



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101395183 B

(45) 授权公告日 2013.08.07

(21) 申请号 200780007824.X

A61K 39/395 (2006.01)

(22) 申请日 2007.01.04

A61P 35/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 16/30 (2006.01)

60/756, 889 2006.01.05 US

C12N 15/13 (2006.01)

60/760, 892 2006.01.20 US

C12N 15/63 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2008.09.04

W0 2004024773 A1, 2004.03.25, 说明书全

文.

(86) PCT申请的申请数据

CN 1694902 A, 2005.11.09, 说明书全文.

PCT/US2007/060115 2007.01.04

审查员 唐华东

(87) PCT申请的公布数据

W02007/130697 EN 2007.11.15

(73) 专利权人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 吴雁 严民宏

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张红春 封新琴

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书2页 说明书65页

序列表30页 附图7页

(54) 发明名称

抗 EPHB4 抗体及其使用方法

(57) 摘要

本发明提供了抗 EphB4 抗体、包含这些抗体的组合物及使用这些抗体的方法。

氨基酸	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
55-57	G	P	T	T	S	G	V	V	I	R					

氨基酸	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
58-63	G	G	I	G	P	T	V	S	G	S	T	D	V	A	G

氨基酸	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
64-69	A	S	G	S	G	L	P	G	L	G	L	D	V	A	M

氨基酸	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
70-75	R	A	S	G	T	V	S	T	A	V	A				

氨基酸	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
76-81	S	A	S	G	T	V	S	T	A	V	A				

氨基酸	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
97-102	S	A	S	G	T	V	S	T	A	V	A				

氨基酸	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111
112-117	G	T	S	V	A	V	P	T							

1. 一种分离的抗 EphB4 抗体,所述抗体包含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3,其中 HVR-L1 为 SEQ ID NO:9, HVR-L2 为 SEQ ID NO:11, HVR-L3 为 SEQ ID NO:13, HVR-H1 为 SEQ ID NO:1, HVR-H2 为 SEQ ID NO:3 和 HVR-H3 为 SEQ ID NO:7。
2. 一种分离的抗 EphB4 抗体,所述抗体包含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3,其中 HVR-L1 为 SEQ ID NO:10, HVR-L2 为 SEQ ID NO:12, HVR-L3 为 SEQ ID NO:14, HVR-H1 为 SEQ ID NO:1, HVR-H2 为 SEQ ID NO:3 和 HVR-H3 为 SEQ ID NO:8。
3. 一种分离的抗 EphB4 抗体,所述抗体包含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3,其中 HVR-L1 为 SEQ ID NO:9, HVR-L2 为 SEQ ID NO:11, HVR-L3 为 SEQ ID NO:15, HVR-H1 为 SEQ ID NO:2, HVR-H2 为 SEQ ID NO:4 和 HVR-H3 为 SEQ ID NO:7。
4. 一种分离的抗 EphB4 抗体,所述抗体包含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3,其中 HVR-L1 为 SEQ ID NO:9, HVR-L2 为 SEQ ID NO:11, HVR-L3 为 SEQ ID NO:16, HVR-H1 为 SEQ ID NO:1, HVR-H2 为 SEQ ID NO:5 和 HVR-H3 为 SEQ ID NO:7。
5. 一种分离的抗 EphB4 抗体,所述抗体包含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3,其中 HVR-L1 为 SEQ ID NO:9, HVR-L2 为 SEQ ID NO:11, HVR-L3 为 SEQ ID NO:17, HVR-H1 为 SEQ ID NO:1, HVR-H2 为 SEQ ID NO:6 和 HVR-H3 为 SEQ ID NO:7。
6. 权利要求 1-5 任一项的抗体,其中至少部分框架序列是人共有框架序列。
7. 权利要求 1-6 任一项的抗体,其中所述抗体包含人 κ 亚组共有框架序列。
8. 权利要求 1-6 任一项的抗体,其中所述抗体包含重链人亚组 III 共有框架序列。
9. 权利要求 8 的抗体,其中所述抗体在重链人亚组 III 共有框架序列第 71、73 或 78 位中的一个或多个位置处包含替代。
10. 权利要求 9 的抗体,其中所述替代是 R71A、N73T、或 N78A 中的一个或多个。
11. 多核苷酸,其编码权利要求 1-10 任一项的抗体。
12. 载体,其包含权利要求 11 的多核苷酸。
13. 权利要求 12 的载体,其中所述载体是表达载体。
14. 宿主细胞,其包含权利要求 12 或 13 的载体。
15. 权利要求 14 的宿主细胞,其中所述宿主细胞是原核的。
16. 权利要求 14 的宿主细胞,其中所述宿主细胞是真核的。
17. 权利要求 16 的宿主细胞,其中所述宿主细胞是哺乳动物的。
18. 制备抗 EphB4 抗体的方法,所述方法包括:(a) 在合适的宿主细胞中表达权利要求 13 的载体,并 (b) 回收所述抗体。
19. 制备抗 EphB4 免疫偶联物的方法,所述方法包括:(a) 在合适的宿主细胞中表达权利要求 13 的载体,并 (b) 回收所述抗体。
20. 权利要求 18 或 19 的方法,其中所述宿主细胞是原核的。
21. 权利要求 18 或 19 的方法,其中所述宿主细胞是真核的。
22. 权利要求 1-10 任一项的抗 EphB4 抗体在制备用于检测 EphB4 的制品中的用途,所述检测包括在生物学样品中检测 EphB4-抗 EphB4 抗体复合物,其中所述复合物中的所述抗 EphB4 抗体是权利要求 1-10 任一项的抗 EphB4 抗体。
23. 权利要求 22 的用途,其中所述抗 EphB4 抗体是可检测标记的。
24. 组合物,其包含权利要求 1-10 任一项的抗 EphB4 抗体。

25. 组合物,其包含权利要求 11 的多核苷酸。
26. 权利要求 24 或 25 的组合物,其中所述组合物进一步包含载体。
27. 权利要求 1-10 任一项的抗 EphB4 抗体在制备抑制血管发生的药物中的用途。
28. 权利要求 27 的用途,其中所述药物是与抗血管发生剂联用的药物。
29. 权利要求 28 的用途,其中所述抗血管发生剂在施用所述抗 EphB4 抗体之前或之后施用。
30. 权利要求 28 的用途,其中所述抗血管发生剂与所述抗 EphB4 抗体同时施用。
31. 权利要求 28-30 任一项的用途,其中所述抗血管发生剂是血管内皮细胞生长因子(VEGF) 的拮抗剂。
32. 权利要求 31 的用途,其中所述 VEGF 拮抗剂是抗 VEGF 抗体。
33. 权利要求 32 的用途,其中所述抗 VEGF 抗体是贝伐单抗。
34. 权利要求 27-33 任一项的用途,其中所述药物还与化疗剂联用。

抗 EPHB4 抗体及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请依据 35USC § 119 要求 2006 年 1 月 5 日提交的美国临时申请 No. 60/756, 889 和 2006 年 1 月 20 日提交的美国临时申请 No. 60/760, 892 的优先权, 通过参考将其完整内容收入本文。

技术领域

[0003] 本发明主要涉及分子生物学领域。更具体的说, 本发明关注抗 EphB4 抗体及其用途。

背景技术

[0004] 维管联结 (vascular supply) 的发育是许多生理性和病理性过程的基本要求。活跃生长中的组织诸如胚胎和肿瘤要求充足的血液供应。它们通过生成促血管发生因子来满足这一需要, 所述促血管发生因子经由称为血管发生 (angiogenesis) 的过程促进新血管形成。血管的管形成是复杂但有序的生物学事件, 涉及所有或许多以下步骤: a) 已有的内皮细胞 (EC) 增殖出 EC 或自祖细胞分化出 EC; b) EC 迁移并接合以形成索样结构; c) 血管索然后发生管发生 (tubulogenesis) 以形成具有中央内腔的血管; d) 已有的索或血管伸出芽以形成次生血管; e) 初级血管丛发生进一步重塑 (remodeling) 和整形 (reshaping); 及 f) 内皮周细胞 (peri-endothelial cell) 被募集来包围内皮管, 为血管提供维持和调控功能, 此类细胞包括用于小毛细血管的周细胞 (pericyte)、用于大血管的平滑肌细胞、和心脏中的心肌细胞。Hanahan, Science 277 : 48-50 (1997); Hogan & Kolodziej, Nat. Rev. Genet. 3 : 513-23 (2002); Lubarsky & Krasnow, Cell 112 : 19-28 (2003)。

[0005] 现在完全确立了血管发生涉及多种病症的发病机理。这些包括实体瘤和转移、动脉粥样硬化、晶状体后纤维组织增生、血管瘤、慢性炎症、眼内新血管疾病诸如增殖性视网膜病例如糖尿病性视网膜病、年龄相关黄斑变性 (AMD)、新生血管性青光眼、移植角膜组织和其它组织的免疫排斥、类风湿性关节炎、和银屑病。Folkman 等, J. Biol. Chem. 267 : 10931-34 (1992); Klagsbrun 等, Annu. Rev. Physiol. 53 : 217-39 (1991); Garner A., "Vascular diseases", 于 Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A 和 Klintworth GK 编, 第 2 版, Marcel Dekker, NY, 1994, pp1625-1710。

[0006] 在肿瘤生长的情况中, 血管发生 (angiogenesis) 对于自增生至瘤形成的转换, 及为肿瘤的生长和转移提供营养似乎是至关重要的。Folkman 等, Nature 339 : 58 (1989)。新血管形成 (neovascularization) 让肿瘤细胞获得了与正常细胞相比的生长优势和增殖自治。肿瘤通常开始于单个异常细胞, 由于与可利用毛细血管床的距离, 该细胞只能增殖至几立方毫米的尺寸, 而且它能在较长的一段时间里保持“休眠”状态而不进一步生长和传播。有些肿瘤细胞然后转向血管发生表型以启动内皮细胞, 所述内皮细胞增殖并成熟成新的毛细血管。这些新形成的血管不仅让原发性肿瘤继续生长, 而且让转移性肿瘤细胞传播并再建群 (recolonization)。因而, 在肿瘤切片中的微血管密度与乳腺癌及数种其它肿瘤

的患者存活之间观察到了相关性。Weidner 等, N. Engl. J. Med. 324 :1-6(1991) ;Horak 等, Lancet340 :1120-24(1992) ;Macchiarini 等, Lancet340 :145-46(1992)。尚未完全了解控制血管发生转换的精确机制,但是认为肿瘤块的新血管形成源自众多血管发生刺激物与抑制物的净平衡。Folkman, Nat. Med. 1(1) :27-31(1995)。

[0007] 血管发育过程受到严密调节。迄今为止,多种分子,多为由周围细胞生成的分泌性因子,已显示出调节 EC 分化、增殖、迁移和接合成索样结构。例如,血管内皮生长因子(VEGF) 已鉴定为涉及刺激血管发生和诱导血管通透性的关键因子。Ferrara 等, Endocr. Rev. 18 :4-25(1997)。甚至单个 VEGF 等位基因的遗失导致胚胎致死的发现指向此因子在血管系统的发育和分化中所发挥的不可替代的作用。此外,VEGF 已显示为与肿瘤和眼内病症有关的新血管形成的关键介导体。Ferrara 等, Endocr. Rev. 见上文。VEGF mRNA 在多数所检查的人肿瘤中过表达。Berkman 等, J. Clin. Invest. 91 :153-59(1993) ;Brown 等, Human Pathol. 26 :86-91(1995) ;Brown 等, Cancer Res. 53 :4727-35(1993) ;Mattern 等, Brit. J. Cancer73 :931-34(1996) ;Dvorak 等, Am. J. Pathol. 146 :1029-39(1995)。

[0008] 同样,眼部液体中 VEGF 的浓度水平与糖尿病性和其它缺血相关性视网膜病患者中的活跃的血管增殖的存在高度相关。Aiello 等, N. Engl. J. Med. 331 :1480-87(1994)。此外,研究证明了 VEGF 在 AMD 患者脉络膜新血管膜中的定位。Lopez 等, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37 :855-68(1996)。

[0009] 抗 VEGF 中和性抗体在裸鼠中遏制多种人肿瘤细胞系的生长 (Kim 等, Nature362 :841-44(1993) ;Warren 等, J. Clin. Invest. 95 :1789-97(1995) ; **Borgström** 等, Cancer Res. 56 :4032-39(1996) ;Melnyk 等, Cancer Res. 56 :921-24(1996)),而且在缺血性视网膜病症模型中还抑制眼内血管发生 (Adamis 等, Arch. Ophthalmol. 114 :66-71(1996))。因此,抗 VEGF 单克隆抗体或其它 VEGF 作用抑制剂是有希望用于治疗肿瘤和多种眼内新血管病症的候选物。此类抗体记载于例如 1998 年 1 月 14 日公开的 EP817,648 和 1998 年 10 月 15 日公开的 W098/45331 和 W098/45332。一种抗 VEGF 抗体,贝伐单抗 (bevacizumab),已获 FDA 批准与化疗方案联合用于治疗转移性结肠直肠癌 (CRC)。而且,贝伐单抗正在许多进行中的治疗各种癌症适应证的临床试验中接受研究。

[0010] EphB4 受体 (“EphB4”或“EphB4R”) 是 eph 受体家族的一个成员,该家族构成人类基因组中最大的酪氨酸激酶受体家族 (综述见 Dodelet, Oncogene, 19 :5614-5619, 2000)。人 eph 受体酪氨酸激酶根据序列同一性分成 A 类和 B 类,其具有称为 ephrin(s) 的相应 A 型和 B 型配体。信号传导可以以正向方式发生,其中受体酪氨酸激酶受到配体的活化,或者以反向方式发生,其中跨膜 ephrinB 配体受到与受体相互作用的活化。eph 受体配体相互作用已经与广泛的生物学功能联系起来,包括轴突导向、组织边界形成、维管发生 (vasculogenesis)、和细胞运动 (Kullander 等, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. , 3 :475-486, 2002 ;Cheng 等, Cytokine Growth Factor Rev. , 13 :75-85, 2002 ;Coulthard 等, Int. J. Dev. Biol. , 46 :375-384, 2002)。EphB4 结合诸如 ephrin-B1、ephrin-B2、和 ephrin-B3 的配体。EphB4 受体具有胞外区,该胞外区有富含半胱氨酸的基序,延伸跨越其氨基端部分,接着是两个纤连蛋白 II 型基序。还有特征为保守激酶区的胞内域和跨膜域。

[0011] 显然仍然需要具有最适于开发成治疗剂的临床属性的药剂。本文记载的发明满足了该需要并提供了其它好处。

[0012] 通过参考完整收入本文中引用的所有参考文献,包括专利申请和出版物。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明部分基于多种 EphB4 结合剂(诸如免疫偶联物、抗体、及其片段)的鉴定。EphB4 呈现为重要且有利的治疗靶,而且本发明提供了以结合 EphB4 为基础的组合物和方法。如本文所述,本发明的 EphB4 结合剂为靶向与 EphB4-EphB4 配体途径的表达和/或活性有关的病理状况提供了重要的治疗剂和诊断剂供使用。因而,本发明提供了与 EphB4 结合有关的方法、组合物、试剂盒和制品。

[0015] 本发明提供了与 EphB4 结合(诸如特异性结合)的抗体。

[0016] 一方面,本发明提供了分离的抗 EphB4 抗体,其中全长 IgG 形式的所述抗体以约 50pM 或更好的结合亲和力(binding affinity)特异性结合人 EphB4。正如本领域完全确立的,配体对其受体的结合亲和力可使用多种测定法中的任一种来测定,并以各种定量数值形式表示。因而,在一个实施方案中,结合亲和力以 Kd 值表示,反映内在结合亲和力(例如具有最小化的亲合力效应(avidity effect))。普遍且优选的是,结合亲和力在体外测量,例如无论是无细胞的环境或细胞相关环境下进行。本领域已知的许多测定法中的任一种,包括那些本文所描述的,都可用于获取结合亲和力的测量值,包括例如 Biacore、放射免疫测定法(RIA)和 ELISA。

[0017] 一方面,本发明提供了与 EphB4 的配体结合区结合的分离的抗体。在有些实施方案中,所述分离的抗体与包含 EphB4 胞外结构域、或由其组成、或基本上由其组成的多肽结合。

[0018] 一方面,本发明提供了与 EphB4 配体竞争 EphB4 结合的分离的抗 EphB4 抗体。

[0019] 一方面,本发明提供了抑制、降低、和/或阻断 EphB4 活性的分离的抗 EphB4 抗体。在有些实施方案中,EphB4 的自磷酸化受到抑制、降低、和/或阻断。

[0020] 一方面,本发明的抗 EphB4 抗体包含:

[0021] (a) 至少一个、两个、三个、四个或五个选自下组的高变区(HVR)序列:

[0022] (i)HVR-L1,其包含序列 A1-A11,其中 A1-A11 为 RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:9),

[0023] (ii)HVR-L2,其包含序列 B1-B7,其中 B1-B7 为 SASFLYS(SEQ ID NO:11),

[0024] (iii)HVR-L3,其包含序列 C1-C9,其中 C1-C9 为 QESTTTPPT(SEQ ID NO:15),

[0025] (iv)HVR-H1,其包含序列 D1-D10,其中 D1-D10 为 GFSISNYLH(SEQ ID NO:2),

[0026] (v)HVR-H2,其包含序列 E1-E18,其中 E1-E18 为 GGIYLYGSSEYADSVKG(SEQ ID NO:4),和

[0027] (vi)HVR-H3,其包含序列 F1-F17,其中 F1-F17 为 ARGSGRLRLGGLDYAMDY(SEQ ID NO:7);及

[0028] (b) 至少一个变异的 HVR,其中所述变异的 HVR 序列包含 SEQ ID NO:1-17 所示序列的至少一个残基的修饰。

[0029] 一方面,本发明提供了包含一个、两个、三个、四个、五个或六个 HVR 的抗体,其中每个 HVR 包含选自 SEQ ID NO:1-17 的序列、或由其组成、或基本上由其组成,且其中 SEQ ID NO:9 或 10 对应于 HVR-L1,SEQ ID NO:11 或 12 对应于 HVR-L2,SEQ ID NO:13、14、15、16、或 17 对应于 HVR-L3,SEQ ID NO:1 或 2 对应于 HVR-H1,SEQ ID NO:3、4、5、或 6 对应于 HVR-H2,和 SEQ ID NO:7 或 8 对应于 HVR-H3。

[0030] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3,其中每个依次包含 SEQ ID NO :9、11、13、1、3、7。

[0031] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3,其中每个依次包含 SEQ ID NO :10、12、14、1、3、8。

[0032] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3,其中每个依次包含 SEQ ID NO :9、11、15、2、4、7。

[0033] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3,其中每个依次包含 SEQ ID NO :9、11、16、1、5、7。

[0034] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3,其中每个依次包含 SEQ ID NO :9、11、17、1、6、7。

[0035] 本发明抗体中的变异的 HVR 可以具有 HVR 内一个或多个(诸如两个、三个、四个、五个、或更多个)残基的修饰。

[0036] 在一个实施方案中,HVR-L1 变体在任意组合的下列位置中包含 1-5(1、2、3、4 或 5)处替代:A6(V 或 S)、A7(S 或 E)、A8(T 或 I)、A9(A 或 F)、和 A10(V 或 L)。

[0037] 在一个实施方案中,HVR-L2 变体在任意组合的下列位置中包含 1-2(1、或 2)处替代:B4(F 或 N)和 B6(Y 或 E)。

[0038] 在一个实施方案中,HVR-L3 变体在任意组合的下列位置中包含 1-7(1、2、3、4、5、6 或 7)处替代:C2(Q、E、或 K)、C3(S 或 T)、C4(Y、N、T、E、或 A)、C5(T、A、或 Q)、C6(T、V、或 I)、C8(P、L、或 E)、和 C9(T 或 S)。

[0039] 在一个实施方案中,HVR-H1 变体在任意组合的下列位置中包含 1-3(1、2、或 3)处替代:D3(T 或 S)、D6(G 或 N)、和 D9(I 或 L)。

[0040] 在一个实施方案中,HVR-H2 变体在任意组合的下列位置中包含 1-5(1、2、3、4 或 5)处替代:E5(P、或 L)、E7(S 或 G)、E8(G 或 S)、E10(T、S、或 R)、和 E11(D、E、或 G)。

[0041] 在一个实施方案中,HVR-H3 变体在下列位置中包含 1 处替代:F3(G 或 S)。

[0042] 每个位置后面括号中的字母指示例示替代(即置换)氨基酸;对本领域技术人员显而易见的是,可使用本领域已知的和/或本文描述的技术常规评估其它氨基酸在本文所述背景中作为替代氨基酸的适宜性。

[0043] 一方面,本发明提供了包含 HVR-H1 区的抗体,所述 HVR-H1 区包含 SEQ ID NO :1 或 2 的序列。一方面,本发明提供了包含 HVR-H2 区的抗体,所述 HVR-H2 区包含 SEQ ID NO :3、4、5、或 6 的序列。一方面,本发明提供了包含 HVR-H3 区的抗体,所述 HVR-H3 区包含 SEQ ID NO :7 或 8 的序列。在一个实施方案中,本发明提供了包含 HVR-L1 区的抗体,所述 HVR-L1 区包含 SEQ ID NO :9 或 10 的序列。在一个实施方案中,本发明提供了包含 HVR-L2 区的抗体,所述 HVR-L2 区包含 SEQ ID NO :11 或 12 的序列。在一个实施方案中,本发明提供了包含 HVR-L3 区的抗体,所述 HVR-L3 区包含 SEQ ID NO :13、14、15、16、或 17 的序列。

[0044] 一方面,本发明提供了包含至少一个、至少两个、或所有三个以下序列的抗体:

[0045] (i)HVR-H1 序列,其包含 SEQ ID NO :2 的序列;

[0046] (ii)HVR-H2 序列,其包含 SEQ ID NO :4 的序列;

[0047] (iii)HVR-H3 序列,其包含 SEQ ID NO :7 的序列。

[0048] 一方面,本发明提供了包含至少一个、至少两个、或所有三个以下序列的抗体:

[0049] (i)HVR-L1 序列,其包含 SEQ ID NO:9 的序列;

[0050] (ii)HVR-L2 序列,其包含 SEQ ID NO:11 的序列;

[0051] (iii)HVR-L3 序列,其包含 SEQ ID NO:15 的序列。

[0052] 如图 1 所示,SEQ ID NO:1-17 的氨基酸序列针对各个 HVR(即 H1、H2 或 H3)而言进行了编号,编号方式与如下所述的 Kabat 编号系统是一致的。

[0053] 一方面,本发明提供了包含图 1 所示重链 HVR 序列的抗体。

[0054] 一方面,本发明提供了包含图 1 所示轻链 HVR 序列的抗体。

[0055] 本发明抗体的有些实施方案包含下文 SEQ ID NO:18 所示人源化 4D5 抗体(huMAb4D5-8)(**HERCEPTIN**[®], Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA)(还可参见美国专利 No. 6, 407, 213 和 Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93)的轻链可变域。

[0056] 1Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg ValThr Ile Thr Cys ArgAla Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln GlnLys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu TyrSer GlyVal Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile SerSer Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr ProPro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys107(SEQ ID NO:18)(HVR 残基标有下划线)

[0057] 在一个实施方案中,所述 huMAb4D5-8 轻链可变域序列在第 30、66 或 91 位(在上文中分别以粗体/斜体标示的 Asn、Arg 和 His)中的一个或多个处有修饰。在一个实施方案中,所述经过修饰的 huMAb4D5-8 序列在第 30 位包含 Ser,在第 66 位包含 Gly,和/或在第 91 位包含 Ser。因而,在一个实施方案中,本发明的抗体包含轻链可变域,其包含下文 SEQ ID NO:52 所示序列:

[0058] 1Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg ValThr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp ValSer Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln GlnLys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser GlyVal Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile SerSer Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr ProPro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys107(SEQ ID NO:52)(HVR 残基标有下划线)

[0059] 相对于 huMAb4D5-8 的替代残基在上文中以粗体/斜体标示。

[0060] 本发明的抗体可包含任何合适的框架可变域序列,倘若 EphB4 的结合活性基本上得到保留。例如,在有些实施方案中,本发明的抗体包含人亚组 III 重链框架共有序列。在这些抗体的一个实施方案中,所述框架共有序列在第 71、73 和/或 78 位包含替代。在这些抗体的有些实施方案中,第 71 位为 A,第 73 位为 T,和/或第 78 位为 A。在一个实施方案中,这些抗体包含 huMAb4D5-8(**HERCEPTIN**[®], Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA)(还可参见美国专利 No. 6, 407, 213&5, 821, 337 和 Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93)的重链可变域框架序列。在一个实施方案中,这些抗体进一步包含人 κ I 轻链框架共有序列。在一个实施方案中,这些抗体包含 huMAb4D5-8 的轻链 HVR 序列(美国专利 No. 6, 407, 213&5, 821, 337)。在一个实施方案中,这些抗体包含

huMAb4D5-8(**HERCEPTIN**[®], Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (还可参见美国专利 No. 6, 407, 213 & 5, 821, 337 和 Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340 (5) : 1073-93) 的轻链可变域序列。

[0061] 在一个实施方案中, 本发明的抗体包含重链可变域, 其中所述框架序列包含 SEQ ID NO :19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、和 / 或 37 的序列, 而且 HVR H1、H2 和 H3 序列分别为 SEQ ID NO :9、11、和 / 或 15。在一个实施方案中, 本发明的抗体包含轻链可变域, 其中所述框架序列包含 SEQ ID NO :38、39、40 和 / 或 41 的序列, 而且 HVR L1、L2 和 L3 序列分别为 SEQ ID NO :2、4、和 / 或 7。

[0062] 在一个实施方案中, 本发明的抗体包含重链可变域, 其中所述框架序列包含 SEQ ID NO :46、47、48、和 / 或 49 的序列, 而且 HVR H1、H2 和 H3 序列分别为 SEQ ID NOS :2、4、和 / 或 7。在一个实施方案中, 本发明的抗体包含轻链可变域, 其中所述框架序列包含 SEQ ID NO :42、43、44、和 / 或 45 的序列, 而且 HVR L1、L2 和 L3 序列分别为 SEQ ID NOS :9、11、和 / 或 15。

[0063] 在一个实施方案中, 本发明的抗体包含重链可变域, 其中所述框架序列包含 SEQ ID NOS :46、47、51、和 49 的序列, 而且 HVR H1、H2 和 H3 序列分别为 SEQ ID NOS :2、4、和 / 或 7。在一个实施方案中, 本发明的抗体包含轻链可变域, 其中所述框架序列包含 SEQ ID NOS :42、43、50、和 45 的序列, 而且 HVR L1、L2 和 L3 序列分别为 SEQ ID NOS :9、11、和 / 或 15。

[0064] 在一个实施方案中, 本发明的抗体是亲和力成熟的, 用以获得期望的靶物结合亲和力。在一个实施例中, 本发明的亲和力成熟的抗体在第 H28、H31、H34、H52a、H54、H55、H57、H58、H95、L29、L30、L31、L32、L33、L53、L55、L90、L91、L92、L93、L94、L96 或 L97 位氨基酸中的一个或多个处包含替代。在一个实施例中, 本发明的亲和力成熟的抗体包含一个或多个以下替代: (a) 重链中, T28S, G31N, I34L, P52aL, S54G, G55S, T57S 或 R, D58E 或 G, G95S, 或者, (b) 轻链中, V29S, S30E, T31I, A32F, V33L, F53N, Y55E, Q90E 或 K, S91T, Y92N、T、E 或 A, T93V 或 I, T94V 或 I, P96L 或 E, T97S。

[0065] 在一个实施方案中, 本发明的抗体包含重链可变域, 该重链可变域包含 SEQ ID NO :53 的序列。在一个实施方案中, 本发明的抗体包含轻链可变域, 该轻链可变域包含 SEQ ID NO :54 的序列。在一个实施方案中, 本发明的抗体包含重链可变域及轻链可变域, 重链可变域包含 SEQ ID NO :53 的序列, 轻链可变域包含 SEQ ID NO :54 的序列。

[0066] 在一个实施方案中, 本发明的抗体包含重链可变域, 该重链可变域包含 SEQ ID NO :55 的序列。在一个实施方案中, 本发明的抗体包含轻链可变域, 该轻链可变域包含 SEQ ID NO :56 的序列。在一个实施方案中, 本发明的抗体包含重链可变域及轻链可变域, 重链可变域包含 SEQ ID NO :55 的序列, 轻链可变域包含 SEQ ID NO :56 的序列。

[0067] 在一个实施方案中, 本发明的抗体包含重链可变域, 该重链可变域包含 SEQ ID NO :57 的序列。在一个实施方案中, 本发明的抗体包含轻链可变域, 该轻链可变域包含 SEQ ID NO :58 的序列。在一个实施方案中, 本发明的抗体包含重链可变域及轻链可变域, 重链可变域包含 SEQ ID NO :57 的序列, 轻链可变域包含 SEQ ID NO :58 的序列。

[0068] 在一个实施方案中, 本发明的抗体包含重链可变域, 该重链可变域包含 SEQ ID NO :59 的序列。在一个实施方案中, 本发明的抗体包含轻链可变域, 该轻链可变域包含 SEQ ID NO :60 的序列。在一个实施方案中, 本发明的抗体包含重链可变域及轻链可变域, 重链

可变域包含 SEQ ID NO :59 的序列,轻链可变域包含 SEQ ID NO :60 的序列。

[0069] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含重链可变域,其包含 SEQ ID NO :61 的序列。在一个实施方案中,本发明的抗体包含轻链可变域,其包含 SEQ ID NO :62 的序列。在一个实施方案中,本发明的抗体包含重链可变域及轻链可变域,重链可变域包含 SEQ ID NO :61 的序列,轻链可变域包含 SEQ ID NO :62 的序列。

[0070] 一方面,本发明提供了与任何上述抗体竞争结合 EphB4 的抗体。一方面,本发明提供了与上述抗体结合 EphB4 上相同表位的抗体。

[0071] 正如本领域已知的及下文更为详细描述,根据上下文和本领域已知的各种定义(正如下文所描述的),界定抗体高变区的氨基酸位置/边界可有所变化。可变域内的有些位置可视为杂合高变位置,因为这些位置根据一套标准可认为是在高变区内,但根据一套不同的标准则认为是在高变区外。在延伸的高变区(如下文进一步定义的)内也可找到一个或多个这些位置。

[0072] 在有些实施方案中,所述抗体是单克隆抗体。在有些实施方案中,所述抗体是多克隆抗体。在有些实施方案中,所述抗体选自嵌合抗体、亲和力成熟的抗体、人源化抗体、和人抗体。在有些实施方案中,所述抗体是抗体片段。在有些实施方案中,所述抗体是 Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、或 scFv。

[0073] 在一个实施方案中,所述抗体是嵌合抗体,例如将来自非人供体的抗原结合序列移植至异源的非人序列、人序列、或人源化序列(例如框架和/或恒定域序列)的抗体。在一个实施方案中,所述非人供体是小鼠。在一个实施方案中,抗原结合序列是合成的,例如通过诱变(例如噬菌体展示筛选等)得到的。在一个实施方案中,本发明的嵌合抗体具有鼠的 V 区和人的 C 区。在一个实施方案中,所述鼠的轻链 V 区与人的 κ 轻链融合。在一个实施方案中,所述鼠的重链 V 区与人的 IgG1C 区融合。

[0074] 本发明的人源化抗体包括那些在 FR 中具有氨基酸替代的抗体和在移植的 CDR 中具有改变的亲和力成熟的变体。CDR 或 FR 中的替代氨基酸不限于那些存在于供体或受体抗体中的氨基酸。在其它实施方案中,本发明的抗体进一步在 Fc 区中的氨基酸残基处包含导致效应器功能得到改善(包括 CDC 和/或 ADCC 和 B 细胞杀伤功能增强)的改变。本发明的其它抗体包括那些具有改善稳定性的特定改变的抗体。在其它实施方案中,本发明的抗体在 Fc 区中的氨基酸残基处包含导致效应器功能得到降低(例如 CDC 和/或 ADCC 功能降低和/或 B 细胞杀伤降低)的改变。在有些实施方案中,本发明抗体的特征为与天然杀伤(NK)细胞上的人补体因子 C1q 和/或人 Fc 受体的结合降低(诸如结合缺失)。在有些实施方案中,本发明抗体的特征为与人 Fc γ RI、Fc γ RIIA、和/或 Fc γ RIIIA 的结合降低(诸如结合缺失)。在有些实施方案中,本发明的抗体是 IgG 类的(例如 IgG1 或 IgG4),而且在 E233、L234、G236、D265、D270、N297、E318、K320、K322、A327、A330、P331 和/或 P329 中包含至少一个突变(编号方式依照 EU 索引)。在有些实施方案中,所述抗体包含突变 L234A/L235A 或 D265A/N297A。

[0075] 一方面,本发明提供了抗 EphB4 多肽,其包含本文中所提供的任何抗原结合序列,其中所述抗 EphB4 多肽与 EphB4 特异性结合。

[0076] 本发明的抗体与 EphB4 结合(诸如特异性结合),而且,在有些实施方案中,可控 EphB4 相关效应的一个或多个方面,包括但不限于 EphB4 活化、EphB4 下游分子信号传导、

