



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1678633 B

(45) 授权公告日 2012.08.29

(21) 申请号 03813742.9

C12N 15/00(2006.01)

(22) 申请日 2003.06.12

C12P 21/00(2006.01)

(30) 优先权数据

10/170,390 2002.06.14 US

(56) 对比文件

WO 0034780 A2, 2000.06.15, 说明书 15 页
SEQ ID NO:10.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2004.12.13

KATO-H ET AL. Role of tyrosine
kinase activity in signal transduction
by the insulin-like growth factor-I (IGF-I)
receptor: Characterization of kinase-def
icient IGF-I receptors and the action
of an IGF-I-mimetic antibody (alpha-IR-3).
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 268
4. 1993, 268(4), 2655-2661.

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2003/016211 2003.06.12

(87) PCT 申请的公布数据

WO2003/106621 EN 2003.12.24

(73) 专利权人 伊缪诺金公司

地址 美国马萨诸塞州

审查员 吴永庆

(72) 发明人 R·辛格 D·J·塔瓦雷斯

N·E·达地吉恩

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 赵蓉民 路小龙

(51) Int. Cl.

C07K 16/00(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

C07H 21/04(2006.01)

权利要求书 4 页 说明书 31 页
序列表 38 页 附图 23 页

(54) 发明名称

抗 IGF-I 受体抗体

(57) 摘要

可特异结合并抑制胰岛素样生长因子-I 受体的抗体、人源化抗体、表面重构抗体、抗体片段、衍生抗体和与细胞毒性试剂形成的偶联物,它们可拮抗 IGF-I、IGF-II 和血清对肿瘤细胞生长和存活的效应,并且它们实质上不存在激动剂活性。所述的抗体及其片段可以用于治疗 IGF-I 受体表达水平升高的肿瘤,如乳癌,结肠癌,肺癌,前列腺癌,卵巢癌,滑膜肉瘤和胰腺癌,所述的衍生抗体可用于 IGF-I 受体表达水平升高的肿瘤的诊断和成像。

1. 与胰岛素样生长因子 -I 受体 (IGF-IR) 特异结合的抗体或表位结合抗体片段, 其中所述的抗体或抗体片段是所述受体的拮抗剂, 并且实质上对所述受体无激动剂活性, 并且其中所述抗体或表位结合抗体片段包含至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区, 其中所述重链可变区具有选自 SEQ ID NO :7 或 SEQ ID NO :13 所示的氨基酸序列, 其中所述轻链可变区具有选自 SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11 或 SEQ ID NO :12 所示的氨基酸序列, 所述片段含有完整抗体的所有互补性决定区。

2. 权利要求 1 中的抗体或抗体片段, 其中所述的抗体或抗体片段经表面重构。

3. 权利要求 1 中的抗体或抗体片段, 其中所述的抗体或抗体片段是人的或人源化的。

4. 与胰岛素样生长因子 -I 受体特异结合的抗体或表位结合抗体片段, 其中所述的抗体或抗体片段能够抑制癌症细胞在生长刺激物存在时的生长超过 80%, 所述生长刺激物选自血清、胰岛素样生长因子 -I 和胰岛素样生长因子 -II, 并且其中所述抗体或表位结合抗体片段包含至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区, 其中所述重链可变区具有选自 SEQ ID NO :7 或 SEQ ID NO :13 所示的氨基酸序列, 其中所述轻链可变区具有选自 SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11 或 SEQ ID NO :12 所示的氨基酸序列, 所述片段含有完整抗体的所有互补性决定区。

5. 权利要求 4 中的抗体或抗体片段, 其中所述的癌症细胞是人类癌细胞。

6. 权利要求 1-5 任一项中的抗体或抗体片段, 其中所述的重链可变区具有 SEQ ID NO :7 所示的氨基酸序列。

7. 权利要求 1-5 任一项中的抗体或抗体片段, 其中所述的重链可变区具有 SEQ ID NO :13 所示的氨基酸序列。

8. 权利要求 1-5 任一项中的抗体或抗体片段, 其中所述的轻链可变区具有 SEQ ID NO :8 所示的氨基酸序列。

9. 权利要求 1-5 任一项中的抗体或抗体片段, 其中所述的轻链可变区具有 SEQ ID NO :9 所示的氨基酸序列。

10. 权利要求 1-5 任一项中的抗体或抗体片段, 其中所述的轻链可变区具有 SEQ ID NO :10 所示的氨基酸序列。

11. 权利要求 1-5 任一项中的抗体或抗体片段, 其中所述的轻链可变区具有 SEQ ID NO :11 所示的氨基酸序列。

12. 权利要求 1-5 任一项中的抗体或抗体片段, 其中所述的轻链可变区具有 SEQ ID NO :12 所示的氨基酸序列。

13. 一种药学组合物, 其包括权利要求 1 中的抗体或抗体片段和药学上可接受的载体。

14. 一种偶联物, 其包括与细胞毒性试剂相连的权利要求 1 中的抗体或抗体片段。

15. 权利要求 14 中的偶联物, 其中所述的细胞毒性试剂选自美登素类, 紫杉烷和 CC-1065。

16. 一种药学组合物, 其包括权利要求 15 中的偶联物和药学上可接受的载体。

17. 一种诊断试剂, 其包括权利要求 13 或权利要求 16 的组合物, 其中所述的抗体或抗体片段被标记。

18. 权利要求 17 中的诊断试剂, 其中所述的标记选自放射性标记, 荧光团, 生色团, 显影剂和金属离子。

19. 一种抑制癌症细胞生长的体外方法,包括将所述的细胞与权利要求 1 的抗体或抗体片段接触。

20. 权利要求 1 的抗体或抗体片段在制备用于治疗患有癌症的患者的药物中的用途。

21. 权利要求 20 中的用途,所述药物进一步包括治疗试剂。

22. 权利要求 21 中的用途,其中所述的治疗试剂是细胞毒性试剂。

23. 权利要求 14 的偶联物在制备用于治疗患有癌症的患者的药物中的用途。

24. 权利要求 20 中的用途,其中所述的癌症选自乳腺癌,结肠癌,卵巢癌,骨肉瘤,宫颈癌,前列腺癌,肺癌,滑膜肉瘤和胰腺癌。

25. 权利要求 17 的诊断试剂在制备用于对疑为患有癌症的受试者进行诊断的药物中的用途。

26. 权利要求 25 中的用途,其中所述的癌症选择乳腺癌,结肠癌,卵巢癌,骨肉瘤,宫颈癌,前列腺癌,肺癌,滑膜肉瘤和胰腺癌。

27. 与胰岛素样生长因子 -I 受体特异结合的改良的抗体或表位结合抗体片段,其通过以下步骤制备:

