cag gtg cag ctt cag gag tcg ggc 99  
 Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly  
                   15                                  20                                  25

cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc 147  
 Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val  
                   30                                  35                                  40

tct ggt tac tcc atc agc ggt ggt tat tta tgg aac tgg ata cgg cag 195  
 Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln  
                   45                                  50                                  55

ccc cca ggg aag gga ctg gag tgg atc ggg tat atc agc tac gac ggt 243  
 Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly  
                   60                                  65                                  70

acc aat aac tac aaa ccc tcc ctc aag gat cga gtc acc ata tca gtg 291  
 Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Val  
                   75                                  80                                  85                                  90

gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct 339  
 Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala  
                   95                                  100                                  105

gcg gac act gca gtg tat tac tgt gcg aga tac ggt agg gtc ttc ttt 387  
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe  
                   110                                  115                                  120

gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggtgagtgga 436  
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   125                                  130

tcctctgcg 445

<210> 85  
 <211> 135  
 <212> PRT  
 <213> 类人

<400> 85  
 Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile  
   1                  5                                  10                                  15

Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro  
                   20                                  25                                  30

Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser  
                   35                                  40                                  45

Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu  
                   50                                  55                                  60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro  
                   65                                  70                                  75                                  80

Ser Leu Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
                   85                                  90                                  95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr

	100		105		110	
Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly						
	115		120		125	
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser						
	130					
<210>	86					
<211>	445					
<212>	DNA					
<213>	类人					
<400>	86					
cagtcttgcg cacggcggtg gtactttcac aactcagaca acatggagaa ctgtcggtaa						60
ggaccatagg acagagtcca cgtcgaagtc ctcagccogg gtcctgacca ctcggaagc						120
ctctgggaca gggagtggac gtgacagaga ccaatgaggt agtcgccacc aataaatacc						180
ttgacctatg cegtcggggg tcccttcctt gacctcacct agcccatata gtcgatgctg						240
ccatggttat tgatgtttgg gagggagttc ctagctcagt ggtatagtca cctgtgcagg						300
ttcttggcca agagggactt cgactcgaga cactggcgac gcctgtgacg tcacataatg						360
acacgctcta tgccatcca gaagaaactg atgacccogg tcccttggga ccagtggcag						420
aggagtccac tcacctagga gacgc						445
<210>	87					
<211>	18					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	人工序列的描述:					
	寡核苷酸					
<400>	87					
gtcagaacgc gtgccgcc						18
<210>	88					
<211>	32					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	人工序列的描述:					
	寡核苷酸					
<400>	88					
accatgaagt tgccctgtag gctgttggtg ct						32
<210>	89					
<211>	32					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	人工序列的描述:					
	寡核苷酸					

---

<400> 89  
gatgttctgg tttcctgctt ccagcagtga tg 32

<210> 90  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：  
寡核苷酸

<400> 90  
ttgtgatgac tcagtctcca ctctccctgc cc 32

<210> 91  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：  
寡核苷酸

<400> 91  
gtcaccctg gagagccggc ctccatctcc tg 32

<210> 92  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：  
寡核苷酸

<400> 92  
caggtctagt cagaccatta tacatagtaa tg 32

<210> 93  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：  
寡核苷酸

<400> 93  
gaaacaccta tttggaatgg tacctgcaga 30

<210> 94  
<211> 32  
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：  
寡核苷酸

<400> 94  
ggcaacttca tggtagcgcc acgagttctg ac 32

<210> 95

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：  
寡核苷酸

<400> 95  
gaaaccagaa catcagcacc aacagcctaa ca 32

<210> 96

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：  
寡核苷酸

<400> 96  
ctgagtcatc acaacatcac tgctggaagc ag 32

<210> 97

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：  
寡核苷酸

<400> 97  
tctccagggg tgacgggcag ggagagtgga ga 32

<210> 98

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：  
寡核苷酸

<400> 98

tctgactaga cctgcaggag atggaggccg gc 32

<210> 99  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：  
 寡核苷酸

<400> 99  
 aaataggtgt ttccattact atgtacaatg c 31

<210> 100  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：  
 寡核苷酸

<400> 100  
 cagggcagtc tccacagctc ctgatctata aa 32

<210> 101  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：  
 寡核苷酸

<400> 101  
 gtttctaadc ggctttatgg ggtccctgac ag 32

<210> 102  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：  
 寡核苷酸

<400> 102  
 gttcagtggc agtggatcag gcacagattt ta 32

<210> 103  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：  
寡核苷酸

<400> 103

cactgaaaat cagcagagtg gaggctgagg at

32

<210> 104

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：  
寡核苷酸

<400> 104

gttgggggttt attactgctt tcaaggttca ca

32

<210> 105

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：  
寡核苷酸

<400> 105

tgttccgtgg acgttcggcc aagggaccaa gg

32

<210> 106

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：  
寡核苷酸

<400> 106

tggaaatcaa acgtgagtgg atcctctgcg

30

<210> 107

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：  
寡核苷酸

<400> 107

tctgcaggta ccattgc

17

<210> 108  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述:  
 寡核苷酸

<400> 108  
 tgcaatggta cctgcagaag c 21

<210> 109  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述:  
 寡核苷酸

<400> 109  
 agactgccct ggcttctgca ggtaccattg ca 32

<210> 110  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述:  
 寡核苷酸

<400> 110  
 cgattagaaa ctttatagat caggagctgt gg 32

<210> 111  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述:  
 寡核苷酸

<400> 111  
 tgccactgaa cctgtcaggg accccataaa gc 32

<210> 112  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：  
     寡核苷酸

<400> 112  
 gattttcagt gtaaaatctg tgccctgatcc ac 32

<210> 113  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：  
     寡核苷酸

<400> 113  
 taaaccccaa catcctcagc ctccactctg ct 32

<210> 114  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：  
     寡核苷酸

<400> 114  
 tccacggaac atgtgaacct tgaaagcagt aa 32

<210> 115  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：  
     寡核苷酸

<400> 115  
 tttgatttcc accttggtcc cttggccgaa c 31

<210> 116  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：  
     寡核苷酸

<400> 116  
 cgcagaggat ccactcacg 19

<210> 117  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：  
 寡核苷酸

<400> 117  
 gtcagaacgc gtgccgcc 18

<210> 118  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：  
 寡核苷酸

<400> 118  
 accatgaaag tggtgagtct gttgtacctc ttga 34

<210> 119  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：  
 寡核苷酸

<400> 119  
 cagccattcc tggtatcctg tctcaggtgc agct 34

<210> 120  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：  
 寡核苷酸

<400> 120  
 tcaggagtcg ggcccaggac tggtgaagcc ttcg 34

<210> 121  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：  
寡核苷酸

<400> 121  
gagaccctgt ccctcacctg cactgtctct ggt 33

<210> 122  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：  
寡核苷酸

<400> 122  
tactccatca ccggtgggta tttatggaac tgg 33

<210> 123  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：  
寡核苷酸

<400> 123  
atacggcagc cccagggaa gggactggag tgg 33

<210> 124  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：  
寡核苷酸

<400> 124  
atgggggtata tcagctacga cggtaccaat aac 33

<210> 125  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：  
寡核苷酸

<400> 125  
tcaacacttt catggtggcg gcacgcgttc tgac 34

<210> 126  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述：  
       寡核苷酸  
  
 <400> 126  
 ataccaggaa tggctgtcaa gaggtacaac agac 34  
  
 <210> 127  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述：  
       寡核苷酸  
  
 <400> 127  
 tgggcccagac tctgaagct gcacctgaga cagg 34  
  
 <210> 128  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述：  
       寡核苷酸  
  
 <400> 128  
 tgagggacag ggtctccgaa ggcttcacca gtcc 34  
  
 <210> 129  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述：  
       寡核苷酸  
  
 <400> 129  
 ccaccggtga tggagtaacc agagacagtg cagg 34  
  
 <210> 130  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述：

**寡核苷酸**

<400> 130 ccctgggggc tgccgtatcc agttccataa ataa	34
<210> 131 <211> 32 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述： 寡核苷酸	
<400> 131 tagctgatat accccatcca ctccagtccc tt	32
<210> 132 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述： 寡核苷酸	
<400> 132 gttattggta ccgtcg	16
<210> 133 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述： 寡核苷酸	
<400> 133 tacgacggta ccaataacta c	21
<210> 134 <211> 32 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述： 寡核苷酸	
<400> 134 aaaccctccc tcaaggatcg aatcaccata tc	32
<210> 135	

<211> 32  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述：  
     寡核苷酸  
  
 <400> 135  
 acgtgacacg tccaagaacc agttctccct ga 32  
  
 <210> 136  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述：  
     寡核苷酸  
  
 <400> 136  
 agctgagctc tgtgaccgct gcggacactg ca 32  
  
 <210> 137  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述：  
     寡核苷酸  
  
 <400> 137  
 gtgtattact gtgcgagata cggtagggtc tt 32  
  
 <210> 138  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述：  
     寡核苷酸  
  
 <400> 138  
 ctttgactac tggggccagg gaaccctggt ca 32  
  
 <210> 139  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述：  
     寡核苷酸

<400> 139 ccgtctcctc aggtgagtgg atcctctgcg	30
<210> 140 <211> 32 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸	
<400> 140 agggagggtt tgtagttatt ggtaccgtcg ta	32
<210> 141 <211> 32 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸	
<400> 141 acgtgtcacg tgatatggtg attcgatcct tg	32
<210> 142 <211> 32 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸	
<400> 142 agagctcagc ttcagggaga actggttctt gg	32
<210> 143 <211> 32 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸	
<400> 143 cagtaataca ctgcagtgtc cgcagcggtc ac	32
<210> 144 <211> 32	