EphB4 配体活化、EphB4 配体下游分子信号传导、对配体（例如 ephrin-B1、ephrin-B2、和 / 或 ephrin-B3）与 EphB4 结合的破坏、EphB4 磷酸化和 / 或 EphB4 多聚化、和 / 或 EphB4 配体磷酸化、和 / 或对任何生物学相关 EphB4 和 / 或 EphB4 配体生物学途径的破坏、对血管发生的抑制、和 / 或对肿瘤、细胞增殖性病症或癌症的治疗和 / 或预防、和 / 或对与 EphB4 表达和 / 或活性（诸如 EphB4 表达和 / 或活性升高）相关的病症的治疗或预防。在有些实施方案中，本发明的抗体与 EphB4 特异性结合。在有些实施方案中，所述抗体与 EphB4 胞外结构域 (ECD) 特异性结合。在有些实施方案中，所述抗体与由 EphB4 胞外结构域组成或基本上由其组成的多肽特异性结合。在有些实施方案中，所述抗体以约 50pM 或更强的 KD 与 EphB4 特异性结合。在有些实施方案中，本发明的抗体在体内和 / 或在体外降低、抑制、和 / 或阻断 EphB4 活性。在有些实施方案中，所述抗体降低、抑制、和 / 或阻断 EphB4 自磷酸化。在有些实施方案中，所述抗体竞争与 EphB4 配体的结合（降低和 / 或阻断 EphB4 配体与 EphB4 结合）。

[0077] 一方面，本发明提供了本发明抗体在制备用于诸如癌症、肿瘤、和 / 或细胞增殖性病症的病症的治疗性和 / 或预防性处理的药物中的用途。在有些实施方案中，所述病症是神经病或神经变性疾病。

[0078] 一方面，本发明提供了本发明抗体在制备用于抑制血管发生的药物中的用途。

[0079] 一方面，本发明提供了包含一种或多种本发明抗体和载体的组合物。在一个实施方案中，所述载体是制药学可接受的。

[0080] 一方面，本发明提供了编码本发明抗 EphB4 抗体的核酸。

[0081] 一方面，本发明提供了包含本发明核酸的载体。

[0082] 一方面，本发明提供了包含一种或多种本发明核酸和载体的组合物。在一个实施方案中，所述载体是制药学可接受的。

[0083] 一方面，本发明提供了包含本发明核酸或载体的宿主细胞。载体可以是任何类型的，例如重组载体，诸如表达载体。可以使用多种宿主细胞中的任一种。在一个实施方案中，宿主细胞是原核细胞，例如大肠杆菌。在一个实施方案中，宿主细胞是真核细胞，例如哺乳动物细胞，诸如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

[0084] 一方面，本发明提供了制备本发明抗体的方法。例如，本发明提供了制备抗 EphB4 抗体（如本文中所定义的，包括全长及其片段）或免疫偶联物的方法，所述方法包括在合适的宿主细胞中表达编码所述抗体（或其片段）的本发明重组载体，并回收所述抗体。

[0085] 一方面，本发明提供了包含容器和装在该容器内的组合物的制品，其中所述组合物包含一种或多种本发明的抗 EphB4 抗体。在一个实施方案中，所述组合物包含本发明的核酸。在一个实施方案中，包含抗体的组合物进一步包含载体，其在有些实施方案中是制药学可接受的。在一个实施方案中，本发明的制品进一步包含关于对受试者施用组合物（例如抗体）的说明书（诸如关于本文所述任何方法的说明书）。

[0086] 一方面，本发明提供了包含第一容器和第二容器的试剂盒，所述第一容器中装有包含一种或多种本发明抗 EphB4 抗体的组合物，所述第二容器中装有缓冲剂。在一个实施方案中，所述缓冲剂是制药学可接受的。在一个实施方案中，包含抗体的组合物进一步包含载体，其在有些实施方案中是制药学可接受的。在一个实施方案中，试剂盒进一步包含关于对受试者施用所述组合物（例如所述抗体）的说明书。

[0087] 一方面,本发明提供了本发明抗 EphB4 抗体在制备用于诸如癌症、肿瘤、和 / 或细胞增殖性病症的病症的治疗性和 / 或预防性处理的药物中的用途。在有些实施方案中,所述病症是神经病或神经变性疾病。在有些实施方案中,所述病症是与血管发生有关的病理状况。

[0088] 一方面,本发明提供了本发明核酸在制备用于诸如癌症、肿瘤、和 / 或细胞增殖性病症的病症的治疗性和 / 或预防性处理的药物中的用途。在有些实施方案中,所述病症是神经病或神经变性疾病。在有些实施方案中,所述病症是与血管发生有关的病理状况。

[0089] 一方面,本发明提供了本发明载体在制备用于诸如癌症、肿瘤、和 / 或细胞增殖性病症的病症的治疗性和 / 或预防性处理的药物中的用途。在有些实施方案中,所述病症是神经病或神经变性疾病 (神经退化性疾病) (neurodegenerative disease)。在有些实施方案中,所述病症是与血管发生有关病理状况。

[0090] 一方面,本发明提供了本发明宿主细胞在制备用于诸如癌症、肿瘤、和 / 或细胞增殖性病症的病症的治疗性和 / 或预防性处理的药物中的用途。在有些实施方案中,所述病症是神经病或神经变性疾病。在有些实施方案中,所述病症是与血管发生有关的病理状况。

[0091] 一方面,本发明提供了本发明制品在制备用于诸如癌症、肿瘤、和 / 或细胞增殖性病症的病症的治疗性和 / 或预防性处理的药物中的用途。在有些实施方案中,所述病症是神经病或神经变性疾病。在有些实施方案中,所述病症是与血管发生有关的病理状况。

[0092] 一方面,本发明提供了本发明试剂盒在制备用于诸如癌症、肿瘤、和 / 或细胞增殖性病症的病症的治疗性和 / 或预防性处理的药物中的用途。在有些实施方案中,所述病症是神经病或神经变性疾病。在有些实施方案中,所述病症是与血管发生有关的病理状况。

[0093] 本发明提供了可用于调控与 EphB4 表达和 / 或活性 (诸如表达和 / 或活性升高或降低、或不想要的表达和 / 或活性) 有关的疾病状态的方法或组合物。

[0094] 一方面,本发明提供了用于治疗或预防 EphB4 表达和 / 或活性升高有关的肿瘤、癌症、和 / 或细胞增殖性病症的方法,所述方法包括对需要此类治疗的受试者施用有效量的抗 EphB4 抗体。

[0095] 一方面,本发明提供了用于杀伤细胞 (诸如癌症或肿瘤细胞) 的方法,所述方法包括对需要此类治疗的受试者施用有效量的抗 EphB4 抗体。

[0096] 一方面,本发明提供了用于降低、抑制、阻断、或阻止肿瘤或癌症生长的方法,所述方法包括对需要此类治疗的受试者施用有效量的抗 EphB4 抗体。

[0097] 一方面,本发明提供了用于治疗或预防神经病或神经变性疾病、或修复受损神经细胞的方法,所述方法包括对需要此类治疗的受试者施用有效量的抗 EphB4 抗体。

[0098] 一方面,本发明提供了用于促进神经元发育、增殖、维持或再生的方法,所述方法包括对需要此类治疗的受试者施用有效量的抗 EphB4 抗体。

[0099] 一方面,本发明提供了用于抑制血管发生 (angiogenesis) 的方法,所述方法包括对需要此类治疗的受试者施用有效量的抗 EphB4 抗体。

[0100] 一方面,本发明提供了用于治疗与血管发生有关的病理状况的方法,所述方法包括对需要此类治疗的受试者施用有效量的抗 EphB4 抗体。在有些实施方案中,所述与血管发生有关的病理状况是肿瘤、癌症、和 / 或细胞增殖性病症。在有些实施方案中,所述与血管发生有关的病理状况是眼内新血管疾病。

[0101] 本发明的方法可用于影响任何合适的病理状态。本文中描述了例示性的病症,包括选自下组的癌症:小细胞肺癌、成神经细胞瘤、黑素瘤、乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌(CRC)、肝细胞癌。

[0102] 在一个实施方案中,本发明方法中所靶向的细胞是癌细胞。例如,癌细胞可选自乳腺癌细胞、结肠直肠癌细胞、肺癌细胞、乳头状癌细胞、结肠癌细胞、胰腺癌细胞、卵巢癌细胞、宫颈癌细胞、中枢神经系统癌细胞、骨源性肉瘤细胞、肾癌细胞、肝细胞癌细胞、膀胱癌细胞、胃癌细胞、头和颈鳞状癌细胞、黑素瘤细胞、白血病细胞、和结肠腺瘤细胞。在一个实施方案中,本发明方法中所靶向的细胞是过度增殖的(hyperproliferative)和/或过度增生(hyperplastic)的细胞。在一个实施方案中,本发明方法中所靶向的细胞是发育异常的(dysplastic)细胞。在又一个实施方案中,本发明方法中所靶向的细胞是转移的细胞。

[0103] 本发明的方法还可进一步包括别的处理步骤。例如,在一个实施方案中,所述方法进一步包括其中将靶细胞和/或组织(例如癌细胞)暴露于放射处理或化疗剂的步骤。

[0104] 一方面,本发明提供了包括联合施用有效量的抗 EphB4 抗体和有效量的另一治疗剂(诸如抗血管发生剂(anti-angiogenesis agent)的方法。例如,抗 EphB4 抗体与抗癌剂或抗血管发生剂联合用于治疗各种赘生性或非赘生性疾患。在一个实施方案中,所述赘生性(neoplastic)或非赘生性(non-neoplastic)疾患是与血管发生有关的病理状况。在有些实施方案中,另一治疗剂是抗血管发生剂、抗肿瘤剂、和/或化疗剂。

[0105] 抗 EphB4 抗体可以与对那些目的有效的另一治疗剂连续或联合施用,或是在同一组合物中或是作为分开的组合物。抗 EphB4 抗体与另一治疗剂(例如抗癌剂、抗血管发生剂)的施用可以同时进行,例如作为单一组合物,或者作为两种或多种不同的组合物,使用相同或不同的施用路径。或者/另外,施用可以以任何次序顺序进行。或者/另外,所述步骤可以作为任何次序的顺序进行和同时进行二者的组合来进行(the steps can be performed as a combination of both sequentially and simultaneously, in any order)。在某些实施方案中,两种或多种组合物的施用之间可以有范围从数分钟到数天、到数周、到数月的间隔。例如,可以先施用抗癌剂,接着施用抗 EphB4 抗体。然而,也设想了同时施用或先施用抗 EphB4 抗体。因而,一方面,本发明提供了包括施用抗 EphB4 抗体、接着施用抗血管发生剂(诸如抗 VEGF 抗体,诸如贝伐单抗)的方法。在某些实施方案中,两种或多种组合物的施用之间可以有时间范围上从数分钟到数天、到数周、到数月的间隔。

[0106] 在某些方面,本发明提供了通过施用有效量的抗 EphB4 抗体和/或血管发生抑制剂和一种或多种化疗剂来治疗病症(诸如肿瘤、癌症、和/或细胞增殖性病症)的方法。多种化疗剂可用于本发明的联合治疗方法。本文在“定义”部分提供了所设想的化疗剂的例示性和非限制性列表。抗 EphB4 抗体与交联剂的施用可以同时进行,例如作为单一组合物,或者作为两种或多种不同的组合物,使用相同或不同的施用路径。或者/另外,施用可以以任何次序顺序进行。或者/另外,所述步骤可以作为任何次序的顺序进行和同时进行二者的组合来进行。在某些实施方案中,两种或多种组合物的施用之间可以有时间上从数分钟到数天、到数周、到数月的间隔。例如,可以先施用化疗剂,接着施用抗 EphB4 抗体。然而,也设想了同时施用或先施用抗 EphB4 抗体。因而,一方面,本发明提供了包括施用抗 EphB4 抗体、接着施用化疗剂的方法。在某些实施方案中,两种或多种组合物的施用之间可以有时间上从数分钟到数天、到数周、到数月的间隔。

[0107] 一方面,本发明提供了用于增强抗血管发生剂在患有与血管发生有关的病理状况的受试者中的功效的方法,所述方法包括对受试者联合施用有效量的抗 EphB4 抗体和抗血管发生剂,由此增强所述抗血管发生剂的抑制活性。

[0108] 另一方面,本发明提供了用于检测 EphB4 的方法,所述方法包括在样品中检测 EphB4- 抗 EphB4 抗体复合物。术语“检测”在用于本文时包括定性的和 / 或定量的检测 (测量水平),有或无参照对照。

[0109] 另一方面,本发明提供了用于诊断与 EphB4 表达和 / 或活性有关的病症的方法,所述方法包括在来自患有或怀疑患有所述病症的患者的生物样品中检测 EphB4- 抗 EphB4 抗体复合物。在有些实施方案中,所述 EphB4 表达是升高的表达或异常的表达。在有些实施方案中,所述病症是肿瘤、癌症、和 / 或细胞增殖性病症。

[0110] 另一方面,本发明提供了任何本文所述抗 EphB4 抗体,其中所述抗 EphB4 抗体包含可检测标记物。

[0111] 另一方面,本发明提供了任何本文所述抗 EphB4 抗体与 EphB4 的复合物。在有些实施方案中,所述复合物是在体内的或在体外的。在有些实施方案中,所述复合物包含癌细胞。在有些实施方案中,所述抗 EphB4 抗体是可检测标记的。

[0112] 附图简述

[0113] 图 1 :抗 EphB4 抗体的重链和轻链 HVR 环序列。该图显示了重链 HVR 序列,即 H1、H2、和 H3,及轻链 HVR 序列,即 L1、L2、和 L3。序列编号如下:克隆 30.35 (HVR-H1 为 SEQ ID NO:1;HVR-H2 为 SEQ ID NO:3;HVR-H3 为 SEQ ID NO:7;HVR-L1 为 SEQ ID NO:9;HVR-L2 为 SEQ ID NO:11;HVR-L3 为 SEQ ID NO:13);克隆 30.35.1D2 (HVR-H1 为 SEQ ID NO:1;HVR-H2 为 SEQ ID NO:3;HVR-H3 为 SEQ ID NO:8;HVR-L1 为 SEQ ID NO:10;HVR-L2 为 SEQ ID NO:12;HVR-L3 为 SEQ ID NO:14);克隆 30.35.2D8 (HVR-H1 为 SEQ ID NO:2;HVR-H2 为 SEQ ID NO:4;HVR-H3 为 SEQ ID NO:7;HVR-L1 为 SEQ ID NO:9;HVR-L2 为 SEQ ID NO:11;HVR-L3 为 SEQ ID NO:15);克隆 30.35.2D12 (HVR-H1 为 SEQ ID NO:1;HVR-H2 为 SEQ ID NO:5;HVR-H3 为 SEQ ID NO:7;HVR-L1 为 SEQ ID NO:9;HVR-L2 为 SEQ ID NO:11;HVR-L3 为 SEQ ID NO:16);而克隆 30.35.2D13 (HVR-H1 为 SEQ ID NO:1;HVR-H2 为 SEQ ID NO:6;HVR-H3 为 SEQ ID NO:7;HVR-L1 为 SEQ ID NO:9;HVR-L2 为 SEQ ID NO:11;HVR-L3 为 SEQ ID NO:17)。

[0114] 氨基酸序列位置依照下述 Kabat 编号系统进行编号。

[0115] 图 2A 和 2B 及图 3 描绘了用于实施本发明的例示性受体人共有框架序列,序列标识符如下:

[0116] 重链可变 (VH) 共有框架 (图 2A 和 2B)

[0117] 人 VH 亚组 I 共有框架减去 Kabat CDR (SEQ ID NO:19)

[0118] 人 VH 亚组 I 共有框架减去延伸的高变区 (SEQ ID NO:20-22)

[0119] 人 VH 亚组 II 共有框架减去 Kabat CDR (SEQ ID NO:23)

[0120] 人 VH 亚组 II 共有框架减去延伸的高变区 (SEQ ID NO:24-26)

[0121] 人亚组亚型 III 共有框架减去 Kabat CDR (SEQ ID NO:27)

[0122] 人 VH 亚组 III 共有框架减去延伸的高变区 (SEQ ID NO:28-30)

[0123] 人 VH 受体框架减去 Kabat CDR (SEQ ID NO:31)

[0124] 人 VH 受体框架减去延伸的高变区 (SEQ ID NO:32-33)

[0125] 人 VH 受体 2 框架减去 Kabat CDR (SEQ ID NO :34)

[0126] 人 VH 受体 2 框架减去延伸的高变区 (SEQ ID NO :35-37)

[0127] 轻链可变 (VL) 共有框架 (图 3)

[0128] 人 VL κ 亚组 I 共有框架 (SEQ ID NO :38)

[0129] 人 VL κ 亚组 II 共有框架 (SEQ ID NO :39)

[0130] 人 VL κ 亚组 III 共有框架 (SEQ ID NO :40)

[0131] 人 VL κ 亚组 IV 共有框架 (SEQ ID NO :41)

[0132] 图 4 描绘了 huMAb4D5-8 轻链和重链的框架区序列。上标 / 粗体的数值指示依照 Kabat 的氨基酸位置。

[0133] 图 5 描绘了 huMAb4D5-8 轻链和重链的修饰的 / 变异的框架区序列。上标 / 粗体的数值指示依照 Kabat 的氨基酸位置。

[0134] 图 6 描绘了抗体克隆 30. 35、30. 35. 1D2、30. 35. 2D8、30. 35. 2D12、和 20. 25. 2D13 的重链可变区和轻链可变区。

[0135] 图 7 :抗 EphB4 单克隆抗体在基于细胞的测定法中阻断 EphB4 受体信号传导。

[0136] 发明详述

[0137] 本发明提供了可用于例如治疗或预防与 EphB4 表达和 / 或活性 (诸如升高的表达和 / 或活性或不想要的表达和 / 或活性) 有关的疾病状态的抗 EphB4 抗体。在有些实施方案中,本发明的抗体用于治疗肿瘤、癌症、和 / 或细胞增殖性病症。

[0138] 另一方面,本发明的抗 EphB4 抗体可用作检测和 / 或分离 EphB4 的试剂,诸如在各种组织和细胞类型中检测 EphB4。

[0139] 本发明进一步提供了制备抗 EphB4 抗体的方法、及编码抗 EphB4 抗体的多核苷酸。

[0140] 通用技术

[0141] 本文中描述或提到的技术和规程一般得到了本领域技术人员的充分理解,而且通常利用常规方法得以采用,诸如例如下列文献中记载的广泛应用的方法: Sambrook et al., Molecular Cloning :A Laboratory Manual 3rd.edition(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y ;CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)) ;丛书 METHODS IN ENZYMOLOGY(Academic Press, Inc.) :PCR2 :A PRACTICAL APPROACH(M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)) ;Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL ;及 ANIMAL CELL CULTURE(R. I. Freshney, ed. (1987))。

[0142] 定义

[0143] “分离的”抗体指已经鉴定且自其天然环境的一种成分分开和 / 或回收的抗体。其天然环境的污染性成分指将会干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质,可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中,将抗体纯化至 (1) 根据 Lowry 法的测定,抗体重量超过 95%,最优选重量超过 99%, (2) 足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N- 末端或内部氨基酸序列的程度,或 (3) 根据还原性或非还原性条件下的 SDS-PAGE 及使用考马斯蓝或优选的银染色,达到同质。既然抗体天然环境的至少一种成分不会存在,那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而,分离的抗体通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0144] “分离的”核酸分子指已经鉴定且与抗体核酸的天然来源中通常与之关联的至少一种污染性核酸分子分开的核酸分子。分离的核酸分子不同于在自然界中发现它时的形式或背景。分离的核酸分子因此与存在于天然细胞中时的核酸分子有区别。然而，分离的核酸分子包括通常表达该抗体的细胞中所包含的核酸分子，例如当所述核酸分子在所述细胞中的染色体定位不同于它在天然细胞中的染色体定位时。

[0145] 术语“依照 Kabat 的可变域残基编号”或“依照 Kabat 的氨基酸位置编号”及其变体指 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) 中的抗体编辑用于重链可变域或轻链可变域 (variable domain) 的编号系统。使用此编号系统，实际的线性氨基酸序列可包含较少或另外的氨基酸，对应于可变域 FR 或 CDR 的缩短或插入。例如，重链可变域可包含 H2 残基 52 后的单一氨基酸插入（依照 Kabat 为残基 52a）及重链 FR 残基 82 后的插入残基（例如依照 Kabat 为残基 82a、82b 和 82c 等）。给定抗体的 Kabat 残基编号可通过将抗体序列与“标准”Kabat 编号序列对比同源区来确定。

[0146] 短语“基本上相似”或“基本上相同”在用于本文时表示两个数值（通常一个涉及本发明的抗体而另一个涉及参照 / 比较抗体）之间足够高的相似程度，以致本领域技术人员将认为在用所述数值（例如 Kd 值）所测量的生物学特性背景内两个数值之间的差异具有很小的或没有生物学和 / 或统计学显著性。作为参照 / 比较抗体该数值的函数，所述两个数值之间的差异优选小于约 50%，优选小于约 40%，优选小于约 30%，优选小于约 20%，优选小于约 10%。

[0147] “结合亲和力”通常指分子（例如抗体）的单一结合位点与其结合配偶体（例如抗原）之间全部非共价相互作用总和的强度。除非另有说明，在用于本文时，“结合亲和力”指反映结合对的成员（例如抗体与抗原）之间 1:1 相互作用的内在结合亲和力。分子 X 对其配偶体 Y 的亲和力通常可用解离常数 (Kd) 来表述。亲和力可通过本领域知道的常用方法来测量，包括本文中所描述的。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原且趋于容易解离，而高亲和力抗体通常更快速的结合抗原且趋于保持更长时间的结合。本领域知道测量结合亲和力的多种方法，其中任一种都可用于本发明的目的。下文描述了具体的示例性实施方案。

[0148] 在一个实施方案中，依照本发明的“Kd”或“Kd 值”是通过如下测定法所述使用 Fab 型式的目的抗体及其抗原进行的放射性标记抗原结合测定法 (RIA) 来测量的：通过在存在未标记抗原的滴定系列的条件下，用最小浓度的 ^{125}I 标记抗原平衡 Fab，然后用抗 Fab 抗体包被的平板捕捉结合的抗原来测量 Fab 对抗原的溶液结合亲和力 (Chen, et al., J Mol Biol 293 :865-881 (1999))。为了确定测定条件，用 50mM 碳酸钠 (pH9.6) 中的 $5\mu\text{g/ml}$ 捕捉用抗 Fab 抗体 (CappelLabs) 包被微量滴定板 (Dynex) 过夜，随后用 PBS 中的 2% (w/v) 牛血清清蛋白于室温（约 23°C ）封闭 2-5 小时。在非吸附平板 (Nunc#269620) 中，将 100pM 或 26pM [^{125}I] - 抗原与连续稀释的目的 Fab 混合（例如与 Presta et al., Cancer Res. 57 :4593-4599 (1997) 中抗 VEGF 抗体，Fab-12 的评估一致）。然后将目的 Fab 保温过夜；不过，保温可持续更长时间（例如 65 个小时）以保证达到平衡。此后，将混合物转移至捕捉板以进行室温保温（例如 1 小时）。然后除去溶液，并用含 0.1% Tween-20 的 PBS 洗板 8 次。平板干燥后，加入 $150\mu\text{l}$ / 孔闪烁液 (MicroScint-20; Packard)，然后在 Topcount 伽马计数器 (Packard) 上对平板计数 10 分钟。选择各 Fab 给出小于或等于最大结合之

20% 的浓度用于竞争性结合测定法。依照另一实施方案, K_d 或 K_d 值是通过表面等离子共振测定法使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 于 25℃ 使用固定化抗原 CM5 芯片在约 10 个响应单位 (RU) 测量的。简而言之, 依照供货商的说明书用盐酸 N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片 (CM5, BIAcore Inc.)。用 10mM 乙酸钠 pH4.8 将抗原稀释至 5 μ g/ml (约 0.2 μ M), 然后以 5 μ l/ 分钟的流速注入至获得约 10 个响应单位 (RU) 的偶联蛋白质。注入抗原后, 注入 1M 乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量, 于 25℃ 以约 25 μ l/ 分钟的流速注入在含 0.05% Tween-20 的 PBS (PBST) 中两倍连续稀释的 Fab (0.78nM 至 500nM)。使用简单一对朗格缪尔 (Langmuir) 结合模型 (BIAcore Evaluation Software version 3.2) 通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。平衡解离常数 (K_d) 以比率 k_{off}/k_{on} 计算。参见例如 Chen, Y., et al., J Mol Biol 293:865-881 (1999)。如果根据上文表面等离子共振测定法, 结合速率超过 $10^6 M^{-1} S^{-1}$, 那么结合速率可使用荧光淬灭技术来测定, 即根据分光计诸如配备了断流装置的分光光度计 (a stop-flow equipped spectrophotometer) (Aviv Instruments) 或 8000 系列 SLM-Aminco 分光光度计 (ThermoSpectronic) 中用搅拌比色杯 (stir red cuvette) 的测量, 在存在浓度渐增的抗原的条件下, 测量 PBS, pH7.2 中的 20nM 抗抗原抗体 (Fab 形式) 在 25℃ 的荧光发射强度 (激发 = 295nm; 发射 = 340nm, 16nm 带通) 的升高或降低。

[0149] 依照本发明的“结合速率” (on-rate, rate of association, association rate) 或 “ k_{on} ” 也可通过上文所述相同的表面等离子共振技术使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 于 25℃ 使用固定化抗原 CM5 芯片在约 10 个响应单位 (RU) 来测定。简而言之, 依照供货商的说明书用盐酸 N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片 (CM5, BIAcore Inc.)。用 10mM 乙酸钠 pH4.8 将抗原稀释至 5 μ g/ml (约 0.2 μ M), 然后以 5 μ l/ 分钟的流速注入至获得约 10 个响应单位 (RU) 的偶联蛋白质。注入抗原后, 注入 1M 乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量, 于 25℃ 以约 25 μ l/ 分钟的流速注入在含 0.05% Tween-20 的 PBS (PBST) 中两倍连续稀释的 Fab (0.78nM 至 500nM)。使用简单一对朗格缪尔 (Langmuir) 结合模型 (BIAcore Evaluation Software version 3.2) 通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。平衡解离常数 (K_d) 以比率 k_{off}/k_{on} 计算。参见例如 Chen, Y., et al., J Mol Biol 293:865-881 (1999)。然而, 如果根据上文表面等离子共振测定法, 结合速率超过 $10^6 M^{-1} S^{-1}$, 那么结合速率优选使用荧光淬灭技术来测定, 即根据分光计诸如配备了断流装置的分光光度计 (Aviv Instruments) 或 8000 系列 SLM-Aminco 分光光度计 (ThermoSpectronic) 中用搅拌比色杯的测量, 在存在浓度渐增的抗原的条件下, 测量 PBS, pH7.2 中的 20nM 抗抗原抗体 (Fab 形式) 在 25℃ 的荧光发射强度 (激发 = 295nm; 发射 = 340nm, 16nm 带通) 的升高或降低。

[0150] 术语“载体”在用于本文时意指能够运输与其连接的其它核酸的核酸分子。一类载体是“质粒”, 指其中可连接另外的 DNA 区段的环状双链 DNA 环。另一类载体是噬菌体载体。另一类载体是病毒载体, 其中可将另外的 DNA 区段连接到病毒基因组中。某些载体能够在其所导入的宿主细胞中自主复制 (例如具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其它载体 (例如非附加型哺乳动物载体) 可在导入宿主细胞后整合到宿主细

胞的基因组中,由此随着宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导与其可操作连接的基因表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为“重组载体”)。通常,在重组 DNA 技术中有用的表达载体常常是质粒形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可互换使用,因为质粒是载体的最常用形式。

[0151] “多核苷酸”或“核酸”在本文中可互换使用,指任何长度的核苷酸聚合物,包括 DNA 和 RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经过修饰的核苷酸或碱基、和 / 或其类似物,或者是可通过 DNA 或 RNA 聚合酶或者通过合成反应掺入聚合物的任何底物。多核苷酸可包含经过修饰的核苷酸,诸如甲基化核苷酸及其类似物。如果有的话,对核苷酸结构的修饰可以在装配聚合物之前或之后进行。核苷酸序列可以由非核苷酸组分中断。多核苷酸可以在合成后进一步修饰,诸如通过与标记物偶联。其它类型的修饰包括例如“帽”,将一个或多个天然存在的核苷酸用类似物替代,核苷酸间修饰诸如例如具有不带电荷连接(例如磷酸甲酯、磷酸三酯、磷酰胺酯(phosphoamidate)、氨基甲酸酯等)和具有带电荷连接(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的修饰,含有悬垂模块(pendant moiety)诸如例如蛋白质(例如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚 L-赖氨酸等)的修饰、具有嵌入剂(例如吡啶、补骨脂素等)的修饰、含有螯合剂(例如金属、放射性金属、硼、氧化性金属等)的修饰、含有烷化剂的修饰、具有经修饰连接(例如 α 端基异构核酸(anomeric nucleic acid)等)的修饰、以及未修饰形式的多核苷酸。另外,通常存在于糖类中的任何羟基可以用例如膦酸(phosphonate)基团、磷酸(phosphate)基团替换,用标准保护基团保护,或活化以制备与别的核苷酸的别的连接,或者可偶联至固体和半固体支持物。5' 和 3' 末端 OH 可磷酸化或者用胺或 1-20 个碳原子的有机加帽基团模块取代。其它羟基也可衍生成标准保护基团。多核苷酸还可含有本领域普遍知道的核糖或脱氧核糖糖类的类似物形式,包括例如 2' - 氧 - 甲基、2' - 氧 - 烯丙基、2' - 氟 - 或 2' - 迭氮 - 核糖,碳环糖类似物, α - 端基异构糖,差向异构糖诸如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖,无环类似物及脱碱基核苷类似物诸如甲基核糖核苷。可用备选连接基团替换一个或多个磷酸二酯连接。这些备选连接基团包括但不限于以下实施方案,其中磷酸酯用 P(O)S(“硫代酸酯”(thioate))、P(S)S(“二硫代酸酯”(dithioate))、(O)NR₂(“酰胺酯”(amidate))、P(O)R、P(O)OR'、CO 或 CH₂(“甲缩醛”(formacetal)) 替代,其中 R 或 R' 各自独立为 H 或者取代或未取代的烷基(1-20 个 C),任选含有醚(-O-)连接、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基(araldyl)。并非多核苷酸中的所有连接都必需是相同的。前述描述适用于本文中提及的所有多核苷酸,包括 RNA 和 DNA。

[0152] “寡核苷酸”在用于本文时一般指短的多核苷酸,一般是单链,一般是合成的,长度一般但不是必需小于约 200 个核苷酸。术语“寡核苷酸”与“多核苷酸”并不互相排斥。上文关于多核苷酸的描述平等且完全适用于寡核苷酸。

[0153] 关于肽或多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为对比序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后,且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分时,候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。为测定百分比氨基酸序列同一性目的的对比可以本领域技术范围内的多种方式进行,例如使用公众可得到的计算机软件,诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign(DNASTAR) 软件。本领域技术人员可决定用于测量对比的适宜参数,包括对所比较序列全长获得最大对比所需

的任何算法。然而,为了本发明的目的,%氨基酸序列同一性值是使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 获得的,其中下文表 A 中提供了 ALIGN-2 程序的完整源代码。ALIGN-2 序列比较计算机程序由 Genentech 公司编写,下文表 A 所示源代码已经连同用户文文件一起提交给美国版权局 (US CopyrightOffice, Washington D.C., 20559),并以美国版权注册号 TXU510087 注册。公众可通过 Genentech 公司 (South San Francisco, California) 得到 ALIGN-2 程序。ALIGN2 程序应当编译成在 UNIX 操作系统,优选数码 UNIX V4.0D 上使用。所有序列比较参数由 ALIGN-2 程序设定且不变。

[0154] 在采用 ALIGN-2 来比较氨基酸序列的情况中,给定氨基酸序列 A 相对于 (to)、与 (with)、或针对 (against) 给定氨基酸序列 B 的 %氨基酸序列同一性 (或者可表述为具有或包含相对于、与、或针对给定氨基酸序列 B 的某一 %氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列 A) 如下计算:

[0155] 分数 X/Y 乘 100

[0156] 其中 X 是由序列对比程序 ALIGN-2 在该程序的 A 和 B 对比中评分为相同匹配的氨基酸残基数,且其中 Y 是 B 中的氨基酸残基总数。可以领会,若氨基酸序列 A 的长度与氨基酸序列 B 的长度不相等,则 A 相对于 B 的 %氨基酸序列同一性将不等于 B 相对于 A 的 %氨基酸序列同一性。

[0157] 除非另有具体说明,本文中所使用的所有 %氨基酸序列同一性值都是依照上一段所述,使用 ALIGN-2 计算机程序获得的。

[0158] 术语“EphB4” (可互换的称为“EphB4R”),在用于本文时,除非另有明确说明或者上下文另有说明,指任何天然的或变异的 (无论是天然的或合成的) EphB4 多肽。术语“天然序列”明确涵盖天然存在的截短或分泌形式 (例如胞外结构域序列)、天然存在的变异形式 (例如可变剪接形式) 和天然存在的等位变体。术语“野生型 EphB4”一般指包含天然存在 EphB4 蛋白的氨基酸序列的多肽。术语“野生型 EphB4 序列”一般指在天然存在 EphB4 中找到的氨基酸序列。