(a) 提供编码抗体或表位结合抗体片段的 DNA,所述抗体或表位结合抗体片段与胰岛素样生长因子 -I 受体 (IGF-IR) 特异结合,其中所述的抗体或抗体片段是所述受体的拮抗剂,并且实质上对所述受体无激动剂活性,所述抗体或表位结合抗体片段包含至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区,其中所述重链可变区具有选自 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列,其中所述轻链可变区具有选自 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列,所述片段含有完整抗体的所有互补性决定区;

(b) 将至少一个核苷酸突变,删除或插入导入进所述的 DNA 中,这样由所述的 DNA 编码的所述抗体或抗体片段的氨基酸序列被改变;

(c) 表达所述的抗体或抗体片段;

(d) 筛选具有所述改良的所述的表达抗体或抗体片段,由此制备所述的改良的抗体或抗体片段。

28. 权利要求 27 中的抗体或抗体片段,其中所述的改良是对 IGF-I 受体的亲和性增加。

29. 权利要求 27 中的抗体或抗体片段,其中所述的至少一个核苷酸突变,删除或插入是通过选自下列的方法产生的:寡核苷酸介导的定点诱变,盒式诱变,易错 PCR, DNA 重排和使用大肠杆菌的增变株。

30. 编码权利要求 1-5 中的任何一个的抗体或抗体片段的多核苷酸。

31. 编码权利要求 1-5 中的任何一个的抗体或抗体片段的轻链或重链可变区的多核苷酸。

32. 含有权利要求 30 中的多核苷酸的载体。

33. 含有权利要求 31 中的多核苷酸的载体。

34. 权利要求 32 中的载体,其中所述的载体是能够表达所述抗体或抗体片段的表达载体。

35. 权利要求 33 中的载体,其中所述的载体是能够表达所述抗体或抗体片段的表达载体。

36. 由保藏于美国典型培养物保藏中心, 登记号为 PTA-4457 的杂交瘤细胞系产生的鼠抗体 EM164, 其可特异地结合胰岛素样生长因子 -I 受体, 其中所述的抗体是所述受体的拮抗剂, 并且对所述受体无激动剂活性。

37. 由保藏于美国典型培养物保藏中心, 登记号为 PTA-4457 的杂交瘤细胞系产生的 EM164 衍生出的人源化或表面重构的抗体或所述抗体的表位结合抗体片段, 其可特异地结合胰岛素样生长因子 -I 受体, 其中所述的抗体或抗体片段是所述受体的拮抗剂, 并且对所述受体无激动剂活性, 其中所述人源化或表面重构的抗体包含至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区, 其中所述重链可变区具有选自 SEQ ID NO :13、88 和 92 所示的氨基酸序列, 所述轻链可变区具有选自 SEQ ID NO :9-12、83-86、90、94、96 和 98 所示的氨基酸序列, 或其中所述人源化或表面重构的抗体包含至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区, 其中所述重链可变区由具有 SEQ ID NO :91 所示序列的多核苷酸编码, 和所述轻链可变区由具有选自 SEQ ID NO :89、93、95 和 97 所示序列的多核苷酸编码, 其中所述片段含有完整抗体的所有互补性决定区。

38. 权利要求 1 中的抗体或抗体片段, 其中所述的 IGF-IR 是人类 IGF-IR。

39. 杂交瘤细胞系 EM164, 其保藏于美国典型培养物保藏中心, 登记号为 PTA-4457。

40. 一种在体外于细胞中诱导凋亡的方法, 包括将所述细胞与权利要求 1 中的抗体或抗体片段接触。

41. 一种在体外于细胞中诱导凋亡的方法, 包括将所述细胞与权利要求 36 中的抗体或抗体片段接触。

42. 一种在体外于细胞中诱导凋亡的方法, 包括将所述细胞与权利要求 37 中的抗体或抗体片段接触。

43. 根据权利要求 40、41 或 42 的方法, 其中所述的细胞是癌症细胞。

44. 根据权利要求 1 中的抗体或抗体片段, 其中所述的抗体或抗体片段具有选自下列的至少一种特性:

- a) 抑制 IGF-IR 的细胞功能, 而且不激活所述的 IGF-IR;
- b) 在血清存在时抑制肿瘤细胞的生长至少 80%;
- c) 结合 IGF-IR, K_D 为 $0.3 \times 10^{-9}M$ 或更小;
- d) 抑制 IGF-I 与 IGF-IR 的结合;
- e) 抑制 IGF-I 通过 IGF-IR 介导的细胞信号传导;
- f) 抑制 IGF-I 诱导的 IGF-IR 磷酸化;
- g) 抑制 IGF-I 和 IGF-II 介导的细胞生长和存活;
- h) 与非洲绿猴 IGF-IR 结合, 但不与小鼠、中国仓鼠或羊的 IGF-IR 结合; 和
- i) 抑制 IRS-1, Akt 和 Erk 1/2 的活化。

45. 根据权利要求 44 的抗体或抗体片段, 其中所述的抗体或抗体片段具有所述的所有特性。

46. 根据权利要求 1 中的抗体或抗体片段, 其中所述的抗体或抗体片段是

- a) 免疫球蛋白 (Ig)G1-4、IgM、IgA1-2、IgD 或 IgE 分子, 或由其衍生; 或
- b) 单链抗体、单链抗体片段、Fab 片段、 $F(ab')_2$ 片段、可变区、高变区、VH 链、VL 链或单链抗体片段。

47. 含有权利要求 32 的载体的宿主细胞。

48. 含有权利要求 33 的载体的宿主细胞。

49. 一种制备抗 IGF-IR 抗体或表位结合抗体片段的方法,包括在适合于表达所述抗 IGF-IR 抗体或抗体片段的条件下培养权利要求 47 的宿主细胞,并收集所述抗 IGF-IR 抗体或抗体片段。

50. 一种制备抗 IGF-IR 抗体或表位结合抗体片段的方法,包括在适合于表达所述抗 IGF-IR 抗体或抗体片段的条件下培养权利要求 48 的宿主细胞,并收集所述抗 IGF-IR 抗体或抗体片段。

抗 IGF-I 受体抗体

技术领域

[0001] [01] 本发明涉及与人胰岛素样生长因子-I受体(IGF-I受体)结合的抗体。更具体地说,本发明涉及可抑制IGF-I受体的细胞功能的抗IGF-I受体抗体。更具体地,本发明涉及可拮抗IGF-I, IGF-II和血清对肿瘤细胞生长和存活的作用的抗体,它们基本上缺乏激动剂活性。本发明也涉及所述抗体的片段,所述抗体的人源化(humanized)和表面重构(resurfaced)的形式,所述抗体的偶联物(conjugates),抗体衍生物(derivatives),和它们在诊断,研究和治疗应用中的用途。本发明进一步涉及改良的抗体或其片段,它们可从上述的抗体及其片段制成。在另一个方面,本发明涉及编码所述抗体或其片段的多聚核苷酸,以及含有所述多聚核苷酸的载体。