<212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述:  
     寡核苷酸  
  
 <400> 144  
 agtagtcaaa gaagacccta ccgtatctcg ca 32  
  
 <210> 145  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述:  
     寡核苷酸  
  
 <400> 145  
 ctgaggagac ggtgaccagg gttccctggc ccc 33  
  
 <210> 146  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述:  
     寡核苷酸  
  
 <400> 146  
 cgcagaggat ccactcac 18  
  
 <210> 147  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> 类人  
  
 <400> 147  
 ctggttactc catcagcggg ggttatttat g 31  
  
 <210> 148  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> 类人  
  
 <400> 148  
 cataaataac caccgctgat ggagtaacca g 31  
  
 <210> 149  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> 类人

<400> 149  
 gggactggag tggatcgggt atatcagcta c 31

<210> 150  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> 类人

<400> 150  
 gtagctgata taccgatcc actccagtcc c 31

<210> 151  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> 类人

<400> 151  
 tccctcaagg atcgagtcac catatcacgt g 31

<210> 152  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> 类人

<400> 152  
 cacgtgatat ggtgactcga tccttgagg a 31

<210> 153  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> 类人

<400> 153  
 gatcgagtca ccatatcagt ggacacgtcc aagaaccag 39

<210> 154  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> 类人

<400> 154  
 ctggttcttg gacgtgtcca ctgatatggt gactcgatc 39

<210> 155  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> 类人

<400> 155  
 gcttccagca gtgatattgt gatgactcag t 31

<210> 156

<211> 31  
<212> DNA  
<213> 类人

<400> 156  
actgagtcac cacaatatca ctgctggaag c

31

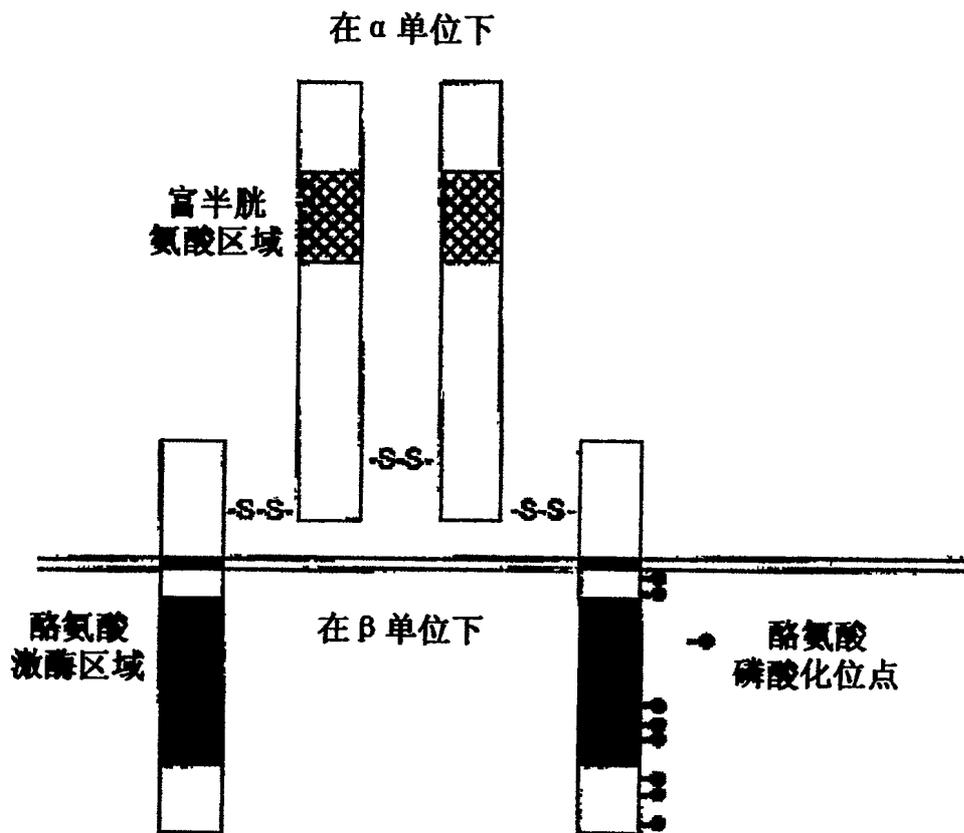


图1

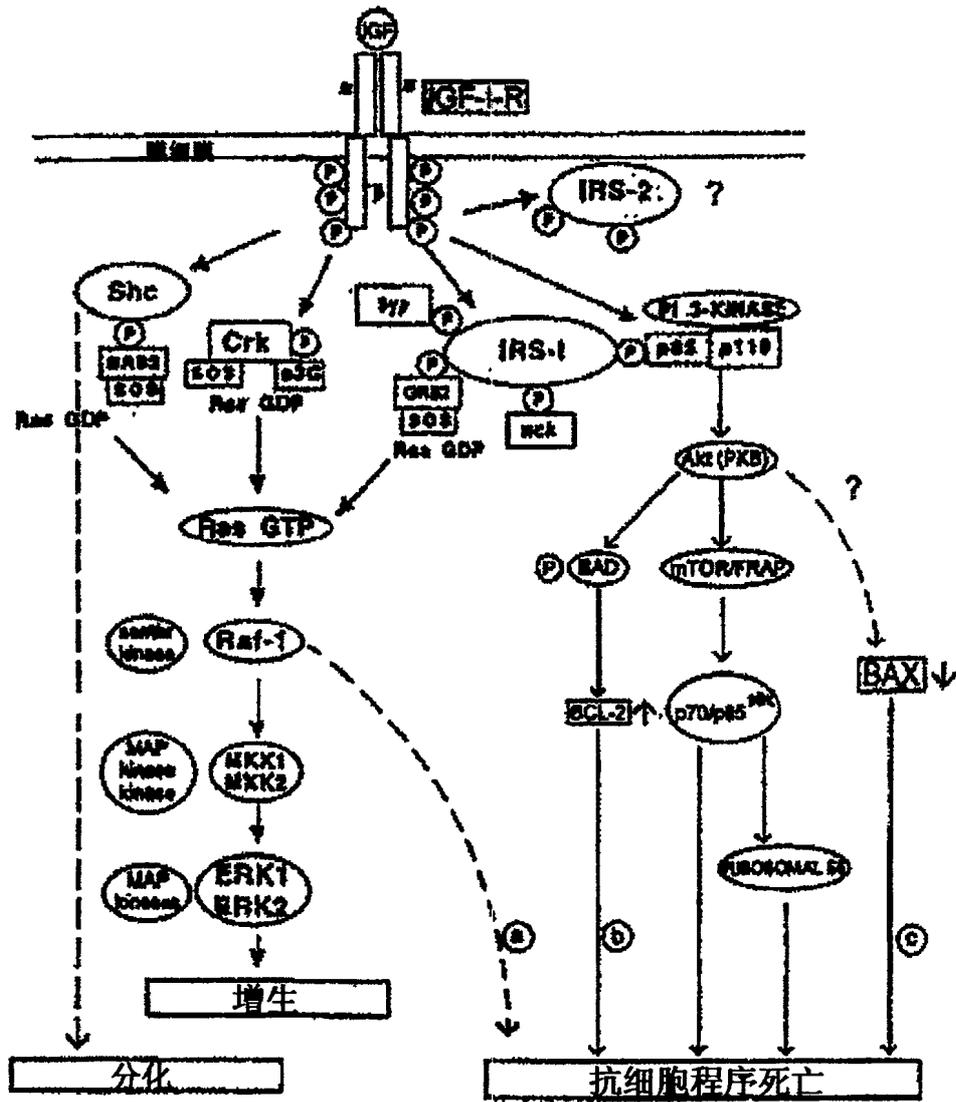


图2

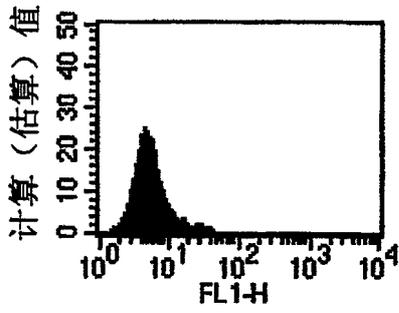


图3A

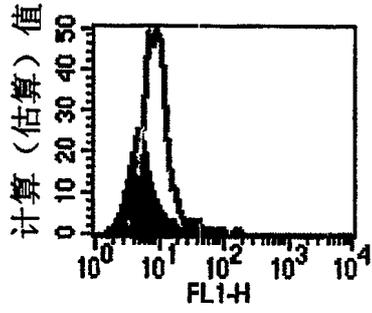


图3B

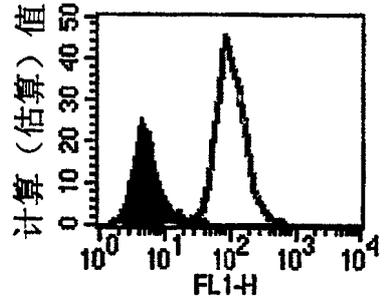
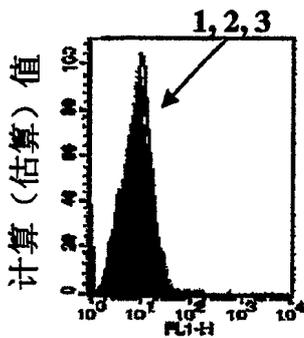
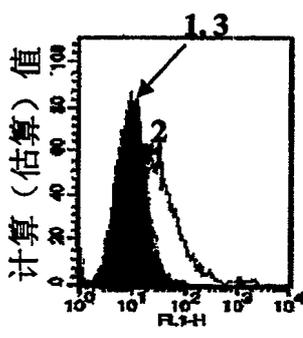