[0159] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”以最广义互换使用,包括单克隆抗体 (例如全长或完整单克隆抗体)、多克隆抗体、多价抗体、多特异性抗体 (例如双特异性抗体,只要它们展现出期望的生物学活性),而且还可以包括某些抗体片段 (如本文中更为详细描述)。抗体可以是人的、人源化的和 / 或亲和力成熟的。

[0160] 术语“可变的”指可变域中的某些部分在抗体序列间差异广泛且用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性的实情。然而,变异性并非均匀分布于抗体的整个可变域。它集中于轻链和重链可变域中称作互补决定区 (CDR) 或高变区的三个区段。可变域中更加高度保守的部分称作框架 (FR)。天然重链和轻链的可变域各自包含四个 FR 区,它们大多采取 β -折迭片构象,通过形成环状连接且在有些情况中形成 β -折迭片结构一部分的三个 CDR 连接。每条链中的 CDR 通过 FR 区非常接近的保持在一起,并与另一条链的 CDR 一起促成抗体的抗原结合位点的形成 (参见 Kabat et al., Sequences of Proteinsof Immunological Interest, 第 5 版, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。恒定域不直接参与抗体与抗原的结合,但展现出多种效应器功能,诸如抗体依赖性细胞的细胞中抗体的参与。

[0161] 用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,各自具有

一个抗原结合位点,及一个剩余的“Fc”片段,其名称反映了它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生一个 $F(ab')_2$ 片段,它具有两个抗原结合位点且仍能够交联抗原。

[0162] “Fv”是包含完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。在双链 Fv 种类中,此区由紧密、非共价结合的一个重链可变域和一个轻链可变域的二聚体组成。在单链 Fv 种类中,一个重链可变域和一个轻链可变域可以通过柔性肽接头共价相连,使得轻链和重链在与双链 Fv 种类类似的“二聚体”结构中相结合。正是在这种构造中,各可变域的三个 CDR 相互作用而在 V_H - V_L 二聚体表面上确定了一个抗原结合位点。六个 CDR 共同赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即使是单个可变域(或只包含对抗原特异的三个 CDR 的半个 Fv)也具有识别和结合抗原的能力,只是亲和力低于完整结合位点。

[0163] Fab 片段还包含轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH1)。Fab' 片段与 Fab 片段的区别之处在于重链 CH1 结构域的羧基末端增加了少数残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab' -SH 是本文中对其中恒定域半胱氨酸残基携带游离巯基的 Fab' 的称谓。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初是作为在 Fab' 片段之间有铰链半胱氨酸的成对 Fab' 片段生成的。还知道抗体片段的其它化学偶联。

[0164] 根据其恒定域的氨基酸序列,来自任何脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可归入两种截然不同的型中的一种,称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)。

[0165] 根据其重链恒定域的氨基酸序列,免疫球蛋白可归入不同的类。免疫球蛋白有五大类:IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,其中有些可进一步分为亚类(同种型),例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。将与不同类的免疫球蛋白对应的重链恒定域分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构造是众所周知的。

[0166] “抗体片段”只包含完整抗体的一部分,其中所述部分优选保留该部分存在于完整抗体中时通常与之有关的至少一项、优选大多数或所有功能。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、和 Fv 片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子;和由抗体片段形成的多特异性抗体。在一个实施方案中,抗体片段包含完整抗体的抗原结合位点,如此保留结合抗原的能力。在另一个实施方案中,抗体片段,例如包含 Fc 区的抗体片段,保留通常与 Fc 区存在于完整抗体中时通常与之有关的至少一项生物学功能,诸如 FcRn 结合、抗体半衰期调控、ADCC 功能和补体结合。在一个实施方案中,抗体片段是体内半衰期与完整抗体基本上相似的单价抗体。例如,这样的抗体片段可包含一个抗原结合臂且其与能够赋予该片段以体内稳定性的 Fc 序列相连。

[0167] 术语“高变区”、“HVR”或“HV”在用于本文时指抗体可变域中序列上高度可变和/或形成结构上定义的环的区域。通常,抗体包含六个高变区:三个在 V_H 中(H1、H2、H3),三个在 V_L 中(L1、L2、L3)。本文中使用且涵盖许多高变区的叙述。Kabat 互补决定区(CDR)是以序列变异性为基础的,而且是最常用的(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothia 改为指结构环的位置(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))。AbM 高变区代表 Kabat CDR 与 Chothia 结构环之间的折衷,而且得到 Oxford Molecular 的 AbM 抗体建模软件的使用。“接触”高变区是以对可获得的复合物晶体结构的分析为基础的。下文记录了这些高变区中每一个的残基。

[0168] 环 Kabat AbM Chothia 接触

[0169]	---	-----	-----	-----	-----
[0170]	L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
[0171]	L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
[0172]	L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
[0173]	H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
[0174]		(Kabat 编号)			
[0175]	H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
[0176]		(Chothia 编号)			
[0177]	H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
[0178]	H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0179] 高变区可包括如下“延伸的高变区”:VL 中的 24-36 或 24-34(L1)、46-56 或 50-56(L2) 和 89-97(L3) 及 VH 中的 26-35(H1)、50-65 或 49-65(H2) 和 93-102、94-102 或 95-102(H3)。对于这些定义中的每一个,可变区残基是依照 Kabat 等,见上文编号的。

[0180] “框架”或“FR”残基指可变域中除本文中所定义的高变区残基外的那些残基。

[0181] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在极大程度上,人源化抗体指人免疫球蛋白(受体抗体)中的高变区残基用具有期望特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中,将人免疫球蛋白的框架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有找到的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。一般而言,人源化抗体将包含至少一个、通常两个基本上整个如下可变域,其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,且所有或基本上所有 FR 是人免疫球蛋白序列的 FR。人源化抗体任选还将包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见 Jones et al., Nature321:522-525(1986);Riechmann et al., Nature332:323-329(1988);和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)。还可参见以下综述及其引用的参考文献:Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115(1998);Harris, Biochem. Soc. Transactions23:1035-1038(1995);Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433(1994)。

[0182] “嵌合”抗体(免疫球蛋白)中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们展现出期望的生物学活性(美国专利 No. 4,816,567;Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA81:6851-6855(1984))。本文中所使用的人源化抗体是嵌合抗体的一个子集。

[0183] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 VH 和 VL 结构域,其中这些结构域存在于一条多肽链上。一般而言,scFv 多肽在 VH 与 VL 结构域之间还包含多肽接头,使得 scFv 能够形成结合抗原所需的结构。关于 scFv 的综述参见 Pluckthun,在 Rosenberg and Moore 编的《The Pharmacology of Monoclonal Antibodies》第 113 卷中, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315(1994)。

[0184] 抗原”指抗体可选择性结合的预定抗原。靶抗原可以是多肽、碳水化合物、核酸、脂

质、半抗原或其它天然存在的或合成的化合物。优选的是，靶抗原是多肽。

[0185] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小型抗体片段，该片段在同一条多肽链 (V_H - V_L) 中包含相连的重链可变域 (V_H) 和轻链可变域 (V_L)。通过使用过短的接头使得同一条链上的两个结构域之间不能配对，迫使这些结构域与另一条链的互补结构域配对，从而产生两个抗原结合位点。双抗体更完整的记载于例如 EP404,097 ;W093/11161 ;Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA90 :6444-6448(1993)。

[0186] “人抗体”指拥有与由人生成的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列和 / 或使用本文所公开的用于生成成人抗体的任何技术生成的抗体。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0187] “亲和力成熟的”抗体指在抗体的一个或多个 CDR 中具有一处或多处改变、导致该抗体对抗原的亲和力与没有这些改变的亲本抗体相比有所改进的抗体。优选的亲和力成熟的抗体将具有纳摩尔或甚至皮摩尔量级的对靶抗原的亲和力。亲和力成熟的抗体可通过本领域已知规程来生成。Marks et al., Bio/Technology10 :779-783(1992) 记载了通过 V_H 和 V_L 结构域改组进行的亲和力成熟。以下文献记载了 CDR 和 / 或框架残基的随机诱变 :Barbas et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91 :3809-3813(1994) ;Schier et al., Gene 169 :147-155(1995) ;Yelton et al., J. Immunol. 155 :1994-2004(1995) ;Jackson et al., J. Immunol. 154(7) :3310-9(1995) ;Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226 :889-896(1992)。

[0188] 抗体“效应器功能”指那些可归于抗体 Fc 区 (天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体 Fc 区) 且随抗体同种型而变化的生物学活性。抗体效应器功能的例子包括 :C1q 结合和补体依赖性细胞毒性 ;Fc 受体结合 ;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) ;吞噬作用 ;细胞表面受体 (例如 B 细胞受体) 下调 ;和 B 细胞活化。

[0189] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”指其中结合到某些细胞毒性细胞 (例如天然杀伤 (NK) 细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞) 上存在的 Fc 受体 (FcR) 上的分泌型 Ig 使得这些细胞毒性效应细胞能够特异性结合携带抗原的靶细胞，随后用细胞毒素杀死靶细胞的细胞毒性形式。该抗体“武装” (arm) 细胞毒性细胞，而且是此类杀伤作用绝对要求的。介导 ADCC 的主要细胞，NK 细胞，只表达 $Fc \gamma RIII$ ，而单核细胞表达 $Fc \gamma RI$ 、 $Fc \gamma RII$ 和 $Fc \gamma RIII$ 。Ravetchand Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9 :457-92(1991) 第 464 页表 3 总结了造血细胞上的 FcR 表达。为了评估目的分子的 ADCC 活性，可进行体外 ADCC 测定法，诸如美国专利 No. 5,500,362 或 5,821,337 或 Presta 美国专利 No. 6,737,056 中所记载的。可用于此类测定法的效应细胞包括外周血单个核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。或者 / 另外，可在体内评估目的分子的 ADCC 活性，例如在动物模型中，诸如 Clynes et al., PNAS(USA) 95 :652-656(1998) 中所披露的。

[0190] “人效应细胞”指表达一种或多种 FcR 并行行使效应器功能的白细胞。优选的是，该细胞至少表达 $Fc \gamma RIII$ 并行行使 ADCC 效应器功能。介导 ADCC 的人白细胞的例子包括外周血单个核细胞 (PBMC)、天然杀伤 (NK) 细胞、单核细胞、细胞毒性 T 细胞和嗜中性粒细胞，优选 PBMC 和 NK 细胞。效应细胞可以从其天然来源分离，例如血液。

[0191] “Fc 受体”或“FcR”描述结合抗体 Fc 区的受体。优选的 FcR 是天然序列人 FcR。此外，优选的 FcR 是结合 IgG 抗体的 FcR (γ 受体)，包括 $Fc \gamma RI$ 、 $Fc \gamma RII$ 和 $Fc \gamma RIII$ 亚类的受体，包括这些受体的等位变体和可变剪接形式。 $Fc \gamma RII$ 受体包括 $Fc \gamma RIIA$ (“活化

受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”),它们具有相似的氨基酸序列,区别主要在其胞质结构域中。活化受体Fc γ RIIA在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体Fc γ RIIB在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见综述Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234(1997))。FcR的综述参见Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492(1991);Capelet al., *Immunomethods* 4:25-34(1994);de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41(1995)。术语“FcR”在本文中涵盖其它FcR,包括那些未来将会鉴定的。该术语还包括新生儿受体,FcRn,它负责将母体IgG转移给胎儿(Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587(1976)和Kim et al., *J. Immunol.* 24:249(1994))并调节免疫球蛋白的动态平衡。W000/42072(Presta)记载了对FcR的结合提高或降低的抗体变体。在此明确收入该专利出版物的内容作为参考。还可参见Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604(2001)。

[0192] 测量对FcRn的结合的方法是已知的(参见例如Ghetie1997,Hinton2004)。可测定人FcRn高亲和力结合多肽与人FcRn的体内结合和血清半衰期,例如在表达人FcRn的转基因小鼠或经转染的人细胞系中,或者在施用了Fc变体多肽的灵长类动物中。

[0193] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”指存在补体时对靶细胞的溶解。经典补体途径的启动是由补体系统第一组分(C1q)结合其关联抗原所结合的抗体(适宜亚类的)起始的。为了评估补体启动,可进行CDC测定法,例如如Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163(1996)中所记载的。

[0194] 具有更改的Fc区氨基酸序列及提高或降低的C1q结合能力的多肽变体记载于美国专利No. 6,194,551B1和W099/51642。在此明确收入那些专利出版物的内容作为参考。还可参见Idusogie et al., *J. Immunol.* 164:4178-4184(2000)。

[0195] 含“Fc区多肽”指包含Fc区的多肽,诸如抗体或免疫粘附素(见下文定义)。Fc区的C-末端赖氨酸(依照EU编号系统的残基447)可以消除,例如在纯化多肽的过程中或者通过重组改造编码多肽的核酸。因此,依照本发明包含具有Fc区的多肽的组合物可包含具有K447的多肽、消除了所有K447的多肽、或具有与没有K447残基的多肽的混合物。

[0196] “阻断性”抗体或“拮抗性”抗体(antagonist antibody)指抑制或降低其所结合的抗原的生物学活性的抗体。优选的阻断性抗体或拮抗性抗体实质或完全抑制抗原的生物学活性。

[0197] “激动性抗体(agonist antibody)”在用于本文时指模拟目的多肽的至少一项功能性活性的抗体。

[0198] 就本文目的而言,“受体人框架”是包含衍生自人免疫球蛋白框架或人共有框架的VL或VH框架之氨基酸序列的框架。“衍生自”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可包含与之相同的氨基酸序列,或者可包含预先存在的氨基酸序列变化。当存在预先存在的氨基酸变化时,优选存在不超过5个,优选4个或更少,或者3个或更少预先存在的氨基酸变化。当VH中存在预先存在的氨基酸变化时,优选那些变化只位于71H、73H和78H中的三个、两个或一个位置;例如,位于那些位置的氨基酸残基可以是71A、73T和/或78A。在一个实施方案中,VL受体人框架在序列上与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列相同。

[0199] “人共有框架”指代表人免疫球蛋白 VL 或 VH 框架序列选集中最常见的氨基酸残基的框架。通常,人免疫球蛋白 VL 或 VH 序列选集来自可变区序列亚型。通常,序列亚型是如 Kabat 等人的亚型。在一个实施方案中,对于 VL,亚型是如 Kabat 等人的亚型 κ I。在一个实施方案中,对于 VH,亚型是如 Kabat 等人的亚型 III。

[0200] “VH 亚组 III 共有框架”包含从 Kabat 等人的可变重链亚型 III 中的氨基酸序列获得的共有序列。在一个实施方案中,VH 亚型 III 共有框架氨基酸序列包含下列各序列的至少一部分或整个全部:

[0201] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO :42)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO :43)-H2-RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO :44)-H3-WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO :45)。

[0202] “VL 亚组 I 共有框架”包含从 Kabat 等人的可变轻链 K 亚型 I 中的氨基酸序列获得的共有序列。在一个实施方案中,VL 亚型 I 共有框架氨基酸序列包含下列各序列的至少一部分或整个:

[0203] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO :46)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO :47)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO :48)-L3-FGQGTKVEIK (SEQ ID NO :49)。

[0204] “病症”或“疾病”指任何会受益于本发明的物质 / 分子或方法的治疗的疾患。这包括慢性和急性病症或疾病,包括那些使哺乳动物倾向于所讨论病症的病理状况。本文中待治疗的病症的非限制性例子包括恶性和良性肿瘤;癌、母细胞瘤、和肉瘤。

[0205] 术语“细胞增殖性病症”和“增殖性病症”指与一定程度的异常细胞增殖有关的病症。在一个实施方案中,细胞增殖性病症指癌症。

[0206] “肿瘤”在用于本文时指所有肿瘤性细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,及所有癌前 (pre-cancerous) 和癌性细胞和组织。术语“癌症”、“癌性”、“细胞增殖性紊乱”、“增殖性紊乱”和“肿瘤”在本文中提到时并不互相排斥。

[0207] 术语“癌症”和“癌性”指向或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长 / 增殖不受调控的生理疾患。癌症的例子包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、肺的鳞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌 (liver cancer)、膀胱癌、肝瘤 (hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌 (hepatic carcinoma)、胃癌、黑素瘤、及各种类型的头和颈癌。

[0208] 血管发生失调可导致可通过本发明的组合物和方法来治疗的许多病症。这些病症包括非肿瘤性的和肿瘤性的疾患。肿瘤性病症包括但不限于上文所描述的那些。非肿瘤性病症包括但不限于不想要的或异常的肥大、关节炎、类风湿性关节炎 (RA)、银屑病、银屑病斑块、结节病、动脉粥样硬化、动脉粥样硬化斑块、糖尿病性和其它增殖性视网膜病包括早产儿视网膜病、晶状体后纤维组织增生、年龄相关黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿、角膜新血管形成、角膜移植片新血管形成、角膜移植片排斥、视网膜 / 脉络膜新血管形成、眼角的新血管形成 (发红)、眼新血管疾病、血管再狭窄、动静脉畸形 (AVM)、脑脊膜瘤、血管瘤、血管纤维瘤、甲状腺增生 (包括格雷夫斯氏 (Graves) 病)、角膜和其它组织移植、慢性炎症、肺炎、急性肺损伤 / ARDS、败血症、原发性肺动脉高压、恶性肺积液 (malignant pulmonary

effusion)、脑水肿(例如与急性中风/闭合性头部外伤/创伤有关的)、滑液炎症、RA 中的血管翳形成、骨化性肌炎、肥大性骨形成、骨关节炎(OA)、顽固性腹水、多囊卵巢病、子宫内膜异位症、第三空间流体病(3rd spacing of fluid diseases)(胰腺炎、间隔综合征、烧伤、肠病)、子宫纤维瘤(uterine fibroids)、早产、慢性炎症诸如 IBD(克罗恩氏(Crohn)病和溃疡性结肠炎)、肾同种异体移植排斥、炎性肠病、肾病综合征、不想要的或异常的组织块生长(非癌性的)、血友病性关节、肥厚性瘢痕、毛发生长的抑制、奥-韦二氏(Osler-Weber)综合征、脓性肉芽肿晶状体后纤维组织增生、硬皮病、沙眼、血管粘连、滑膜炎、皮炎、先兆子痫、腹水、心包积液(诸如与心包炎有关的)和胸腔积液。

[0209] 在用于本文时,“治疗”或“处理”指试图改变所治疗个体或细胞的自然进程的临床干预,可以是为了预防或在临床病理学的进程中进行。治疗的期望效果包括预防疾病的发生或复发、缓解症状、削弱疾病的任何直接或间接病理学后果、预防转移、减缓疾病进展的速率、改善或减轻疾病状态、及免除或改善预后。在有些实施方案中,本发明的抗体用于延迟疾病或病症的发生/发展。

[0210] 术语“神经变性疾病”和“神经变性病症”以最广义使用,包括其病理学涉及神经原变性和/或功能障碍的所有病症,包括但不限于周围神经病;运动神经元病症,诸如肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis)(ALS, Lou Gehrig 氏病)、贝耳氏(Bell)麻痹、和涉及脊髓性肌萎缩或麻痹的各种疾患;及其它人神经变性疾病,诸如阿耳茨海默氏病、帕金森氏病、癫痫、多发性硬化、亨廷顿氏舞蹈症、唐氏综合征、神经性聋、和梅尼尔氏(Meniere)病。

[0211] “周围神经病”指影响周围神经的神经变性病症,最常表现为运动、感觉、感觉运动、或自主功能障碍中的一项或组合。周围神经病可以是例如通过遗传获得的,可以源自系统疾病,或者可以是毒剂诸如神经毒性药物例如抗肿瘤剂或者工业或环境污染物诱发的。“周围感觉神经病”的特征为周围感觉神经元的变性,这可以是特发性的,可以是作为例如糖尿病(糖尿病性神经病)、癌症的细胞抑制药疗法(例如使用化疗剂的治疗,诸如长春新碱、顺铂、甲氨蝶呤、3'-迭氮-3'-脱氧胸苷、或紫杉烷,例如帕利他塞(paclitaxel) [TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.] 和多西他塞(doxetaxel) [TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France])、酒精中毒、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、或遗传素因(genetic predisposition)的后果而发生的。通过遗传获得的周围神经病包括例如雷弗素姆氏(Refsum)病、克腊比氏(Krabbe)病、异染性脑白质营养不良、法布里氏(Fabry)病、代-索二氏(Dejerine-Sottas)综合征、无 β 脂蛋白血症、和夏科-马里-图思(Charcot-Marie-Tooth, CMT)病(也称为 Proneal 肌萎缩或遗传性运动感觉神经病(HMSN))。大多数类型的周围神经病缓慢发生/发展,病程数月或数年。在临床实践中,此类神经病称作慢性的。有时周围神经病快速发生/发展,病程数天,称作急性的。周围神经病常常一起影响感觉和运动神经,从而引起混合型感觉和运动神经病,但是纯感觉的和纯运动的神经病也是已知的。

[0212] “个体”指脊椎动物,优选哺乳动物,更优选人。哺乳动物包括,但不限于,牲畜(诸如牛)、运动用动物、宠物(诸如猫、犬、和马)、灵长类动物、小鼠和大鼠。

[0213] 为了治疗的目的,“哺乳动物”指归入哺乳类的任何动物,包括人,家畜和牲畜,及动物园、运动或宠物动物,诸如犬、马、猫、牛等。优选的是,哺乳动物指人。

[0214] “有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的治疗或预防效果的量。

[0215] 本发明的物质 / 分子、拮抗剂或激动剂的“治疗有效量”可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重及该物质 / 分子、激动剂或拮抗剂在个体中引发期望应答的能力等因素而变化。治疗有效量还指该物质 / 分子、激动剂或拮抗剂的治疗有益效果胜过任何有毒或有害后果的量。“预防有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的预防效果的量。通常而非必然,由于预防剂量是在疾病发作之前或在疾病的早期用于受试者的,因此预防有效量将低于治疗有效量。

[0216] 术语“细胞毒剂”在用于本文时指抑制或防止细胞的功能和 / 或引起细胞破坏的物质。该术语意图包括:放射性同位素,例如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²和 Lu 的放射性同位素;化疗剂,例如甲氨蝶呤 (methotrexate)、阿霉素 (adriamycin)、长春花生物碱类 (vinca alkaloids) (长春新碱 (vincristine)、长春碱 (vinblastine)、依托泊苷 (etoposide))、多柔比星 (doxorubicin)、美法仑 (melphalan)、丝裂霉素 (mitomycin) C、苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、柔红霉素 (daunorubicin) 或其它嵌入剂;酶及其片段,诸如溶核酶;抗生素;和毒素,诸如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素,包括其片段和 / 或变体;及下文披露的各种抗肿瘤药或抗癌药。下文记载了其它细胞毒剂。杀肿瘤药引起肿瘤细胞的破坏。

[0217] “化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂类 (alkylating agents), 诸如塞替派 (thiotepa) 和 **CYTOXAN®** 环磷酰胺 (cyclophosphamide); 磺酸烷基酯类 (alkyl sulfonates), 诸如白消安 (busulfan)、英丙舒凡 (improsulfan) 和呱泊舒凡 (pipo sulfan); 氮丙啶类 (aziridines), 诸如苯佐替派 (benzodepa)、卡波醌 (carboquone)、美妥替派 (meturedepa) 和乌瑞替派 (uredepa); 乙撑亚胺类 (ethylenimines) 和甲基蜜胺类 (methylamelamines), 包括六甲蜜胺 (altretamine)、三乙撑蜜胺 (triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺 (triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺 (triethylenethiophosphoramidate) 和三羟甲蜜胺 (trimethylolomelamine); 番荔枝内酯类 (acetogenins) (尤其是布拉他辛 (bullatacin) 和布拉他辛酮 (bullatacinone)); δ -9-四氢大麻酚 (tetrahydrocannabinol) (屈大麻酚 (dronabinol), **MARINOL®**); β -拉帕醌 (lapachone); 拉帕醇 (lapachol); 秋水仙素类 (colchicines); 白桦脂酸 (betulinic acid); 喜树碱 (camptothecin) (包括合成类似物托泊替康 (topotecan) (**HYCAMTIN®**), CPT-11 (伊立替康 (irinotecan), **CAMPTOSAR®**))、乙酰喜树碱、东莨菪亭 (scopoletin) 和 9-氨基喜树碱); 苔藓抑素 (bryostatin); callystatin; CC-1065 (包括其阿多来新 (adozelesin)、卡折来新 (carzelesin) 和比折来新 (bizelesin) 合成类似物); 鬼臼毒素 (podophyllotoxin); 鬼臼酸 (podophyllinic acid); 替尼泊苷 (teniposide); 隐藻素类 (cryptophycins) (特别是隐藻素 1 和隐藻素 8); 多拉司他汀 (dolastatin); duocarmycin (包括合成类似物, KW-2189 和 CB1-TM1); 艾榴塞洛素 (eleutherobin); pancratistatin; sarcodictyin; 海绵抑素 (spongistatin); 氮芥类 (nitrogen mustards), 诸如苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、萘氮芥 (chlornaphazine)、胆磷酰胺 (cholophosphamide)、雌莫司汀 (estramustine)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、双氯乙基甲胺 (mechlorethamine)、盐酸氧氮芥 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、

美法仑 (melphalan)、新氮芥 (novembichin)、苯芥胆甾醇 (phenesterine)、泼尼莫司汀 (prednimustine)、曲磷胺 (trofosfamide)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard); 亚硝脲类 (nitrosoureas), 诸如卡莫司汀 (carmustine)、氯脲菌素 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine) 和雷莫司汀 (ranimustine); 抗生素类, 诸如烯二炔类抗生素 (enediynes) (例如加利车霉素 (calicheamicin), 尤其是加利车霉素 γ II 和加利车霉素 ω II (参见例如 Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl. 33:183-186(1994))); 蒽环类抗生素 (dynemicin), 包括 dynemicin A; 埃斯波霉素 (esperamicin); 以及新制癌素 (neocarzinostatin) 发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素 (aclacinomycin)、放线菌素 (actinomycin)、蒽蒽霉素 (anthramycin)、偶氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycin)、放线菌素 C (cactinomycin)、carabycin、洋红霉素 (carminomycin)、嗜癌霉素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycin)、放线菌素 D (dactinomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、**ADRIAMYCIN®** 多柔比星 (doxorubicin) (包括吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、麻西罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素类 (mitomycins) 诸如丝裂霉素 C、霉酚酸 (mycophenolic acid)、诺拉霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycin)、培洛霉素 (peplomycin)、potfiromycin、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链佐星 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin); 抗代谢物类, 诸如甲氨蝶呤 (methotrexate) 和 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨蝶呤 (methotrexate)、蝶罗呤 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨 (fludarabine)、6-巯基嘌呤 (mercaptopurine)、硫咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鸟嘌呤 (thioguanine); 嘧啶类似物, 诸如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6-氮尿苷 (azauridine)、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、脱氧氟尿苷 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine); 雄激素类, 诸如卡鲁睾酮 (calusterone)、丙酸屈他雄酮 (dromostanolone propionate)、表硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone); 抗肾上腺类, 诸如氨鲁米特 (aminoglutethimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充剂, 诸如亚叶酸 (folinic acid); 醋葡萄糖内酯 (aceglatone); 醛磷酸胺糖苷 (aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸 (aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶 (eniluracil); 安吡啶 (amsacrine); bestabucil; 比生群 (bisantrene); 依达曲沙 (edatraxate); 地磷酰胺 (defosfamide); 地美可辛 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); elfornithine; 依利醋铵 (elliptinium acetate); 埃坡霉素 (epothilone); 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓; 羟脲 (hydroxyurea); 香菇多糖 (lentinan); 氯尼达明 (lonidamine); 美登木素生物碱类 (maytansinoids), 诸如美登素 (maytansine) 和安丝菌素 (ansamitocin); 米托胍脲 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 莫呱达醇 (mopidamol); 二胺硝吡啶 (nitracrine); 喷司他丁 (pentostatin); 蛋氨酸氮芥 (phenamet); 吡柔比星

(pirarubicin); 洛索蒽醌 (losoxantrone); 2-乙基酰肼 (ethylhydrazide); 丙卡巴肼 (procarbazine); **PSK®** 多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 雷佐生 (razoxane); 根霉素 (rhizoxin); 西佐喃 (sizofiran); 螺旋锗 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢菌素类 (trichothecenes) (尤其是 T-2 毒素、疣孢菌素 (verrucarin) A、杆孢菌素 (roridin) A 和蛇行菌素 (anguidin)); 乌拉坦 (urethan); 长春地辛 (vindesine) (**ELDISINE®**, **FILDESIN®**); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露莫司汀 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 呱泊溴烷 (pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷 (arabinoside) (“Ara-C”); 塞替派 (thiotepa); 类紫杉醇类 (taxoids), 例如 **TAXOL®** 帕利他塞 (paclitaxel) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.)、**ABRAXANE™** 不含克列莫佛 (Cremophor)、清蛋白改造纳米颗粒剂型帕利他塞 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) 和 **TAXOTERE®** 多西他塞 (doxetaxel) (**Rhône -Poulenc Rorer, Antony, France**); 苯丁酸氮芥 (chlorambucil); 吉西他滨 (gemcitabine) (**GEMZAR®**); 6-硫鸟嘌呤 (thioguanine); 巯基嘌呤 (mercaptopurine); 甲氨蝶呤 (methotrexate); 铂类似物, 诸如顺铂 (cisplatin) 和卡铂 (carboplatin); 长春碱 (vinblastine) (**VELBAN®**); 铂 (platinum); 依托泊苷 (etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺 (ifosfamide); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 长春新碱 (vincristine) (**ONCOVIN®**); 奥沙利铂 (oxaliplatin); 亚叶酸 (leucovorin); 长春瑞滨 (vinorelbine) (**NAVELBINE®**); 能灭瘤 (novantrone); 依达曲沙 (edatrexate); 道诺霉素 (daunomycin); 氨基蝶呤 (aminopterin); 伊本膦酸盐 (ibandronate); 拓扑异构酶抑制剂 RFS2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 类视黄酸类 (retinoids), 诸如视黄酸 (retinoic acid); 卡培他滨 (capecitabine) (**XELODA®**); 任何上述物质的药剂学可接受的盐、酸或衍生物; 以及两种或多种上述物质的组合, 诸如 CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙联合疗法的缩写) 和 FOLFOX (奥沙利铂 (ELOXATIN™) 联合 5-FU 和亚叶酸的治疗方案的缩写)。

[0218] 该定义还包括起调节、降低、阻断或抑制可促进癌生长的激素效果作用的抗激素剂, 且常常是系统或全身治疗的形式。它们自身可以是激素。例子包括抗雌激素类和选择性雌激素受体调节剂类 (SERM), 包括例如他莫昔芬 (tamoxifen) (包括 **NOLVADEX®** 他莫昔芬)、**EVISTA®** 雷洛昔芬 (raloxifene)、屈洛昔芬 (droloxifene)、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬 (trioxifene)、那洛昔芬 (keoxifene)、LY117018、奥那司酮 (onapristone) 和 **FARESTON®** 托瑞米芬 (toremifene); 抗孕酮类; 雌激素受体下调剂类 (ERD); 起抑制或关闭卵巢作用的药剂, 例如促黄体生成激素释放激素 (LHRH) 激动剂, 诸如 **LUPRON®** 和 **ELIGARD®** 醋酸亮丙瑞林 (leuprolide acetate)、醋酸戈舍瑞林 (goserelin acetate)、醋酸布舍瑞林 (buserelin acetate) 和曲普瑞林 (triptorelin); 抗雄激素类, 诸如氟他米特 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide) 和比卡米特 (bicalutamide); 其它抗雄激素类, 诸如氟他米特 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide) 和比卡米特 (bicalutamide); 及抑制在肾上腺中调节雌激素生成的芳香酶的芳香酶抑制剂, 诸如例如 4(5)-咪唑、氨鲁米特 (aminoglutethimide)、**MEGASE®** 醋酸甲地孕酮 (megestrol acetate)、

AROMASIN®依西美坦 (exemestane)、**福美坦** (formestane)、**法偈唑** (fadrozole)、**RIVISOR®**伏氯唑 (vorozole)、**FEMARA®**来曲唑 (letrozole) 和 **ARIMIDEX®**阿那曲唑 (anastrozole)。另外,化疗剂的这种定义包括二膦酸盐类 (bisphosphonates), 诸如氯膦酸盐 (clodronate) (例如 **BONEFOS®**或 **OSTAC®**)、**DIDROCAL®**依替膦酸盐 (etidronate)、NE-58095、**ZOMETA®**唑来膦酸 / 唑来膦酸盐 (zoledronic acid/zoledronate)、**FOSAMAX®**阿伦膦酸盐 (alendronate)、**AREDIA®**帕米膦酸盐 (pamidronate)、**SKELID®**替鲁膦酸盐 (tiludronate) 或 **ACTONEL®**利塞膦酸盐 (risedronate); 以及曲沙他滨 (troxacitabine) (1,3- 二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 特别是那些抑制涉及粘着细胞增殖的信号传导途经中的基因表达的反义寡核苷酸, 诸如例如 PKC- α 、Raf、H-Ras 和表皮生长因子受体 (EGF-R); 疫苗, 诸如 **THERATOPE®**疫苗和基因疗法疫苗, 例如 **ALLOVECTIN®**疫苗、**LEUVECTIN®**疫苗和 **VAXID®**疫苗; **LURTOTECAN®**拓扑异构酶 1 抑制剂; **ABARELIX®** rmRH; lapatinib ditosylate (ErbB-2 和 EGFR 双重酪氨酸激酶小分子抑制剂, 也称为 GW572016); 及任何上述物质的药剂学可接受的盐、酸或衍生物。