背景技术

[0002] [02] 胰岛素样生长因子-I受体(IGF-I受体)是一种跨膜异源四聚体蛋白,其具有两个细胞外 α 链和两个跨膜 β 链,通过二硫键连接成 $\beta-\alpha-\alpha-\beta$ 构型。胰岛素样生长因子-I(IGF-I)和胰岛素样生长因子-II(IGF-II)作为配体通过IGF-I受体的细胞外结构域结合到其上,从而激活其细胞内的酪氨酸激酶结构域,引起该受体的自体磷酸化(autophosphorylation)和底物磷酸化。IGF-I受体与胰岛素受体同源,在 β 链的酪氨酸激酶结构域中有84%的高度序列相似性,在 α 链的细胞外富含半胱氨酸的结构域中有48%的较低序列相似性(Ulrich, A. 等,1986, EMBO, 5, 2503-2512; Fujita-Yamaguchi, Y. 等,1986, J. Biol. Chem., 261, 16727-16731; LeRoith, D. 等,1995, Endocrine Reviews, 16, 143-163)。IGF-I受体及其配体(IGF-I和IGF-II)在大量的生理学过程中扮演者重要角色,包括在胚胎发生,成体的代谢,细胞增殖和细胞分化过程中的生长和发育(LeRoith, D., 2000, Endocrinology, 141, 1287-1288; LeRoith, D., 1997, New England J. Med., 336, 633-640)。

[0003] [03] IGF-I和IGF-II可在血液中作为内分泌激素而发挥作用,此时它们主要与IGF结合蛋白以复合物的形式存在,IGF-I和IGF-II还可作为局部产生的旁分泌和自分泌生长因子而发挥作用(Humbel, R. E., 1990, Eur. J. Biochem., 190, 445-462; Cohick, W. S. 和 Clemmons, D. R., 1993, Annu. Rev. Physiol. 55, 131-153)。

[0004] [04] IGF-I受体被认为涉及促进肿瘤细胞的生长,转化和存活(Baserga, R. 等, 1997, Biochem. Biophys. Acta, 1332, F105-F126; Blakesley, V. A. 等, 1997, Journal of Endocrinology, 152, 339-344; Kaleko, M., Rutter, W. J. 和 Miller, A. D. 1990, Mol. Cell. Biol, 10, 464-473)。因此,已经知道数种类型的肿瘤表达的IGF-I受体水平较正常水平高,包括乳癌,结肠癌,卵巢癌,滑膜肉瘤和胰腺癌(Khandwala, H. M. 等, 2000, Endocrine Reviews, 21, 215-244; Werner, H. 和 LeRoith, D., 1996, Adv. Cancer Res., 68, 183-223; Happerfield, L. C. 等, 1997, J. Pathol, 183, 412-417; Frier, S. 等, 1999, Gut, 44, 704-708; van Dam, P. A. 等, 1994, J. Clin. Pathol., 47, 914-919; Xie, Y. 等, 1999, Cancer Res., 59, 3588-3591; Bergmann, U. 等, 1995, Cancer Res., 55, 2007-2011)。在体外,

IGF-I 和 IGF-II 显示可以作为数种人类肿瘤细胞系有效的有丝分裂原,如肺癌,乳癌,结肠癌,骨肉瘤和宫颈癌 (Ankrapp, D. P. 和 Bevan, D. R., 1993, *Cancer Res.*, 53, 3399-3404; Cullen, K. J., 1990, *Cancer Res.*, 50, 48-53; Hermanto, U. 等, 2000, *Cell Growth & Differentiation*, 11, 655-664; Guo, Y. S. 等, 1995, *J. Am. Coll. Surg.*, 181, 145-154; Kappel, C. C. 等, 1994, *Cancer Res.*, 54, 2803-2807; Steller, M. A. 等, 1996, *Cancer Res.*, 56, 1761-1765)。这些肿瘤和肿瘤细胞系中的数种也可表达高水平的 IGF-I 或 IGF-II, 它们可以自分泌或旁分泌的方式刺激其生长 (Quinn, K. A. 等, 1996, *J. Biol. Chem.*, 271, 11477-11483)。

[0005] [05] 流行病学研究已经显示,较高的 IGF-I 血浆水平(和 IGF 结合蛋白-3 的较低水平)与前列腺癌,结肠癌,肺癌和乳癌的危险性增加有关 (Chan, J. M. 等, 1998, *Science*, 279, 563-566; Wolk, A. 等, 1998, *J. Natl. Cancer Inst.*, 90, 911-915; Ma, J. 等, 1999, *J. Natl. Cancer Inst.*, 91, 620-625; Yu, H. 等, 1999, *J. Natl. Cancer Inst.*, 91, 151-156; Hankinson, S. E. 等, 1998, *Lancet*, 351, 1393-1396)。已经有建议,可以采用降低血浆中 IGF-I 水平或抑制 IGF-I 受体功能的策略来预防癌症 (Wu, Y. 等, 2002, *Cancer Res.*, 62, 1030-1035; Grimberg, A 和 Cohen P., 2000, *J. Cell. Physiol*, 183, 1-9)。

[0006] [06] IGF-I 受体可保护肿瘤细胞免受生长因子缺失 (growth factor deprivation), 贴壁非依赖性 (anchorage-independence) 或细胞毒性药物处理所引起的凋亡 (Navarro, M. 和 Baserga, R., 2001, *Endocrinology*, 142, 1073-1081; Baserga, R. 等, 1997, *Biochem. Biophys. Acta*, 1332, F105-F126)。对其促有丝分裂,转化和抗凋亡活性至关重要的 IGF-I 受体结构域已经通过突变分析被鉴定出来。

[0007] [07] 例如, IGF-I 受体的酪氨酸 1251 残基被鉴定对于抗凋亡和转化活性非常重要,但与其促有丝分裂活性无关 (O'Connor, R. 等, 1997, *Mol. Cell. Biol*, 17, 427-435; Miura, M. 等, 1995, *J. Biol. Chem.*, 270, 22639-22644)。通过配体活化的 IGF-I 受体的细胞内信号通路涉及胰岛素受体底物 (IRS-1 和 IRS-2) 的酪氨酸残基的磷酸化,它们可将磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI-3-激酶) 招集 (recruit) 至膜上。PI-3 激酶的膜结合磷脂产物可活化丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt, 其底物包括促凋亡蛋白 BAD, 它可被磷酸化成为非活化状态 (Datta, S. R., Brunet, A. 和 Greenberg, M. E., 1999, *Genes & Development*, 13, 2905-2927; Kulik, G., Klippel, A. 和 Weber, M. J., 1997, *Mol. Cell. Biol* 17, 1595-1606)。在 MCF-7 人乳癌细胞中 IGF-I 受体的促有丝分裂信号需要 PI-3-激酶,不依赖有丝分裂原活化的蛋白激酶,而在分化的大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞中的存活信号需要 PI-3-激酶和有丝分裂原活化的蛋白激酶通路 (Dufourny, B. 等, 1997, *J. Biol. Chem.*, 272, 31163-31171; Parfizas, M., Saltiel, A. R. 和 LeRoith, D., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272, 154-161)。