图3C



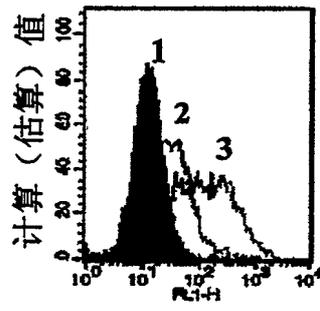
未转染细胞

图4A



细胞 IGF-IR+

图4B



细胞 IR+

图4C

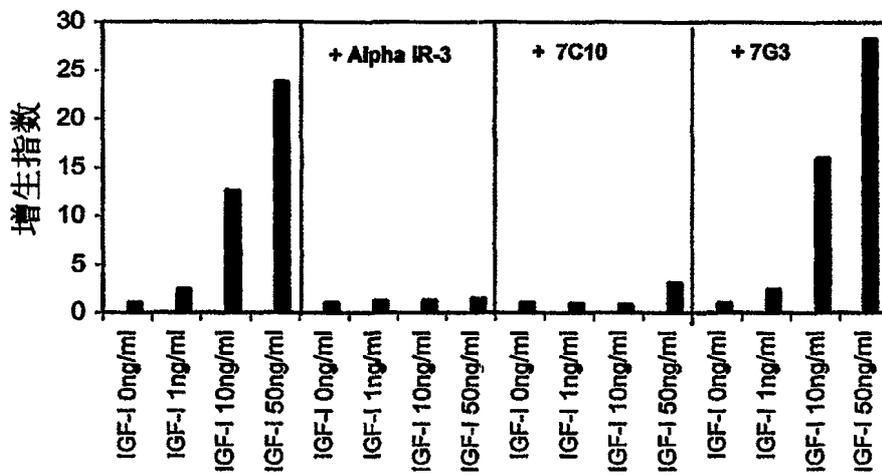


图5

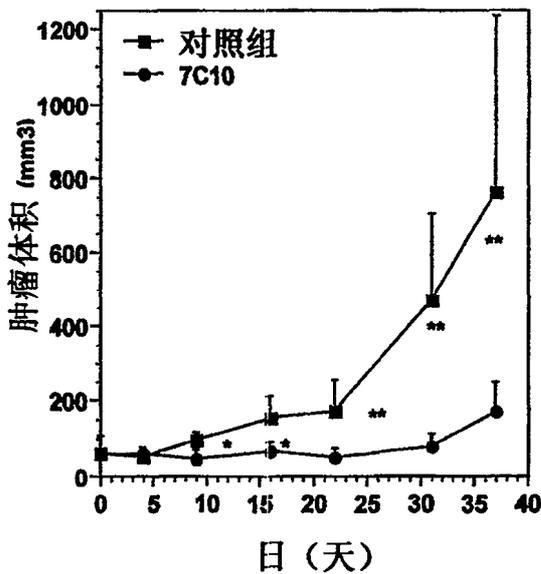


图6A

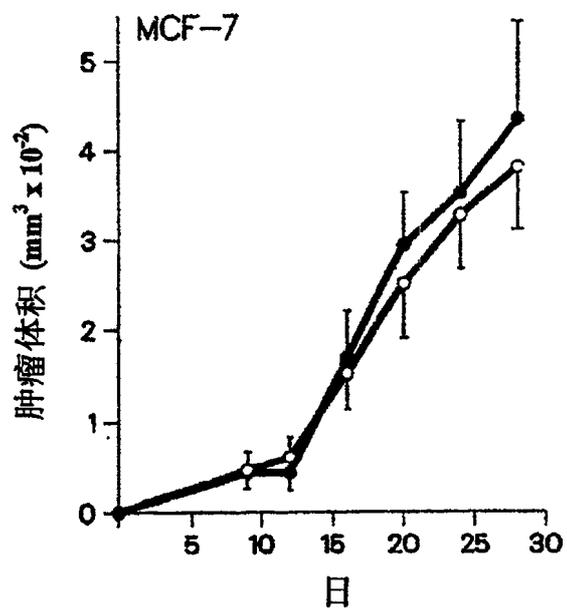


图6B

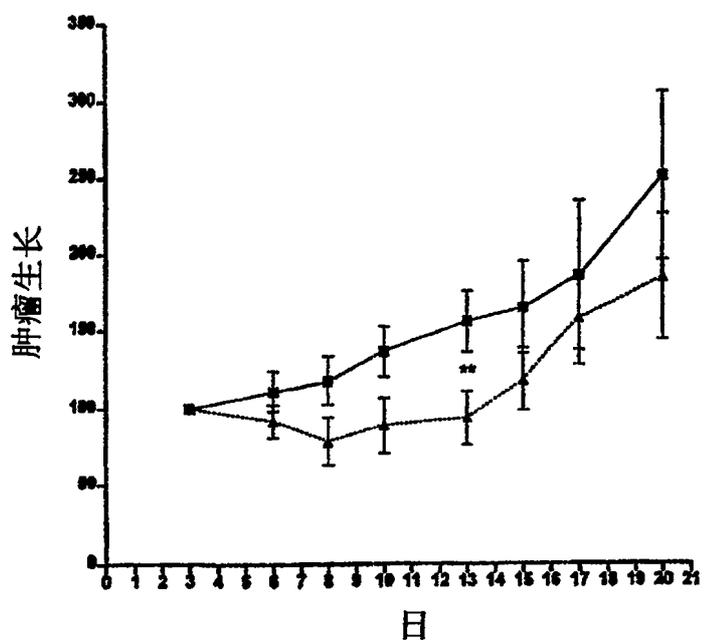


图6C

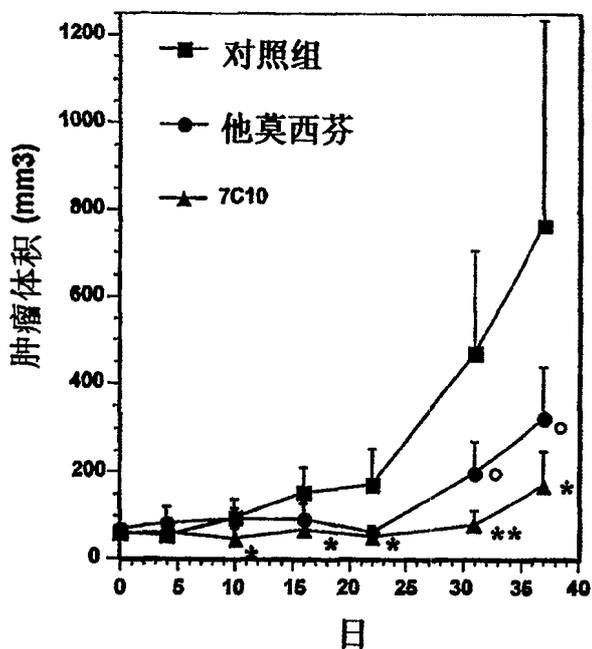


图7

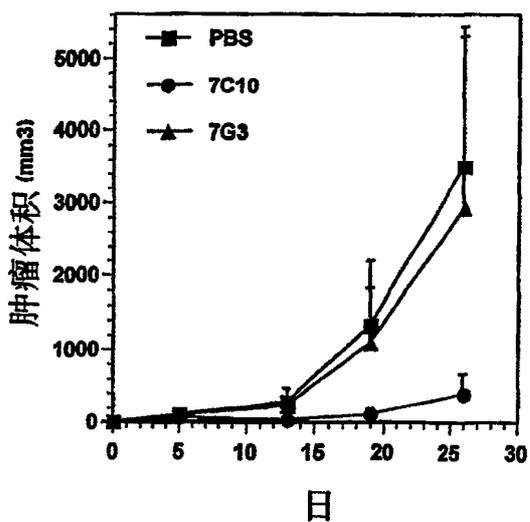


图8A

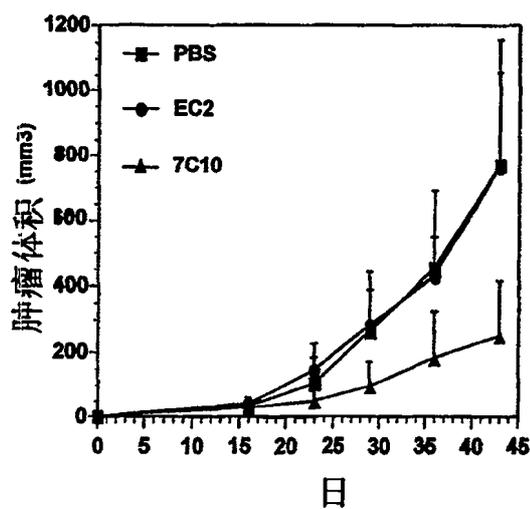


图8B

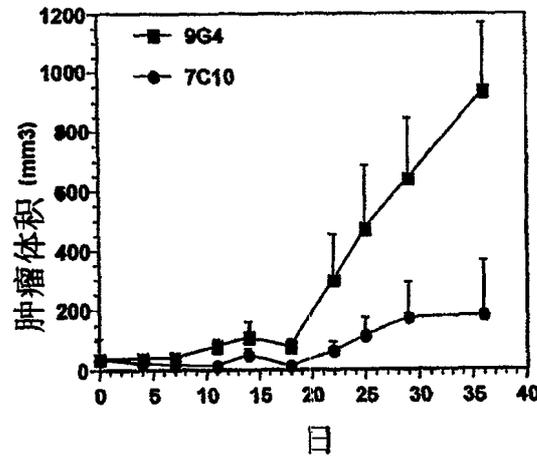


图8C

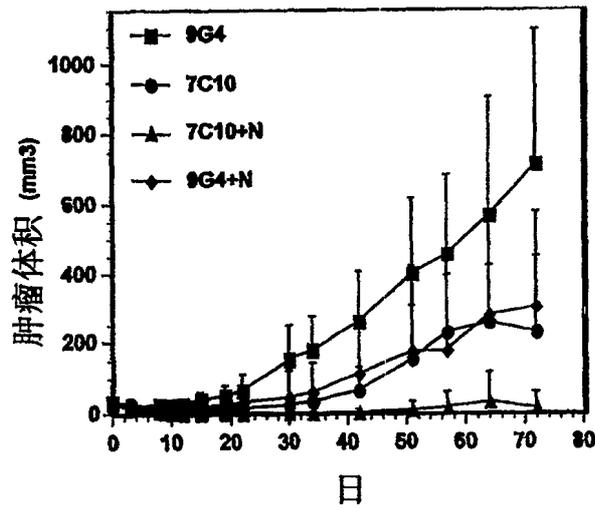


图9

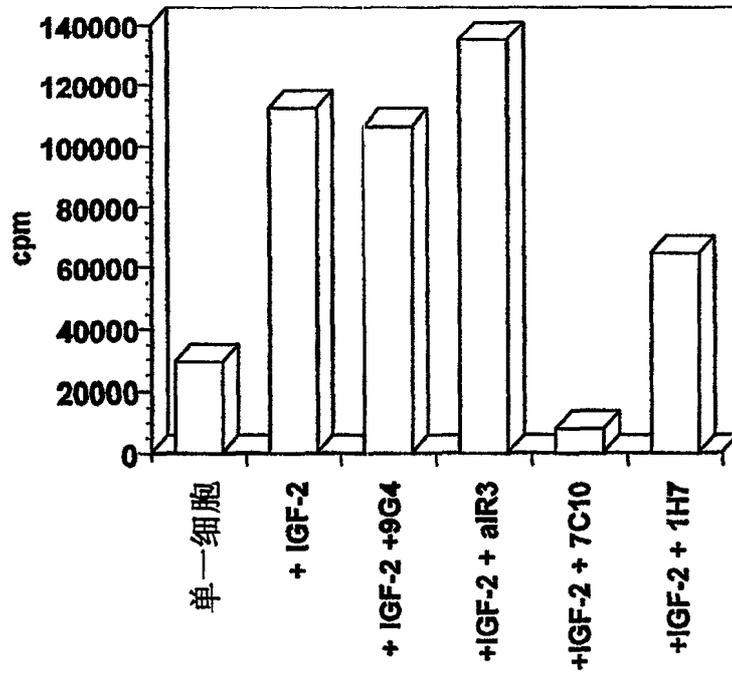


图10

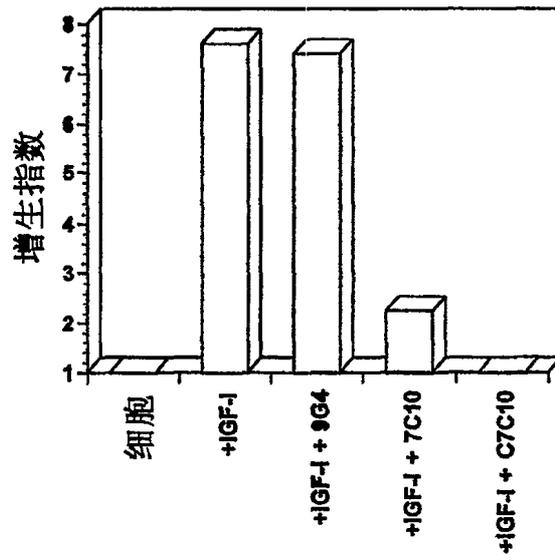


图11

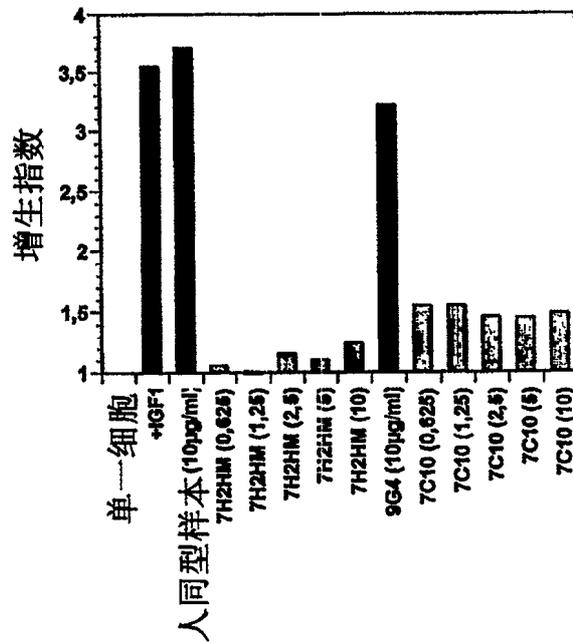


图12

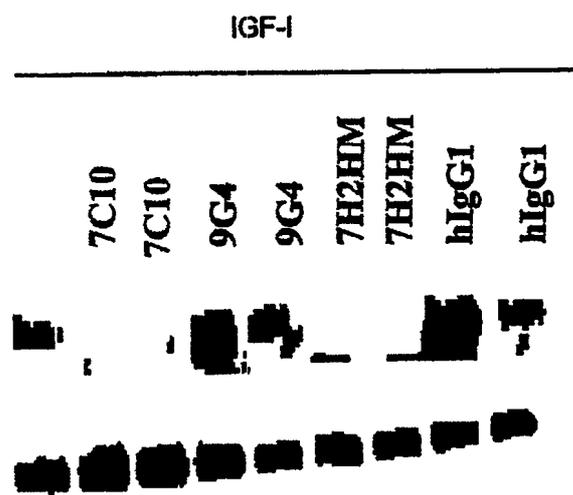


图13

```

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGTCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGAAGTGAT
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACTTCAACGGACAATCCGACAACCACGACTACAAGACCTAAGGACGAAGGTCTTCACTA
ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGTCT
      寡 MKV-1      L M F W I P A S R S D -
                        前导肽3'端
GTTTTGATGACCCAAATTCACCTCCCTGCCTGTCTGAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATC
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CAAACTACTGGGTTTAAGGTGAGAGGGACGGACAGTCAGAACCTCTAGTTCGGAGGTAG

V L M T Q I P L S L P V S L G D Q A S I -

TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTACAATGGTAC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
AGAACGTCTAGATCAGTCTCGTAACATGTATCATTACCTTTGTGGATAAATGTTACCATG

S C R S S Q S I V H S N G N T Y L Q W Y -
                        CDR 1
CTGCAGAAACCAGGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGACTTTAT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
GACGTCTTTGGTCCAGTCAGAGGTTTCGAGGACTAGATGTTTCAAAGGTTGGCTGAAATA

L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R L Y -
                        CDR 2
GGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CCCCAGGGTCTGTCCAAGTCACCGTCACCTAGTCCCTGTCTAAAGTGTGAGTTCTAGTCG

G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S -

AGCGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTGG
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TCGCACCTCCGACTCCTAGACCCTCAAATAATGACGAAAGTTCCAAGTGTACAAGGCACC

S V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P W -
                        CDR 3
                        GG
ACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TGCAAGCCACCTCCGTGGTTCGACCTTTAGTTTGCCCGACTACGACGTGGTTGACATAGG

T F G G G T K L E I K

      寡 MKC
TAGAAGGGTGGTAGGTCA
ATCTTCCCACCATCCAGT
421 -----+-----+-----+-----+-----+ 438
TAGAAGGGTGGTAGGTCA

```

图14

```

ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCTCTTGACAGCCATTCCTGGTATCCTGFTCTGATGTA
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACTACCACAATTCAGAAGACATGGACAACCTGTCGGTAAGGACCATAGGACAGACTACAT
MHV-12 ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT
MHV-8 ATGAGAGTGCATTCCTTTTGTG
                L L T A I P G I L S D V -
                前导肽3'端
CAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCTCTCACCTGC
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
GTCGAAGTCCCTCAGTCCCTGGACCGGAGCACTTGGGAAGAGTCAGAGACAGAGAGTGGACG
Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C -
TCTGTCAACCGCTACTCCATCACCAGGTGGTTATTTATGGAACCTGGATCCGGCAGTTTCCA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
AGACAGTGGCCGATGAGGTAGTGGCCACCAATAAATACCTTGACCTAGGCCGTCAAAGGT
S V T G Y S I T G G Y L W N W I R Q F P -
                CDR 1
GGAAACAAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAGCTACGACGGTACCAATAACTACAAACCA
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CCTTTGTTTGACCTCACCTACCCGATGTATTCGATGCTGCCATGGTTATTGATGTTTGGT
G N K L E W M G Y I S Y D G T N N Y K P -
                CDR 2
TCTCTCAAAGATCGAATCTCCATCACTCGTGACACATCTAAGAACCAGTTTTTCTGAAG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
AGAGAGTTTCTAGCTTAGAGGTAGTGGACACTGTGTAGATTCTTGGTCAAAAAGGACTTC
S L K D R I S I T R D T S K N Q F F L K -
TTGAATCTGTGACTAATGAAGACACAGCTACATATTACTGTGCAAGATACGGTAGGGTC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
AACTTAAGACACTGATTACTTCTGTGTCGATGTATAATGACACGTTCTATGCCATCCCAG
L N S V T N E D T A T Y Y C A R Y G R V -