[0219] “生长抑制剂”在用于本文时指在体外或在体内抑制细胞 (诸如表达 EphB4 的细胞) 生长的化合物或组合物。因此, 生长抑制剂可以是显著降低处于 S 期的细胞 (诸如表达 EphB4 的细胞) 百分比的药剂。生长抑制剂的例子包括阻断细胞周期行进 (处于 S 期以外的位置) 的药剂, 诸如诱导 G1 停滞和 M 期停滞的药剂。经典的 M 期阻断剂包括长春药类 (vincas) (长春新碱 (vincristine) 和长春碱 (vinblastine))、紫杉烷类 (taxanes)、和拓扑异构酶 II 抑制剂诸如多柔比星 (doxorubicin)、表柔比星 (epirubicin)、柔红霉素 (daunorubicin)、依托泊苷 (etoposide) 和博来霉素 (bleomycin)。那些阻滞 G1 的药剂也溢出进入 S 期停滞, 例如 DNA 烷化剂类诸如他莫昔芬 (tamoxifen)、泼尼松 (prednisone)、达卡巴嗪 (dacarbazine)、双氯乙基甲胺 (mechlorethamine)、顺铂 (cisplatin)、甲氨蝶呤 (methotrexate)、5- 氟尿嘧啶 (5-fluorouracil) 和 ara-C。更多信息可参见《The Molecular Basis of Cancer》, Mendelsohn 和 Israel 编, 第 1 章, 题为 “Cellcycle regulation, oncogenes, and antieoplastic drugs”, Murakaini 等人, WBSaunders, Philadelphia, 1995, 尤其是第 13 页。紫杉烷类 (紫杉醇 (paclitaxel) 和多西他赛 (docetaxel)) 是衍生自紫杉树的抗癌药。衍生自欧洲紫杉的多西他赛 (**TAXOTERE®**, Rhone-Poulenc Rorer) 是紫杉醇 (**TAXOL®**, Bristol-MyersSquibb) 的半合成类似物。紫杉醇和多西他赛促进由微管蛋白二聚体装配成微管并通过防止解聚使微管稳定, 导致对细胞中有丝分裂的抑制。

[0220] “多柔比星 (Doxorubicin)”是蒽环类抗生素。多柔比星的完整化学名是 (8S- 顺式)-10-[(3-氨基-2,3,6-三脱氧- α -L-来苏-吡喃己糖基)氧基]-7,8,9,10-四氢-6,8,11-三羟基-8-(羟基乙酰基)-1-甲氧基-5,12-萘二酮。

[0221] (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxo-hexapyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8-(hydroxyacetyl)-1-methoxy-5,12-naphthacenedione

[0222] 术语“抗肿瘤组合物”指可用于治疗癌症的组合物, 其包含至少一种活性治疗剂,

例如“抗癌剂”。治疗剂（抗癌剂，在本文中也称为“抗肿瘤剂”）的例子包括但不限于例如化疗剂、生长抑制剂、细胞毒剂、放射疗法中所使用的药剂、抗血管发生剂、凋亡剂、抗微管蛋白剂、毒素、和其它用于治疗癌症的药剂例如抗 VEGF 中和性抗体、VEGF 拮抗剂、抗 HER-2、抗 CD20、表皮生长因子受体 (EGFR) 拮抗剂（例如酪氨酸激酶抑制剂）、HER1/EGFR 抑制剂、erlotinib、COX-2 抑制剂（例如塞来考昔 (celecoxib)）、干扰素、细胞因子、能与 ErbB2、ErbB3、ErbB4、或 VEGF 受体中的一种或多种靶物结合的拮抗剂（例如中和性抗体）、血小板衍生生长因子 (PDGF) 和 / 或干细胞因子 (SCF) 的受体酪氨酸激酶的抑制剂（例如甲磺酸伊马替尼 (imatinib mesylate) (**Gleevec**® Novartis))、TRAIL/Apo2、及其它生物活性和有机化学剂等。

[0223] 术语“前体药物”在用于本申请时指与母药 (parent drug) 相比对肿瘤细胞的细胞毒性较小并能够酶促活化或转变为更具活性母药形式的药用活性物质的前体或衍生物形式。参见例如 Wilman “Prodrugs in Cancer Chemotherapy”, Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) 和 Stella 等 “Prodrugs :A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery”, Directed Drug Delivery, Borchardt 等, 编, pp. 247-267, Humana Press (1985)。本发明的前体药物包括但不限于含磷酸盐 / 酯前体药物、含硫代磷酸盐 / 酯前体药物、含硫酸盐 / 酯前体药物、含肽前体药物、D- 氨基酸修饰前体药物、糖基化前体药物、含 β - 内酰胺前体药物、含任选取代苯氧基乙酰胺的前体药物或含任选取代苯乙酰胺的前体药物、可转化为更具活性而无细胞毒性的药物的 5- 氟胞嘧啶和其它 5- 氟尿苷前体药物。可衍生为本发明使用的前体药物形式的细胞毒性药物的例子包括但不限于上文描述的那些化疗剂。

[0224] “抗血管发生剂”或“血管发生抑制剂”指或直接或间接抑制血管发生 (angiogenesis)、血管生成 (vasculogenesis)、或不想要的血管通透性的小分子量物质、多核苷酸、多肽、分离的蛋白质、重组蛋白、抗体、或其偶联物或融合蛋白。例如, 抗血管发生剂是上文定义的血管发生剂的抗体或其它拮抗剂, 例如 VEGF 的抗体、VEGF 受体的抗体、阻断 VEGF 受体信号传导的小分子（例如 PTK787/ZK2284、SU6668、SUTENT/SU11248 (sunitinib malate)、AMG706）。抗血管发生剂还包括天然血管发生抑制剂, 例如血管他丁 (angiostatin)、内皮他丁 (endostatin) 等。参见例如 Klagsbrun and D'Amore Annu. Rev. Physiol. 53 :217-39 (1991); Streit and Detmar Oncogene 22 :3172-3179 (2003) (例如列举恶性黑素瘤中抗血管发生疗法的表 3); Ferrara & Alitalo Nature Medicine 5 (12) : 1359-1364 (1999); Tonini 等 Oncogene 22 :6549-6556 (2003) (例如列举抗血管发生因子的表 2); Sato Int. J. Clin. Oncol. 8 :200-206 (2003) (例如列举临床试验中所使用的抗血管发生剂的表 1)。

[0225] 本发明的组合物及其制备方法

[0226] 本发明涵盖包含抗 EphB4 抗体的组合物, 包括药用组合物; 及包含抗 EphB4 抗体编码序列的多核苷酸。在用于本文时, 组合物包含一种或多种结合 EphB4 的抗体, 和 / 或一种或多种包含编码一种或多种结合 EphB4 的抗体的序列的多核苷酸。这些组合物可进一步包含合适的载体, 诸如制药学可接受的赋形剂, 包括缓冲剂, 它们是本领域众所周知的。

[0227] 本发明还涵盖分离的抗体和多核苷酸的实施方案。本发明还涵盖基本上纯的抗体和多核苷酸的实施方案。

[0228] 本发明的抗 EphB4 抗体优选是单克隆的。本发明的范围还涵盖本文中所提供的抗 EphB4 抗体的 Fab、Fab'、Fab'-SH 和 F(ab')₂。这些抗体片段可通过常规手段来创建，诸如酶促消化，或者可以通过重组技术来生成。此类抗体片段可以是嵌合的或人源化的。这些片段可用于下文所列的诊断和治疗目的。

[0229] 单克隆抗体是由一群基本上同质的抗体获得的，即构成群体的各个抗体相同，除了可能以极少量存在的可能的天然存在突变。由此，修饰语“单克隆”指明抗体的特征，即不是不同的或多克隆的抗体的混合物。

[0230] 本发明的抗 EphB4 单克隆抗体可使用最初由 Kohler et al., Nature 256 : 495(1975) 记载的杂交瘤方法来制备，或者可以通过重组 DNA 方法（美国专利 No. 4,816,567）来制备。

[0231] 在杂交瘤方法中，免疫小鼠或其它适宜的宿主动物，诸如仓鼠，以引发生成或能够生成如下抗体的淋巴细胞，所述抗体将特异性结合用于免疫的蛋白质。EphB4 的抗体一般通过在动物中多次皮下 (sc) 或腹膜内 (ip) 注射 EphB4 和佐剂来生成。EphB4 可以使用本领域众所周知的方法来制备，其中有些方法在本文中有描述。例如，EphB4 的重组生产在下文中有描述。在一个实施方案中，将动物用包含 EphB4 胞外结构域 (ECD) 且其融合至免疫球蛋白重链 Fc 部分的 EphB4 衍生物免疫。在一个优选的实施方案中，将动物用 EphB4-IgG1 融合蛋白免疫。动物通常针对 EphB4 的免疫原性偶联物或衍生物用单磷酸脂质 A (MPL)/trehalose dicrynomycolate (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) 进行免疫，溶液皮内注射于多个部位。2 周后，对动物进行加强免疫。7-14 天后，对动物采血，并测定抗 EphB4 滴度。对动物进行加强免疫，直到滴度达到平台 (plateaus)。

[0232] 或者，可以在体外免疫淋巴细胞。然后，使用合适的融合剂诸如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合，以形成杂交瘤细胞 (Goding, Monoclonal Antibodies : Principle and Practice, pp. 59-103, Academic Press, 1986)。

[0233] 将如此制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中接种和培养，所述培养基优选含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的一种或多种物质。例如，若亲本骨髓瘤细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT)，则用于杂交瘤的培养基典型的将含有次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷 (HAT 培养基)，这些物质阻止 HGPRT 缺陷细胞生长。

[0234] 优选的骨髓瘤细胞是那些高效融合、支持所选抗体生成细胞稳定的高水平生成抗体、并对诸如 HAT 培养基的培养基敏感的。在这些细胞中，优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤系，诸如那些可从索尔克研究所细胞分配中心 (Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA) 获得的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤及可从美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) 获得的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞所衍生的。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也已记载用于生成单克隆抗体 (Kozbor, J. Immunol. 133 : 3001 (1984) ; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)。

[0235] 可对杂交瘤细胞正在其中生长的培养液测定针对 EphB4 的单克隆抗体的生成。优选的是，通过免疫沉淀或通过体外结合测定法，诸如放射免疫测定法 (RIA) 或酶联免疫吸附测定法 (ELISA)，测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。

[0236] 单克隆抗体的结合亲和力和可溶性可通过例如 Munson et al., *Anal. Biochem.* 107 : 220 (1980) 的 Scatchard 分析来测定。

[0237] 在鉴定得到生成具有期望特异性、亲和力和 / 或活性的抗体的杂交瘤细胞后, 该克隆可通过有限稀释规程进行亚克隆并通过标准方法进行培养 (Goding, *Monoclonal Antibodies : Principles and Practice*, pp. 59-103, Academic Press, 1986)。适于这一目的的培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。另外, 杂交瘤细胞可在动物中作为腹水瘤进行体内培养。

[0238] 可通过常规免疫球蛋白纯化规程, 诸如例如蛋白 A-Sepharose、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析, 将亚克隆分泌的单克隆抗体与培养液、腹水或血清适当分开。

[0239] 本发明的抗 EphB4 抗体可以通过使用组合库筛选具有期望活性的合成抗体克隆来创建。在原理上, 通过筛选噬菌体文库来选择合成抗体克隆, 所述噬菌体文库含有展示融合至噬菌体外壳蛋白的各种抗体可变区 (Fv) 片段的噬菌体。通过针对所需抗原的亲和层析淘选此类噬菌体文库。表达能够结合所需抗原的 Fv 片段的克隆被吸附至抗原, 从而与文库中不结合的克隆分开。然后将结合的克隆从抗原上洗脱, 而且可以通过额外的抗原吸附 / 洗脱循环进一步富集。本发明的任何抗 EphB4 抗体可以如下获得, 即设计合适的抗原筛选规程来选择感兴趣的噬菌体克隆, 接着使用来自感兴趣的噬菌体克隆的 Fv 序列和 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3 中记载的合适的恒定区 (Fc) 序列构建全长抗 EphB4 抗体克隆。

[0240] 抗体的抗原结合域由两个约 110 个氨基酸的可变 (V) 区形成, 分别来自重链 (VL) 和轻链 (VH), 都呈现三个高变环或互补决定区 (CDR)。可变域可以功能性的展示在噬菌体上, 或是作为单链 Fv (scFv) 片段 (其中 VH 和 VL 通过短的、柔性的接头共价相连), 或者作为 Fab 片段 (其中它们各自与恒定域融合且非共价相互作用), 如 Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12 : 433-455 (1994) 所述。在用于本文时, 编码 scFv 的噬菌体克隆和编码 Fab 的噬菌体克隆统称为“Fv 噬菌体克隆”或“Fv 克隆”。

[0241] VH 和 VL 基因的全集可以通过聚合酶链式反应 (PCR) 分开克隆, 并在噬菌体文库中随机重组, 然后可以搜索抗原结合克隆, 如 Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12 : 433-455 (1994) 所述。来自经免疫来源的文库能提供对免疫原有高亲和力的抗体, 无需构建杂交瘤。或者, 可以克隆未免疫的全集, 用于为广泛的非自身的及自身的抗原提供单一抗体来源, 无需任何免疫, 如 Griffiths et al., *EMBO J.*, 12 : 725-734 (1993) 所述。最后, 未免疫的文库还可以以合成方式来构建, 即从干细胞克隆未重排的 V 基因, 并使用包含随机序列的 PCR 引物来编码高度可变的 CDR3 区及用来在体外实现重排, 如 Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227 : 381-388 (1992) 所述。

[0242] 通过与次要外壳蛋白 pIII 融合, 使用丝状噬菌体来展示抗体片段。抗体片段可以展示为单链 Fv 片段, 其中 VH 与 VL 结构域通过柔性多肽间隔物在同一多肽链上相连, 例如如 Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222 : 581-597 (1991) 所述, 或者展示为 Fab 片段, 其中一条链与 pIII 融合, 另一条链分泌到细菌宿主细胞周质中, 在此装配 Fab- 外壳蛋白结构, 其通过取代一些野生型外壳蛋白而展示在噬菌体表面上, 例如如 Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19 : 4133-4137 (1991) 所述。

[0243] 一般而言,从收获自人或动物的免疫细胞获得编码抗体基因片段的核酸。如果希望文库偏向抗 EphB4 克隆,那么可以给受试者免疫 EphB4 以产生抗体应答,并回收脾细胞和/或循环 B 细胞或其它外周血淋巴细胞 (PBL) 用于文库构建。在一个优选的实施方案中,如下得到了偏向抗 EphB4 克隆的人抗体基因片段文库,即在携带功能性人免疫球蛋白基因阵列 (且缺乏功能性内源抗体生成系统) 的转基因小鼠中产生抗 EphB4 抗体应答,使得 EphB4 免疫产生生成针对 EphB4 的人抗体的 B 细胞。生成抗体的转基因小鼠的生成在下文中有描述。

[0244] 可以如下获得抗 EphB4 反应性细胞群的进一步富集,即使用合适的筛选规程来分离表达 EphB4 特异性膜结合抗体的 B 细胞,例如通过用 EphB4 亲和层析进行的细胞分离或者细胞对荧光标记的 EphB4 的吸附及后续的荧光激活细胞分选 (FACS)。

[0245] 或者,来自未免疫供体的脾细胞和/或 B 细胞或其它 PBL 的使用提供了可能的抗体全集的更佳展现,而且还容许使用 EphB4 在其中没有抗原性的动物 (人或非人的) 物种构建抗体文库。为了构建掺入体外抗体基因的文库,从受试者收获干细胞以提供编码未重排抗体基因区段的核酸。可以从多种动物物种 (诸如人、小鼠、大鼠、兔类、luprine、犬、猫、猪、牛、马、和禽类等) 获得感兴趣的免疫细胞。

[0246] 从感兴趣的细胞回收编码抗体可变基因区段 (包括 VH 和 VL 区段) 的核酸并扩增。就重排的 VH 和 VL 基因文库而言,可以如下获得所需 DNA,即从淋巴细胞分离基因组 DNA 或 mRNA,接着用与重排的 VH 和 VL 基因的 5' 和 3' 末端匹配的引物进行聚合酶链式反应 (PCR),如 Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86 :3833-3837 (1989) 所述,由此构建多样性 V 基因全集供表达。可以从 cDNA 和基因组 DNA 扩增 V 基因,反向引物位于编码成熟 V 结构域的外显子的 5' 末端,正向引物基于 J 区段内部,如 Orlandi et al. (1989) 和 Ward et al., Nature, 341 :544-546 (1989) 所述。然而,为了从 cDNA 进行扩增,反向引物还可基于前导外显子内,如 Jones et al., Biotechnol., 9 :88-89 (1991) 所述,正向引物基于恒定区内,如 Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86 :5728-5732 (1989) 所述。为了使互补性最大化,引物中可以掺入简并性,如 Orlandi et al. (1989) 或 Sastry et al. (1989) 所述。优选的是,如下将文库多样性最大化,即使用靶向每个 V 基因家族的 PCR 引物来扩增免疫细胞核酸样品中存在的所有可获得的 VH 和 VL 重排,例如如 Marks et al., J. Mol. Biol., 222 :581-597 (1991) 或 Orum et al., Nucleic Acids Res., 21 :4491-4498 (1993) 所述。为了将所扩增的 DNA 克隆到表达载体中,可以在 PCR 引物的一端引入罕见的限制性位点作为标签,如 Orlandi et al. (1989) 所述,或者用带标签的引物进行进一步的 PCR 扩增,如 Clackson et al., Nature, 352 :624-628 (1991) 所述。

[0247] 合成重组的 V 基因全集可以在体外从 V 基因区段衍生。大多数人 VH 基因区段已经克隆和测序 (Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227 :776-798 (1992)), 并定位 (Matsuda et al., Nature Genet., 3 :88-94 (1993)); 这些克隆的区段 (包括 H1 和 H2 环的所有主要构造) 可用于生成多样性 VH 基因全集,用到编码序列和长度多样性的 H3 环的 PCR 引物,如 Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227 :381-388 (1992) 所述。VH 全集还可如下生成,所有序列多样性集中于单一长度的长 H3 环,如 Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 :4457-4461 (1992) 所述。人 VK 和 V λ 区段已经克隆和测序 (Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23 :1456-1461 (1993)), 而且可用于生成合成的轻链全集。基于一系列 VH 和 VL

折叠结构及 L3 和 H3 长度的合成 V 基因全集将编码具有可观结构多样性的抗体。扩增编码 V 基因的 DNA 后,依照 Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227 :381-388 (1992) 的方法,可以在体外重排种系 V 基因区段。

[0248] 抗体片段全集可以如下构建,即以数种方式将 VH 与 VL 基因联合在一起。可以在不同载体中创建各个全集,并在体外重组载体,例如如 Hogrefe et al., *Gene*, 128 : 119-126 (1993) 所述,或者在体外通过组合感染来重组载体,例如 Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.*, 21 :2265-2266 (1993) 中记载的 loxP 系统。体内重组方法利用 Fab 片段的双链性质来克服因大肠杆菌转化效率施加的库容量限制。分开克隆未免疫的 VH 和 VL 全集,一个克隆入噬菌粒,另一个克隆入噬菌体载体。然后通过用噬菌体感染含噬菌粒的细菌使得每个细胞包含一种不同组合来联合两个文库,库容量只受细胞存在数的限制(约 10^{12} 个克隆)。两种载体都包含体内重组信号,使得 VH 与 VL 基因重组到单一复制子上,并共包装成噬菌体病毒粒。这些巨型文库提供了大量的具有优良亲和力 (K_d^{-1} 为约 $10^{-8}M$) 的多样性抗体。

[0249] 或者,可以将全集依次克隆入同一载体,例如如 Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 :7978-7982 (1991) 所述,或者通过 PCR 装配到一起,然后克隆,如 Clackson et al., *Nature*, 352 :624-628 (1991) 所述。PCR 装配还可用于将 VH 和 VL DNA 与编码柔性肽间隔物的 DNA 连接以形成单链 Fv(scFv) 全集。在另一种技术中,“细胞内 PCR 装配”用于通过 PCR 在淋巴细胞内联合 VH 与 VL 基因,然后克隆所连接基因的全集,如 Embleton et al., *Nucl. Acids Res.*, 20 :3831-3837 (1992) 所述。

[0250] 未免疫文库(天然的或合成的)生成的抗体可具有中等亲和力 (K_d^{-1} 为约 10^6 - 10^7M^{-1}),但还可以如下在体外模拟亲和力成熟,即构建和再次选择次生文库,如 Winter et al. (1994),见上文所述。例如,在 Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226 :889-896 (1992) 的方法或 Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 :3576-3580 (1992) 的方法中,使用易错聚合酶在体外随机引入突变 (Leung et al., *Technique*, 1 :11-15 (1989))。另外,可以通过随机突变一个或多个 CDR 来进行亲和力成熟,例如在选定的个别 Fv 克隆中使用携带跨越感兴趣 CDR 的随机序列的引物进行 PCR 并筛选更高亲和力的克隆。W09607754 (公开于 1996 年 3 月 14 日) 记载了用于在免疫球蛋白轻链的互补决定区中诱导突变以创建轻链基因文库的方法。另一种高效方法是将通过噬菌体展示选出的 VH 或 VL 结构域与得自未免疫供体的天然存在 V 结构域变体组合,并在数轮链改组中筛选更高亲和力,如 Marks et al., *Biotechnol.*, 10 :779-783 (1992) 所述。此技术容许生成亲和力在 $10^{-9}M$ 范围的抗体和抗体片段。

[0251] EphB4 核酸和氨基酸序列是本领域已知的。编码 EphB4 的核酸序列可以使用所需 EphB4 区域的氨基酸序列来设计。或者,可以使用 cDNA 序列(或其片段), GenBank 编号为 NM_004444 的或者披露于美国专利 No. 5,635,177 的。编码 EphB4 的 DNA 可以通过本领域已知的多种方法来制备。这些方法包括但不限于通过 Engels et al., *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28 :716-734 (1989) 中记载的任何方法,诸如三酯、亚磷酸酯、氨基磷酸酯(phosphoramidite) 和 H-磷酸酯法进行的化学合成。在一个实施方案中,编码 EphB4 的 DNA 的设计中使用表达宿主细胞所优选的密码子。或者,编码 EphB4 的 DNA 可以从基因组或 cDNA 文库分离。

[0252] 构建编码 EphB4 的 DNA 后,将 DNA 分子与表达载体,诸如质粒中的表达控制序列可操作连接,其中所述控制序列受到该载体转化的宿主细胞的识别。一般而言,质粒载体包含复制和控制序列,其衍生自与宿主细胞相容的物种。载体通常携带复制位点,以及编码能够在转化细胞中提供表型选择的蛋白质的序列。适于在原核和真核宿主细胞中表达的载体是本领域已知的,有些在本文中有进一步描述。可以使用真核生物体,诸如酵母或衍生自多细胞生物体诸如哺乳动物的细胞。

[0253] 任选的是,编码 EphB4 的 DNA 与分泌前导序列可操作连接,导致表达产物被宿主细胞分泌到培养基中。分泌前导序列的例子包括 stII、ecotin、lamB、疱疹 GD、lpp、碱性磷酸酶、转化酶、和 α -因子。适用于此处的还有蛋白 A 的 36 个氨基酸的前导序列 (Abrahmsen et al., EMBO J., 4 :3901(1985))。

[0254] 宿主细胞用上文所述本发明的表达或克隆载体转染,优选转化,并在常规营养培养基中培养,培养基可以为了诱导启动子、选择转化子、或扩增编码所需序列的基因而适当修改。

[0255] 转染指宿主细胞摄取表达载体,无论编码序列事实上是否表达。本领域普通技术人员直到许多转染方法,例如 CaPO_4 沉淀和电穿孔。若宿主细胞内存在此载体运转的任何指示,则认为转染成功。用于转染的方法是本领域众所周知的,有些在本文中有描述。

[0256] 转化指将 DNA 导入生物体,使得 DNA 可进行复制,或是作为染色体外元件,或是通过染色体整合。根据所用宿主细胞,使用适于所述细胞的标准技术进行转化。用于转化的方法是本领域众所周知的,有些在本文中有描述。

[0257] 用于生成 EphB4 的原核宿主细胞可以如 Sambrook et al., 见上文一般所述进行培养。

[0258] 用于生成 EphB4 的哺乳动物宿主细胞可以在多种培养基中培养,所述培养基是本领域众所周知的,有些在本文中有描述。

[0259] 此公开书中涉及的宿主细胞涵盖体外培养的细胞以及宿主动物内的细胞。

[0260] EphB4 的纯化可以使用本领域公认的方法来实现,本文描述了其中一些。

[0261] 纯化的 EphB4 可以附着于合适的基质,诸如琼脂糖珠、丙烯酰胺珠、玻璃珠、纤维素、各种丙烯酸共聚物、羟基甲基丙烯酸酯凝胶、聚丙烯酸和聚甲基丙烯酸共聚物、尼龙、中性和离子载体、诸如此类,用于噬菌体展示克隆的亲合层析分离。EphB4 蛋白对基质的附着可以通过 Methods in Enzymology, vol. 44 (1976) 中记载的技术来实现。将蛋白质配体附着于多糖基质,例如琼脂糖、右旋糖苷或纤维素的常用技术涉及用卤化氰活化载体,随后将肽配体的脂肪族或芳香族伯胺偶联至活化后的基质。

[0262] 或者, EphB4 可用于包被吸附板的孔,在附着至吸附板的宿主细胞上表达,或用于细胞分选,或者偶联至生物素以用链霉亲和素包被的珠捕捉,或者用于本领域已知的用于淘选噬菌体展示库的任何其它方法。

[0263] 在适于至少部分噬菌体颗粒结合吸附剂条件下,使噬菌体文库样品接触固定化的 EphB4。正常情况下,选择包括 pH、离子强度、温度等等的条件来模拟生理学条件。结合至固相的噬菌体进行清洗,然后用酸洗脱,例如如 Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88 :7978-7982 (1991) 所述,或者用碱洗脱,例如如 Marks et al., J. Mol. Biol., 222 : 581-597 (1991) 所述,或者通过 EphB4 抗原竞争洗脱,例如在与 Clackson et al., Nature,

352:624-628(1991) 的抗原竞争法类似的规程中。噬菌体在单轮选择中可以富集 20-1,000 倍。此外,富集的噬菌体可以在细菌培养物中进行培养,并进行更多轮选择。

[0264] 选择的效率取决于许多因素,包括清洗过程中解离的动力学,及单个噬菌体上的多个抗体片段是否能同时结合抗原。具有较快解离动力学(和弱结合亲和力)的抗体可以通过使用短时间的清洗、多价噬菌体展示、及固相中的高抗原包被密度来保留。高密度不仅通过多价相互作用而稳定了噬菌体,而且有利于已解离的噬菌体的再结合。具有较慢解离动力学(和强结合亲和力)的抗体的选择可以通过使用长时间的清洗和单价噬菌体展示(如 Bass et al., Proteins, 8:309-314(1990) 和 W092/09690 所述)及低抗原包被密度(如 Marks et al., Biotechnol., 10:779-783(1992) 所述)来促进。

[0265] 有可能在对 EphB4 具有不同亲和力的噬菌体抗体之间进行选择,甚至是亲和力略有差异的。然而,选定抗体的随机诱变(例如如有些上文所述亲和力成熟技术进行)有可能产生许多突变体,多数结合抗原,少数具有更高的亲和力。通过限制 EphB4,罕见的高亲和力噬菌体能竞争胜出。为了保留所有较高亲和力的突变体,可以将噬菌体与过量的生物素化 EphB4 一起温育,但是生物素化 EphB4 的摩尔浓度低于 EphB4 的目标摩尔亲和常数。然后用链霉亲和素包被的顺磁珠捕捉高亲和力的结合噬菌体。此类“平衡捕捉”容许依照结合亲和力来选择抗体,其灵敏性容许从大大过量的低亲和力噬菌体中分离出亲和力只高出 2 倍的突变体克隆。还可以操作清洗结合至固相的噬菌体的条件来进行基于解离动力学的区分。

[0266] 抗 EphB4 克隆可以进行活性选择。在一个实施方案中,本发明提供了阻断 EphB4 配体(诸如 ephrin-B1、ephrin-B2 和 / 或 ephrin-B3)与 EphB4 之间的结合但不阻断 EphB4 配体与第二蛋白质(诸如 EphB1、EphB3、EphB4、EphB5 和 / 或 EphB6)结合的抗 EphB4 抗体。对应于此类抗 EphB4 抗体的 Fv 克隆可以如下选出:(1)如上所述从噬菌体文库分离抗 EphB4 克隆,并任选通过在合适的细菌宿主中培养来扩增所分离的噬菌体克隆群;(2)选出分别想阻断和不阻断其活性的 EphB4 和第二蛋白质;(3)使抗 EphB4 噬菌体克隆吸附至固定化的 EphB4;(4)使用过量的第二蛋白质来洗脱任何不想要的、识别 EphB4 结合决定簇(其与第二蛋白质的结合决定簇交叠或共享)的克隆;并(5)洗脱在步骤(4)后仍然吸附的克隆。任选的是,具有期望的阻断 / 不阻断特性的克隆可以通过一次或多次重复本文所述选择规程来进一步富集。

[0267] 编码本发明杂交瘤衍生单克隆抗体或噬菌体展示 Fv 克隆的 DNA 易于使用常规规程分离和测序(例如通过使用设计成自杂交瘤或噬菌体 DNA 模板特异性扩增感兴趣的重链和轻链编码区的寡核苷酸引物)。一旦分离,可将 DNA 置于表达载体中,然后将该表达载体转染到原本不生成免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞中,诸如大肠杆菌细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞,以在重组宿主细胞中获得所需单克隆抗体的合成。关于编码抗体的 DNA 在细菌中的重组表达的综述性论文包括 Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256(1993) 及 Pluckthun, Immunol. Revs, 130:151(1992)。

[0268] 编码本发明 Fv 克隆的 DNA 可以联合编码重链和 / 或轻链恒定区的已知 DNA 序列(例如适宜的 DNA 序列可得自 Kabat et al., 见上文)以形成编码全长或部分重链和 / 或轻链的克隆。应当领会,任何同种型的恒定区都可用于此目的,包括 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE 恒定区,而且此类恒定区可以得自任何人或动物物种。衍生自一种动物(诸如人)物种

的可变域 DNA, 然后与另一动物物种的恒定区 DNA 融合以形成“杂合的”全长重链和 / 或轻链的编码序列的 Fv 克隆包括在本文所用“嵌合”和“杂合”抗体的定义中。在一个优选的实施方案中, 衍生自人可变 DNA 的 Fv 克隆与人恒定区 DNA 融合以形成完全人的、全长或部分重链和 / 或轻链的编码序列。

[0269] 还可以修饰编码衍生自本发明杂交瘤的抗 EphB4 抗体的 DNA, 例如通过替代, 即用人重链和轻链恒定区的编码序列代替衍生自杂交瘤抗体的同源鼠源序列 (例如如 Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984) 中的方法)。可以进一步修饰编码杂交瘤或 Fv 克隆衍生抗体或片段的 DNA, 通过共价接合免疫球蛋白编码序列和非免疫球蛋白多肽的整个或部分编码序列。可以以该方式制备具有本发明的 Fv 克隆或杂交瘤克隆衍生抗体的结合特异性的“嵌合”或“杂合”抗体。

[0270] 抗体片段

[0271] 本发明涵盖抗体片段。在某些情况中, 使用抗体片段有优势, 而不是完整抗体。片段的较小尺寸容许快速清除, 而且可导致更易于接近实体瘤。

[0272] 已经开发了用于生成抗体片段的多种技术。传统上, 通过蛋白水解消化完整抗体来衍生这些片段 (参见例如 Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992); Brennan et al., Science 229:81(1985))。然而, 现在可直接由重组宿主细胞生成这些片段。Fab、Fv 和 scFv 抗体片段都可在大肠杆菌中表达及由大肠杆菌分泌, 如此容许容易地生成大量的这些片段。可从上文讨论的噬菌体抗体库中分离抗体片段。或者, 可直接从大肠杆菌回收 Fab'-SH 片段并化学偶联以形成 F(ab')₂ 片段 (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167(1992))。依照另一种方法, 可直接从重组宿主细胞培养物分离 F(ab')₂ 片段。包含补救受体结合表位残基、具有延长的体内半衰期的 Fab 和 F(ab')₂ 片段记载于美国专利 No. 5,869,046。用于生成抗体片段的其它技术对于熟练从业人员将是显而易见的。在其它实施方案中, 选择的抗体是单链 Fv 片段 (scFv)。参见 W093/16185; 美国专利 No. 5,571,894; 及 5,587,458。Fv 和 sFv 是具有完整结合位点、缺少恒定区的唯一类型; 如此, 它们适于在体内使用时降低非特异性结合。可构建 sFv 融合蛋白以生成效应器蛋白质在 sFv 的氨基或羧基末端的融合物。参见 Antibody Engineering, Borrebaeck 编, 同上。抗体片段还可以是“线性抗体”, 例如如美国专利 No. 5,641,870 中所记载的。此类线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