[0008] [08] 已经显示,通过反义 (anti-sense) 策略下调 IGF-I 受体可降低几种肿瘤细胞系在体内和体外的致肿瘤性,如黑色素瘤,肺癌,卵巢癌,成胶质细胞瘤,成神经细胞瘤和横纹肌肉瘤 (Resnicoff, M. 等, 1994, *Cancer Res.*, 54, 4848-4850; Lee, C.-T. 等, 1996, *Cancer Res.*, 56, 3038-3041; Muller, M. 等, 1998, *Int. J. Cancer*, 77, 567-571; Trojan, J. 等, 1993, *Science*, 259, 94-97; Liu, X. 等, 1998, *Cancer Res.*, 58, 5432-5438; Shapiro, D. N. 等, 1994, *J. Clin. Invest.*, 94, 1235-1242)。而且,据报道, IGF-I 受体的显性负突变体 (dominant negative mutant) 可降低过度表达 IGF-I 受体的转化 Rat-1 细胞在体内的

致肿瘤性和体外的生长 (Prager, D. 等, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 2181-2185)。

[0009] [09] 表达 IGF-I 受体 mRNA 的反义分子的肿瘤细胞当被注射进入动物中时, 在生物扩散腔 (biodiffusion chambers) 中会发生大量的凋亡。这种观察使得 IGF-I 受体成为一种有吸引力的治疗靶标, 这是基于这样的假设, 即通过抑制 IGF-I 受体可使肿瘤细胞较正常细胞更易凋亡 (Resnicoff, M. 等, 1995, Cancer Res., 55, 2463-2469; Baserga, R., 1995, Cancer Res., 55, 249-252)。

[0010] [10] 在肿瘤细胞中抑制 IGF-I 受体的功能的另一个策略是应用抗 IGF-I 受体的抗体, 所述抗体可与 IGF-I 受体的细胞外结构域结合, 并抑制其活化。据报道, 已经进行了几种尝试来开发抗 IGF-I 受体的鼠单克隆抗体, 其中获得了两种抑制性抗体 IR3 和 1H7, 它们的应用已经在几个 IGF-I 受体研究中被报道。

[0011] [11] 应用胰岛素受体的部分纯化的胎盘制剂来免疫小鼠, 产生选择性地结合胰岛素受体的抗体 IR1, 以及两种抗体 IR2 和 IR3, 这两种抗体显示出对 IGF-I 受体 (生长调节素 -C 受体) 的优先沉淀, 但也能微弱地沉淀胰岛素受体, 由此开发出 IR3 抗体 (Kull, F. C. 等, 1983, J. Biol. Chem., 258, 6561-6566)。

[0012] [12] 通过用纯化的 IGF-I 受体胎盘制剂免疫小鼠开发出 1H7 抗体, 在这个过程中除了产生抑制性抗体 1H7 外, 还产生三种刺激性抗体 (Li, S.-L. 等, 1993, Biochem. Biophys. Res. Commun., 196, 92-98; Xiong, L. 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5356-5360)。

[0013] [13] 在另一个报道中, 通过用表达高水平的 IGF-I 受体的转染 3T3 细胞免疫小鼠, 获得一系列针对人 IGF-I 受体的特异性鼠单克隆抗体, 通过结合竞争研究及其对 IGF-I 与转染 3T3 细胞结合的抑制或刺激可将它们分为 7 类 (Soos, M. A. 等, 1992, J. Biol. Chem., 267, 12955-12963)。

[0014] [14] 因此, 尽管 IR3 抗体是体外 IGF-I 受体研究中最常用的抑制性抗体, 但它有一些缺点, 即它对表达人 IGF-I 受体的转染 3T3 和 CHO 细胞显示有激动活性 (agonistic activity) (Kato, H. 等, 1993, J. Biol. Chem., 268, 2655-2661; Steele-Perkins, G. 和 Roth, R. A., 1990, Biochem. Biophys. Res. Commun., 171, 1244-1251)。同样, 在由 Soos 等人开发的一系列抗体中, 最具抑制性的抗体 24-57 和 24-60 也在转染 3T3 细胞中显示出激动活性 (Soos, M. A. 等, 1992, J. Biol. Chem., 267, 12955-12963)。尽管, 据报道 IR3 抗体可抑制 IGF-I (但不是 IGF-II) 与完整细胞中表达的受体的结合, 在溶解后, 它显示出在体外抑制 IGF-I 和 IGF-II 刺激细胞中 DNA 合成的能力 (Steele-Perkins, G. 和 Roth, R. A., 1990, Biochem. Biophys. Res. Commun., 171, 1244-1251)。IR3 抗体的结合表位已经从嵌合的胰岛素-IGF-I 受体构建物中推导出来, 是 IGF-I 受体的 223-274 区域 (Gustafson, T. A. 和 Rutter, W. J., 1990, J. Biol. Chem., 265, 18663-18667; Soos, M. A. 等, 1992, J. Biol. Chem., 267, 12955-12963)。

[0015] [15] MCF-7 人乳癌细胞系通常被用作模型细胞系来证明体外 IGF-I 和 IGF-II 的生长响应 (Dufourny, B. 等, 1997, J. Biol. Chem., 272, 31163-31171)。在 MCF-7 细胞中, IR3 抗体可不完全地阻断在无血清的条件下外源性添加的 IGF-I 和 IGF-II 的刺激效应的大约 80%。而且, IR3 抗体在 10% 的血清中并不很明显地抑制 (小于 25%) MCF-7 细胞的生长 (Cullen, K. J. 等, 1990, Cancer Res., 50, 48-53)。在体外, IR3 抗体对血清刺激的 MCF-7

细胞生长的这种微弱抑制作用与体内研究的结果一致,在体内, IR3 抗体的处理并不能明显抑制裸鼠中 MCF-7 异种移植物的生长 (Arteaga, C. L. 等, 1989, J. Clin. Invest., 84, 1418-1423)。

[0016] [16] 由于 IR3 和其他已报道的抗体的微弱激动活性,以及它们不能明显抑制肿瘤细胞如 MCF-7 细胞在血清刺激这样更加生理化的条件下生长(这里所述的血清刺激不同于在无血清条件下外源添加的 IGF-I 或 IGF-II 的刺激作用),因此需要能够明显抑制肿瘤细胞的血清刺激性生长,但其本身不显示出明显的激动剂活性的新的抗 IGF-I 受体抗体。