                CDR 3
                GGG
TTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
AAGAAACTGATGACCCCGTTCCGTTGGTGGAGAGTGTGAGAGGAGTCGGTTTTGCTGTGGG
F F D Y W G Q G T T L T V S S
                寡 MHC-1
GGTAGACAGATAGGTGAC
CCATCTGTCTATCCACTG
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 438
GGTAGACAGATAGGTGAC

```

图15

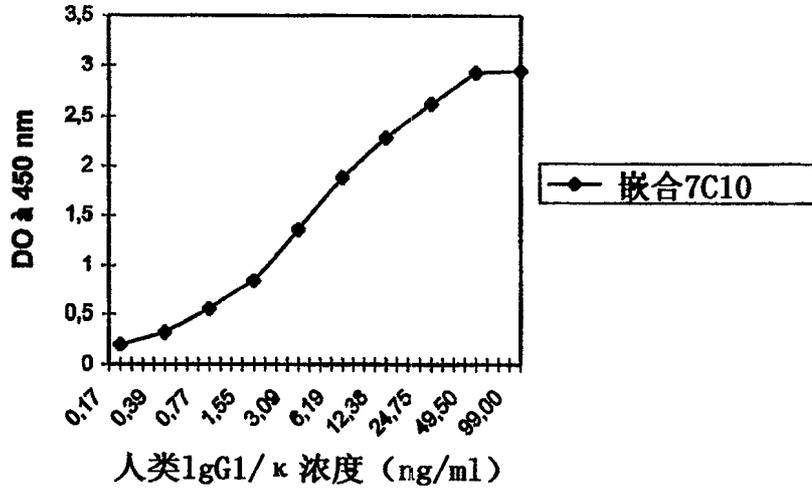


图16

	3      7	<i>CDR 1</i>
鼠 7C10 VL	DVL <u>M</u> TQ <u>I</u> PLSLPVSLGDQASISC	<b>RSSQSI</b> VHSNGNTYLQ
DRB1-4.3	..... <u>T</u> .....	..... <b>E</b>
C94-5B11' CL	..... <u>T</u> .....	..... <b>E</b>
鼠 Kabat sgII	.. <u>V</u> .. <u>T</u> .....	..... <b>L</b> ..... <b>E</b>
		<i>CDR 2</i>
鼠 7C10 VL	WYLQKPGQSPKLLIY <b>KVSNR</b> LY	GVPDRFSGSGSGTDFTL
DRB1-4.3	.....	..... <b>FS</b> .....
C94-5B11' CL	.....	..... <b>FS</b> .....
鼠 Kabat sgII	.....	..... <b>FS</b> .....
	77	<i>CDR 3</i>
鼠 7C10 VL	KISS <u>V</u> EAEDLGVYYC <b>FQGS</b> HVPWT	FGGGTKLEIK
DRB1-4.3	... <u>R</u> .....	..... <b>F</b> ... <b>S</b> ... <b>D</b> ..
C94-5B11' CL	... <u>R</u> .....	.....
鼠 Kabat sgII	... <u>R</u> .....	... <b>T</b> ... <b>Y</b> .....

图17

		<i>CDR 1</i>	
鼠 7C10 VL	DVLMTQIPLSLPVS LGDQASISC	<u>RSSQSIVHSNGNTYLQ</u>	
GM607	.IV...S.....TP.EP.....	.....LL.....YN..D	
DPK15/A19	.IV...S.....TP.EP.....	.....LL.....YN..D	
人 Kabat sgII	.IV...S.....TP.EP.....	.....LL..D.XX..X	
 <i>CDR 2</i> 			
鼠 7C10 VL	WYLQKPGQSPKLLIY	<u>KVSNRLY</u>	GVPDRFSGSGSGTDFTLK
GM607	.....Q.....	LG...AS	.....
DPK15/A19	.....Q.....	LG...AS	.....
人 Kabat sgII	.....Q.....	L...AS	.....
 <i>CDR 3</i> 			
鼠 7C10 VL	ISSVEAEDLGVIYC	<u>FGSHVPWT</u>	FGGGTKLEIK
GM607	..R.....V.....	M.ALQT.Q.	..Q...V...
DPK15/A19	..R.....V.....	M.ALQT.	
人 Kabat sgII	..R.....V.....	M.ALQX.R.	..Q...V...

图18

		<i>CDR 1</i>	
鼠 7C10 VL	DVLMTQIPLSLPVS LGDQASISC	<u>RSSQSIVHSNGNTYLQ</u>	
GM 607	.IV...S.....TP.EP.....	.....LL.....YN..D	
人类化7C10 VL 1	..V...S.....TP.EP.....	.....LL.....YN..D	
人类化7C10 VL 2	.IV...S.....TP.EP.....	.....LL.....YN..D	
 <i>CDR 2</i> 			
鼠 7C10 VL	WYLQKPGQSPKLLIY	<u>KVSNRLY</u>	GVPDRFSGSGSGTDFTL
GM 607	.....Q.....	LG...AS	.....
人类化7C10 VL 1	.....Q.....		
人类化7C10 VL 2	.....Q.....		
 <i>CDR 3</i> 			
鼠 7C10 VL	KISSVEAEDLGVIYC	<u>FGSHVPWT</u>	FGGGTKLEIK
GM 607	..R.....V.....	M.ALQT.Q.	..Q...V...
人类化7C10 VL 1	..R.....V.....		..Q...V...
人类化7C10 VL 2	..R.....V.....		..Q...V...

图19

MluI  
 |  
 GTCAGAACGCGTGCCGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGG  
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60  
 CAGTCTTGCGCACGGCGGTGGTACTTCAACGGACAATCCGACAACCACGACTACAAGACC

M K L P V R L L V L M F W -

前导肽

TTTCCTGCTTCCAGCAGTGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACC  
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120  
 AAAGGACGAAGGTCGTCACTACAACACTACTGAGTCAGAGGTGAGAGGGACGGGCAGTGG

2

F P A S S S D V V M T Q S P L S L P V T -

CCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGA  
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180  
 GGACCTCTCGGCCGGAGGTAGAGGACGTCCAGATCAGTCTCGTAACATGTATCATTACCT

CDR 1

P G E P A S I S C R S S Q S I V H S N G -

KpnI  
 |

AAACCTATTTGCAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT  
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240  
 TTGTGGATAAACGTTACCATGGACGCTTCGGTCCCGTCAGAGGTGTCGAGGACTAGATA

N T Y L Q W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y -

AAAGTTTCTAATCGGCTTTATGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACA  
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300  
 TTTCAAAGATTAGCCGAAATACCCAGGGACTGTCCAAGTCACCGTCACCTAGTCCGTGT

CDR 2

K V S N R L Y G V P D R F S G S G S G T -

GATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCTTT  
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360  
 CTAAAATGTGACTTTTAGTCGTCTCACCTCCGACTCCTACAACCCCAAATAATGACGAAA

D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F -

CAAGGTTACATGTTCCGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGTGAG  
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420  
 GTTCCAAGTGTAAGGCACCTGCAAGCCGGTTCCTGGTTCCACCTTTAGTTTGCACCTC

CDR 3

Q G S H V P W T F G Q G T K V E I K

BamHI  
 |  
 TGGATCCTCTGCG  
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 433  
 ACCTAGGAGACGC