[0273] 人源化抗体

[0274] 本发明涵盖人源化抗体。本领域知道用于人源化非人抗体的多种方法。例如, 人源化抗体可具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称为“输入”残基, 它们通常取自“输入”可变区。基本上可遵循 Winter 及其同事的方法进行人源化 (Jones et al., Nature 321:522-525(1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327(1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536(1988)), 即用非人高变区序列替代人抗体的对应序列。因此, 此类“人源化”抗体是嵌合抗体 (美国专利 4,816,567), 其中显著少于完整的人可变区用非人物种的相应序列替代。在实践中, 人源化抗体通常是如下人抗体, 其中有些高变区残基和可能的有些 FR 残基用啮齿类抗体类似位点的残基替代。

[0275] 用于制备人源化抗体的人轻链和重链可变区的选择对于降低抗原性是非常重要的。依照所谓的“最适 (best-fit)”方法, 用啮齿类抗体的可变区序列对已知人可变区序列

的整个文库进行筛选。然后选择与啮齿类最接近的人序列作为人源化抗体的人框架 (Sims et al., J. Immunol. 151 :2296(1993) ;Chothia et al., J. Mol. Biol. 196 :901(1987))。另一种方法使用由特定轻链或重链亚类 (subgroup) 的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架。相同框架可用于几种不同的人源化抗体 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 4285(1992) ;Presta et al., J. Immunol. 151 :2623(1993))。

[0276] 更为重要的是,抗体在人源化后保留对抗原的高亲和力和其它有利的生物学特性。为了达到此目的,依照一种方法,通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的过程来制备人源化抗体。通常可获得免疫球蛋白三维模型,这是本领域技术人员所熟悉的。还可获得图解和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。通过检查这些显示图像能分析残基在候选免疫球蛋白序列发挥功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样,可以从受体序列和输入序列中选出 FR 残基并组合,从而得到期望的抗体特征,诸如对靶抗原的亲合力升高。一般而言,高变区残基直接且最实质地参与影响对抗原的结合。

[0277] 人抗体

[0278] 本发明的人抗 EphB4 抗体可以通过如上所述联合选自人衍生噬菌体展示库的 Fv 克隆可变域序列与已知的人恒定域序列来构建。或者,可以通过杂交瘤方法来生成本发明的人单克隆抗 EphB4 抗体。用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系已有记载,例如 Kozbor J. Immunol., 133 :3001(1984) ;Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) ;及 Boerner et al., J. Immunol., 147 :86(1991)。

[0279] 例如,现在有可能生成在缺乏内源免疫球蛋白生成的情况下能够在免疫后生成人抗体完整全集的转基因动物(例如小鼠)。例如,已经记载了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合删除导致内源抗体生成的完全抑制。在此类种系突变小鼠中转移大量人种系免疫球蛋白基因将导致在抗原攻击后生成人抗体。参见例如 Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :2551(1993) ;Jakobovits et al., Nature 362 : 255-258(1993) ;Bruggermann et al., Year in Immunol. 7 :33(1993)。

[0280] 基因改组也可用于在体外自非人(例如啮齿类)抗体衍生人抗体,其中人抗体具有与起始非人抗体相似的亲和力和特异性。依照此方法,它也称为“表位印记”(epitope imprinting),如上所述通过噬菌体展示技术得到的非人抗体片段的重链或轻链可变区用人 V 结构域基因全集替换,产生非人链-人链 scFv 或 Fab 嵌合物群。用抗原进行的选择导致非人链/人链嵌合 scFv 或 Fab 的分离,其中人链在一级噬菌体展示克隆中消除相应的非人链后恢复了抗原结合位点,即表位决定(印记, imprint)人链配偶体的选择。在重复该过程以替换剩余非人链时,得到人抗体(参见 PCT W093/06213, 公开于 1993 年 4 月 1 日)。与传统的通过 CDR 移植进行的非人抗体的人源化不同,此技术提供完全人的抗体,它们不含非人起源的 FR 或 CDR 残基。

[0281] 双特异性抗体

[0282] 双特异性抗体指对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆抗体,优选人抗体或人源化抗体。在本案中,结合特异性之一针对 EphB4,结合特异性之另一针对任何其它抗原。例示性的双特异性抗体可结合 EphB4 蛋白质的两种不同表位。双特异性抗体还可用于

将细胞毒剂定位于表达 EphB4 的细胞。这些抗体拥有 EphB4 结合臂和结合细胞毒剂（例如肥皂草毒蛋白、抗干扰素- α 、长春花生物碱类、蓖麻毒蛋白 A 链、甲氨蝶呤或放射性同位素半抗原）的臂。可将双特异性抗体制备成全长抗体或抗体片段（例如 $F(ab')_2$ 双特异性抗体）。

[0283] 用于构建双特异性抗体的方法是本领域已知的。在传统上，双特异性抗体的重组生产基于两对免疫球蛋白重链-轻链的共表达，其中两种重链具有不同的特异性（Millstein and Cuello, *Nature* 305:537(1983)）。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配，这些杂交瘤（四源杂交瘤（quadroma））生成 10 种不同抗体分子的潜在混合物，其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行的正确分子的纯化相当麻烦且产物产量低。类似的规程披露于 W093/08829，公开于 1993 年 5 月 13 日及 Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655(1991)。

[0284] 依照一种不同且更优选的方法，将具有期望结合特异性（抗体-抗原结合位点）的抗体可变域与免疫球蛋白恒定域序列融合。优选的是，与包含至少部分铰链、 C_H2 和 C_H3 区的免疫球蛋白重链恒定域进行融合。优选在至少一种融合物中存在包含轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区（ C_H1 ）。将编码免疫球蛋白重链融合物和，在需要时，免疫球蛋白轻链的 DNA 插入分开的表达载体，并共转染到合适的宿主生物体中。在用于构建的三种多肽链比例不等时提供最佳产量的实施方案中，这为调整三种多肽链的相互比例提供了极大的灵活性。然而，在至少两种多肽链以相同比例表达导致高产量时或在该比例没有特别意义时，有可能将两种或所有三种多肽链的编码序列插入一个表达载体。

[0285] 在该方法的一个优选实施方案中，双特异性抗体由一个臂上具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链，和另一个臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对（提供第二结合特异性）构成。由于免疫球蛋白轻链仅在半双特异性分子中的存在提供了便利的分离途径，因此发现这种不对称结构便于将期望的双特异性复合物与不想要的免疫球蛋白链组合分开。该方法披露于 W094/04690。关于生成双特异性抗体的进一步详情参见例如 Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210(1986)。

[0286] 依照另一种方法，可改造一对抗体分子间的界面，以将从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分比最大化。优选的界面包含至少部分抗体恒定域 C_H3 结构域。在该方法中，将第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链用较大侧链（例如酪氨酸或色氨酸）替换。通过将大氨基酸侧链用较小氨基酸侧链（例如丙氨酸或苏氨酸）替换，在第二抗体分子的界面上产生与大侧链相同或相似大小的补偿性“空腔”。这提供了较之其它不想要的终产物诸如同二聚体提高异二聚体产量的机制。

[0287] 双特异性抗体包括交联或“异源偶联”抗体。例如，异源偶联物中的一种抗体可与亲合素偶联，另一种抗体与生物素偶联。例如，此类抗体已经建议用于将免疫系统细胞靶向不想要的细胞（美国专利 No. 4,676,980），及用于治疗 HIV 感染（W091/00360，W092/00373 和 EP03089）。可使用任何便利的交联方法来制备异源偶联抗体。合适的交联剂是本领域众所周知的，连同许多交联技术一起披露于美国专利 No. 4,676,980。

[0288] 文献中还记载了由抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如，可使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan et al., *Science* 229:81(1985) 记载了通过蛋白水解切割完整抗体以生成 $F(ab')_2$ 片段的规程。将这些片段在存在二硫醇络合剂亚砷酸钠的情况下

还原,以稳定邻近的二硫醇并防止分子间二硫键的形成。然后将产生的 Fab' 片段转变为硫代硝基苯甲酸酯 (TNB) 衍生物。然后将 Fab' -TNB 衍生物之一通过巯基乙胺的还原重新恢复成 Fab' -硫醇,并与等摩尔量的另一种 Fab' -TNB 衍生物混合,以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作酶的选择性固定化试剂。

[0289] 最新的进展便于从大肠杆菌直接回收 Fab' -SH 片段,这些片段可化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby et al., J. Exp. Med. 175 :217-225 (1992) 记载了完全人源化的双特异性抗体 F(ab')₂ 分子的生成。由大肠杆菌分开分泌每种 Fab' 片段,并在体外进行定向化学偶联以形成双特异性抗体。如此形成的双特异性抗体能够结合过表达 HER2 受体的细胞和正常人 T 细胞,以及触发人细胞毒性淋巴细胞针对人乳腺肿瘤靶物的溶解活性。

[0290] 还记载了从重组细胞培养物直接生成和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如,已使用亮氨酸拉链生成双特异性抗体。Kostelny et al., J. Immunol. 148 (5) : 1547-1553 (1992)。将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两种不同抗体的 Fab' 部分连接。抗体同二聚体在铰链区还原以形成单体,然后重新氧化以形成抗体异二聚体。这种方法也可用于生成抗体同二聚体。Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6444-6448 (1993) 记载的“双抗体”技术提供了构建双特异性抗体片段的替代机制。该片段包含通过接头相连的重链恒定域 (V_H) 和轻链恒定域 (V_L),所述接头太短使得同一条链上的两个结构域之间不能配对。因此,迫使一个片段上的 V_H 和 V_L 结构域与另一个片段上的互补 V_L 和 V_H 结构域配对,由此形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链 Fv (sFv) 二聚体构建双特异性抗体片段的另一种策略。参见 Gruber et al., J. Immunol. 152 : 5368 (1994)。

[0291] 设想了具有超过两个效价的抗体。例如,可制备三特异性抗体。Tutt et al., J. Immunol. 147 :60 (1991)。

[0292] 多价抗体

[0293] 多价抗体可以比二价抗体更快的受到表达该抗体所结合抗原的细胞的内在化 (和 / 或异化)。本发明的抗体可以是可容易的通过编码抗体多肽链的核酸的重组表达而生成的、具有三个或更多抗原结合位点 (例如四价抗体) 的多价抗体 (IgM 类别以外的)。多价抗体可包含二聚化结构域和三个或更多抗原结合位点。优选的二聚化结构域包含 (或由其组成) Fc 区或铰链区。在这种情况下,抗体将包含 Fc 区及 Fc 区氨基末端的三个或更多抗原结合位点。本文中优选的多价抗体包含 (或由其组成) 三个至约八个,但优选四个抗原结合位点。多价抗体包含至少一条多肽链 (且优选两条多肽链),其中所述多肽链包含两个或多个可变域。例如,多肽链可包含 VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc,其中 VD1 是第一可变域,VD2 是第二可变域,Fc 是 Fc 区的一条多肽链,X1 和 X2 代表氨基酸或多肽,而 n 是 0 或 1。例如,多肽链可包含 :VH-CH1-柔性接头-VH-CH1-Fc 区链 ;或 VH-CH1-VH-CH1-Fc 区链。本文中的多价抗体优选进一步包含至少两条 (且优选四条) 轻链可变域多肽。本文中的多价抗体可包含例如约两条至约八条轻链可变域多肽。本文设想的轻链可变域多肽包含轻链可变域,且任选进一步包含 CL 结构域。

[0294] 抗体变体

[0295] 在有些实施方案中,设想了本文所述抗体的氨基酸序列修饰。例如,可能希望改进抗体的结合亲和力和 / 或其它生物学特性。抗体的氨基酸序列变体是通过将适宜的核苷酸

变化引入抗体核酸或通过肽合成制备的。此类修饰包括例如抗体氨基酸序列内的残基删除和 / 或插入和 / 或替代。可进行任何删除、插入和替代组合以获得最终的构建物,倘若最终的构建物具有期望的特征。可在制备序列时将氨基酸改变引入主题抗体氨基酸序列。

[0296] 可用于鉴定抗体中作为优选诱变位置的某些残基或区域的方法有“丙氨酸扫描诱变”,如 Cunningham and Wells, Science244 :1081-1085(1989) 中所述。这里,鉴定一个残基或一组靶残基(如带电荷的残基,诸如精氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸和谷氨酸)并用中性或带负电荷的氨基酸(最优选丙氨酸或多聚丙氨酸)替代,以影响氨基酸与抗原的相互作用。然后通过在对替代位点引入更多或其它变体,推敲对替代展示功能敏感性的氨基酸位置。由此,尽管用于引入氨基酸序列变异的位点是预先决定的,然而突变本身的本质不必预先决定。例如,为了分析指定位点处突变的后果,在靶密码子或区域进行丙氨酸扫描或随机诱变,并对所表达免疫球蛋白筛选期望的活性。

[0297] 氨基酸序列插入包括氨基和 / 或羧基末端的融合,长度范围由一个残基至包含上百或更多残基的多肽,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有 N 端甲硫氨酰残基的抗体或与细胞毒性多肽融合的抗体。抗体分子的其它插入变体包括将抗体的 N 或 C 端与酶(如用于 ADEPT)或延长抗体血清半衰期的多肽融合。

[0298] 多肽的糖基化典型的或是 N- 连接的或是 O- 连接的。N- 连接指碳水化合物模块附着于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺 -X- 丝氨酸和天冬酰胺 -X- 苏氨酸(其中 X 是除脯氨酸外的任何氨基酸)是将碳水化合物模块酶促附着于天冬酰胺侧链的识别序列。如此,多肽中这两种三肽序列任一的存在产生了潜在的糖基化位点。O- 连接的糖基化指将糖类 N- 乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一附着于羟基氨基酸,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但也可使用 5- 羟脯氨酸或 5- 羟赖氨酸。

[0299] 向抗体中添加糖基化位点可通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个上述三肽序列而便利的完成(用于 N- 连接的糖基化位点)。所述改变还可通过向原始抗体的序列中添加或替代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行(用于 O- 连接的糖基化位点)。

[0300] 若抗体包含 Fc 区,则可改变附着其上的碳水化合物。例如,美国专利申请 US2003/0157108(Presta, L.) 中记载了有缺乏岩藻糖的成熟碳水化合物结构附着于抗体 Fc 区的抗体。还可参见 US2004/0093621(Kyowa Hakko KogyoCo., Ltd.)。W02003/011878(Jean-Mairet 等人)和美国专利第 6,602,684 号(Umana 等人)中提到了在附着于抗体 Fc 区的碳水化合物中有等分 N- 乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 的抗体。W01997/30087(Patel 等人)中报告了在附着于抗体 Fc 区的寡糖中有至少一个半乳糖残基的抗体。关于有更改碳水化合物附着于其 Fc 区的抗体还可参见 W01998/58964(Raju, S.) 和 W01999/22764(Raju, S.)。关于具有改良糖基化的抗原结合分子还可参见 US2005/0123546(Umana et al.)。

[0301] 本文中的优选糖基化变体包含 Fc 区,其中附着于 Fc 区的碳水化合物结构缺乏岩藻糖。此类变体具有改进的 ADCC 功能。任选的是,Fc 区还包含进一步改进 ADCC 的一个或多个氨基酸替代,例如 Fc 区位置 298、333 和 / 或 334 处的替代(Eu 残基编号方式)。涉及“脱岩藻糖型”或“岩藻糖缺乏型”抗体的出版物的例子包括:US2003/0157108;W02000/61739;W02001/29246;US2003/0115614;US2002/0164328;US2004/0093621;US2004/0132140;US2004/0110704;US2004/0110282;US2004/0109865;W02003/085119;W02003/084570;

W02005/035586 ; W02005/035778 ; W02005/053742 ; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336 : 1239-1249 (2004) ; Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87 : 614 (2004)。生成脱岩藻糖化抗体的细胞系的例子包括蛋白质岩藻糖化缺陷的 Lec13CHO 细胞 (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249 : 533-545 (1986) ; 美国专利申请号 US2003/0157108A1, Presta, L ; 及 W02004/056312A1, Adams et al., 尤其是实施例 11) 和敲除细胞系, 诸如 α -1,6-岩藻糖转移酶基因, FUT8, 敲除的 CHO 细胞 (Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87 : 614 (2004))。

[0302] 另一类变体是氨基酸替代变体。这些变体在抗体分子中有至少一个氨基酸残基用不同残基替代。最有趣进行替代诱变的位点包括高变区, 但是也设想了 FR 改变。表 1 中“优选替代”栏显示了保守替代。如果此类替代导致生物学活性变化, 那么可导入表 1 中称为“例示替代”的更实质变化, 或如下文参照氨基酸分类进一步所述, 并筛选产物。

[0303] 表 1

[0304]

原始残基	例示替代	优选替代
Ala (A)	Val ; Leu ; Ile	Val
Arg (R)	Lys ; Gln ; Asn	Lys
Asn (N)	Gln ; His ; Asp, Lys ; Arg	Gln
Asp (D)	Glu ; Asn	Glu
Cys (C)	Ser ; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn ; Glu	Asn
Glu (E)	Asp ; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn ; Gln ; Lys ; Arg	Arg
Ile (I)	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe ; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸 ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Ile
Lys (K)	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met (M)	Leu ; Phe ; Ile	Leu
Phe (F)	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val ; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ; Phe ; Thr ; Ser	Phe
Val (V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正亮氨酸	Leu

[0305] 对抗体生物学特性的实质性修饰可通过选择对维持以下方面的效果差异显著的替代来实现 : (a) 替代区域中多肽主链的结构, 例如 (折叠) 片或螺旋构象, (b) 靶位点处分子的电荷或疏水性, 或 (c) 侧链的体积。

[0306] 根据共同的侧链特性, 天然存在残基可如下分组 :

[0307] (1) 疏水性的 : 正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile ;

[0308] (2) 中性、亲水性的 : Cys、Ser、Thr、Asn、Gln ;

[0309] (3) 酸性的 : Asp、Glu ;

[0310] (4) 碱性的 : His、Lys、Arg ;

[0311] (5) 影响链取向的残基 : Gly、Pro ;

[0312] (6) 芳香族的 : Trp、Tyr、Phe。

[0313] 非保守替代需要用这些类别之一的成员替换另一个类别的。

[0314] 一类替代变体涉及替代亲本抗体（例如人源化或人抗体）的一个或多个高变区残基。通常，选择用于进一步开发的所得变体相对于产生它们的亲本抗体将具有改良的生物学特性。用于生成此类替代变体的一种便利方法涉及使用噬菌体展示的亲和力成熟。简而言之，将数个高变区位点（例如 6-7 个位点）突变，在各个位点产生所有可能的氨基酸替代。如此生成的抗体展示在丝状噬菌体颗粒上，作为与各个颗粒内包装的 M13 基因 III 产物的融合物。然后如本文所公开的对噬菌体展示的变体筛选其生物学活性（例如结合亲和力）。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点，可进行丙氨酸扫描诱变以鉴定对抗原结合具有重要贡献的高变区残基。或者 / 另外，分析抗原 - 抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体和抗原之间的接触点可能是有益的。所述接触残基及邻近残基是依照本文详述的技术进行替代的候选位点。一旦产生这样的变体，如本文所述对该组变体进行筛选，可选择在一种或多种相关测定法中具有优良特性的抗体用于进一步的开发。

[0315] 编码抗体氨基酸序列变体的核酸分子可通过本领域知道的多种方法来制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离（在天然发生氨基酸序列变体的情况中），或者通过对较早制备的变体或非变异型式的抗体进行寡核苷酸介导的（或定点）诱变、PCR 诱变和盒式诱变来制备。

[0316] 可能希望在本发明免疫球蛋白多肽的 Fc 区中引入一处或多处氨基酸修饰，由此生成 Fc 区变体。Fc 区变体可包括在一个或多个氨基酸位置（包括铰链半胱氨酸）包含氨基酸修饰（如替代）的人 Fc 区序列（如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区）。

[0317] 依照此描述和本领域的教导，设想了在有些实施方案中，本发明方法中所使用的抗体与野生型对应抗体相比可在例如 Fc 区中包含一处或多处改变。与它们的野生型对应物相比，这些抗体仍将基本上保留治疗功效所需要的相同特性。例如，认为可在 Fc 区中进行将会导致 C1q 结合和 / 或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 改变（即或是增强或是削弱）的某些改变，例如 W099/51642 中所述。还可参见关注 Fc 区变体其它实例的 Duncan and Winter, Nature 322 :738-40 (1988) ; 美国专利 5,648,260 ; 美国专利 5,624,821 ; 及 W094/29351。

[0318] W000/42072 (Presta) 和 W02004/056312 (Lowman) 记载了对 FcR 的结合提高或降低的抗体变体。在此明确收入这些专利出版物的内容作为参考。还可参见 Shields et al. J. Biol. Chem. 9 (2) :6591-6604 (2001)。半衰期延长且对新生儿 Fc 受体 (FcRn)（它负责将母体 IgG 转移给胎儿）(Guyer et al., J. Immunol. 117 :587 (1976) 及 Kim et al., J. Immunol. 24 :249 (1994)) 的结合改良的抗体记载于 US2005/0014934A1 (Hinton et al.)。这些抗体包含具有一处或多处改进 Fc 区与 FcRn 结合的替代的 Fc。具有改变的 Fc 区氨基酸序列且 C1q 结合能力升高或降低的多肽变体记载于美国专利 No. 6,194,551B1, W099/51642。在此明确收入这些专利出版物的内容作为参考。还可参见 Idusogie et al. J. Immunol. 164 :4178-4184 (2000)。

[0319] 抗体衍生物

[0320] 可进一步修饰本发明的抗体以包含本领域知道的且易于获得的额外非蛋白质性质部分。优选的是，适于抗体衍生化的部分是水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇 (PEG)、乙二醇 / 丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、右旋糖苷、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚 -1,3- 二氧戊环、聚 -1,3,6- 三噁烷、乙烯 / 马来酸酐共聚物、聚氨

基酸（均聚物或随机共聚物）、和右旋糖苷或聚（n- 乙烯吡咯烷酮）聚乙二醇、丙二醇均聚物、环氧丙烷 / 环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇（如甘油）、聚乙烯醇及其混合物。由于其在水中的稳定性，聚乙二醇丙醛在生产中可能具有优势。聚合物可以是任何分子量，而且可以是分支的或不分支的。附着到抗体上的聚合物数目可以变化，而且如果附着了超过一个聚合物，那么它们可以是相同或不同的分子。一般而言，可根据下列考虑来确定用于衍生化的聚合物的数目和 / 或类型，包括但不限于待改进抗体的具体特性或功能、抗体衍生物是否将用于指定条件下的治疗等。

[0321] 筛选具有期望特性的抗体

[0322] 可通过本领域知道的多种测定法对本发明的抗体表征它们的物理 / 化学特性和生物学功能。在有些实施方案中，抗体表征了以下一项或多项：降低或阻断 EphB4 活化，降低或阻断 EphB4 下游分子信号传导，降低或阻断 EphB4 配体活化，降低或阻断 EphB4 配体下游分子信号传导，破坏或阻断配体（例如 ephrin-B1、ephrin-B2、和 / 或 ephrin-B3）与 EphB4 的结合、EphB4 磷酸化和 / 或 EphB4 多聚化、和 / 或 EphB4 配体磷酸化，和 / 或治疗和 / 或预防肿瘤、细胞增殖性病症或癌症，和 / 或治疗或预防与 EphB4 表达和 / 或活性（诸如 EphB4 表达和 / 或活性升高）有关的病症。

[0323] 可通过一系列测定法进一步鉴定纯化的抗体，包括但不限于 N 端测序、氨基酸分析、非变性大小排阻高压液相层析（HPLC）、质谱、离子交换层析和木瓜蛋白酶消化。

[0324] 在本发明的某些实施方案中，对本文中所生成的抗体分析它们的生物学活性。在有些实施方案中，对本发明的抗体测试它们的抗原结合活性。本领域知道的且可用于本文的抗原结合测定法包括但不限于使用诸如 Western 印迹、放射免疫测定法、ELISA（酶联免疫吸附测定法）、“三明治”免疫测定法、免疫沉淀测定法、荧光免疫测定法和蛋白 A 免疫测定法等技术的任何直接或竞争性结合测定法。下文在实施例部分中提供了例示性的抗原结合测定法。

[0325] 在又一个实施方案中，本发明提供了与 30.35、30.35.1D2 和 / 或 30.35.2D8 抗体竞争 EphB4 结合的抗 EphB4 单克隆抗体。此类竞争性抗体包括所识别的 EphB4 表位与抗体 30.35、30.35.1D2 和 / 或 30.35.2D8 所识别的 EphB4 表位相同或交叠的抗体。此类竞争性抗体可以通过对抗 EphB4 杂交瘤上清液筛选与经过标记的 30.35、30.35.1D2 和 / 或 30.35.2D8 抗体竞争对固定化 EphB4 的结合来得到。与含有无关抗体或不含抗体的对照结合混合物中检测到的结合的、经过标记的抗体的量相比，含有竞争性抗体的杂交瘤上清液会减少测试竞争结合混合物中检测到的结合的、经过标记的抗体的量。本文所述任何竞争结合测定法都适用于前述规程。

[0326] 另一方面，本发明提供了包含 30.35、30.35.1D2 或 30.35.2D8 抗体的一个或多个（诸如 2、3、4、5、和 / 或 6 个）HVR 的抗 EphB4 单克隆抗体。包含 30.35、30.35.1D2 和 / 或 30.35.2D8 的一个或多个 HVR 的抗 EphB4 单克隆抗体可以如下来构建，即如上所述将 30.35、30.35.1D2 和 / 或 30.35.2D8 的一个或多个 HVR 移植到模板抗体序列上，例如最接近亲本抗体相应鼠序列的人抗体序列或特定亲本抗体轻链或重链亚组所有人抗体的共有序列，并在重组宿主细胞中表达所得嵌合轻链和 / 或重链可变区序列，有或无伴随的恒定区序列。

[0327] 具有本文所述独特特性的本发明抗 EphB4 抗体可以如下得到，即通过任何便利的

方法对抗 EphB4 杂交瘤克隆筛选期望特性。例如,如果需要阻断或不阻断 EphB4 配体结合 EphB4 的抗 EphB4 单克隆抗体,那么可以在结合竞争测定法中测试候选抗体,诸如竞争性结合 ELISA,其中板孔用 EphB4 包被,将目的 Eph 配体过量的抗体溶液铺到经过包被的板上,并酶法检测结合的抗体,例如使结合的抗体接触偶联有 HRP 的抗 Ig 抗体或生物素化抗 Ig 抗体并显现 HRP 显色反应,例如通过用链霉亲和素-HRP 和 / 或过氧化氢使板显色并通过分光光度法用 ELISA 读板仪在 490nm 检测 HRP 显色反应。

[0328] 如果需要抑制或活化 EphB4 活性的抗 EphB4 抗体,那么可以在 EphB4 磷酸化测定法中测试候选抗体。此类测定法是本领域已知的,实施例部分中描述了一个这样的测定法。

[0329] 如果需要抑制细胞生长的抗 EphB4 抗体,那么可以在测量细胞生长抑制的体外和 / 或体内测定法中测试候选抗体。此类测定法是本领域已知的,本文中有进一步的描述和例示。

[0330] 在一个实施方案中,本发明设想了具有一些但非所有效应器功能的改良抗体,这使得它在抗体体内半衰期是重要的但某些效应器功能(诸如补体和 ADCC)是不必要的或有害的许多应用中成为期望的候选物。在某些实施方案中,测量所生成免疫球蛋白的 Fc 活性以确保只保留了期望的特性。可进行体外和 / 或体内细胞毒性测定法以确认 CDC 和 / 或 ADCC 活性的降低 / 消减。例如,可进行 Fc 受体 (FcR) 结合测定法以确认抗体缺乏 Fc γ R 结合(因此有可能缺乏 ADCC 活性)但保留 FcRn 结合能力。介导 ADCC 的主要细胞, NK 细胞,只表达 Fc γ RIII,而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9 :457-92(1991) 第 464 页表 3 总结了造血细胞上的 FcR 表达。美国专利 No. 5,500,362 或 5,821,337 中记载了用于评估目的分子的 ADCC 活性的体外测定法的实例。可用于此类测定法的效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者 / 另外,可在体内评估目的分子的 ADCC 活性,例如在动物模型中,诸如 Clynes et al., PNAS(USA) 95 :652-656(1998) 中所披露的。还可进行 C1q 结合测定法以确认抗体不能结合 C1q 且因此缺乏 CDC 活性。为了评估补体激活,可进行 CDC 测定法,例如如 Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202 :163(1996) 中所述。还可使用本领域知道的方法进行 FcRn 结合和体内清除 / 半衰期测定,例如实施例部分中所描述的。

[0331] 载体、宿主细胞和重组方法

[0332] 为了重组生产本发明的抗体,分离编码它的核酸,并将其插入可复制载体,用于进一步克隆(DNA 扩增)或表达。可使用常规流程容易的分离编码抗体的 DNA 并测序(如使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异结合的寡核苷酸探针)。可利用许多载体。载体的选择部分取决于将要使用的宿主细胞。通常,优选的宿主细胞是原核或真核(通常是哺乳动物)起源的。应当领会,任何同种型的恒定区可用于此目的,包括 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE 恒定区,而且此类恒定区可以从任何人或动物物种获得。

[0333] a. 使用原核宿主细胞生成抗体:

[0334] i. 载体构建

[0335] 可使用标准重组技术来获得编码本发明抗体多肽构件的多核苷酸序列。可从抗体生成细胞诸如杂交瘤细胞分离期望的多核苷酸序列并测序。或者,可使用核苷酸合成仪或 PCR 技术合成多核苷酸。一旦得到,将编码多肽的序列插入能够在原核宿主中复制并表达异源多核苷酸的重组载体。为了本发明,可使用本领域可获得的且知道的许多载体。适宜载

体的选择将主要取决于将要插入载体的核酸的大小和将要用载体转化的具体宿主细胞。根据其功能（扩增或表达异源多核苷酸，或二者兼之）及其与它在其中驻留的具体宿主细胞的相容性，每种载体含有多种构件。载体构件通常包括但不限于复制起点、选择标志基因、启动子、核糖体结合位点（RBS）、信号序列、异源核酸插入片段、和转录终止序列。

[0336] 一般而言，与宿主细胞一起使用的质粒载体包含衍生自与这些宿主相容物种的复制子和控制序列。载体通常携带复制位点，以及能够在转化细胞中提供表型选择的标志序列。例如，通常用衍生自大肠杆菌物种的质粒 pBR322 转化大肠杆菌。pBR322 包含编码氨苄青霉素（Amp）和四环素（Tet）抗性的基因，由此提供轻松鉴定转化细胞的手段。pBR322、其衍生物、或其它微生物质粒或噬菌体还可包含或经修饰而包含可被微生物生物体用于表达内源蛋白质的启动子。Carter 等人，美国专利 5,648,237 中详细记载了用于表达特定抗体的 pBR322 衍生物的实例。

[0337] 另外，可将包含与宿主微生物相容的复制子和控制序列的噬菌体载体用作这些宿主的转化载体。例如，可使用噬菌体诸如 λ GEM. TM. -11 来构建可用于转化易感宿主细胞诸如大肠杆菌 LE392 的重组载体。

[0338] 本发明的表达载体可包含两种或多种启动子-顺反子对，它们编码每一种多肽构件。启动子是位于顺反子上游（5'）的非翻译调控序列，它调控顺反子的表达。原核启动子通常分成两类，诱导型的和组成性的。诱导型启动子指响应培养条件的变化（如营养物的存在与否或温度变化）而启动受其控制的顺反子的升高水平转录的启动子。

[0339] 众所周知受到多种潜在宿主细胞识别的大量启动子。通过限制酶消化切下源 DNA 中的启动子并将分离的启动子序列插入本发明的载体，由此可将选择的启动子与编码轻链或重链的顺反子 DNA 可操作连接。天然启动子序列和许多异源启动子都可用于指导靶基因的扩增和 / 或表达。在有些实施方案中，使用异源启动子，因为与天然靶多肽启动子相比，它们通常容许所表达靶基因的更高转录和更高产量。

[0340] 适用于原核宿主的启动子包括 PhoA 启动子、 β -半乳糖苷酶和乳糖启动子系统、色氨酸（trp）启动子系统、和杂合启动子诸如 tac 或 trc 启动子。然而，在细菌中有功能的其它启动子（诸如其它已知的细菌或噬菌体启动子）也是合适的。它们的核苷酸序列已经发表，由此熟练工作人员能够使用提供任何所需限制位点的接头或衔接头将它们与编码靶轻链和重链的顺反子可操作连接（Siebenlist et al., Cell 20:269 (1980)）。

[0341] 在本发明的一个方面，重组载体内的每个顺反子都包含指导所表达多肽穿膜转运的分泌信号序列构件。一般而言，信号序列可以是载体的构件，或者它可以是插入载体的靶多肽 DNA 的一部分。为了本发明而选择的信号序列应当是受到宿主细胞识别并加工（即被信号肽酶切除）的信号序列。对于不识别并加工异源多肽的天然信号序列的原核宿主细胞，将信号序列用选自例如下组的原核信号序列替代：碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp、或热稳定的肠毒素 II (STII) 前导序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA 和 MBP。在本发明的一个实施方案中，表达系统的两个顺反子中都使用的信号序列是 STII 信号序列或其变体。