[0017] 发明概述

[0018] [17] 因此,本发明的一个目的是提供可特异结合胰岛素样生长因子 -I 受体并通过拮抗该受体而抑制该受体的细胞活性的抗体,抗体片段和抗体衍生物,它们实质上也不具有对该受体的激动剂活性。

[0019] [18] 因此,在第一个实施方案中,提供了鼠抗体 EM 164,在此对其进行了完整的表征,即其轻链和重链可变区的氨基酸序列,轻链和重链可变区的基因的 cDNA 序列,其 CDR(互补决定区)的鉴定,其表面氨基酸的鉴定,和将其以重组形式进行表达的手段。

[0020] [19] 在又一个实施方案中,提供了重构表面或人源化的抗体 EM 164,其中所述抗体或其片段的暴露于表面的残基在轻链和重链中被重置以便更接近已知的人抗体表面。这种人源化抗体与鼠 EM164 相比,在作为治疗或诊断试剂方面的实用性要更强。人源化的抗体 EM164 的特征在此也完全被揭示,包括其轻链和重链可变区各自的氨基酸序列,轻链和重链可变区的基因的 DNA 序列,CDR 的鉴定,其表面氨基酸的鉴定,和其以重组形式进行表达的方式的公开。

[0021] [20] 在第三个实施方案中,提供了一种抗体,它能够在生长刺激物存在的情况下抑制癌症细胞的生长超过大约 80%,所述刺激物例如血清,胰岛素样生长因子 -I 和胰岛素样生长因子 -II。

[0022] [21] 在第四个实施方案中,提供了一种抗体或抗体片段,其具有重链和轻链,所述重链包含分别具有 SEQ ID NOS:1-3 中所示的氨基酸序列的 CDR:

[0023] SYWMH (SEQ ID NO:1),

[0024] EINPSNGRTNYNEKFKR (SEQ ID NO:2),

[0025] GRPDYYGSSKWYFDV (SEQ ID NO:3);

[0026] 所述轻链包含分别具有 SEQ ID NOS:4-6 中所示的氨基酸序列的 CDR:

[0027] RSSQSIVHSNVNTYLE (SEQ ID NO:4);

[0028] KVSNRFS (SEQ ID NO:5);

[0029] FQGSHVPPT (SEQ ID NO:6)。

[0030] [22] 在第五个实施方案中,提供了抗体,其重链具有的氨基酸序列与 SEQ ID NO:7 中所示的氨基酸序列具有至少 90% 的序列同一性(identity):

[0031] QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKRPGQGLEWIGEINPSNGRTNYNEKFKRKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYFARGRPDYYGSSKWYFDVWGAGTTTVTVSS (SEQ ID NO:7)。

[0032] [23] 同样,提供了抗体,其轻链具有的氨基酸序列与 SEQ ID NO:8 中所示的氨基酸序列具有至少 90% 的序列同一性:

[0033] DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNVNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSG

SGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIKR(SEQ ID NO :8)。

[0034] [24] 在第六个实施方案中,提供了抗体,其具有人源化或重构表面的轻链可变区,该区域具有与 SEQ ID NOS :9-12 中之一对应的氨基酸序列:

[0035] DVVMTQTPLSLPVSLGDPASISCRSSQSIVHSNVTYLEWYLQKPGQSPRLIYKVSNRFSGVPDRFSGS GAGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIKR(SEQ ID NO :9);

[0036] DVLMTQTPLSLPVSLGDPASISCRS QSIVHSNVTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGAGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIKR(SEQ ED NO :10);

[0037] DVLMTQTPLSLPVSLGDPASISCRSSQSIVHSNVTYLEWYLQKPGQSPRLIYKVSNRFSGVPDRFSGS GAGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIKR(SEQ ID NO :11);或

[0038] DVVMTQTPLSLPVSLGDPASISCRSSQSIVHSNVTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSG SGAGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIKR(SEQ ID NO :12)。

[0039] [25] 同样,提供了抗体,其具有人源化或重构表面的重链可变区,该区域具有与 SEQ ID NO :13 对应的氨基酸序列:

[0040] QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKRPGQGLEWIGEINPSNGRTNYNQKFQ GKAT LTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYFARGRPDYYS SKWYFDVWGQGTTVTVSS(SEQ ID NO :13)。

[0041] [26] 在第七个实施方案中,提供了具有改良的特性的本发明抗体或抗体片段。例如,对 IGF-I 受体具有更强的亲和性的抗体或抗体片段可通过本发明的抗体或片段的亲和力成熟 (affinity maturation) 来制备。[27] 本发明进一步提供了所述抗体的偶联物,其中细胞毒性试剂直接地或者通过一个可断裂的或不可断裂的连接物 (linker) 共价连接于本发明的抗体或抗体的表位 (epitope) 结合片段。在优选的实施方案中,所述细胞毒性试剂是紫杉醇,美登素类 (maytansinoid), CC-1065 或 CC-1065 类似物 (analog)。

[0042] [28] 本发明进一步提供了被进一步标记的可在研究或诊断应用中被使用的抗体或其片段。在优选的实施方案中,所述标记是放射标记,荧光团 (fluorophore), 生色团 (chromophore), 显影剂 (imaging agent) 或金属离子。

[0043] [29] 也提供了一种诊断方法,其中所述的被标记的抗体或片段被施于怀疑患有癌症的受试者,并测定或监测受试者体内的标记物的分布。

[0044] [30] 在第八个实施方案中,本发明提供了通过将本发明的抗体,抗体片段或抗体偶联物单独施用或者与其他细胞毒性试剂或治疗试剂联合施用来治疗患有癌症的受试者的方法。所述癌症可以是下列的一种或者多种,例如乳癌,结肠癌,卵巢癌,骨肉瘤,宫颈癌,前列腺癌,肺癌,滑膜肉瘤,前列腺癌或其他被确定其中 IGF-I 受体水平升高的癌症。

附图说明

[0045] [31] 图 1 显示了纯化的 EM164 抗体与过量表达人 Y1251F IGF-I 受体或人胰岛素受体的细胞的特异结合的荧光激活细胞拣选 (FACS) 分析。