图20

```

      MluI
      |
GTCAGAACGCGTGCCGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGG
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
CAGTCTTGCGCACGGCGGTGGTACTTCAACGACAAATCCGACAACCACGACTACAAGACC

      M K L P V R L L V L M F W -
      前导肽
TTTCCTGCTTCCAGCAGTGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACC
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
AAAGGACGAAGGTCGTCACTACAACACTACTGAGTCAGAGGTGAGAGGGACGGGCAGTGG
      2
F P A S S S D I V M T Q S P L S L P V T -
CCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGTCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GGACCTCTCGGCCGAGGTAGAGGACGTCCAGATCAGTCTCGTAACATGTATCATTACCT
      CDR 1
P G E P A S I S C R S S Q S I V H S N G -
      KpnI
      |
AACACCTATTTGCAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TTGTGGATAAACGTTACCATGGACGTCTTCGGTCCCCTCAGAGGTGTCGAGGACTAGATA

N T Y L Q W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y -
AAAGTTTCTAATCGGCTTTATGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACA
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
TTTCAAAGATTAGCCGAAATACCCAGGGACTGTCCAAGTCACCGTCACCTAGTCCGTGT
      CDR 2
K V S N R L Y G V P D R F S G S G S G T -
GATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCTTT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
CTAAAATGTGACTTTTAGTCGTCTCACCTCCGACTCCTACAACCCCAAATAATGACGAAA

D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C E -
CAAGGTTACATGTTCCGTGGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTGAG
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
GTTCCAAGTGTACAAGGCACCTGCAAGCCGGTTCCTGTTCCACCTTTAGTTTGCACCTC
      CDR 3
Q G S H V P W T F G Q G T K V E I K
BamHI
|
TGGATCCTCTGCG
421 -----+----- 433
ACCTAGGAGACGC

```

图21

	17	27	<b>CDR 1</b>
<b>7C10 VH</b>	<u>D</u> VQLQESG <u>P</u> GLV <u>K</u> PSQ <u>S</u> LSLTCSVT <u>G</u> YSIT	<u>G</u> GYL <u>W</u> N	WIRQ
<b>AN03' CL</b>	.....		<b>S..Y..</b> .....
Kabat sgI (A)	<u>E</u> ..... <u>S</u> ..... <u>T</u> ..... <u>D</u> ...		<b>S..WN.</b> ...
<b>CDR 2</b>			
<b>7C10 VH</b>	FPGNKLEWMG	<u>Y</u> ISYD <u>G</u> T <u>N</u> NY <u>K</u> PSL <u>K</u> D	RISITRDTSKNQ <u>F</u> FL
<b>AN03' CL</b>	.....	<b>..N...N...N...N</b> .....	
Kabat sgI (A)	.....	<b>...S.STY.N...S</b> .....	<b>...Y..</b>
	84	<b>CDR 3</b>	
<b>7C10 VH</b>	<u>K</u> LNSVTNEDTATYYCAR	<u>Y</u> GRV- <u>F</u> FDY	WGQGTTLT <u>V</u> SS
<b>AN03' CL</b>	..... <u>T</u> .....	<b>E.YGY</b> .....	
Kabat sgI (A)	<u>Q</u> ..... <u>T</u> .....	<b>G.YGYG</b> ...	<b>...V....</b>

图22

	<b>Rch 1</b>	30	<b>CDR 1</b>	<b>Rch 2</b>	
<b>鼠7C10 VH</b>	DVQLQESG <u>P</u> GLV <u>K</u> PSQ <u>S</u> LSLTCSVT <u>G</u> YSIT		<u>G</u> GYL <u>W</u> N	WIRQ	
<b>人Kabat sgII</b>	Q..... <u>T</u> ..... <u>T</u> ..... <u>S</u> ..... <u>G</u> ..... <u>V</u> ..... <u>S</u>		<b>SYWS</b> .. .....		
<b>人VH FURI' CL</b>	Q..... <u>E</u> T..... <u>T</u> ..... <u>S</u> ..... <u>S</u>		<b>S..Y.S</b> .....		
<b>人种系</b>	Q..... <u>E</u> T..... <u>T</u> ..... <u>S</u> ..... <u>S</u>		<b>S..Y.S</b> .....		
	<b>Rch 2</b>	48	<b>CDR 2</b>	67 71	<b>Rch 3</b>
<b>鼠7C10 VH</b>	FPGNKLEWMG	<u>Y</u> ISYD <u>G</u> T <u>N</u> NY <u>K</u> PSL <u>K</u> D	RISITRDTSKNQ <u>F</u> FL		
<b>人Kabat sgII</b>	P..KG...I.	<b>R.Y.S.STX.N...S</b>	.VT. <u>S</u> <u>V</u> ..... <u>S</u> .		
<b>人VH FURI' CL</b>	P..KG...I.	<b>SMFHS.SSY.N...S</b>	.VT. <u>S</u> <u>V</u> ..... <u>S</u> .		
<b>人种系</b>	P..KG...I.	<b>S.YHS.STY.N...S</b>	.VT. <u>S</u> <u>V</u> ..... <u>S</u> .		
	<b>Rch 3</b>	<b>CDR 3</b>	<b>Rch 4</b>		
<b>鼠7C10 VH</b>	<u>K</u> LNSVTNEDTATYYCAR	<u>Y</u> GRV <u>F</u> FDY	WGQGTTLT <u>V</u> SS		
<b>人Kabat sgII</b>	..S...AA...V.....	<b>ELPGGYDV</b>	.....LV....		
<b>人VH FURI' CL</b>	Q.R...AA...V.....	<b>GRYCSSTSCNWFDP</b>	.....LV....		
<b>人种系</b>	..S...AA...V.....				

图23

		30	CDR 1	48
鼠7C10 VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSIT	<u>GGYLWN</u>	WIRQFPGNKLEW	MG
人种系	Q.....ET.....T.S..... <u>S</u>	<u>S..Y.G</u>	....P..KG...	<u>I</u> .
人类化VH 1	Q.....ET.....T.S.....		....P..KG.....	
人类化VH 2	Q.....ET.....T.S.....		....P..KG... <u>I</u> .	
人类化VH 3	Q.....ET.....T.S..... <u>S</u>		....P..KG... <u>I</u> .	
	CDR 2	67	71	
7C10 VH souris	<u>YISYDGTNNYKPSLKD</u>	<u>RISITR</u>	<u>DTSKNQFFLKLNSVTNEDTATYYCAR</u>	
human germline	<u>S.FHS.SSY.N.....S</u>	<u>.VT.SV</u>	.....S...S...AA...V.....	
VH Humanisé 1	.....	..T.S	.....S...S...AA...V.....	
VH Humanisé 2	.....	<u>.VT.S</u>	.....S...S...AA...V.....	
VH Humanisé 3	.....	<u>.VT.SV</u>	.....S...S...AA...V.....	
	CDR 3			
7C10 VH souris	<u>YGRVFDY</u>	WGQGTTLTVSS		
human germline				
VH Humanisé 1	.....	.....LV.....		
VH Humanisé 2	.....	.....LV.....		
VH Humanisé 3	.....	.....LV.....		