[0342] 在另一方面，依照本发明的免疫球蛋白的生成可在宿主细胞的细胞质中发生，因此不需要在每个顺反子内存在分泌信号序列。在那点上，免疫球蛋白轻链和重链在细胞质内表达、折叠和装配而形成功能性免疫球蛋白。某些宿主菌株（如大肠杆菌 trxB⁻ 菌株）提供有利于二硫键形成的细胞质条件，从而容许所表达蛋白质亚基的正确折叠和装配。Proba

and Pluckthun, Gene 159 :203(1995))。

[0343] 适于表达本发明抗体的原核宿主细胞包括古细菌 (Archaeobacteria) 和真细菌 (Eubacteria), 诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体。有用细菌的实例包括埃希氏菌属 (*Escherichia*) (如大肠埃希氏菌 *E. coli*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) (如枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*)、肠杆菌属 (*Enterobacteria*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) (如铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa*) 物种、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescans*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、变形菌属 (*Proteus*)、志贺氏菌属 (*Shigella*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*)、透明颤菌属 (*Vitreoscilla*)、或副球菌属 (*Paracoccus*)。在一个实施方案中, 使用革兰氏阴性细胞。在一个实施方案中, 使用大肠杆菌细胞作为本发明的宿主。大肠杆菌菌株的实例包括菌株 W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, 第 2 卷, Washington, D. C., 美国微生物学学会, 1987, 第 1190-1219 页; ATCC 保藏号 27, 325) 及其衍生物, 包括具有基因型 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41kanR 的菌株 33D3 (美国专利号 5, 639, 635)。其它菌株及其衍生物, 诸如大肠杆菌 294 (ATCC31, 446)、大肠杆菌 B、大肠杆菌 λ 1776 (ATCC31, 537) 和大肠杆菌 RV308 (ATCC31, 608) 也是合适的。这些实例只是例示而非限制。本领域知道用于构建具有指定基因型的任何上述细菌衍生物的方法, 参见例如 Bass et al., Proteins 8 : 309-314 (1990)。通常必需考虑复制子在细菌细胞中的可复制性来选择适宜的细菌。例如, 在使用众所周知的质粒诸如 pBR322、pBR325、pACYC177 或 pKN410 来提供复制子时, 大肠杆菌、沙雷氏菌属、或沙门氏菌属物种可能适于用作宿主。通常, 宿主细胞应当分泌最小量的蛋白水解酶, 而且可能希望在细胞培养中掺入额外的蛋白酶抑制剂。

[0344] ii. 抗体生成

[0345] 用上述表达载体转化宿主细胞, 并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当改动的常规营养培养基中进行培养。

[0346] 转化即将 DNA 导入原核宿主, 使得 DNA 能够进行复制, 或是作为染色体外元件或是通过染色体成分。根据所用宿主细胞, 使用适于这些细胞的标准技术进行转化。采用氯化钙的钙处理通常用于具有坚固细胞壁屏障的细菌细胞。另一种转化方法采用聚乙二醇 / DMSO。使用的还有一种技术是电穿孔。

[0347] 在本领域知道的且适于培养选定宿主细胞的培养基中培养用于生成本发明多肽的原核细胞。合适培养基的实例包括添加了必需营养补充物的 LB 培养基 (Luria broth)。在有些实施方案中, 培养基还含有根据表达载体的构建而选择的选择剂, 以选择性容许包含表达载体的原核细胞生长。例如, 向用于培养表达氨苄青霉素抗性基因的细胞的培养基中添加氨苄青霉素。

[0348] 除了碳、氮、和无机磷酸盐来源以外, 还可含有适当浓度的任何必需补充物, 或是单独加入或是作为与另一种补充物或培养基的混合物, 诸如复合氮源。任选的是, 培养基可含有一种或多种选自下组的还原剂: 谷胱甘肽、半胱氨酸、胱胺、巯基乙酸盐 / 酯、二硫赤藓糖醇和二硫苏糖醇。

[0349] 在合适的温度培养原核宿主细胞。例如, 对于培养大肠杆菌, 优选的温度范围是约 20°C 至约 39°C, 更优选约 25°C 至约 37°C, 甚至更优选约 30°C。主要取决于宿主生物体, 培养基的 pH 可以是范围为约 5 至约 9 的任何 pH。对于大肠杆菌, pH 优选约 6.8 至约 7.4, 更

优选约 7.0。

[0350] 如果本发明的表达载体中使用诱导型启动子,那么在适于激活启动子的条件下诱导蛋白质表达。在本发明的一个方面,使用 PhoA 启动子来控制多肽的转录。因此,为了诱导,在磷酸盐限制培养基中培养经过转化的宿主细胞。优选的是,磷酸盐限制培养基是 C. R. A. P 培养基(参见例如 Simmons et al., J. Immunol. Methods 263 :133-147 (2002))。根据所采用的载体构建物,可采用多种其它诱导物,正如本领域所知道的。

[0351] 在一个实施方案中,所表达的本发明多肽分泌到宿主细胞的周质中并从中回收。蛋白质回收通常涉及破坏微生物,通常通过诸如渗透压震扰 (osmotic shock)、超声处理或裂解等手段。一旦细胞遭到破坏,可通过离心或过滤清除细胞碎片或整个细胞。可以通过例如亲和树脂层析进一步纯化蛋白质。或者,蛋白质可能转运到培养液中并从中分离。可从培养液清除细胞,并将培养物上清液过滤和浓缩,用于进一步纯化所生成蛋白质。可使用普遍知道的方法诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和 Western 印迹分析进一步分离和鉴定所表达蛋白质。

[0352] 在本发明的一个方面,通过发酵过程大量进行抗体生产。多种大规模补料 - 分批发酵流程可用于生产重组蛋白。大规模发酵具有至少 1000 升的容量,优选约 1,000 至 100,000 升的容量。这些发酵罐使用搅拌器叶轮来分配氧和养分,尤其是葡萄糖(优选的碳源/能源)。小规模发酵通常指在体积容量不超过约 100 升的发酵罐中进行的发酵,范围可以是约 1 升至约 100 升。

[0353] 在发酵过程中,通常在将细胞在合适条件下培养至期望密度(如 OD₅₅₀ 约 180-220,在此阶段细胞处于早期稳定期)后启动蛋白质表达的诱导。根据所采用的载体构建物,可使用多种诱导物,正如本领域知道的和上文描述的。可在诱导前将细胞培养更短的时间。通常将细胞诱导约 12-50 小时,但是可使用更长或更短的诱导时间。

[0354] 为了提高本发明多肽的产量和质量,可修改多项发酵条件。例如,为了改善所分泌抗体多肽的正确装配和折叠,可使用过度表达伴侣蛋白诸如 Dsb 蛋白 (DsbA、DsbB、DsbC、DsbD 和 / 或 DsbG) 或 FkpA(具有伴侣活性的一种肽基脯氨酰 - 顺式,反式 - 异构酶)的额外载体来共转化宿主原核细胞。已经证明伴侣蛋白促进在细菌宿主细胞中生成的异源蛋白质的正确折叠和溶解度。Chen et al., J. Biol. Chem. 274 :19601-19605 (1999); Georgiou 等人,美国专利 6,083,715;Georgiou 等人,美国专利 6,027,888;Bothmann and Pluckthun, J. Biol. Chem. 275 :17100-17105 (2000); Ramm and Pluckthun, J. Biol. Chem. 275 :17106-17113 (2000); Arie et al., Mol. Microbiol. 39 :199-210 (2001))。

[0355] 为了将所表达异源蛋白质(尤其是对蛋白水解敏感的异源蛋白质)的蛋白水解降至最低,可将蛋白水解酶缺陷的某些宿主菌株用于本发明。例如,可修饰宿主细胞菌株,在编码已知细菌蛋白酶的基因中进行遗传突变,诸如蛋白酶 III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶 I、蛋白酶 Mi、蛋白酶 V、蛋白酶 VI 及其组合。可以获得有些大肠杆菌蛋白酶缺陷菌株,参见例如 Joly et al., (1998) 见上文;Georgiou 等人,美国专利 5,264,365;Georgiou 等人,美国专利 5,508,192;Hara et al., Microbial Drug Resistance 2 :63-72 (1996)。

[0356] 在一个实施方案中,在本发明的表达系统中使用蛋白水解酶缺陷且经过过度表达一种或多种伴侣蛋白的质粒转化的大肠杆菌菌株作为宿主细胞。

[0357] iii. 抗体纯化

[0358] 可采用本领域知道的标准蛋白质纯化方法。下面的流程是合适纯化流程的例示：免疫亲和或离子交换柱上的分馏、乙醇沉淀、反相 HPLC、硅土或阳离子交换树脂诸如 DEAE 上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀、和使用例如 Sephadex G-75 的凝胶过滤。

[0359] 在一个方面，将固定在固相上的蛋白 A 用于本发明全长抗体产物的免疫亲和纯化。蛋白 A 是来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的 41kD 细胞壁蛋白质，它以高亲和力结合抗体 Fc 区。Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62 :1-13(1983)。蛋白 A 固定其上的固相优选具有玻璃或石英表面的柱子，更优选可控孔径玻璃柱或硅酸柱。在有些应用中，柱子以诸如甘油等试剂包被，试图防止污染物的非特异粘附。

[0360] 作为纯化的第一步，将衍生自如上所述细胞培养物的制备物施加到蛋白 A 固定化固相上，使得目的抗体特异结合蛋白 A。然后清洗固相以清除与固相非特异结合的污染物。最后通过洗脱从固相回收目的抗体。

[0361] b. 使用真核宿主细胞生成抗体：

[0362] 载体构件通常包括但不限于如下一种或多种：信号序列、复制起点、一种或多种标志基因、增强子元件、启动子、和转录终止序列。

[0363] (i) 信号序列构件

[0364] 在真核宿主细胞中使用的载体还可在目的成熟蛋白质或多肽的 N 端包含信号序列或具有特异切割位点的其它多肽。优选受到宿主细胞识别并加工（即被信号肽酶切除）的异源信号序列。在哺乳动物细胞表达中，可利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导，例如单纯疱疹病毒 gD 信号。

[0365] 将这些前体区的 DNA 连接到编码抗体的 DNA 的读码框中。

[0366] (ii) 复制起点

[0367] 通常，哺乳动物表达载体不需要复制起点构件。例如，SV40 起点通常可能只因包含早期启动子才使用。

[0368] (iii) 选择基因构件

[0369] 表达和克隆载体可包含选择基因，也称为选择标志。典型的选择基因编码如下蛋白质：(a) 赋予对抗生素或其它毒素的抗性，如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素；(b) 补足相应的营养缺陷；或 (c) 提供不能从复合培养基获得的关键营养物。

[0370] 选择方案的一个实例利用药物来阻滞宿主细胞的生长。经异源基因成功转化的那些细胞生成赋予药物抗性的蛋白质，因而幸免于选择方案。此类显性选择的实例使用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0371] 适于哺乳动物细胞的选择标志的另一个实例是能够鉴定有能力摄取抗体核酸的细胞的选择标志，诸如 DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白 I 和 II 优选灵长类金属硫蛋白基因、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

[0372] 例如，首先通过将所有转化子在含有甲氨蝶呤 (Mtx, DHFR 的一种竞争性拮抗剂) 的培养基中进行培养来鉴定经 DHFR 选择基因转化的细胞。在采用野生型 DHFR 时，适宜的宿主细胞是 DHFR 活性缺陷的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系（如 ATCC CRL-9096）。

[0373] 或者，可通过在含有针对选择标志的选择剂诸如氨基糖苷抗生素如卡那霉素、新霉素或 G418 的培养基中培养细胞来选择经编码抗体、野生型 DHFR 蛋白、和另一种选择标志诸如氨基糖苷 3' - 磷酸转移酶 (APH) 的 DNA 序列转化或共转化的宿主细胞（特别是包含

内源 DHFR 的野生型宿主)。参见美国专利 4,965,199。

[0374] (iv) 启动子构件

[0375] 表达和克隆载体通常包含受到宿主生物体识别的启动子,且与抗体多肽核酸可操作连接。已知真核细胞的启动子序列。事实上,所有真核基因都具有富含 AT 区,它位于起始转录的位点上游约 25 至 30 个碱基处。在许多基因的转录起点上游 70 至 80 个碱基处发现的另一种序列是 CNCAAT 区,其中 N 可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的 3' 端是 AATAAA 序列,它可能是向编码序列的 3' 端添加聚腺苷酸 (polyA) 尾的信号。所有这些序列合适的插入真核表达载体中。

[0376] 在哺乳动物宿主细胞中由载体转录抗体多肽受到例如从病毒(诸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(诸如 2 型腺病毒)、牛乳头瘤病毒、禽类肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒、和猿猴病毒 40(SV40))基因组获得的、来自异源哺乳动物启动子(如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子)的、来自热休克启动子的启动子的控制,倘若这些启动子与宿主细胞系统相容的话。

[0377] 方便的以 SV40 限制性片段的形式获得 SV40 病毒的早期和晚期启动子,该片段还包含 SV40 病毒复制起点。方便的以 HindIII 限制性片段的形式获得人巨细胞病毒的立即早期启动子。美国专利 4,419,446 中公开了使用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达 DNA 的系统。美国专利 4,601,978 中记载了该系统的一种修改或者,可使用劳氏肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

[0378] (v) 增强子元件构件

[0379] 常常通过在载体中插入增强子序列来提高高等真核细胞对编码本发明抗体多肽的 DNA 的转录。现在知道来自哺乳动物基因(球蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、 α -胎蛋白和胰岛素)的许多增强子序列。然而,通常使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括 SV40 复制起点晚期侧的增强子(bp100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒复制起点晚期侧的增强子、和腺病毒增强子。关于激活真核启动子的增强元件还可参见 Yaniv, Nature 297:17-18(1982)。增强子可剪接到载体中,位于抗体多肽编码序列的 5' 或 3' 位置,但是优选位于启动子的 5' 位点。

[0380] (vi) 转录终止构件

[0381] 在真核宿主细胞中使用的表达载体通常还包含终止转录和稳定 mRNA 所必需的序列。此类序列通常可从真核或病毒 DNA 或 cDNA 非翻译区的 5' 端和偶尔的 3' 端获得。这些区域包含在编码抗体的 mRNA 的非翻译区中转录成聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止构件是牛生长激素聚腺苷酸化区。参见 W094/11026 及其中公开的表达载体。

[0382] (vii) 宿主细胞的选择和转化

[0383] 适于克隆或表达本文载体中的 DNA 的宿主细胞包括本文描述的高等真核细胞,包括脊椎动物宿主细胞。脊椎动物细胞在培养(组织培养)中的繁殖已经成为常规流程。有用哺乳动物宿主细胞系的实例有经 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7, ATCC CRL1651)、人胚肾系(293 细胞或为悬浮培养而亚克隆的 293 细胞, Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59(1977))、幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL10)、中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216(1980))、小鼠塞托利(Sertoli)细胞(TM4,

Mather, Biol. Reprod. 23 :243-251(1980))、猴肾细胞 (CV1, ATCC CCL70)、非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL1587)、人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL2)、犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL34)、牛鼠 (buffalo rat) 肝细胞 (BRL3A, ATCC CRL1442)、人肺细胞 (W138, ATCC CCL75)、人肝细胞 (Hep G2, HB8065)、小鼠乳瘤 (MMT060562, ATCC CCL51)、TRI 细胞 (Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383 :44-68(1982))、MRC5 细胞、FS4 细胞和人肝细胞瘤 (hepatoma) 系 (Hep G2)。

[0384] 为了生成抗体,用上文所述表达或克隆载体转化宿主细胞,并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当改动的常规营养培养基中进行培养。

[0385] (viii) 宿主细胞的培养

[0386] 可在多种培养基中培养用于生成本发明抗体的宿主细胞。商品化培养基诸如 Ham 氏 F10 (Sigma)、极限必需培养基 (MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、和 Dulbecco 氏修改 Eagle 氏培养基 (DMEM, Sigma) 适于培养宿主细胞。另外,可使用下列文献中记载的任何培养基作为宿主细胞的培养基:Ham et al., Meth. Enz. 58 :44(1979); Barnes et al., Anal. Biochem. 102 :255(1980); 美国专利 4,767,704;4,657,866;4,927,762;4,560,655;5,122,469;W090/03430;W087/00195;或美国专利复审 30,985。任何这些培养基可根据需要补充激素和/或其它生长因子(诸如胰岛素、运铁蛋白或表皮生长因子)、盐(诸如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲剂(诸如 HEPES)、核苷酸(诸如腺苷和胸苷)、抗生素(诸如 GENTAMYCIN™ 药物)、痕量元素(定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)、和葡萄糖或等效能源。还可以适宜浓度含有本领域技术人员知道的任何其它必需补充物。培养条件诸如温度、pH 等即为表达而选择的宿主细胞先前所用的,这对于普通技术人员是显然的。

[0387] (ix) 抗体的纯化

[0388] 在使用重组技术时,可在细胞内生成抗体,或者直接分泌到培养基中。如果在细胞内生成抗体,那么首先需要通过例如离心或超滤清除微粒碎片,或是宿主细胞或是裂解片段。如果抗体分泌到培养基中,那么通常首先使用商品化蛋白质浓缩滤器(例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤单元)浓缩来自这些表达系统的上清液。可在任何上述步骤中包括蛋白酶抑制剂诸如 PMSF 以抑制蛋白水解,而且可包括抗生素以防止外来污染物的生长。

[0389] 可使用例如羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析(优选的纯化技术是亲和层析)来纯化从细胞制备的抗体组合物。蛋白 A 作为亲和配体的适宜性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白 Fc 结构域的种类和同种型。蛋白 A 可用于纯化基于人 γ 1、 γ 2、或 γ 4 重链的抗体 (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62 :1-13(1983))。蛋白 G 推荐用于所有小鼠同种型和人 γ 3 (Guss et al., EMBOJ. 5 :1567-1575(1986))。亲和配体所附着的基质最常用的是琼脂糖,但是可使用其它基质。物理稳定的基质诸如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯能获得比琼脂糖更快的流速和更短的加工时间。若抗体包含 CH3 结构域,则可使用 Bakerbond ABX™ 树脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) 进行纯化。根据待回收的抗体,也可使用其它蛋白质纯化技术诸如离子交换柱上的分馏、乙醇沉淀、反相 HPLC、硅土上的层析、肝素 SEPHAROSE™ 上的层析、阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬氨酸柱)上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE 和硫酸铵沉淀。

[0390] 在任何初步纯化步骤之后,可将含有目的抗体和污染物的混合物进行低 pH 疏水

相互作用层析,使用 pH 约 2.5-4.5 的洗脱缓冲液,优选在低盐浓度(如约 0-0.25M 盐)进行。

[0391] 免疫偶联物

[0392] 本发明还提供了包含偶联有细胞毒剂的本文所述任何抗 EphB4 抗体的免疫偶联物(可互换的称为“抗体-药物偶联物”或“ADC”),所述细胞毒剂诸如化疗剂、药物、生长抑制剂、毒素(如细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(即放射偶联物)。

[0393] 抗体-药物偶联物在癌症治疗中用于局部投递毒害细胞剂或抑制细胞试剂(即用于杀死或抑制肿瘤细胞的药物)的用途(Syrigos and Epenetos, *Anticancer Research* 19: 605-614(1999); Niculescu-Duvaz and Springer, *Adv. Drg. Del. Rev.* 26: 151-172(1997); 美国专利 4,975,278) 能将药物部分靶向投递至肿瘤,并在那儿进行细胞内积累,而系统施用这些未经偶联的药物试剂可能在试图消除的肿瘤细胞以外导致不可接受的对正常细胞的毒性水平(Baldwin et al., *Lancet* 603-05(1986年5月15日); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, 在《*Monoclonal Antibodies' 84: Biological And Clinical Applications*》中, A. Pinchera 等人编, 第 475-506 页, 1985)。由此试图获得最大功效及最小毒性。多克隆抗体和单克隆抗体皆有报道可用于这些策略(Rowland et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 21: 183-87(1986))。这些方法中所使用的药物包括道诺霉素(daunomycin)、多柔比星(doxorubicin)、甲氨蝶呤(methotrexate)和长春地辛(vindesine)(Rowland et al., 1986, 见上文)。抗体-毒素偶联物中所使用的毒素包括细菌毒素诸如白喉毒素、植物毒素诸如蓖麻毒蛋白、小分子毒素诸如格尔德霉素(geldanamycin)(Mandler et al., *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581(2000); Mandler et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028(2000); Mandler et al., *Bioconjugate Chem.* 13: 786-791(2002))、美登木素生物碱类(EP1391213; Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623(1996))、和加利车霉素(Lode et al., *Cancer Res.* 58: 2928(1998); Hinman et al., *Cancer Res.* 53: 3336-3342(1993))。毒素可通过包括微管蛋白结合、DNA 结合或拓扑异构酶抑制在内的机制发挥其毒害细胞和抑制细胞的效果。有些细胞毒药物在与大的抗体或蛋白质受体配体偶联时趋于失活或活性降低。

[0394] **ZEVALIN®** (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) 是由针对在正常和恶性 B 淋巴细胞表面上发现的 CD20 抗原的鼠 IgG1K 单克隆抗体与通过硫脲接头-螯合剂所结合的 ¹¹¹In 或 ⁹⁰Y 放射性同位素构成的抗体-放射性同位素偶联物(Wiseman et al., *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7): 766-77(2000); Wiseman et al., *Blood* 99(12): 4336-42(2002); Witzig et al., *J. Clin. Oncol.* 20(10): 2453-63(2002); Witzig et al., *J. Clin. Oncol.* 20(15): 3262-69(2002))。尽管 ZEVALIN 具有针对 B 细胞非何杰金氏(Hodgkin)淋巴瘤(NHL)的活性,然而施药在大多数患者中导致严重且长时间的血细胞减少。MYLOTARG™(gemtuzumabozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals), 即由人 CD33 抗体与加利车霉素连接而构成的抗体-药物偶联物, 在 2000 年批准用于经注射治疗急性骨髓性白血病(*Drugs of the Future* 25(7): 686(2000); 美国专利 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001)。Cantuzumab mertansine(Immunogen Inc.), 即由

huC242 抗体经二硫化物接头 SPP 与美登木素生物碱药物部分 DM1 连接而构成的抗体-药物偶联物,正在进行用于治疗表达 CanAg 的癌症诸如结肠癌、胰腺癌、胃癌和其它癌的 II 期试验。MLN-2704(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.),即由抗前列腺特异膜抗原(PSMA)单克隆抗体与美登木素生物碱药物部分 DM1 连接而构成的抗体-药物偶联物,正在进行用于前列腺肿瘤潜在治疗的开发。将多拉司他汀(dolastatin)的合成类似物 auristatin 肽、auristatin E(AE)和单甲基 auristatin(MMAE)与嵌合单克隆抗体 cBR96(对癌上的 Lewis Y 特异)和 cAC10(对恶性血液肿瘤上的 CD30 特异)偶联(Doronina et al., Nature Biotechnology 21(7):778-784(2003)),且正在进行治疗性开发。

[0395] 本文(例如上文)描述了可用于生成免疫偶联物的化疗剂。可使用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*)、蓖麻毒蛋白(ricin)A 链、相思豆毒蛋白(abrin)A 链、蒴莲根毒蛋白(modeccin)A 链、 α -帚曲霉素(sarcin)、油桐(*Aleutites fordii*)毒蛋白、香石竹(dianthin)毒蛋白、美洲商陆(*Phytolacca americana*)毒蛋白(PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制物、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(crotonin)、肥皂草(*saponaire officinalis*)抑制物、白树毒蛋白(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)和单端孢菌素(trichothecenes)。参见例如 1993 年 10 月 28 日公开的 W093/21232。多种放射性核素可用于生成放射偶联抗体。实例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。抗体和细胞毒剂的偶联物可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备,诸如 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯(诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)己二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯 2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。例如,可如 Vitetta et al., Science 238:1098(1987)中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14 标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见 W094/11026。

[0396] 本文还设想了抗体与一种或多种小分子毒素诸如加利车霉素(calicheamicin)、美登木素生物碱类(maytansinoids)、多拉司他汀类(dolostatins)、aurostatins、单端孢菌素(trichothecene)和 CC1065 及这些毒素具有毒素活性的片段的偶联物。

[0397] i. 美登素和美登木素生物碱类

[0398] 在有些实施方案中,免疫偶联物包含偶联有一个或多个美登木素生物碱分子的本发明抗体(全长或片段)。

[0399] 美登木素生物碱类是通过抑制微管蛋白多聚化来发挥作用的有丝分裂抑制剂。美登素最初从东非灌木齿叶美登木(*Maytenus serrata*)分离得到(美国专利 3,896,111)。随后发现某些微生物也生成美登木素生物碱类,诸如美登醇和 C-3 美登醇酯(美国专利 4,151,042)。例如下列美国专利公开了合成美登醇及其衍生物和类似物:4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 及 4,371,533。

[0400] 美登木素生物碱类药物模块在抗体药物偶联物中是有吸引力的药物模块,因为它们:(i) 相对易于通过发酵或发酵产物的化学修饰、衍生化来制备;(ii) 易于用适于通过非二硫化物接头的偶联的官能基衍生化;(iii) 在血浆中稳定;且(iv) 有效针对多种肿瘤细胞系。

[0401] 例如下列专利公开了包含美登木素生物碱类的免疫偶联物及其制备和治疗用途:美国专利 5,208,020;5,416,064;及欧洲专利 EP0425235B1,明确将其公开内容收入本文作为参考。Liu et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA93:8618-8623(1996) 记载了包含与针对人结肠直肠癌的单克隆抗体 C242 连接的称为 DM1 的美登木素生物碱的免疫偶联物。发现该偶联物具有针对培养的结肠癌细胞的高度细胞毒性,而且在体内肿瘤生长测定法中显示抗肿瘤活性。Chari et al.,Cancer Research52:127-131(1992) 记载了其中美登木素生物碱经二硫化物接头与结合人结肠癌细胞系上抗原的鼠抗体 A7 或结合 HER-2/neu 癌基因的另一种鼠单克隆抗体 TA.1 偶联的免疫偶联物。在体外在人乳癌细胞系 SK-BR-3 上测试了 TA.1-美登木素生物碱偶联物的细胞毒性,该细胞系每个细胞表达 3×10^5 个 HER-2 表面抗原。药物偶联物达到了与游离美登木素生物碱药物相似的一定程度的细胞毒性,这可通过增加每个抗体分子偶联的美登木素生物碱分子数目来提高。A7-美登木素生物碱偶联物在小鼠中显示低系统性细胞毒性。

[0402] 抗体-美登木素生物碱偶联物可通过将抗体与美登木素生物碱分子化学连接且不显著削弱抗体或美登木素生物碱分子的生物学活性来制备。参见例如美国专利 No. 5,208,020,明确将其公开内容收入本文作为参考。每个抗体分子偶联平均 3-4 个美登木素生物碱分子在增强针对靶细胞的细胞毒性中显示功效,且对抗体的功能或溶解度没有负面影响,尽管预计甚至一个分子的毒素/抗体也将较之裸抗体的使用增强细胞毒性。美登木素生物碱类在本领域是众所周知的,而且可通过已知技术合成或从天然来源分离。例如美国专利 5,208,020 和上文提及的其它专利及非专利发表物中公开了合适的美登木素生物碱类。优选的美登木素生物碱类是美登醇和美登醇分子的芳香环或其它位置经过修饰的美登醇类似物,诸如各种美登醇酯。

[0403] 本领域知道许多连接基团可用于制备抗体-美登木素生物碱偶联物,包括例如美国专利 5,208,020 或欧洲专利 0425235B1;Chari et al.,CancerResearch52:127-131(1992);2004 年 10 月 9 日提交的美国专利申请 No. 10/960,602 中所公开的,明确将其公开内容收入本文作为参考。包含接头构件 SMCC 的抗体-美登木素生物碱类偶联物可以如 2004 年 10 月 8 日提交的美国专利申请 No. 10/960,602 中所披露的来制备。连接基团包括二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团、或酯酶不稳定基团,正如上文所述专利中所公开的,优选二硫化物和硫醚基团。本文中描述和例示了别的连接基团。

[0404] 可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和美登木素生物碱的偶联物,诸如 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯(诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯 2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如 1,5-二氟-2,

4-二硝基苯)的双功能衍生物。特别优选的偶联剂包括 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯 (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173 :723-737 (1978)) 和 N-琥珀酰亚氨基-4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯 (SPP), 由此提供二硫键连接。

[0405] 根据连接的类型,可将接头附着于美登木素生物碱分子的多个位置。例如,可使用常规偶联技术通过与羟基的反应来形成酯键。反应可发生在具有羟基的 C-3 位置、经羟甲基修饰的 C-14 位置、经羟基修饰的 C-15 位置、和具有羟基的 C-20 位置。在一个优选的实施方案中,在美登醇或美登醇类似物的 C-3 位置形成键连接。

[0406] ii. Auristatin 和多拉司他汀

[0407] 在有些实施方案中,免疫偶联物包含与多拉司他汀类 (dolastatins) 或多拉司他汀肽类似物及衍生物、auristatin 类偶联的本发明抗体 (美国专利 No. 5,635,483 ; 5,780,588)。多拉司他汀类和 auristatin 类已经显示出干扰微管动力学、GTP 水解、及核和细胞分裂 (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45 (12) :3580-3584) 且具有抗癌 (US5,663,149) 和抗真菌活性 (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42 :2961-2965)。多拉司他汀或 auristatin 药物模块可经由肽药物模块的 N (氨基) 末端或 C (羧基) 末端附着于抗体 (W002/088172)。

[0408] 例示性的 auristatin 实施方案包括 N-末端连接的单甲基 auristatin 药物模块 DE 和 DF,披露于“Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands”, US 流水号 No. 10/983,340,2004 年 11 月 5 日提交,明确将其公开内容完整收入本文作为参考。

[0409] 典型的是,基于肽的药物模块可通过在两个或多个氨基酸和 / 或肽片段之间形成肽键来制备。此类肽键可依照例如肽化学领域众所周知的液相合成法来制备 (参见 E. **Schröder** and K. Lübke, The Peptides, volume 1, pp76-136, 1965, Academic Press)。auristatin/ 多拉司他汀药物模块可依照以下文献中的方法来制备 :US5,635,483 ; US5,780,588 ; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111 :5463-5465 ; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13 :243-277 ; Pettit, G. R., et al. Synthesis, 1996, 719-725 ; Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15 :859-863 ; 及 Doronina (2003) Nat Biotechnol 21 (7) :778-784 ; “Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands”, 美国流水号 No. 10/983,340,2004 年 11 月 5 日提交,将其完整收入本文作为参考 (披露了例如制备诸如 MMAE 和 MMAF 偶联至接头的单甲基缬氨酸化合物的接头和方法)。

[0410] iii. 加利车霉素

[0411] 在其它说是反拿中,免疫偶联物包含偶联有一个或多个加利车霉素分子的本发明抗体。加利车霉素抗生素家族能够在亚皮摩尔浓度生成双链 DNA 断裂。关于加利车霉素家族偶联物的制备参见美国专利 5,712,374 ; 5,714,586 ; 5,739,116 ; 5,767,285 ; 5,770,701 ; 5,770,710 ; 5,773,001 ; 5,877,296 (都授予美国 Cyanamid 公司)。可用的加利车霉素结构类似物包括但不限于 γ 1I、 α 2I、 α 3I、N-乙酰基- γ 1I、PSAG 和 θ 1I (Hinman et al., Cancer Research 53 :3336-3342 (1993) ; Lode et al., Cancer Research 58 :2925-2928 (1998) ; 及上述授予美国 Cyanamid 公司的美国专利)。可与抗体缀合的另一种抗肿瘤药物是 QFA,它是一种抗叶酸药物。加利车霉素和 QFA 都具有胞内作用位点,且不易穿过质膜。因此,这些试剂经由抗体介导的内在化的细胞摄取大大增强了它们的细胞毒效

果。

[0412] iv. 其它细胞毒剂

[0413] 可与本发明抗体偶联的其它抗肿瘤剂包括 BCNU、链佐星 (streptozocin)、长春新碱 (vincristine)、5- 氟尿嘧啶、美国专利 5, 053, 394、5, 770, 710 中记载的统称为 LL-E33288 复合物的试剂家族、及埃斯波霉素类 (esperamicins) (美国专利 5, 877, 296)。

[0414] 可用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链 (来自铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*)、蓖麻毒蛋白 (ricin) A 链、相思豆毒蛋白 (abrin) A 链、蒴莲根毒蛋白 (modeccin) A 链、 α - 帚曲霉素 (sarcin)、油桐 (*Aleutitesfordii*) 毒蛋白、香石竹 (*dianthin*) 毒蛋白、美洲商陆 (*Phytolaca americana*) 毒蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (*Momordicacharantia*) 抑制物、麻疯树毒蛋白 (curcin)、巴豆毒蛋白 (croton)、肥皂草 (*sapaonaria officinalis*) 抑制物、白树毒蛋白 (gelonin)、丝林霉素 (mitogellin)、局限曲菌素 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin)、依诺霉素 (enomycin) 和单端孢菌素 (trichothecenes)。参见例如 1993 年 10 月 28 日公布的 W093/21232。