[0046] [32] 图 2 显示了 EM164 抗体与生物素化人 IGF-I 受体结合的结合滴定曲线。

[0047] [33] 图 3 显示了 EM164 抗体对生物素化 IGF-I 与人乳癌 MCF-7 细胞结合的抑制。

[0048] [34] 图 4 显示了 EM164 抗体对 MCF-7 细胞中 IGF-I 刺激的 IGF-I 受体自体磷酸化的抑制。

[0049] [35] 图 5 显示了 EM164 抗体对 MCF-7 细胞中 IGF-I 刺激的 IRS-1 磷酸化的抑制。

- [0050] [36] 图 6 显示了 EM164 抗体对 SaOS-2 细胞中 IGF-I 刺激的信号转导的抑制。
- [0051] [37] 图 7 显示了通过 MTT 分析检测的 EM164 抗体对不同的生长条件下, MCF-7 细胞的生长和存活的影响。
- [0052] [38] 图 8 显示了在不同血清浓度下 EM164 抗体对 MCF-7 细胞的生长和存活的影响。
- [0053] [39] 图 9 显示了 EM164 抗体对 IGF-I 和血清刺激的 NCI-H838 细胞生长 和存活的抑制作用。
- [0054] [40] 图 10 显示了 EM164 抗体, 紫杉醇或 EM164 抗体和紫杉醇的联合处理对小鼠中 Calu-6 肺癌异种移植物生长的影响。
- [0055] [41] 图 11 显示了人源化 EM164 抗体 (v1.0) 和鼠 EM164 抗体结合之间的竞争。
- [0056] [42] 图 12 显示了鼠抗 IGF-I 受体抗体 EM164 的轻链引导区和可变区的 cDNA (SEQ ID NO :49) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :50)。箭头标记了构架 1 的起始点。3 个 CDR 的序列根据 Kabat 被划线标出。
- [0057] [43] 图 13 显示了鼠抗 IGF-I 受体抗体 EM164 重链引导区和可变区的 cDNA (SEQ ID NO :51) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :52)。箭头标记了构架 1 的起始点。3 个 CDR 序列根据 Kabat 被划线标出。
- [0058] [44] 图 14 显示了抗体 EM164 的轻链和重链 CDR 氨基酸序列, 根据 Chothia 典型分类定义 (Chothis canonical class definitions) 确定。也显示了 AbM 建模软件对重链 CDR 的定义。轻链 :CDR1 是 SEQ ID NO :4, CDR2 是 SEQ ID NO :5, CDR3 是 SEQ ID NO :6。重链 :CDR1 是 SEQ ID NO :1, CDR2 是 SEQ ID NO :2, 和 CDR3 是 SEQ ID NO :3。AbM 重链 :CDR1 是 SEQ ID NO :53, CDR2 是 SEQ ID NO :54, CDR3 是 SEQ ID NO :55。
- [0059] [45] 图 15 显示了 Cr1 (SEQ ID NO :56) 和 J558.c (SEQ ID NO :57) 基因的胚系序列与抗 IGF-I 受体抗体 EM164 的轻链和重链氨基酸序列的比对。短划线 (-) 表示序列的同一性。
- [0060] [46] 图 16 显示了用于构建和表达重组的嵌合的和人源化的 EM164 抗体的质粒。A) 轻链克隆质粒, B) 重链克隆质粒, C) 哺乳动物抗体表达质粒。
- [0061] [47] 图 17 显示了从结构文件组中的 127 个抗体中筛选出的轻链的 10 个最同源的氨基酸序列, 被用来预测 EM164 的表面残基, em164LC (SEQ ID NO :58), 2jel (SEQ ID NO :59), 2pcp (SEQ ID NO :60), 1nqb (SEQ ID NO :61), 1kel (SEQ ID NO :62), 1hyx (SEQ ID NO :63), 1ligf (SEQ ID NO :64), 1tet (SEQ ID NO :65), 1clz (SEQ ID NO :66), 1bln (SEQ ID NO :67), 1cly (SEQ ID NO :68), 保守序列 (SEQ ID NO :69)。
- [0062] [48] 图 18 显示了从结构文件组中的 127 个抗体中筛选出的重链的 10 个最同源的氨基酸序列, 被用来预测 EM164 的表面残基, em164HC (SEQ ID NO :70), 1nqb (SEQ ID NO :71), 1ngp (SEQ ID NO :72), 1fbi (SEQ ID NO :73), 1afv (SEQ ID NO :74), 1yuh (SEQ ID NO :75), 1plg (SEQ ID NO :76), 1d5b (SEQ ID NO :77), 1ae6 (SEQ ID NO :78), 1axs (SEQ ID NO :79), 3hf1 (SEQ ID NO :80), 保守序列 (SEQ ID NO :81)。
- [0063] [49] 图 19 显示了所述 10 个最同源结构的每个 (A) 轻链和 (B) 重链可变区残基的平均可及性。数字代表在 Kabat 抗体序列中的位置编号。
- [0064] [50] 图 20 显示了鼠 EM164 (muEM164) 和人源化 EM164 (huEM164) 的轻链可变区氨

氨基酸序列。muEM164 (SEQ ID NO :82), huEM164V1.0 (SEQ ED NO :83), huEM164V1.1 (SEQ ED NO :84), huEM164V1.2 (SEQ ED NO :85), huEM164V1.3 (SEQ ED NO :86)。

[0065] [51] 图 21 显示了鼠 EM164 抗体 (muEM164, SEQ ID NO :87) 和人源化 EM164 抗体 (huEM164, SEQ ED NO :88) 的重链可变区氨基酸序列。

[0066] [52] 图 22 显示了 huEM164v1.0 轻链可变区 DNA 和氨基酸序列 (DNA, SEQ ID NO :89, 氨基酸 SEQ ID NO :90) 和重链可变区 DNA 和氨基酸序列 (DNA, SEQ ID NO :91, 氨基酸 SEQ ID NO :92)。

[0067] [53] 图 23 显示了人源化 EM164v1.1 的轻链可变区 DNA 和氨基酸序列 (DNA, SEQ ID NO :93; 氨基酸 SEQ ID NO :94), v1.2 的轻链可变区 DNA 和氨基酸序列 (DNA, SEQ ID NO :95; 氨基酸 SEQ ID NO :96) 和 v1.3 的轻链可变区 DNA 和氨基酸序列 (DNA, SEQ ID NO :97; 氨基酸 SEQ ID NO :98)。

[0068] [54] 图 24 显示了人源化 EM164v1.0 抗体和鼠 EM164 抗体对 IGF-I 刺激的 MCF-7 细胞生长和存活的抑制。

[0069] [55] 图 25 显示 EM164 可抑制 IGF-I 刺激的 MCF-7 细胞周期。

[0070] [56] 图 26 显示 EM164 可抑制 IGF-I 和血清的抗凋亡效应。用 EM164 进行的处理可引起细胞凋亡式的细胞死亡,这通过被切割的 CK18 蛋白水平升高证实。

[0071] [57] 图 27 显示了使用 EM164 抗体,吉西他滨 (gemcitabine) 或 EM164 和吉西他滨的联合进行的处理对免疫缺陷小鼠中人 BxPC-3 胰腺癌异种移植物生长的影响。

[0072] 发明详述

[0073] [58] 本发明发现和改良了可与细胞表面上的人胰岛素样生长因子 -I 受体 (IGF-IR) 特异结合的新的抗体。所述抗体和片段具有独特的抑制受体的细胞功能的能力,而没有活化受体本身的能力。因此,以前已知的可特异结合和抑制 IGF-IR 的抗体即使在缺少 IGF-IR 配体的情况下也可活化受体,而本发明的抗体或片段可拮抗 IGF-IR 却又实质上缺少激动剂活性。而且,本发明的抗体和抗体片段可抑制人肿瘤细胞如 MCF-7 细胞在有血清条件下的生长超过 80%,其抑制程度高于使用以前已知的抗 IGF-IR 抗体所获得的程度。