图24







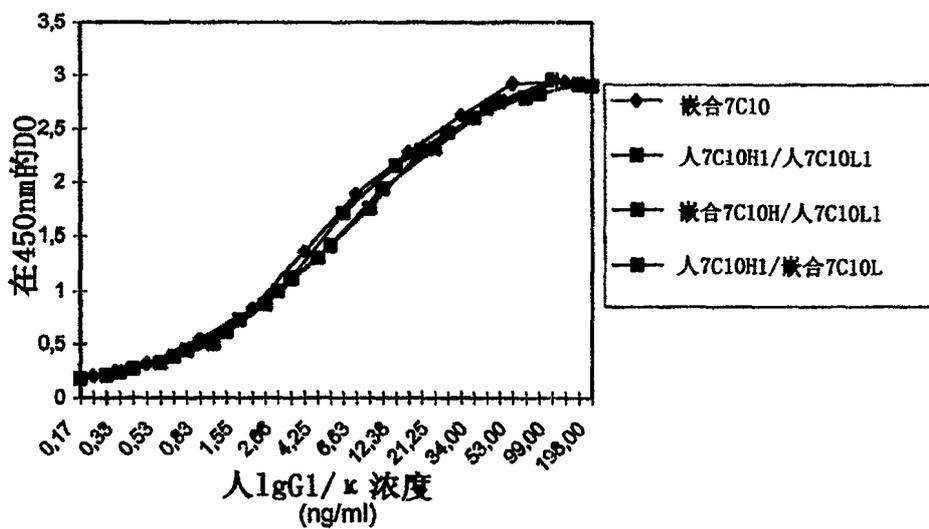


图28

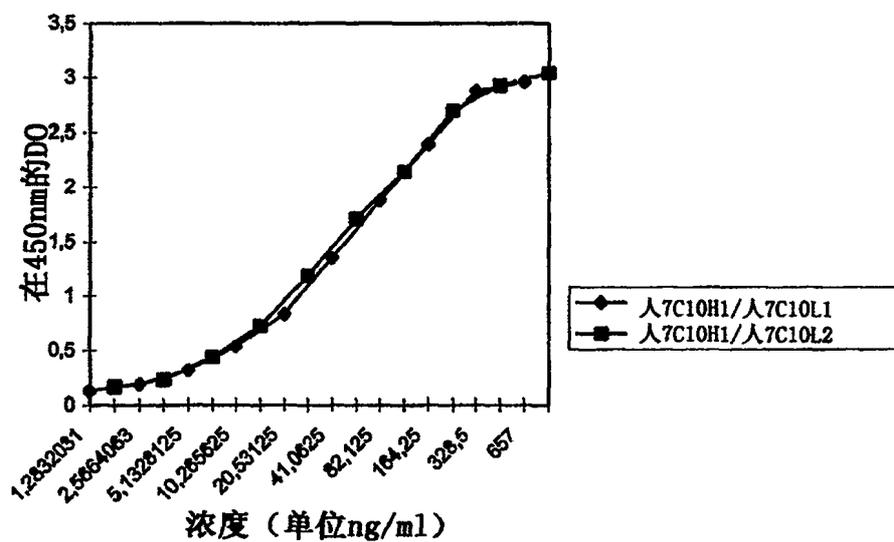


图29

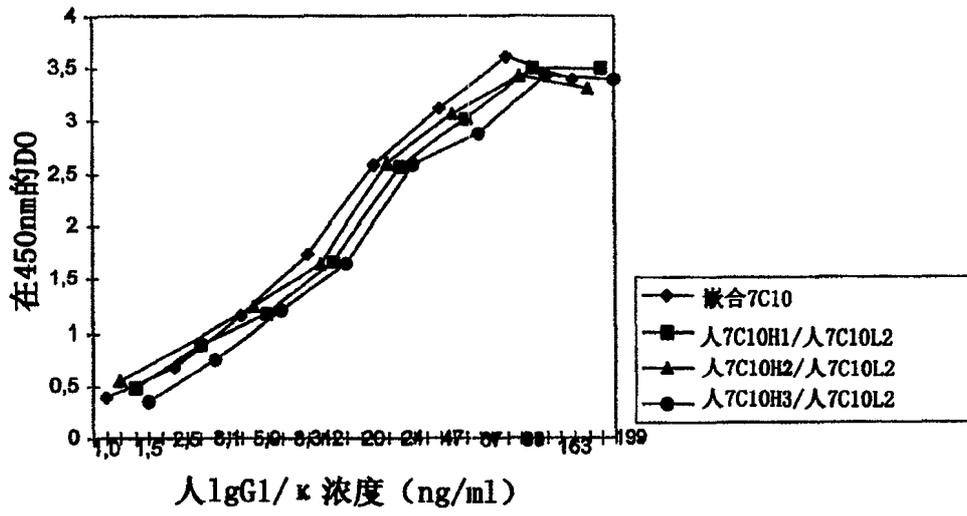


图30

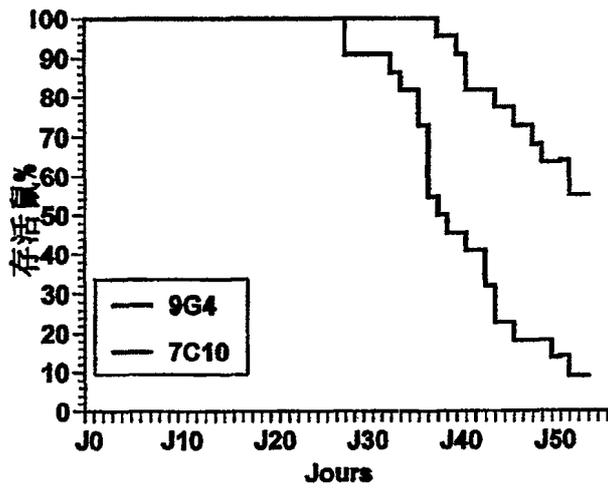


图31

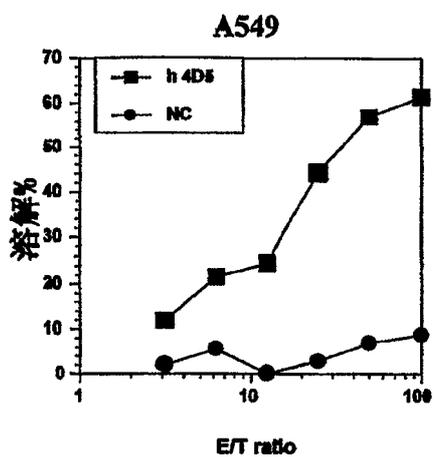


图32A

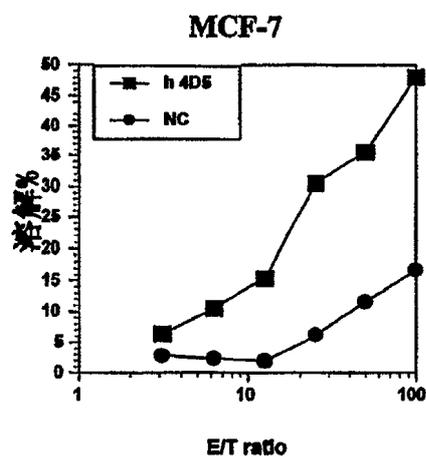


图32B

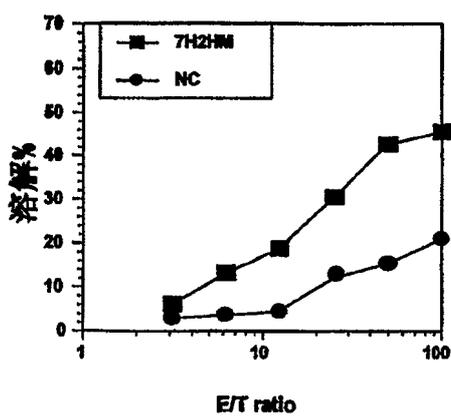


图32C

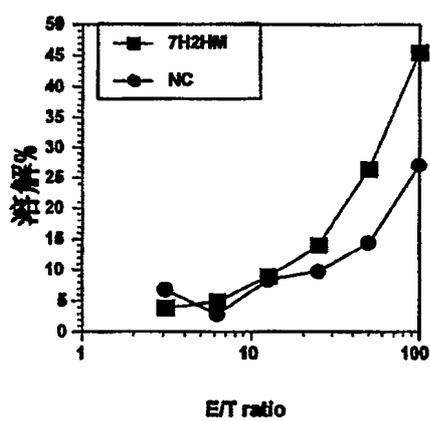


图32D

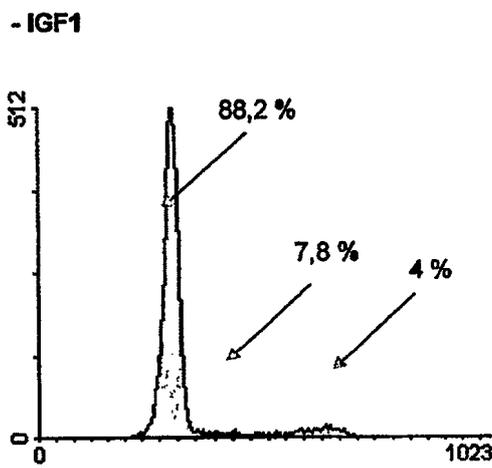


图33A

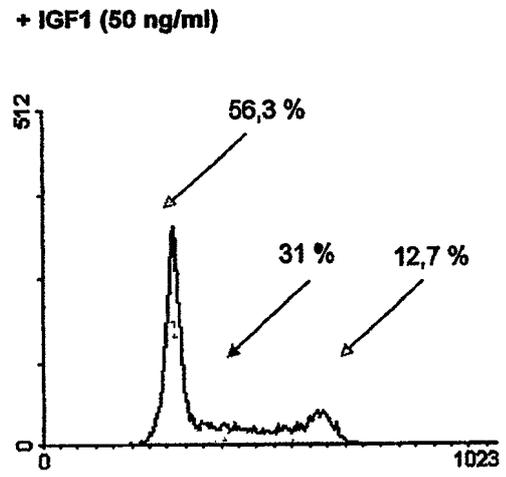


图33B

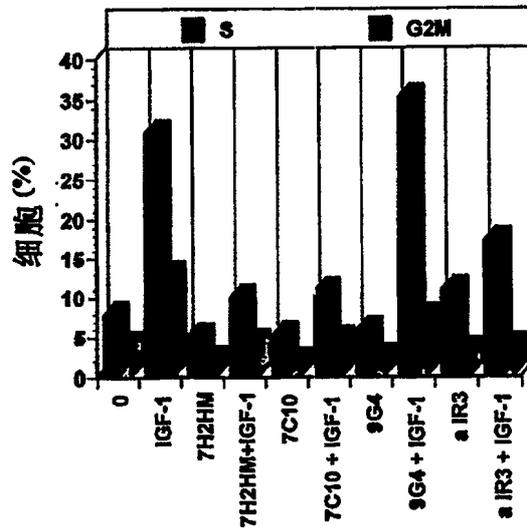


图33C

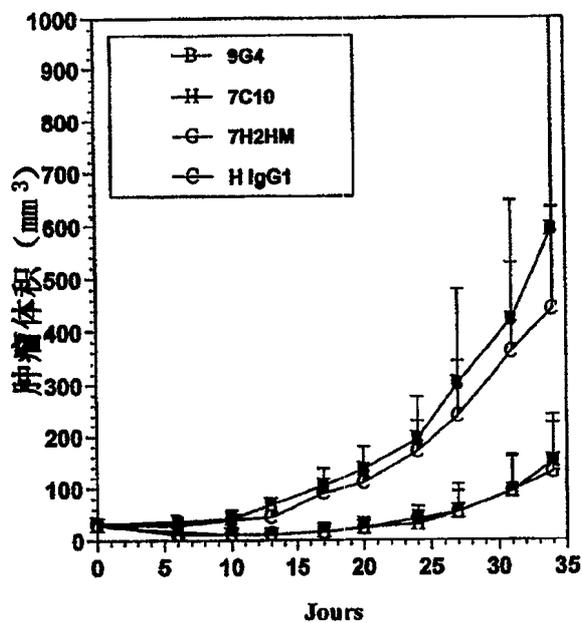


图34A

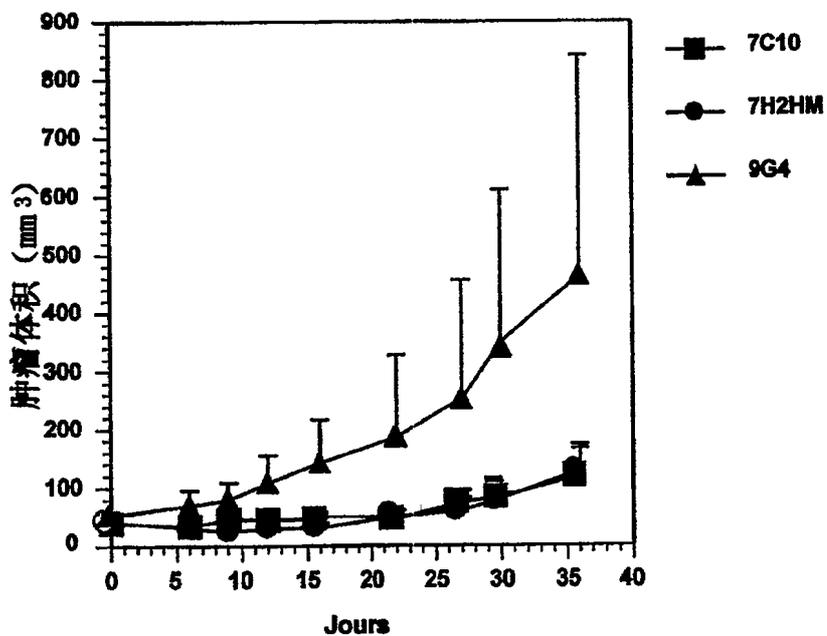


图34B

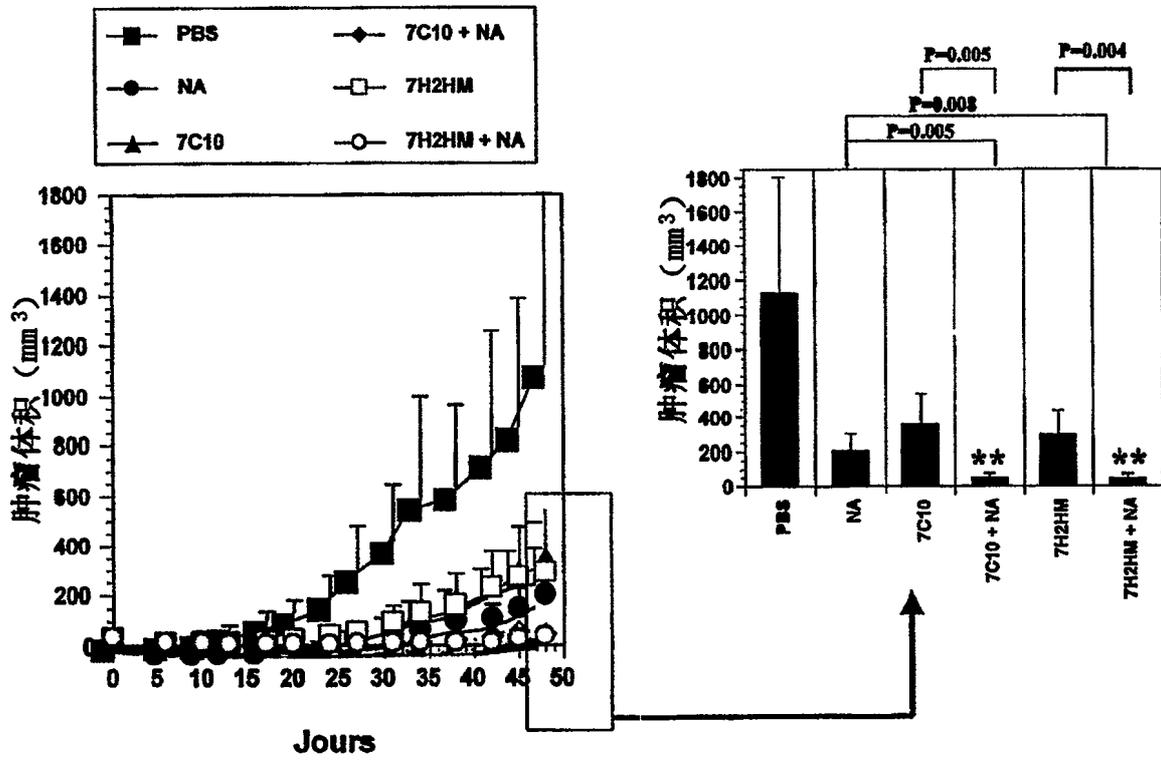


图35A

图35B

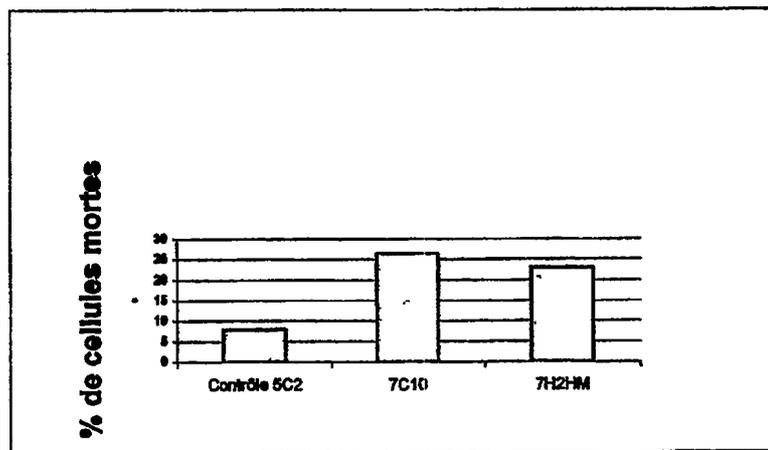


图36

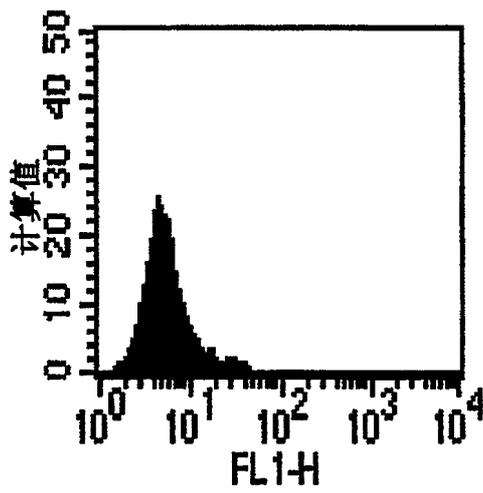


图37A

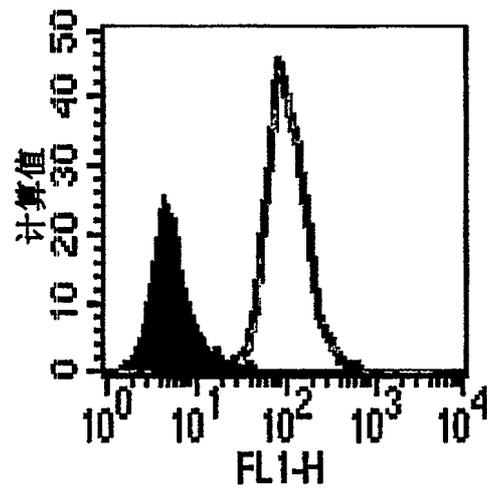


图37B