[0415] 本发明还设想了抗体和具有核酸降解活性的化合物 (如核糖核酸酶或 DNA 内切核酸酶, 诸如脱氧核糖核酸酶; DNA 酶) 之间形成的免疫偶联物。

[0416] 为了选择性破坏肿瘤, 抗体可包含高度放射性原子。多种放射性同位素可用于生成放射偶联抗体。实例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 和 Lu 的放射性同位素。在将偶联物用于检测时, 可包含放射性原子用于闪烁照相研究, 例如 $\text{Tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} , 或是包含自旋标记物用于核磁共振 (NMR) 成像 (也称为磁共振成像, mri), 诸如碘 -123、碘 -131、钆 -111、氟 -19、碳 -13、氮 -15、氧 -17、钆、锰或铁。

[0417] 可以已知方式将放射性或其它标记物掺入偶联物。例如, 可生物合成肽, 或是通过化学氨基酸合成法合成肽, 其中使用涉及例如氟 -19 代替氢的合适氨基酸前体。可经肽中的半胱氨酸残基来附着标记物, 诸如 $\text{Tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 和 In^{111} 。可以经赖氨酸残基来附着钇 -90。IODOGEN 法 (Fraker et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 80 : 49-57 (1978)) 可用于掺入碘 -123。《Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy》(Chatal, CRC Press, 1989) 详细记载了其它方法。

[0418] 可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和细胞毒剂的偶联物, 诸如 N- 琥珀酰亚氨基 -3-(2- 吡啶基二硫代) 丙酸酯 (SPDP)、琥珀酰亚氨基 -4-(N- 马来酰亚氨基甲基) 环己烷 -1- 羧酸酯 (SMCC)、亚氨基硫烷 (IT)、亚氨酸酯 (诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类 (诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类 (诸如戊二醛)、双叠氮化合物 (诸如双 (对 - 叠氮苯甲酰基) 己二胺)、双重氮衍生物 (诸如双 (对 - 重氮苯甲酰基) - 乙二胺)、二异硫氰酸酯 (诸如甲苯 2,6- 二异氰酸酯)、和双活性氟化合物 (诸如 1,5- 二氟 -2,4- 二硝基苯) 的双功能衍生物。例如, 可如 Vitetta et al., Science 238 : 1098 (1987) 中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳 -14 标记的 1- 异硫氰酸苯甲基 -3- 甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见 W094/11026。接头可以是便于在细胞中释放细胞毒药物的“可切割接头”。例如, 可使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、光不稳定接头、二甲基接头、或含二硫化物接头 (Chari et al., Cancer Research 52 : 127-131 (1992) ; 美国专利 5, 208, 020)。

[0419] 本发明的化合物明确涵盖但不限于用下列交联剂制备的 ADC: 商品化 (如购自 Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, U. S. A.) 的 BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、sulfo-EMCS、sulfo-GMBS、sulfo-KMUS、sulfo-MBS、sulfo-SIAB、sulfo-SMCC 和 sulfo-SMPB、和 SVSB (琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基磺)苯甲酸酯)。见 2003-2004 年度应用手册和产品目录 (Applications Handbook and Catalog) 第 467-498 页。

[0420] v. 抗体-药物偶联物的制备

[0421] 在本发明的抗体-药物偶联物 (ADC) 中, 将抗体 (Ab) 经接头 (L) 与一个或多个药物部分 (D) 缀合, 例如每个抗体偶联约 1 个至约 20 个药物部分。可采用本领域技术人员知道的有机化学反应、条件和试剂通过数种路径来制备通式 I 的 ADC, 包括: (1) 抗体的亲核基团经共价键与二价接头试剂反应, 形成 Ab-L, 随后与药物部分 D 反应; 和 (2) 药物部分的亲核基团经共价键与二价接头试剂反应, 形成 D-L, 随后与抗体的亲核基团反应。本文中描述了用于制备 ADC 的别的方法。

[0422] Ab-(L-D)_pI

[0423] 接头可以由一种或多种接头构件构成。例示性的接头构件包括 6-马来酰亚胺己酰基 ("MC")、马来酰亚胺丙酰基 ("MP")、缬氨酸-瓜氨酸 ("val-cit")、丙氨酸-苯丙氨酸 ("ala-phe")、对氨基苄氧羰基 ("PAB")、4-(2-吡啶基硫代)戊酸 N-琥珀酰亚胺酯 ("SPP")、4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸 N-琥珀酰亚胺酯 ("SMCC")、和 (4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸 N-琥珀酰亚胺酯 ("SIAB")。本领域知道别的接头构件, 本文也描述了一些。还可参见 "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", 美国流水号 No. 10/983, 340, 2004 年 11 月 5 日提交, 将其完整内容收入本文作为参考。

[0424] 在有些实施方案中, 接头可包含氨基酸残基。例示性的氨基酸接头构件包括二肽、三肽、四肽或五肽。例示性的二肽包括: 缬氨酸-瓜氨酸 (vc 或 val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸 (af 或 ala-phe)。例示性三肽包括: 甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸 (gly-val-cit) 和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸 (gly-gly-gly)。构成氨基酸接头构件的氨基酸残基包括那些天然存在的氨基酸, 以及次要的氨基酸和非天然存在的氨基酸类似物, 诸如瓜氨酸。氨基酸接头构件可以在它们的特定酶 (例如肿瘤相关蛋白酶, 组织蛋白酶 B、C 和 D, 或纤溶酶蛋白酶) 的酶促切割的选择性方面进行设计和优化。

[0425] 抗体的亲核基团包括但不限于: (i) N 末端氨基; (ii) 侧链氨基, 如赖氨酸; (iii) 侧链巯基, 如半胱氨酸; 和 (iv) 糖基化抗体中糖的羟基或氨基。氨基、巯基、和羟基是亲核的, 能够与接头部分上的亲电子基团反应而形成共价键, 而接头试剂包括: (i) 活性酯类, 诸如 NHS 酯、HOBt 酯、卤代甲酸酯、和酸性卤化物; (ii) 烷基和苯甲基卤化物, 诸如卤代乙酰胺; (iii) 醛类、酮类、羧基和马来酰亚胺基团。某些抗体具有可还原的链间二硫键, 即半胱氨酸桥。可通过还原剂诸如 DTT (二硫苏糖醇) 处理使抗体具有与接头试剂缀合的反应活性。每个半胱氨酸桥理论上将形成两个反应性硫醇亲核体。可经由赖氨酸与 2-亚氨基硫烷 (Traut 氏试剂) 的反应, 导致胺转变为硫醇, 从而将额外亲核基团引入抗体。可以通过导入一个、两个、三个、四个、或更多个半胱氨酸残基 (例如制备包含一个或多个非天然半胱氨酸氨基酸残基的突变型抗体) 而将反应性硫醇基导入抗体 (或其片段)。

[0426] 还可通过修饰抗体来生成本发明的抗体-药物偶联物,即引入可与接头试剂或药物上的亲核取代基反应的亲电子部分。可用例如高碘酸盐氧化剂氧化糖基化抗体的糖,从而形成可与接头试剂或药物部分的胺基团反应的醛或酮基团。所得亚胺 Schiff 碱基可形成稳定的键,或者可用例如硼氢化物试剂还原而形成稳定的胺连接。在一个实施方案中,糖基化抗体的碳水化合物部分与半乳糖氧化酶或偏高碘酸钠的反应可在蛋白质中生成羰(醛和酮)基团,它可与药物上的适宜基团反应(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一个实施方案中,包含 N 末端丝氨酸或苏氨酸残基的蛋白质可与偏高碘酸钠反应,导致在第一个氨基酸处生成醛(Geoghegan & Stroh, Bioconjugate Chem. 3:138-146(1992); US5,362,852)。此类醛可与药物部分或接头亲核体反应。

[0427] 同样,药物部分上的亲核基团包括但不限于:胺、硫醇、羟基、酰肼、肟、肟、缩氨基硫脲、肟羧酸酯、和芳基酰肼基团,它们能够与接头部分上的亲电子基团反应而形成共价键,而接头试剂包括:(i) 活性酯类,诸如 NHS 酯、HOBt 酯、卤代甲酸酯、和酸性卤化物;(ii) 烷基和苯甲基卤化物,诸如卤代乙酰胺;(iii) 醛类、酮类、羧基、和马来酰亚胺基团。

[0428] 或者,可通过例如重组技术或肽合成来制备包含抗体和细胞毒剂的融合蛋白。DNA 的长度可包含各自编码偶联物两个部分的区域,或是彼此毗邻或是由编码接头肽的区域分开,该接头肽不破坏偶联物的期望特性。

[0429] 在又一个实施方案中,可将抗体与“受体”(诸如链霉亲和素)偶联从而用于肿瘤预先靶向,其中对患者施用抗体-受体偶联物,接着使用清除剂由循环中清除未结合的偶联物,然后施用与细胞毒剂(如放射性核苷酸)偶联的“配体”(如亲合素)。

[0430] 药用配制剂

[0431] 可通过将具有期望纯度的抗体与任选的生理学可接受载体、赋形剂或稳定剂混合来制备包含本发明抗体的治疗用配制剂,以水溶液、冻干或其它干燥剂型的形式贮存(Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000))。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,而且包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化己烷双胺;苯扎氯铵、苯索氯铵;酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约 10 个残基)多肽;蛋白质,诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如 EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐相反离子,诸如钠;金属复合物(如 Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,诸如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇(PEG)。

[0432] 本文中的配制剂还可含有超过一种所治疗具体适应症所必需的活性化合物,优选活性互补且彼此没有不利影响的。合适的是,此类分子以对于预定目的有效的量组合。

[0433] 活性成分还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、在胶状药物传递系统中(例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)、或在粗滴乳液中。此类技术公开于例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000)。

[0434] 用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这可容易的通过使用无菌滤膜过滤来实现。

[0435] 可制备持续释放配制剂。持续释放配制剂的合适例子包括含有本发明免疫球蛋白的固体疏水性聚合物半透性基质,该基质以定型产品的形式存在,如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利 3,773,919)、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体)及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙酸乙烯和乳酸-乙醇酸等聚合物能够持续释放分子 100 天以上,但是某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。当胶囊化抗体在体内长时间维持时,它们可能由于暴露于 37℃ 的潮湿环境而变性或聚集,导致生物学活性损失和免疫原性可能改变。可根据相关机制来设计合理的稳定化策略。例如,如果发现聚集机制是经由硫醇-二硫化物互换而形成分子间 S-S 键,那么可通过修饰巯基残基、由酸性溶液冻干、控制湿度、采用适宜添加剂和开发特定的聚合物基质组合物来实现稳定。

[0436] 用途

[0437] 本发明的抗体可用于例如体外、回体(ex vivo)和体内治疗方法。

[0438] 一方面,本发明提供了治疗或预防与 EphB4 表达升高和/或活性升高有关的肿瘤、癌症、和/或细胞增殖性病症的方法,该方法包括给需要此类治疗的受试者施用有效量的抗 EphB4 抗体。

[0439] 一方面,本发明提供了降低、抑制、或预防肿瘤或癌生长的方法,该方法包括给需要此类治疗的受试者施用有效量的抗 EphB4 抗体。

[0440] 已经将 EphB4 与发育中的胚胎中的运动轴突导向和神经嵴细胞迁移联系起来。因而,本发明的抗体还可用于治疗(包括预防)其病理学涉及细胞退化/变性或功能障碍的病症,诸如治疗各种(慢性)神经变性(退化)病症和急性神经细胞损伤。此类神经变性(退化)病症包括但不限于周围神经病;运动神经元病症,诸如肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis)(ALS, Lou Gehrig 氏病)、贝耳氏(Bell)麻痹、和涉及脊髓性肌萎缩或麻痹的各种疾患;及其它人神经变性疾病,诸如阿耳茨海默氏病、帕金森氏病、癫痫、多发性硬化、亨廷顿氏舞蹈症(Huntington's chorea)、唐氏综合征(Down's syndrome)、神经性耳聋、和梅尼尔氏(Meniere)病;及急性神经细胞损伤,例如由外伤或脊髓损伤所致的。

[0441] 本发明的抗体还可用于抑制血管发生。在有些实施方案中,血管发生的部位就是肿瘤或癌。

[0442] 一方面,本发明提供了抑制血管发生的方法,该方法包括给需要此类治疗的受试者施用有效量的抗 EphB4 抗体。

[0443] 一方面,本发明提供了治疗与血管发生有关的病理学疾患的方法,该方法包括给需要此类治疗的受试者施用有效量的抗 EphB4 抗体。在有些实施方案中,所述与血管发生有关的病理学疾患是肿瘤、癌症、和/或细胞增殖性病症。在有些实施方案中,所述与血管发生有关的病理学疾患是眼内新血管疾病。

[0444] 此外,本发明的至少一些抗体可结合来自其它物种的抗原。因而,本发明的抗体可

用于结合特定抗原活性,例如,在包含抗原的细胞培养物中、在人类受试者中或在具有本发明抗体与之交叉反应的抗原的其它哺乳动物中(例如黑猩猩、狒狒、狨、猕猴和恒河猴,猪或小鼠)。在一个实施方案中,本发明的抗体可用于抑制抗原活性,通过使抗体与抗原接触使得抗原活性受到抑制。优选的是,所述抗原是人蛋白质分子。

[0445] 在一个实施方案中,本发明的抗体可用于结合患有与抗原表达升高和/或活性升高有关的病症的受试者体内抗原的方法,包括给受试者施用本发明的抗体使得受试者体内的抗原得到结合。优选的是,所述抗原是人蛋白质分子且所述受试者是人受试者。或者,受试者可以是表达本发明抗体所结合的抗原的哺乳动物。又或者,受试者可以是其中导入了抗原(例如通过施用抗原或通过表达抗原转基因)的哺乳动物。可出于治疗目的将本发明的抗体施用于人受试者。此外,可出于兽医目的将本发明的抗体施用于表达免疫球蛋白与之交叉反应的抗原的非人哺乳动物(例如灵长类动物、猪或小鼠),或是人疾病的动物模型。关于后者,此类动物模型可用于评估本发明抗体的治疗功效(例如测试施药的剂量和时程)。

[0446] 本发明的抗体可用于治疗、抑制、延缓进展、预防/延缓复发、改善或预防与一种或多种抗原分子的表达和/或活性相关的疾病、病症、或疾患。

[0447] 例示性的病症包括癌瘤、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、和白血病或淋巴样恶性肿瘤。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌和肺的鳞状癌)、腹膜癌、肝细胞癌(hepatocellular cancer)、胃癌(gastric or stomach cancer)(包括胃肠癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、尿道癌、肝瘤(hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌(kidney or renal cancer)、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、肛门癌、阴茎癌、黑素瘤、多发性骨髓瘤和B细胞淋巴瘤、脑、以及头颈癌、及相关转移。在有些实施方案中,癌症选自:小细胞肺癌、成神经细胞瘤(neuroblastomas)、黑素瘤、乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌(CRC)、和肝细胞癌。

[0448] 在某些实施方案中,将包含偶联有一种或多种细胞毒剂的抗体的免疫偶联物施用于患者。在有些实施方案中,免疫偶联物和/或它所结合的抗原由细胞内在化,导致免疫偶联物杀伤它所结合的靶细胞的治疗功效提高。在一个实施方案中,细胞毒剂靶向或干扰靶细胞中的核酸。在一个实施方案中,细胞毒剂靶向或干扰微管聚合。此类细胞毒剂的实例包括本文所述任何化疗剂(诸如美登木素生物碱类、auristatin、多拉司他汀、或加利车霉素)、放射性同位素、或核糖核酸酶或DNA内切核酸酶。

[0449] 在治疗中,本发明的抗体可单独使用,或者与其它组合物联用。例如,本发明的抗体可与另一种抗体、化疗剂(包括化疗剂混合物)、其它细胞毒剂、抗血管发生剂、细胞因子、和/或生长抑制剂共施用。当本发明的抗体抑制肿瘤生长时,可能特别希望将其联合一种或多种抑制肿瘤生长的其它治疗剂。或者/另外,患者可接受联合放射疗法(例如外部射束照射或使用放射性标记药剂诸如抗体的疗法)。上文所述此类联合疗法包括联合施药(当两种或多种药剂包含在相同或分开的配制剂中时)和分开施药,在后一种情况中,本发明抗体的施用可发生在辅助疗法的施用之前和/或之后。

[0450] 联合疗法

[0451] 如上所述,本发明提供了联合疗法,其中抗EphB4抗体与另一疗法一起施用。例

如,抗 EphB4 抗体与抗癌治疗剂或抗新血管形成疗法联合使用以治疗各种增生性或非增生性疾病。在一个实施方案中,所述增生性或非增生性疾病的特征在于与异常或不期望的血管发生有关的病理学病症。抗 EphB4 抗体可以与对那些目的有效的另外的药剂顺次或联合施用,或是在同一组合物中或是作为分开的组合物。或者 / 另外,可以施用 EphB4 的多种抑制剂。

[0452] 抗 EphB4 抗体的施用可以同时进行,例如作为单一组合物或者作为两种或多种不同的组合物,使用相同或不同的施用路径。或者 / 另外,施药可以以任一次序顺次进行。在某些实施方案中,两种或多种组合物的施用之间可以有时间范围为数分钟、数天、数周、数月的时间间隔。例如,可以先施用抗癌剂,接着是 EphB4 抑制剂。然而,也设想了同时施用或先施用抗 EphB4 抗体。

[0453] 与抗 EphB4 抗体联合施用的治疗剂的有效量取决于医师或兽医的判断。完成剂量施用和调整以实现对待治疗疾病的最大控制。此外剂量取决于诸如待使用的治疗剂的类型和所治疗的特定患者等因素。抗癌剂的合适剂量就是当前所用的那些,而且可以由于抗癌剂与抗 EphB4 抗体的联合作用(协同)而降低。在某些实施方案中,抑制剂的组合增强单一抑制剂的功效。术语“增强”指治疗剂在其常用或批准的剂量功效得到提高。

[0454] 典型的是,抗 EphB4 抗体和抗癌剂适于相同或相似的疾病以阻断或降低病理学病症,诸如肿瘤生长或癌细胞时的生长。在一个实施方案中,所述抗癌剂是抗血管发生剂。

[0455] 与癌症有关的抗血管发生疗法是致力于抑制为支持肿瘤生长而提供养分所需要的肿瘤血管发育的癌症治疗策略。因为血管发生涉及原发性肿瘤生长和转移二者,所以本发明提供的血管发生治疗不但能够在原发性位点抑制肿瘤的增生性生长,而且能够预防肿瘤在继发性位点的转移,从而容许由其它治疗剂攻击肿瘤。

[0456] 本领域已经鉴定和知道许多抗血管发生剂,包括本文所列的那些,例如定义中所列的,还可参见例如 Carmeliet and Jain, *Nature* 407 :249-257 (2000) ; Ferrara et al., *Nature Reviews: Drug Discovery*, 3 :391-400 (2004) ; Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8 : 200-206 (2003)。还可参见美国专利申请 US20030055006。在一个实施方案中,抗 EphB4 抗体与抗 VEGF 中和性抗体(或片段)和 / 或另外的 VEGF 拮抗剂或 VEGF 受体拮抗剂(包括但不限于例如可溶性 VEGF 受体(例如 VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、neuropillins(例如 NRP1、NRP2))片段)、能够阻断 VEGF 或 VEGFR 的适体、中和性抗 VEGFR 抗体、VEGFR 酪氨酸激酶(RTK)的低分子量抑制剂、VEGF 的反义策略、针对 VEGF 或 VEGF 受体的核酶、VEGF 的拮抗性变体、及其组合联合使用。或者 / 另外,任选的是,可以在 VEGF 拮抗剂和其它药剂外对患者共施用两种或多种血管发生抑制剂。在某些实施方案中,可以与抗 EphB4 抗体、VEGF 拮抗剂和抗血管发生剂联合施用一种或多种别的治疗剂,例如抗癌剂。

[0457] 在本发明的某些方面,可用于抗 EphB4 抗体的联合肿瘤疗法的其它治疗剂包括其它癌症疗法(例如手术、放射学治疗(例如涉及照射或施用放射性物质)、化疗、本文所列和本领域知道的抗癌剂的治疗、或其组合)。或者 / 另外,结合本文披露的相同抗原或两种或多种本文披露的不同抗原的两种或多种抗体可以共施用于患者。有时,还对患者施用一种或多种细胞因子可能是有益的。

[0458] 化疗剂

[0459] 在某些方面,本发明提供了阻断或降低肿瘤生长或癌细胞生长的方法,其通过对

易感于或诊断有癌症的患者施用有效量的 EphB4 拮抗剂和 / 或血管发生抑制剂和一种或多种化疗剂来实现。多种化疗剂可用于本发明的联合治疗方法。本文在“定义”中提供了所设想的化疗剂的例示性和非限制性列表。

[0460] 正如本领域普通技术人员会理解的,化疗剂的适宜剂量一般在单独或联合其它化疗剂施用该化疗剂的临床疗法中早就采用的那些剂量附近变动。根据所治疗的疾患,剂量有可能发生变化。施行治疗的医师能够为受试者个体确定适宜的剂量。

[0461] 复发性肿瘤生长

[0462] 本发明还提供了用于抑制或预防复发性肿瘤生长或复发性癌细胞生长的方法和组合物。复发性肿瘤生长或复发性癌细胞生长用于描述正在接受一种或多种当前可用疗法(例如癌症疗法,诸如化疗、放疗、手术、激素疗法和 / 或生物学疗法 / 免疫疗法、抗 VEGF 抗体疗法,特别是特定癌症的标准治疗方案)或用一种或多种当前可用疗法治疗过的患者在临床上不足以治疗该患者或不再由该疗法取得任何有益效果使得这些患者需要别的有效疗法的状况。在用于本文时,该表述还指“无响应 / 顽固性 (non-responsive/refractory)”患者的状况,例如描述患者对疗法有响应但遭受副作用、形成抗性、对疗法不响应、对疗法的响应不令人满意等。在各种实施方案中,癌症是复发性肿瘤生长或复发性癌细胞生长,其中癌细胞数目没有令人满意的减少,或者增多了,或者肿瘤尺寸没有显著的缩小,或者增大了,或者癌细胞的尺寸或数目未能进一步缩小或减少。确定癌细胞是否是复发性肿瘤生长或复发性癌细胞生长可以在体内或在体外进行,通过本领域知道的用于测定治疗对癌细胞有效性的任何方法,在这样的语境中使用本领域公认的“复发性”或“顽固性”或“无响应”的含义。对抗 VEGF 治疗有抗性的肿瘤是复发性肿瘤生长 (relapse tumor growth) 的一个例子。

[0463] 本发明提供了在受试者中阻断或降低复发性肿瘤生长或复发性癌细胞生长的方法,其通过施用一种或多种抗 EphB4 抗体以阻断或降低受试者中的复发性肿瘤生长或复发性癌细胞生长来实现。在某些实施方案中,可以在癌症治疗剂之后施用所述拮抗剂。在某些实施方案中,与癌症疗法同时施用抗 EphB4 抗体。或者 / 另外,抗 EphB4 抗体疗法与另一癌症疗法交替施行,这可以以任意次序进行。本发明还涵盖施用一种或多种抑制性抗体来预防癌症在有癌症倾向的患者中发作或复发的方法。在一个实施方案中,癌症疗法是使用抗血管发生剂的治疗,例如 VEGF 拮抗剂。抗血管发生剂包括本领域知道的那些和本文定义中所列的那些。在一个实施方案中,抗血管发生剂是抗 VEGF 中和性抗体或片段(例如人源化的 A4.6.1、**AVASTIN**® (Genentech, South San Francisco, CA)、Y0317、M4、G6、B20、2C3 等)。参见例如美国专利 6,582,959,6,884,879,6,703,020;W098/45332;W096/30046;W094/10202;EP0666868B1;美国专利申请 20030206899,20030190317,20030203409,20050112126;Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164(2004);及 W02005012359。别的药剂可以与 VEGF 拮抗剂和抗 EphB4 抗体联合施用以阻断或降低复发性肿瘤生长或复发性癌细胞生长,例如见本文中标题为“联合疗法”的部分。

[0464] 本发明的抗体(和辅助治疗剂)通过任何合适手段来施用,包括胃肠外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内,以及损伤内(如果希望局部治疗的话)施用。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。另外,脉冲输注抗体也是合适的,特别是以抗体剂量逐渐减小的形式。可通过任何合适路径服药,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射,这部分

取决于施药是短期的还是长期的。

[0465] 可以与优良医学实践一致的方式配制、剂量给药和施用本发明的抗体组合物。在此内容中考虑的因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体哺乳动物、患者个体的临床状况、病症的起因、投递药剂的部位、施药的方法、施药的日程安排、和医学从业人员知道的其它因素。不是必需而是任选将抗体与目前用于预防或治疗所讨论病症的一种或多种药剂一起配制。此类其它药剂的有效量取决于配制剂中存在的本发明抗体的量、病症或治疗的类型、和上文讨论的其它因素。这些通常是以与上文所用相同剂量和施用路径使用,或是迄今所用剂量的大约 1-99%。

[0466] 对于疾病的预防或治疗,本发明抗体的适宜剂量(当单独使用或者与其它药剂诸如化疗剂联用时)取决于待治疗疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重程度和病程、施用抗体是用于预防还是治疗目的、先前的疗法、患者的临床史和对抗体的应答、及主治医师的判断。将抗体一次性或者在一系列治疗中适当的施用于患者。根据疾病的类型和严重程度,大约 $1\mu\text{g/kg}$ 到 15mg/kg (例如 0.1mg/kg - 10mg/kg) 抗体是施用于患者的初始候选剂量,无论是例如通过一次或多次分开施用,或者是通过连续输注。典型每日剂量的范围可以为大约 $1\mu\text{g/kg}$ 到 100mg/kg 或者更多,取决于上述因素。对于持续数天或更长时间的重复给药,根据疾患,治疗维持到直至发生期望的疾病症状抑制。抗体的例示性剂量的范围为大约 0.05mg/kg 到大约 10mg/kg 。如此,可以给患者施用大约 0.5mg/kg 、 2.0mg/kg 、 4.0mg/kg 或 10mg/kg (或其任意组合) 的一剂或多剂。所述剂可以间歇施用,例如每周或每三周(一次)(例如使得患者接受大约 2 到大约 20 剂,例如大约 6 剂抗体)。可以施用一剂较高的加载剂 (loading dose), 继之以一剂或多剂较低的剂量。一种例示性的剂量给药方案包括施用一剂大约 4mg/kg 的加载剂,继之以每周一剂的大约 2mg/kg 抗体的维持剂。然而,其他剂量方案可能也是有用的。可以方便地通过常规技术和测定法来监测这种疗法的进展。

[0467] 本发明的抗 EphB4 抗体可用于检测特定细胞或组织中的 EphB4 表达的测定法(诸如诊断或预后测定法),其中所述抗体如下所述进行标记和/或固定在不溶性基质上。

[0468] 另一方面,本发明提供了用于检测 EphB4 的方法,该方法包括检测样品中的 EphB4- 抗 EphB4 抗体复合物。术语“检测”在用于本文时包括定性和/或定量检测(测量水平),有或无参照对照。

[0469] 另一方面,本发明提供了诊断与 EphB4 表达和/或活性有关的病症的方法,该方法包括对来自患有或怀疑患有所述病症的患者的生物学样品检测 EphB4- 抗 EphB4 抗体复合物。在一些实施方案中, EphB4 表达是增加的表达或异常(不期望)的表达。在一些实施方案中,所述病症是肿瘤、癌症、和/或细胞增殖性病症。

[0470] 另一方面,本发明提供了本文所述任何抗 EphB4 抗体,其中所述抗 EphB4 抗体包含可检测的标记物。

[0471] 另一方面,本发明提供了本文所述任何抗 EphB4 抗体与 EphB4 的复合物。在一些实施方案中,复合物是体内的或体外的。在一些实施方案中,复合物包含癌细胞。在一些实施方案中,抗 EphB4 抗体是可检测标记的。

[0472] 抗 EphB4 抗体可用于大量公知检测测定法中任一种的 EphB4 检测。例如,可以如下对生物学样品测定 EphB4,即从期望来源获得样品,将样品与抗 EphB4 抗体混合以允许抗体与混合物中存在的任何 EphB4 形成抗体/EphB4 复合物,并检测混合物中存在的任何抗体

/EphB4 复合物。可以通过本领域已知的适于特定样品的方法制备生物学样品供测定使用。根据所使用的测定法的类型来选择混合样品与抗体的方法和检测抗体 /EphB4 复合物的方法。此类测定法包括免疫组织化学、竞争性和三明治 / 夹心式测定法、和空间阻抑测定法 (steric inhibition assay)。

[0473] EphB4 的分析方法均使用一种或多种以下试剂：经过标记的 EphB4 类似物、固定化的 EphB4 类似物、经过标记的抗 EphB4 抗体、固定化的抗 EphB4 抗体和空间偶联物。经过标记的试剂还称为“示踪剂”。

[0474] 使用的标记物是不干扰 EphB4 与抗 EphB4 抗体结合的任何可检测官能团 (functionality)。许多标记物已知用于免疫测定法，例子包括可以直接检测的模块，诸如荧光染料、化学发光和放射性标记物，以及必须反应或衍生化才能检测的模块，诸如酶。此类标记物的例子包括：

[0475] 使用的标记物是不干扰 EphB4 与抗 EphB4 抗体结合的任何可检测官能团。许多标记物已知用于免疫测定法，例子包括可以直接检测的模块，诸如荧光染料、化学发光和放射性标记物，以及必须反应或衍生化才能检测的模块，诸如酶。此类标记物的例子包括放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I ，荧光团诸如稀土螯合物或荧光素及其衍生物，若丹明及其衍生物，丹酰，伞形酮，萤光素酶，例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶（美国专利 No. 4, 737, 456），萤光素，2, 3- 二氢酞嗪二酮，辣根过氧化物酶 (HRP)，碱性磷酸酶， β - 半乳糖苷酶，葡糖淀粉酶，溶菌酶，糖类氧化酶例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶、和葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶，杂环氧化酶诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶，偶联有使用过氧化氢来氧化染料前体的酶诸如 HRP，乳过氧化物酶，或微过氧化物酶，生物素 / 亲合素，自旋标记物，噬菌体标记物，稳定自由基，等等。

[0476] 已经有将这些标记物共价结合至蛋白质或多肽的常规方法。例如，偶联剂诸如二醛、碳化二亚胺、双马来酰亚胺、双亚氨酸酯、双重氮化联苯胺等可用于给抗体标记上上述荧光、化学发光和酶标记物。参见例如美国专利 No. 3, 940, 475 (荧光测定法) 和 3, 645, 090 (酶) ; Hunter et al., Nature, 144 :945 (1962) ; David et al., Biochemistry, 13 :1014-1021 (1974) ; Pain et al., J. Immunol. Methods, 40 :219-230 (1981) ; 和 Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30 :407-412 (1982)。本文中优选的标记物是酶，诸如辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。将此类标记物（包括酶）与抗体偶联对于熟悉免疫测定技术的普通技术人员来说是一种标准操作规程。参见例如 O' Sullivan et al., " Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay, " 于 Methods in Enzymology, ed. J. J. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), pp. 147-166。

[0477] 某些测定法需要试剂的固定化。固定化能够将抗 EphB4 抗体与仍然在溶液中游离的任何 EphB4 分开。为此，或是通过吸附至不溶于水的基质或表面 (Bennich et al., U. S. 3, 720, 760)、通过共价偶联（例如利用戊二醛交联）在测定法步骤前使抗 EphB4 抗体或 EphB4 类似物不溶解，或是例如通过免测沉淀，在测定法步骤之后使抗 EphB4 抗体或 EphB4 类似物不溶解。

[0478] 可以利用免疫组织化学和染色方案来检查样品中的蛋白质表达。组织切片的免疫组织化学染色已经证明是一种评估或检测样品中蛋白质存在的可靠方法。免疫组织化学

（“IHC”）技术利用抗体来探查和显现原位细胞抗原，通常通过生色或者荧光方法。对于样品制备，可以使用来自哺乳动物（典型的是人类患者）的组织或细胞样品。样品的例子包括但不限于癌细胞，诸如结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、淋巴瘤、和白白血病细胞。可以通过本领域已知的多种规程来获得样品，包括但不限于手术切除、抽吸或活检。组织可以是新鲜的或冷冻的。在一个实施方案中，样品是固定和包埋在石蜡或类似物中的。可以通过常规方法来固定（即保存）组织样品。本领域普通技术人员将领会，固定剂的选择由样品是用于组织学染色还是其它分析的目的来决定。本领域普通技术人员还将领会，固定时长取决于组织样品的大小和所使用的固定剂。

[0479] IHC 可以与别的技术诸如形态学染色和 / 或荧光原位杂交一起实施。现有两种常用的 IHC 方法：直接和间接测定法。根据第一种测定法，直接测定抗体与靶抗原（例如 EphB4）的结合。这种直接测定法使用经过标记的试剂，诸如荧光标签或酶标记的第一抗体，其不需要进一步的抗体相互作用就能显现。在一种典型的间接测定法中，未偶联的第一抗体结合至抗原，然后经过标记的第二抗体结合至第一抗体。若第二抗体偶联有酶标记物，则添加生色底物或荧光底物以提供抗原的显现。因为数种第二抗体可以与第一抗体上的不同表位反应，所以发生信号放大。