[0074] [59] 本发明的实施源自一种鼠抗 IGF-IR 抗体,在此称为 EM164,对此进行了完全的表征,包括轻链和重链的氨基酸序列,CDR 的鉴定,表面氨基酸的鉴定,以及其以重组形式进行表达的方式。

[0075] [60] 在图 15 中显示了胚系序列 (germline sequence),并将其与 EM164 的序列进行比对。这样的比较鉴定出 EM164 中可能的体细胞突变 (somatic mutation),包括在轻链 CDR1 中的一个和重链 CDR2 中的一个。

[0076] [61] 抗体 EM164 和其人源化形式的轻链和重链的一级氨基酸和 DNA 序列在此被公开。但本发明的范围不限于包含这些序列的抗体和片段。相反,与胰岛素样生长因子 -I 受体特异结合,并拮抗该受体的生物学活性,而又实质上缺少激动剂活性的所有抗体和片段都包括在本发明的范围之内。因此,抗体和抗体片段可能在其骨架 (scaffold), CDR, 轻链和重链的氨基酸序列上与抗体 EM164 或人源化衍生物有区别,并仍然包括在本发明的范围之内。

[0077] [62] 通过建模 (modeling) 和其分子结构而鉴定的抗体 EM164 的 CDR 已经被预测。另外,尽管所述 CDR 对于抗原结合部位 (epitope) 的识别很重要,但它们对于本发明的抗体

和片段并不是必需的。因此,提供了具有改善的性质的抗体和片段,例如可通过本发明的抗体的亲和力成熟来产生。

[0078] [63] 多样的抗体和抗体片段,以及抗体模拟物 (mimics) 可以很容易地通过在位于一套特定的 CDR 的侧面的可变区和恒定区序列中进行突变,删除和 / 或插入而产生。因此,例如,对于一套既定的 CDR,可以通过不同重链的取代而得到不同类型的 Ab,由此产生例如 IgG1-4, IgM, IgA1-2, IgD, IgE 型抗体和同型 (isotypes) 抗体。同样,在本发明范围内的人造抗体可通过将一组既定的 CDR 嵌入进整个合成的骨架中而产生。术语“可变的 (variable)”在此用来描述可变结构域的某些部分,它们的序列在抗体之间是不同的,可用于各种特定抗体与其抗原的特异性结合。然而,可变性通常并不是在抗体的可变结构域中平均分布的。这种可变性典型地集中在轻链和重链可变结构域内的称为互补性决定区 (complementarity determining regions, CDR) 或高变区 (hypervariable regions) 的三个片段内。可变结构域的更加高度保守的部分称为构架 (framework, FR)。重链和轻链的可变结构域每个都包含 4 个构架区,大部分采取 β -片层构型,通过三个 CDR 连接,形成环状连接,在一些情况下形成 β -片层结构的一部分。各条链中的 CDR 通过 FR 区紧靠在一起,并和来自另一条链的 CDR 一起形成抗体的抗原结合位点 (E. A. Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, 1991, NIH)。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但显示有多种效应器功能 (effector function), 如该抗体参与抗体依赖的细胞毒性。

[0079] [64] 人源化抗体或不受其他哺乳动物排斥的抗体可以采用几种技术来产生,如表面重构 (resurfacing) 和 CDR 移植 (CDR grafting)。在表面重构技术中,将分子建模,统计分析和诱变技术结合起来调整可变区的非 CDR 表面以使其类似于靶宿主的已知抗体的表面。抗体表面重构的策略和方法降低抗体在不同宿主中的免疫原性的其它方法在美国专利 5,639,641 中公开,在此引入以供参考。在 CDR 移植技术中,鼠重链和轻链 CDR 被移植进人的整个构架序列中。

[0080] [65] 本发明也包括在本说明书中描述的抗体的功能等价物 (functionalequivalents)。功能等价物具有与所述抗体相当的结合特性,包括例如,嵌合的,人源化的和单链的抗体及其片段。产生这样的功能等价物的方法在 PCT 申请 WO 93/21319, 欧洲专利申请 239,400 ; PCT 申请 W089/09622 ; 欧洲专利申请 338,745 ; 和欧洲专利申请 EP 332,424 中公开,分别在此整体引入以供参考。

[0081] [66] 功能等价物包括有其氨基酸序列实质上与本发明的抗体的可变区或高变区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。“实质上相同”在用于描述氨基酸序列时是指与另一条氨基酸序列具有至少大约 90%, 更优选至少大约 95% 的序列同一性的序列,这种同一性可以根据 Pearson 和 Lipman 的 FASTA 搜索方法测定, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-2448 (1988)。

[0082] [67] 嵌合抗体优选具有实质上或全部地源自人抗体恒定区的恒定区以及实质上或全部地源自除人之外的哺乳动物的可变区序列的可变区。抗体的人源化形式的制备例如可通过将鼠抗体的互补性决定区放进人构架结构域中来完成,例如,见 PCT 申请公开号 W092/22653。人源化抗体优选具有除了实质上或全部地源自相应的人抗体区的互补性决定区 (CDR) 和实质上或全部地源自非人的哺乳动物的 CDR 之外的恒定区和可变区。

[0083] [68] 功能等价物也包括单链抗体片段,也称为单链抗体(scFvs)。这些片段含有抗体可变重链氨基酸序列(V_H)的至少一个片段,该片段与抗体可变轻链序列(V_L)的至少一个片段相连,这些片段间可以具有一个或多个将其互相连接的连接物,也可以没有这样的连接物。这样的连接物可以是短的,柔性的肽,它们是经过选择的,以确保一旦(V_L)和(V_H)结构域被连接起来便能形成适当的三维折叠,从而保留住作为该单链抗体片段的来源的完整抗体的靶分子结合特异性。通常,(V_L)或(V_H)序列的羧基末端可通过这样的肽连接物共价相连至互补(V_L)和(V_H)序列的氨基酸末端。单链抗体片段可通过分子克隆,抗体噬菌体表面展示文库或类似的技术产生。这些蛋白可在真核细胞或原核细胞,包括在细菌中产生。

[0084] [69] 单链抗体片段包含具有本说明书中描述的完整抗体的可变区或互补性决定区(CDRs)中的至少一个的氨基酸序列,但缺少那些抗体的一些或所有的恒定结构域。这些恒定结构域不是抗原结合所必需的,但构成了完整抗体的结构的主要部分。单链抗体片段因此可以克服在应用含有部分或所有恒定结构域的抗体时相关的一些问题。例如,单链抗体片段往往没有生物分子和重链恒定区之间的不期望的相互作用,或其它不想要的生物学活性。另外,单链抗体片段较完整抗体要显著小,因此较完整抗体有更高的毛细血管通透性,可使单链抗体片段更有效地定位和结合于靶抗原结合位点上。而且,抗体片段可以相对大规模地在原核细胞中产生,因此方便了其生产。而且,单链抗体片段相对小的尺寸使它们在接受者中引起免疫响应的可能性小于完整抗体。