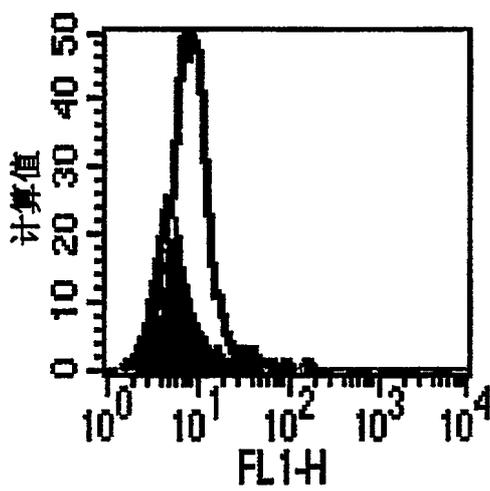


图37C

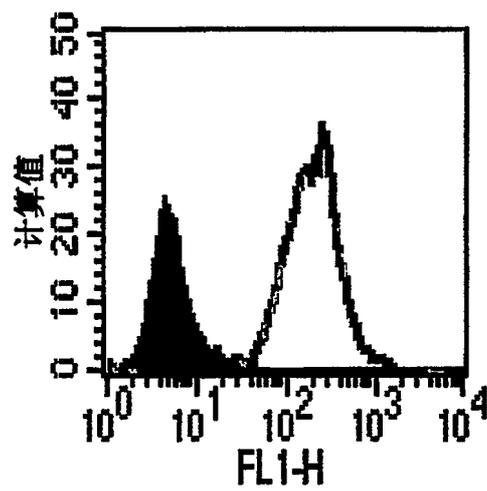


图37D

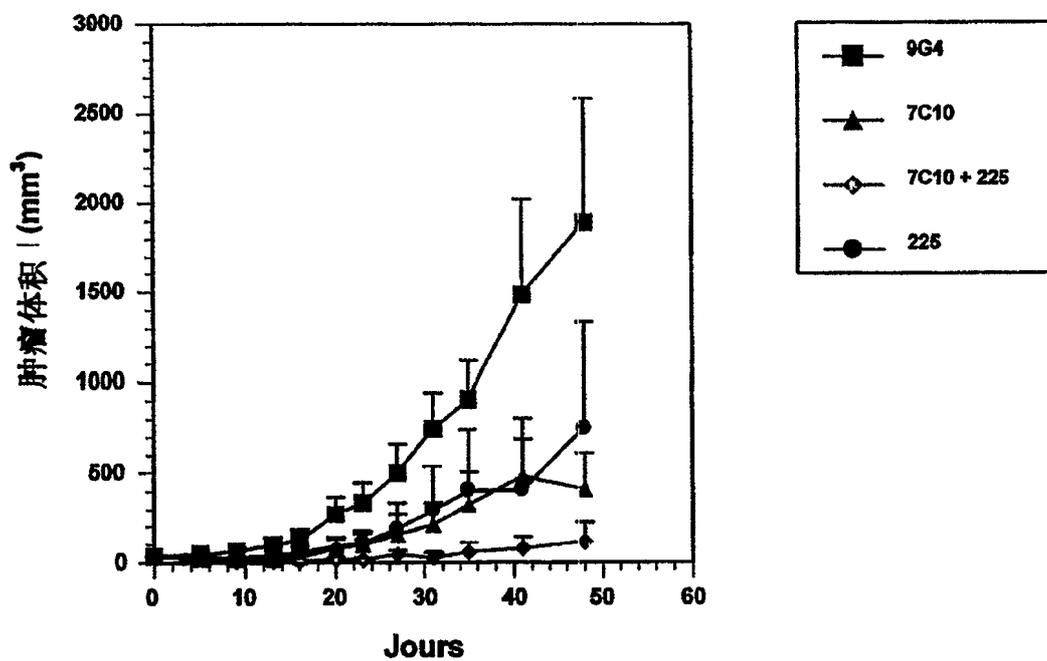


图38

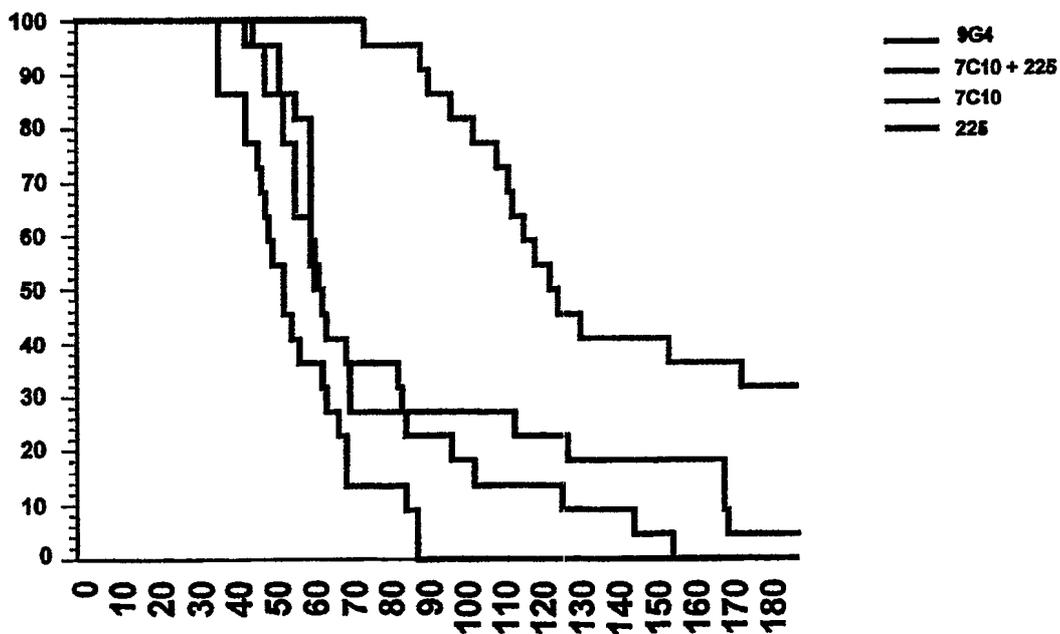


图39

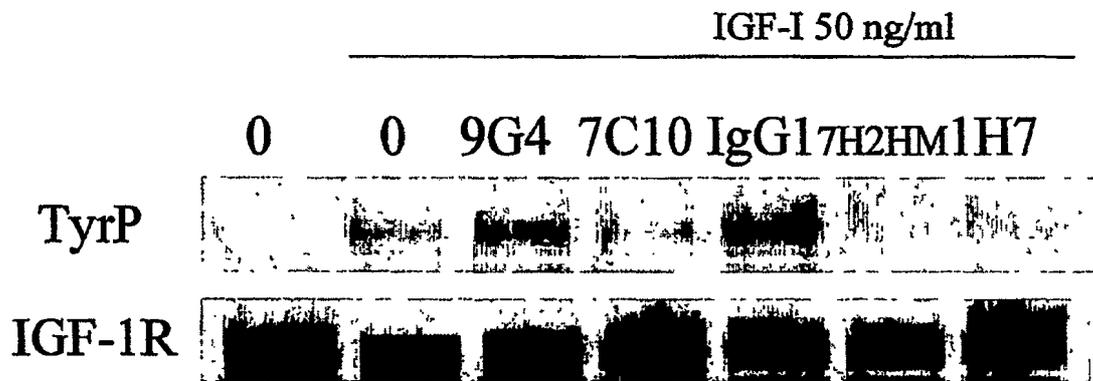


图40A

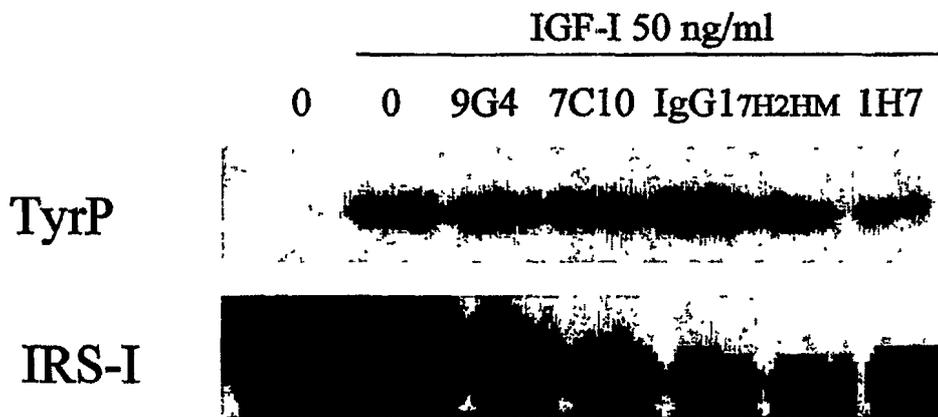


图40B

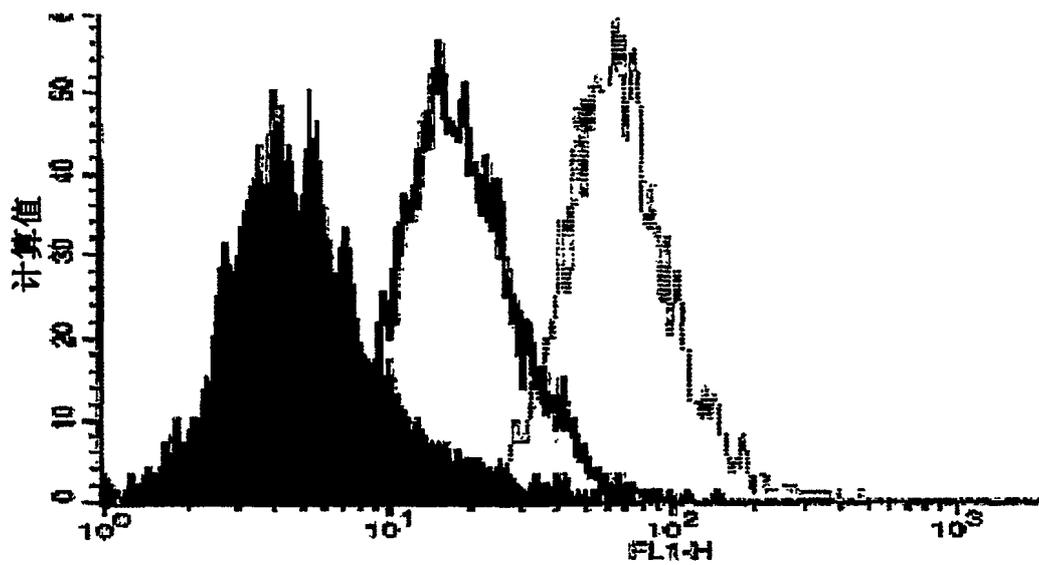


图41

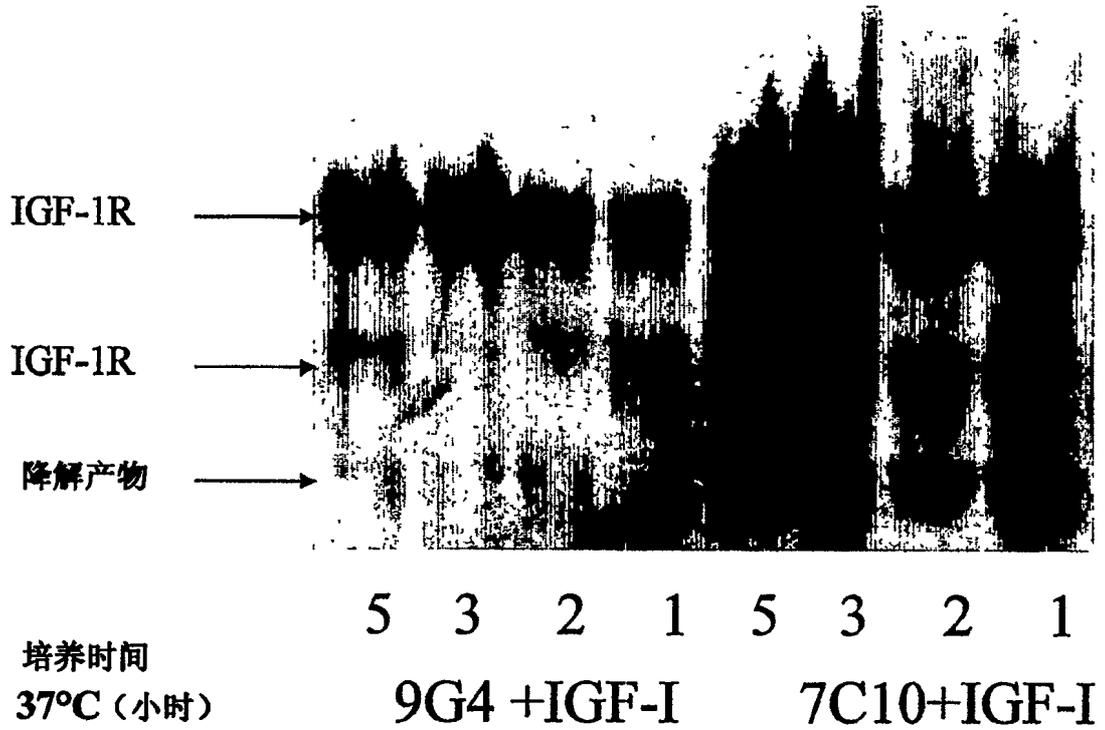


图42A

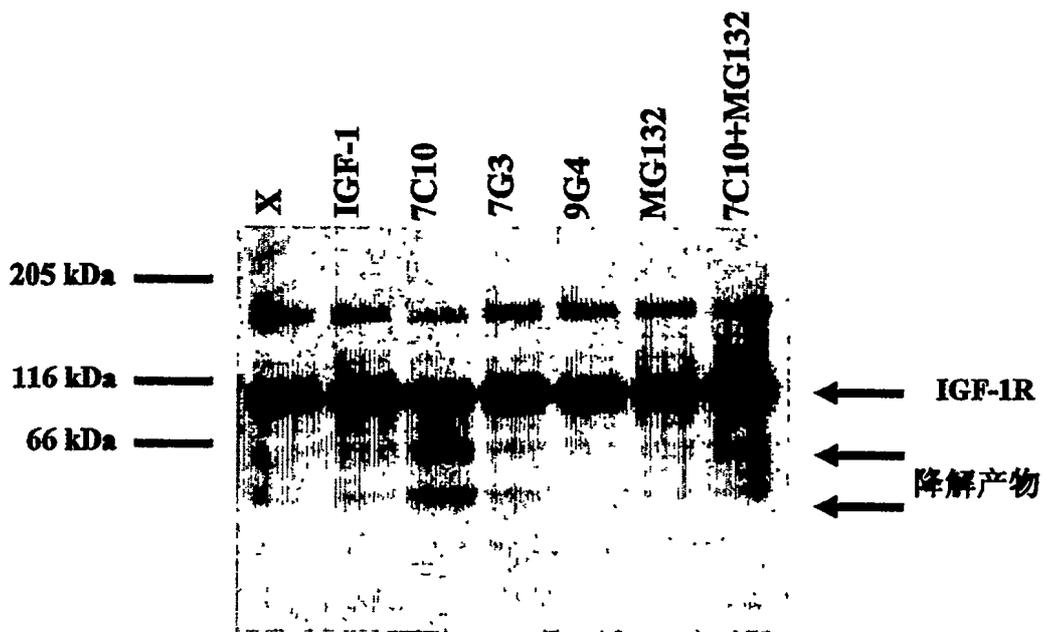


图42B

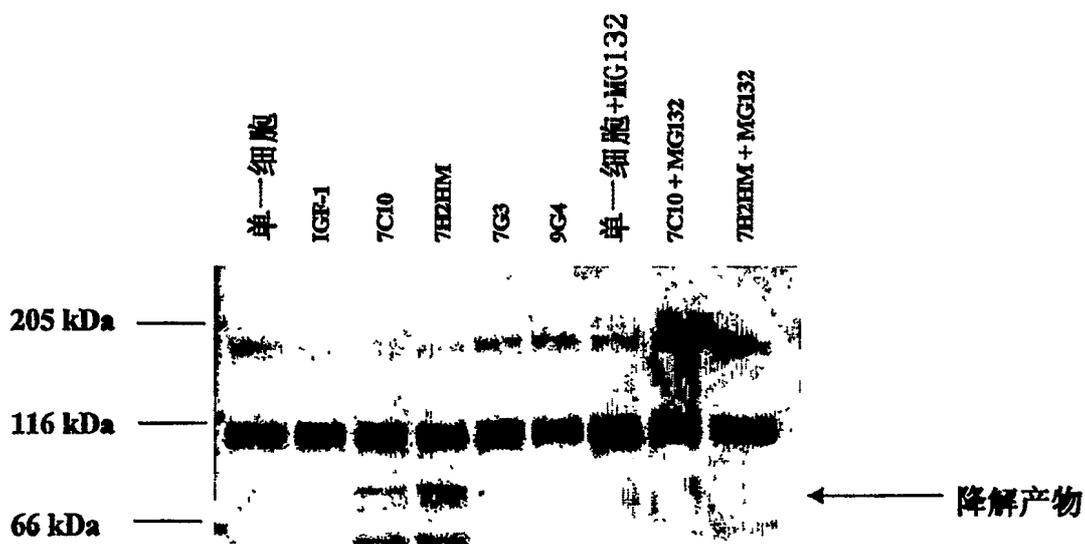


图42C

专利名称(译)	新的抗IGF - IR抗体及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN100410275C</a>	公开(公告)日	2008-08-13
申请号	CN03802448.9	申请日	2003-01-20
[标]申请(专利权)人(译)	皮尔法伯制药公司		
申请(专利权)人(译)	皮埃尔法布雷医药公司		
当前申请(专利权)人(译)	皮埃尔法布雷医药公司		
[标]发明人	L格奇 N科尔瓦亚 O莱热		
发明人	L·格奇 N·科尔瓦亚 O·莱热		