[0480] 用于免疫组织化学的第一和 / 或第二抗体通常用可检测模块进行标记。现有多种标记物，它们通常可以分成下列类型：

[0481] 在上文讨论的样品制备规程外，可能还需要在 IHC 之前、期间或之后对组织切片进行进一步的处理。例如，可以实施表位修复法，诸如在柠檬酸盐缓冲液中对组织样品进行加热（参见例如 Leong et al. Appl. Immunohistochem. 4(3) :201(1996)）。

[0482] 在任选的封闭步骤后，组织切片在合适条件下暴露于第一抗体足够时间，使得第一抗体结合至组织样品中的靶蛋白抗原。实现这一目的的适宜条件可以通过常规实验来确定。抗体与样品的结合程度通过使用上文讨论的任一种可检测标记物来测定。优选的，标记物是酶标记物（例如 HRP），其催化生色底物诸如 3,3'-二氨基联苯胺色原体（chromogen）的化学变化。优选的是，将酶标记物偶联至特异性结合第一抗体的抗体（例如第一抗体是兔多克隆抗体，第二抗体是山羊抗兔抗体）。

[0483] 可以将如此制备的标本放置好并盖上盖玻片。然后进行载玻片评估，例如利用显微镜，并且可以采用本领域常规使用的染色强度标准。染色强度标准可以如下评估：

[0484] 表 2

[0485]

染色样式	得分
在细胞中没有观察到染色。	0
在超过 10% 的细胞中检测到微弱 / 刚刚可察觉的染色。	1+
在超过 10% 的细胞中观察到弱至中等的染色。	2+
在超过 10% 的细胞中观察到中等至强的染色。	3+

[0486] 典型的，在 IHC 测定法中得分为约 2+ 或更高的染色样式是诊断性和 / 或预后性的。在有些实施方案中，得分为约 1+ 或更高的染色样式是诊断性和 / 或预后性的。在其它实施方案中，得分为约 3 或更高的染色样式是诊断性和 / 或预后性的。应当理解，在使用 IHC 检查来自肿瘤或结肠腺瘤的细胞和 / 或组织时，一般测定或评估肿瘤细胞和 / 或组织（而非样品中可能存在的基质或周围组织）中的染色。

[0487] 其它测定法,称为竞争性或三明治 / 夹心式测定法,已经明确建立并广泛用于商业诊断工业。

[0488] 竞争性测定法依赖于示踪剂 EphB4 类似物与测试样品 EphB4 竞争有限数目的抗 EphB4 抗体抗原结合位点的能力。通常在竞争前或竞争后使抗 EphB4 抗体不溶解,然后将结合至抗 EphB4 抗体的示踪剂和 EphB4 与未结合的示踪剂和 EphB4 分开。通过倾倒 (其中预先使结合配对物不溶解) 或者通过离心 (其中在竞争性反应后使结合配对物沉淀) 来实现这种分离。测试样品中 EphB4 的量与结合的示踪剂的量成反比,所述结合的示踪剂的量通过标记物质的量来测量。绘制已知量的 EphB4 的剂量 - 应答曲线,与测试结果进行比较以定量确定测试样品中存在的 EphB4 的量。当使用酶作为可检测标记物时,这些测定法称为 ELISA 系统。

[0489] 另一种竞争性测定法,称为“均相”测定法 (homogeneous assay),不需要相分离。此处,制备并使用酶与 EphB4 的偶联物,使得在抗 EphB4 抗体结合 EphB4 时,抗 EphB4 抗体的存在改变酶活性。在这种情况下,EphB4 或其免疫学活性片段用双功能有机桥偶联至酶诸如过氧化物酶。选择偶联物与抗 EphB4 抗体一起使用,使得抗 EphB4 抗体的结合抑制或增强标记物的酶活性。此方法本身被广泛实践,称作 EMIT。

[0490] 空间偶联物 (steric conjugate) 用于均相测定法的空间位阻法 (steric hindrance method)。通过将低分子量半抗原共价连接至小 EphB4 片段来合成这些偶联物,使得针对半抗原的抗体基本上不能与抗 EphB4 抗体同时结合偶联物。在此测定法规程下,测试样品中存在的 EphB4 将结合抗 EphB4 抗体,从而允许抗半抗原结合偶联物,导致偶联物半抗原特性的变化,例如当半抗原是荧光团时荧光的变化。

[0491] 三明治 / 夹心式测定法特别可用于 EphB4 或抗 EphB4 抗体的测定。在顺次三明治测定法 (sequential sandwich assay) 中,固定化抗 EphB4 抗体用于吸附测试样品 EphB4,通过清洗去除测试样品,所结合的 EphB4 用于吸附经过标记的第二抗 EphB4 抗体,然后将所结合的物质与残余的示踪剂分开。结合的示踪剂的量与测试样品 EphB4 成正比。在“同步”三明治测定法 (simultaneous sandwich assay) 中,在添加经过标记的抗 EphB4 前不分离测试样品。使用抗 EphB4 单克隆抗体作为一种抗体和多克隆抗 EphB4 抗体作为另一种抗体的顺次三明治测定法可用于对样品测试 EphB4。

[0492] 上文仅仅是 EphB4 的例示性检测测定法。现在或者此后开发的使用抗 EphB4 抗体测定 EphB4 的其它方法均包括在本发明范围内,包括本文所述的生物测定法。

[0493] 制品

[0494] 在本发明的另一个方面,提供了包含可用于治疗、预防和 / 或诊断上文所述紊乱的物质的制品。制品包括容器和贴在所述容器上或与其相关连的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶子、小管、注射器等。容器可用各种材料制成,诸如玻璃或塑料。容器中装有其自身或在联合其它组合物时有效治疗、预防和 / 或诊断疾患的组合物,而且可具有无菌存取口 (例如容器可以是具有皮下注射针头可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小管)。组合物中的至少一种活性剂是本发明的抗体。标签或包装插页指示该组合物用于治疗选择的疾患,诸如癌症。此外,制品可包括 (a) 其中装有组合物的第一容器,其中该组合物包含本发明的抗体;和 (b) 其中装有组合物的第二容器,其中该组合物包含其它细胞毒剂。本发明此实施方案中的制品还可包括指示第一和第二抗体组合物可用于治疗特定疾患如癌症的

包装插页。或者 / 另外, 制品还可包括第二 (或第三) 容器, 其中装有制药学可接受的缓冲剂, 诸如注射用抑菌水 (BWF1)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏 (Ringer) 溶液和右旋糖溶液。它还可包括商业和用户立场上所需的其它物质, 包括其它缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。

[0495] 下面是本发明方法和组合物的实施例。应当理解, 根据上文提供的一般描述, 可实施各种其它实施方案。

[0496] 实施例

[0497] 实施例 1 : 抗 EphB4 抗体的生成

[0498] 抗 EphB4 抗体是使用噬菌体展示生成的, 其中使用 EphB4-His 蛋白来选择噬菌体。本领域知道多种方法可用于生成噬菌体展示库, 从中可以得到目的抗体。一种生成目的抗体的方法是通过如 Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340 (5) : 1073-93 所述使用噬菌体抗体库。使用噬菌体展示选择的克隆使用噬菌体 ELISA 针对 EphB4-His 蛋白进行筛选。选择独特克隆用于通过噬菌体竞争 ELISA 和阻断测定法进一步表征, 以确定该噬菌体抗体克隆能否阻断 EphB4-ephrinB2 相互作用。克隆 30.35 表现很好, 因而被选择用于进一步的分析。为了改善克隆 30.35 的亲合力, 在 YW30.35 的背景中生成噬菌体展示库, 每个靶向所选 HVR 进行软式或硬式随机化 (soft or hard randomization)。所选克隆通过噬菌体 ELISA 进行筛选, 然后表达成 Fab 蛋白并使用 Biacore 测定其亲合力。所选克隆重定格式成全长 IgG, 并使用 Biacore 测定其亲合力。亲本克隆 30.35 和亲合力成熟克隆的序列如图 1 所示。

[0499] 实施例 2 : 抗 EphB4 抗体的表征

[0500] 为了测定抗 EphB4 单抗的结合亲合力, 使用 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 进行表面等离子共振 (SRP) 测量。简言之, 依照供应商的说明书用盐酸 N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片 (CM5, BIAcore Inc.)。用 10mM 乙酸钠 pH4.8 将抗 EphB4 抗体稀释至 5 μ g/ml, 然后以 5 μ l/ 分钟的流速注入至获得约 500 个响应单位 (response unit RU) 的偶联抗体。接着, 注入 1M 乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量, 于 25°C 以约 25 μ l/ 分钟的流速注入在含 0.05% Tween-20 的 PBS 中两倍连续稀释的人或鼠 EphB4-His 分子 (0.7nM-500nM)。使用简单一对一朗格缪尔结合模型 (BIAcore Evaluation Software version 3.2) 计算结合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。平衡解离常数 (K_d) 以比率 k_{off}/k_{on} 计算。此实验的结果如表 3 所示。“NA”表示未进行测量。

[0501] 表 3 : 抗 EphB4 抗体对人和小鼠 EphB4 的结合亲和力和动力学

[0502]

抗EphB4	小鼠抗原			人抗原		
	$k_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	Kd(nM)	$k_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	Kd(nM)
YW30.35	0.31	0.75	2.4	0.03	0.96	32
YW30.35.1D2	1.28	< 0.05	< 0.04	0.36	< 0.05	< 0.14
YW30.35.2D8	0.92	< 0.05	< 0.05	0.4	< 0.05	< 0.12
YW30.35.2D12	NA	NA	NA	0.27	< 0.05	< 0.19
YM30.35.2D13	NA	NA	NA	0.45	< 0.05	< 0.11

[0503] 在不同实验中,测试了抗 EphB4 抗体克隆 30.35 针对其它 EphB 受体的交叉反应性。简言之, COS7 细胞用表达全长人 EphB1、人 EphB2、人 EphB4 或人 EphB6 的质粒瞬时转染。转染后 24 小时,细胞进行 FACS 分析以检测抗 EphB4 抗体的结合,如果有的话。抗 EphB4 克隆 30.35 不与人 EphB1、人 EphB2、人 EphB3 或人 EphB6 交叉反应。

[0504] 实施例 3:抗 EphB4 抗体在基于细胞的测定法中阻断 EphB4 受体信号传导

[0505] 为了证明抗 EphB4 抗体阻断膜结合 EphrinB2 和 EphB4 的相互作用的能力,我们进行了基于细胞的测定法,其中由不同细胞类型呈现 EphB4 和 EphrinB2。过表达人 EphrinB2 的 3T3 细胞用于刺激表达高水平 EphB4 但低水平 EphrinB2 的 HUVEC 细胞,测试了抗 EphB4 抗体抑制 EphB4 活化的能力。

[0506] 过表达人 EphrinB2 的 3T3 细胞如下制备:人全长 EphrinB2 克隆入 pcDNA5/FRT 载体 (Invitrogen),随后用于与 3T3.Flp 细胞 (Invitrogen) 一起依照制造商的手册生成稳定细胞系。

[0507] 过表达人 EphrinB2 的 3T3 细胞铺在 HUVEC 细胞之上达 15 或 30 分钟,此时存在或不存在抗 EphB4 抗体。EphB4 受体的活化如下评估,即免疫沉淀 EphB4 蛋白,然后使用抗磷酸-酪氨酸抗体(抗体 4G10;Upstate)通过 western 印迹检测受体酪氨酸磷酸化的存在与否。简言之,细胞用 RIPA 缓冲液裂解。细胞裂解物通过离心澄清,以 $5\mu\text{g}/$ 样品添加抗 EphB4 抗体 35.2D8。于 4°C 温育 2 小时后,免疫复合物使用蛋白 A 琼脂糖电泳。EphB4 磷酸化通过 Western 印迹使用抗磷酸酪氨酸抗体 4G10(Upstate) 以 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度进行分析。

[0508] 此实验的结果如图 7 所示。3T3 细胞铺在 HUVEC 细胞之上造成显著的 EphB4 酪氨酸磷酸化(第 4 和 5 道)。HUVEC 与抗 EphB4 抗体(克隆 35.2D8, $5\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 30 分钟预温育有效消除 3T3-EphrinB2 细胞覆盖诱导的 EphB4 酪氨酸磷酸化(第 6 道)。相反,用单独的抗 EphB4 抗体处理 HUVEC 细胞在 HUVEC 中不引起 EphB4 活化(第 2 和 3 道),而且未处理的 HUVEC 细胞不展示 EphB4 活化。这些结果确立了抗 EphB4 抗体在直接细胞-细胞接触的环境中阻断配体-受体相互作用。

[0509] 尽管为了清楚理解的目的已经通过举例说明的方式较为详细地描述了上述方面,但说明书和实施例不应解释为限制发明范围。

序列表

<110> 健泰科生物技术公司 (Genentech, Inc.)

<120> 抗 EPHB4 抗体及其使用方法

<130>P2300R1

<150>US 60/756, 889

<151>2006-01-05

<150>US 60/760, 892

<151>2006-01-20

<160>62

<210>1

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HVR-H1

<400>1

Gly Phe Thr Ile Ser Gly Tyr Tyr Ile His

5

10

<210>2

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HVR-H1

<400>2

Gly Phe Ser Ile Ser Asn Tyr Tyr Leu His

5

10

<210>3

<211>18

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HVR-H2

<400>3

Gly	Gly	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser
1				5				10					15	
Val	Lys	Gly												

<210>4

<211>18

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HVR-H2

<400>4

Gly	Gly	Ile	Tyr	Leu	Tyr	Gly	Ser	Ser	Ser	Glu	Tyr	Ala	Asp	Ser
1				5				10					15	
Val	Lys	Gly												

<210>5

<211>18

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HVR-H2

<400>5

Gly	Gly	Ile	Tyr	Leu	Tyr	Ser	Gly	Ser	Arg	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser
1				5				10					15	
Val	Lys	Gly												

<210>6

<211>18

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HVR-H2

<400>6

Gly	Gly	Ile	Tyr	Leu	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser
1				5					10					15
Val	Lys	Gly												

<210>7

<211>17

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HVR-H3

<400>7

Ala	Arg	Gly	Ser	Gly	Leu	Arg	Leu	Gly	Gly	Leu	Asp	Tyr	Ala	Met
1				5					10					15
Asp	Tyr													

<210>8

<211>17

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HVR-H3

<400>8

Ala	Arg	Ser	Ser	Gly	Leu	Arg	Leu	Gly	Gly	Leu	Asp	Tyr	Ala	Met
1				5					10					15
Asp	Tyr													

<210>9

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HVR-L1

<400>9

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

5

10

<210>10

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HVR-L1

<400>10

Arg Ala Ser Gln Asp Ser Glu Ile Phe Leu Ala

5

10

<210>11

<211>7

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HVR-L2

<400>11

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

5

<210>12

<211>7

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HVR-L2

<400>12

Ser Ala Ser Asn Leu Glu Ser

5

<210>13

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HVR-L3

<400>13

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

5

<210>14

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HVR-L3

<400>14

Gln Gln Ser Asn Ala Val Pro Leu Thr

5

<210>15

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HVR-L3

<400>15

Gln Glu Ser Thr Thr Thr Pro Pro Thr

5

<210>16

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HVR-L3

<400>16

Gln Lys Ser Glu Thr Ile Pro Pro Ser

5

<210>17

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HVR-L3

<400>17

Gln Gln Thr Ala Gln Thr Pro Glu Thr

5

<210>18

<211>107

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>Light chain variable domain of huMab4D5-8

<400>18

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

<210>19

<211>87

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>19

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

<210>20

<211>81

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>20

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

<210>21

<211>80

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>21

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

Val Thr Val Ser Ser
80

<210>22

<211>79

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>22

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

<210>23

<211>87

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>23

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser
1				5					10					15
Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Val	Ser
				20					25					30
Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg
				35					40					45

Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
50 55 60
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210>24

<211>81

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>24

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

<210>25

<211>80

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>25

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser

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

<210>26

<211>79

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>26

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

<210>27

<211>87

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>27

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

<210>28

<211>81

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>28

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

<210>29

<211>80

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>29

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

<210>30

<211>79

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>30

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Al a
				20					25					30
Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp
				35					40					45
Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala
				50					55					60
Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val

	65	70	75
Thr Val Ser Ser			
<210>31			
<211>87			
<212>PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 序列是合成的			
<400>31			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
1 5 10 15			
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys			
20 25 30			
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg			
35 40 45			
Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln			
50 55 60			
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser			
65 70 75			
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
80 85			

<210>32
 <211>81
 <212>PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400>32

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
1 5 10 15			
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala			
20 25 30			
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp			
35 40 45			

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210>33

<211>80

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>33

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

<210>34

<211>87

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>34

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

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

<210>35

<211>81

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>35

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

<210>36

<211>80

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>36

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

<210>37

<211>79

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>37

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

<210>38

<211>80

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>38

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

<210>39

<211>80

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>39

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

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210>40

<211>80

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>40

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

<210>41

<211>80

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>41

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

	35	40	45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu			
	50	55	60
Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr			
	65	70	75
Lys Val Glu Ile Lys			
	80		

<210>42

<211>23

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>42

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210>43

<211>15

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>43

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210>44

<211>32

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>44

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

<210>45

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>45

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
				5				10	

<210>46

<211>25

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>46

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5				10					15	
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser					
				20				25						

<210>47

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>47

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

<210>48

<211>30

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>48

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

<210>49

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>49

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210>50

<211>32

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>50

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

<210>51

<211>30

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>51

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

<210>52

<211>107

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400>52

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5					10					15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser
				20					25					30
Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35					40					45

Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
Ile	Lys													

<210>53

<211>128

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>Mab30.35 的重链可变区

<400>53

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1														
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Ile	Ser
Gly	Tyr	Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
Glu	Trp	Val	Gly	Gly	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe
Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met
Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
Gly	Ser	Gly	Leu	Arg	Leu	Gly	Gly	Leu	Asp	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr							

<210>54

<211>108

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>Mab30.35 的轻链可变区

<400>54

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

Ile Lys Arg

<210>55

<211>128

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>Mab30.35.1D2 的重链可变区

<400>55

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10				15	
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Ile	Ser
				20					25				30	
Gly	Tyr	Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40				45	

Glu	Trp	Val	Gly	Gly	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr
				50					55					60
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe
				65					70					75
Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met
				80					85					90
Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
				95					100					105
Ser	Ser	Gly	Leu	Arg	Leu	Gly	Gly	Leu	Asp	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
				110					115					120
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr							
				125										

<210>56

<211>108

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>Mab30. 35. 1D2 的轻链可变区

<400>56

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

<210>57

<211>128

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>Mab30. 35. 2D8 的重链可变区

<400>57

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

<210>58

<211>108

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>Mab30. 35. 2D8 的轻链可变区

<400>58

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5					10					15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser

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

<210>59

<211>128

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>Mab30. 35. 2D12 的重链可变区

<400>59

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

125

<210>60

<211>108

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>Mab30. 35. 2D12 的轻链可变区

<400>60

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

Ile Lys Arg

<210>61

<211>128

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>Mab30. 35. 2D13 的重链可变区

<400>61

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

Gly Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
	35	40 45
Glu Trp Val Gly Gly Ile Tyr Leu Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr		
	50	55 60
Ala Asp Ser Val Lys Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe		
	65	70 75
Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met		
	80	85 90
Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg		
	95	100 105
Gly Ser Gly Leu Arg Leu Gly Gly Leu Asp Tyr Ala Met Asp Tyr		
	110	115 120
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
	125	

<210>62

<211>108

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>Mab30. 35. 2D13 的轻链可变区

<400>62

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

克隆#	L3								
	89	90	91	92	93	94	95	96	97
30.35	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
30.35.1D2	Q	Q	S	N	A	V	P	L	T
30.35.2D8	Q	E	S	T	T	T	P	P	T
30.35.2D12	Q	K	S	E	T	I	P	P	S
30.35.2D13	Q	Q	T	A	Q	T	P	E	T

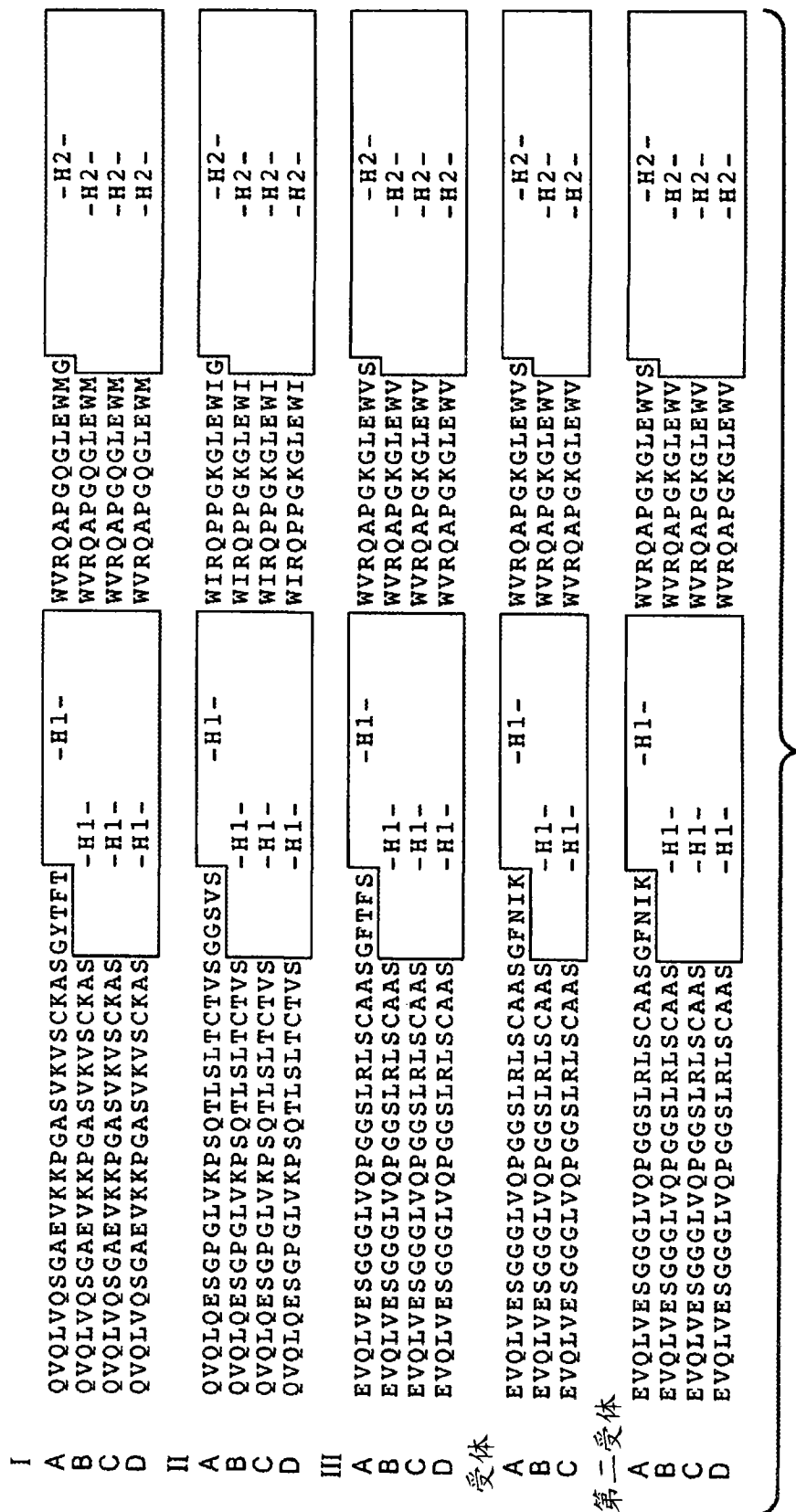


图 2A

I			
A	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	SEQ ID NO.: 19
B	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	SEQ ID NO.: 20
C	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCA	SEQ ID NO.: 21
D	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYC	SEQ ID NO.: 22
II			
A	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYCAR	SEQ ID NO.: 23
B	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYCAR	SEQ ID NO.: 24
C	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYCA	SEQ ID NO.: 25
D	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYC	SEQ ID NO.: 26
III			
A	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	SEQ ID NO.: 27
B	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	SEQ ID NO.: 28
C	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCA	SEQ ID NO.: 29
D	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYC	SEQ ID NO.: 30
受体			
A	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCSR	SEQ ID NO.: 31
B	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCSR	SEQ ID NO.: 32
C	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCS	SEQ ID NO.: 33
第二受体			
A	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	SEQ ID NO.: 34
B	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	SEQ ID NO.: 35
C	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCA	SEQ ID NO.: 36
D	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYC	SEQ ID NO.: 37

图 2B

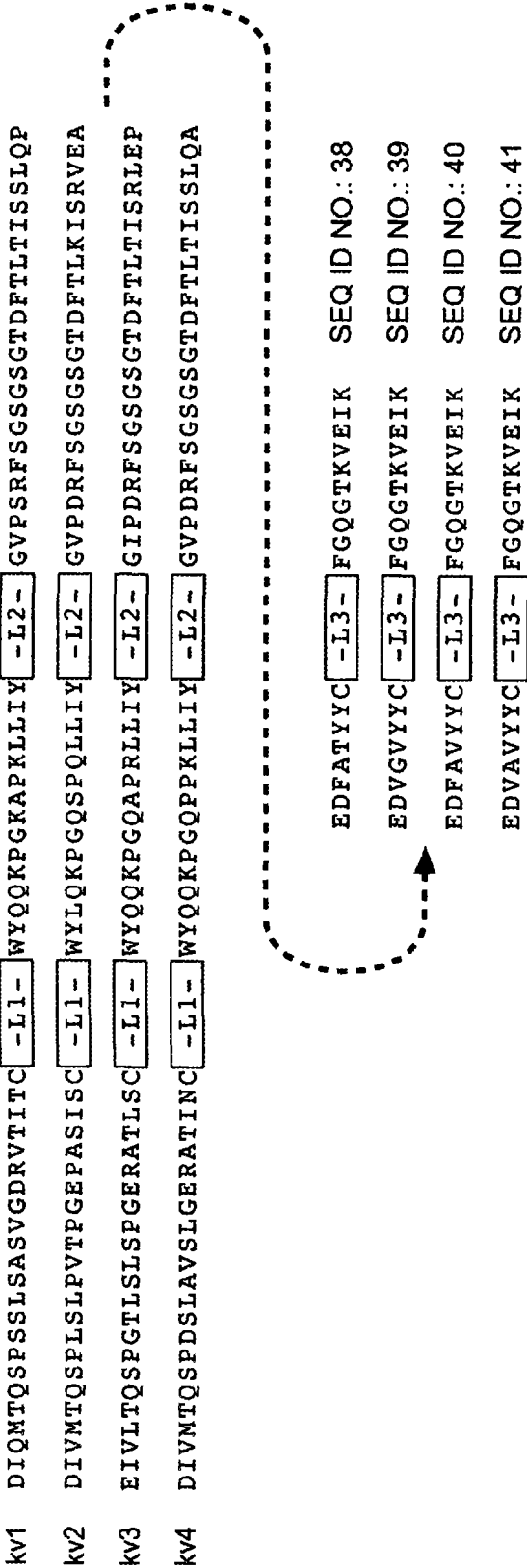


图 3

huMAb4D5-8 轻链的框架序列

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 42)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEQ ID NO: 43)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEQ ID NO: 44)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 45)

huMAb4D5-8 重链的框架序列

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 46)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEQ ID NO: 47)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹²
(SEQ ID NO: 48)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO: 49)

图 4

第 66 位(下划线)有修饰的 huMAb4D5-8 轻链的框架序列

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 42)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEQ ID NO: 43)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEQ ID NO: 50)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Arg Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 45)

第 71、73 和 78 位(下划线)有修饰的 huMAb4D5-8 重链的框架序列

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 46)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEQ ID NO: 47)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys⁹² (SEQ ID NO: 51)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO: 49)

图 5

30.35
VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGYYIHWRQAPGKGLEWVGGIYPYSGSTDY
ADSVKGYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLRLGGLDYAMDYWGQGLVT
(SEQ ID NO:53)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:54)

30.35.1D2
VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGYYIHWRQAPGKGLEWVGGIYPYSGSTDY
ADSVKGYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSGLRLGGLDYAMDYWGQGLVT
(SEQ ID NO:55)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDSEIFLAWYQQKPGKAPKLLIYSASNLESGVPS
RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSNAVPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:56)

30.35.2D8
VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSISNYLHWVRQAPGKGLEWVGGIYLYGSSSEY
ADSVKGYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLRLGGLDYAMDYWGQGLVT
(SEQ ID NO:57)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQESTTTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:58)

30.35.2D12
VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGYYIHWRQAPGKGLEWVGGIYLYSGSRGY
ADSVKGYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLRLGGLDYAMDYWGQGLVT
(SEQ ID NO:59)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQKSETIPPSFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:60)

30.35.2D13
VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGYYIHWRQAPGKGLEWVGGIYLYSGSTDY
ADSVKGYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLRLGGLDYAMDYWGQGLVT
(SEQ ID NO:61)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTAQTPETFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:62)

图 6

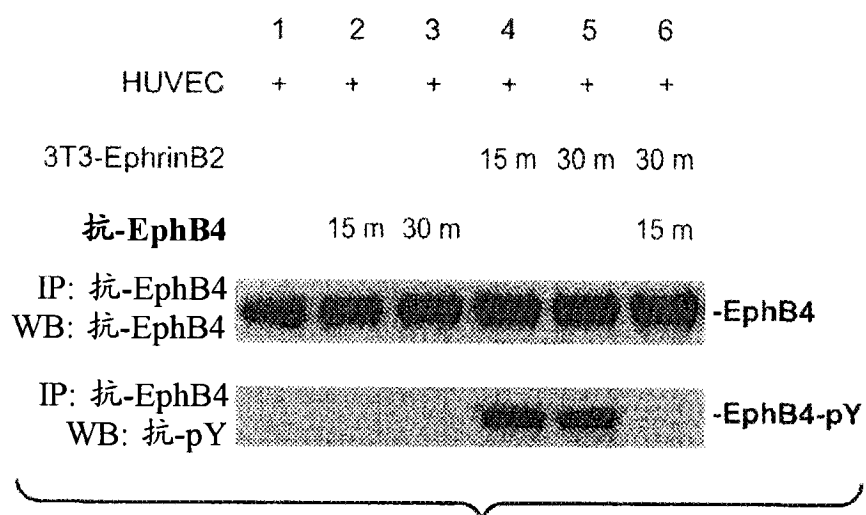


图 7

专利名称(译)	抗EPHB4抗体及其使用方法		
公开(公告)号	CN101395183B	公开(公告)日	2013-08-07
申请号	CN200780007824.X	申请日	2007-01-04
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
当前申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
[标]发明人	吴雁 严民宏		
发明人	吴雁 严民宏		
IPC分类号	C07K16/28 C12N5/10 G01N33/53 A61K39/395 A61P35/00 C07K16/30 C12N15/13 C12N15/63		
代理人(译)	张红春		
审查员(译)	唐华东		
优先权	60/760892 2006-01-20 US 60/756889 2006-01-05 US		
其他公开文献	CN101395183A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了抗EphB4抗体、包含这些抗体的组合物及使用这些抗体的方法。

克隆#	H1											
30.35	G	F	T	I	S	G	Y	Y	I	H		36
30.35.1D2	G	F	T	I	S	G	Y	Y	I	H		
30.35.2D8	G	F	S	I	S	N	Y	Y	L	H		
30.35.2D12	G	F	T	I	S	G	Y	Y	I	H		
30.35.2D13	G	F	T	I	S	G	Y	Y	I	H		

克隆#	H2	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
30.35	G	G	I	Y	P	Y	S	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	
30.35.1D2	G	G	I	Y	P	Y	S	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	
30.35.2D8	G	G	I	Y	L	Y	S	G	S	S	E	Y	A	D	S	V	K	G	
30.35.2D12	G	G	I	Y	L	Y	S	G	S	S	R	G	D	Y	A	D	S	V	K
30.35.2D13	G	G	I	Y	L	Y	S	G	S	S	R	G	D	Y	A	D	S	V	K

克隆#	H3	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	101	102
30.35	A	R	G	S	G	R	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y
30.35.1D2	A	R	S	S	G	L	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y
30.35.2D8	A	R	G	S	G	L	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y
30.35.12	A	R	G	S	G	L	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y
30.35.2D13	A	R	G	S	G	L	R	L	G	G	L	D	Y	A	M	D	Y

克隆#	L1	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
30.35	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	A
30.35.1D2	R	A	S	Q	D	S	F	I	F	L	A	A
30.35.2D8	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	A
30.35.2D12	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	A
30.35.2D13	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	A

克隆#	12	51	52	53	54	55	56
30.35	S	A	S	F	L	Y	S
30.35.1D2	S	A	S	N	L	E	S
30.35.2D8	S	A	S	F	L	Y	S
30.35.2D12	S	A	S	F	L	Y	S
30.35.2D13	S	A	S	F	L	Y	S

克隆#	L3								
	89	90	91	92	93	94	95	96	97
30.35	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
30.35.1D2	Q	Q	S	N	A	V	P	P	T
30.35.2D8	Q	E	S	T	T	T	P	P	T
30.35.2D12	Q	K	S	E	T	T	P	P	T
30.35.2D13	Q	Q	T	A	Q	T	P	P	S