IPC分类号	C07K16/28 A61K39/395 G01N33/68 A61P35/00 A61P17/06 A01K67/027 C12N15/00 C12N15/20 C12N5/12 A61K31/4035 A61K31/415 A61K31/517 A61K31/519 A61K45/00 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/99 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/395 C07K16/2863 C07K2319/00 C07K2317/565 A61K2039/507 A61K2039/505 A61P17/00 A61P17/06 A61K2300/00		
代理人(译)	程伟		
审查员(译)	杨振宇		
优先权	2002000653 2002-01-18 FR 2002000654 2002-01-18 FR 2002005753 2002-05-07 FR		
其他公开文献	CN1620468A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及能够与人胰岛素样生长因子I受体IGF-IR特异结合，特别是鼠源、嵌合和人源化的单克隆抗体，以及编码这些抗体的氨基酸和核酸序列。本发明还涉及应用这些抗体作为过度表达IGF-IR的癌症或任何与所述受体过度表达有关的病理状况的预防和/或治疗癌症的药物，以及用于诊断与IGF-IR受体过度表达有关的试剂盒。发明进一步包括这种抗体与抗EGFR抗体和/或化合物和/或抗癌剂或毒素共轭剂联合的产物和/或组合物，及其预防和/或治疗某些癌症的应用。

	MFI (平均荧光强度)		
	未感染的细胞	IGF1R +细胞	IR +细胞
细胞	8	8	7
抗 IR	4.6	9	91
抗 IGF-IR (α IR3)	9	35	32
EC2	8	13	11
抗鼠 FITC	4.3	9	13
超培养培养基	9	10	11
15B9	7.5	25	77.8
9F5D	8	41	40
13G5	7.8	37	24
7C10	8.6	49	13