[0085] [70] 功能等价物进一步包括具有与完整抗体相同或相当的结合特性的抗体片段。这样的片段含有一个或两个Fab片段或 $F(ab')_2$ 片段。优选地,所述抗体片段含有完整抗体的所有六个互补性决定区,尽管含有更少的这样的区域,如含有三个,四个或五个CDR的片段也是有功能的。进一步,功能等价物可以是下面的免疫球蛋白类型的任何一类中的成员或者组合:IgG, IgM, IgA, IgD, 或 IgE, 及其亚类。

[0086] [71] 在此所述的抗IGF-I受体抗体EM164及其人源化变体的氨基酸和核酸序列的知识,可用来开发同样可结合人IGF-I受体,并抑制IGF-I受体的细胞功能的其他抗体。基于初级抗体(primary antibody)序列的知识,数个研究调查了在抗体序列中不同位置导入一个或多个氨基酸变化对其特性如结合和表达水平的影响(Yang, W. P. 等,1995, J. Mol Biol, 254, 392-403; Rader, C. 等,1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 8910-8915; Vaughan, T. J. 等,1998, Nature Biotechnology, 16, 535-539)。

[0087] [72] 在这些研究中,初级抗体的变异体已经通过改变CDR1, CDR2, CDR3或构架区中重链和轻链基因的序列而产生,使用的方法如寡核苷酸介导的位点定向诱变,盒式诱变(cassette mutagenesis),易错PCR, DNA重排(shuffling),或者利用大肠杆菌的增变株(mutator-strains)(Vaughan, T. J. 等,1998, Nature Biotechnology, 16, 535-539; Adey, N. B. 等,1996,第16章,277-291页,在"Phage Display of Peptides and Proteins", Eds. Kay, B. K. 等, Academic Press)。这些改变初级抗体的序列的方法导致二级抗体(secondary antibodies)的亲水性增加(Gram, H. 等,1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3576-3580; Boder, E. T. 等,2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 10701-10705; Davies, J. 和 Riechmann, L., 1996, Immunotechnology, 2, 169-179; Thompson, J. 等,1996, J. Mol Biol, 256, 77-88; Short, M. K. 等,2002, J. Biol. Chem., 277, 16365-16370; Fui-ukawa, K. 等,2001, J. Biol. Chem., 276, 27622-27628)。

[0088] [73] 通过改变抗体的一个或多个氨基酸残基的类似定向策略,在本发明中描述的抗体序列可以被用来开发具有改善的功能的抗 IGF-I 受体抗体。

[0089] [74] 本发明的偶联物包括在此公开的与细胞毒性试剂相连接的抗体,片段和其类似物。优选的细胞毒性试剂是美登素类(maytansinoids),紫杉烷(taxanes)和 CC-1065 类似物。所述偶联物可通过体外的方法来制备。为了将细胞毒性试剂与抗体连接,使用了连接基团。适合的连接基团在本领域是为人所熟知的,包括二硫基团,硫醚基,酸性不稳定(acid labile)基团,光不稳定基团,肽酶不稳定基团和酯酶不稳定基团。优选的连接基团是二硫基和硫醚基。例如,偶联物可采用二硫化物交换反应或在抗体和细胞毒性试剂之间形成硫醚键而构建。

[0090] [75] 美登素类和美登素类类似物属于优选的细胞毒性试剂。合适的美登素类的例子包括 maytansinol 和 maytansinol 类似物。合适的美登素类在美国专利 4,424,219 ; 4,256,746 ; 4,294,757 ; 4,307,016 ; 4,313,946 ; 4,315,929 ; 4,331,598 ; 4,361,650 ; 4,362,663 ; 4,364,866 ; 4,450,254 ; 4,322,348 ; 4,371,533 ; 6,333,410 ; 5,475,092 ; 5,585,499 和 5,846,545 中公开。

[0091] [76] 紫杉烷类也是优选的细胞毒性试剂。适合用于本发明的紫杉烷类在美国专利 6,372,738 和 6,340,701 中公开。

[0092] [77] CC-1065 和其类似物也是优选的用于本发明的细胞毒性药物。CC-1065 和其类似物在美国专利 6,372,738 ; 6,340,701 ; 5,846,545 和 5,585,499 中公开。

[0093] [78] 制备这样的细胞毒性偶联物的一种吸引人的候选物是 CC-1065,它是从链霉菌(*Streptomyces zelensis*)的培养肉汤中分离出的一种有效的抗肿瘤抗生素。CC-1065 在体外较普遍使用的抗癌药物,如阿霉素,氨甲蝶呤和长春新碱的效力高大约 1000 倍(B. K. Bhuyan 等, *Cancer Res.*, 42, 3532-3537 (1982))。

[0094] [79] 细胞毒性药物例如氨甲蝶呤,柔毛霉素,阿霉素,长春新碱,长春碱,美法仑,丝裂霉素 C,苯丁酸氮芥,卡奇霉素也适合制备本发明的偶联物,所述药物分子也可通过中间载体分子如血清白蛋白而连接于抗体分子上。

[0095] [80] 为了进行诊断性应用,本发明的抗体通常会用可检测的部分(moiety)来标记。所述的可检测的部分可以是能够直接或间接产生可检测信号的任何一种物质。例如,可检测部分可以是放射性同位素,如 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , 或 ^{131}I ; 荧光或化学发光化合物,如异硫氰酸荧光素,若丹明,或虫萤光素(luciferin); 或酶,如碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶。

[0096] [81] 可应用本领域中已知的将抗体与可检测部分偶联的任何方法,包括由 Hunter 等, *Nature* 144:945(1962); David 等, *Biochemistry* 13:1014(1974); Pain 等, *J. Immunol. Meth* 40:219(1981); 和 Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30:407(1982) 描述的那些方法。

[0097] [82] 本发明的抗体可以在任何已知的分析方法中被应用,如竞争结合分析,直接和间接夹心分析,和免疫沉淀分析(Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, 147-158 页(CRC Press, Inc., 1987))。

[0098] [83] 本发明的抗体也用于进行体内成像,其中用可检测部分如不透射线的试剂或放射性同位素标记的抗体被施予受试者,优选施于血流中,然后测定宿主中标记抗体的存

在和位置。这种成像技术可用于恶性肿瘤的分级 (staging) 和治疗。抗体可用任何可在宿主中可检测到的部分来标记, 不管是通过核磁共振, 放射学或本领域中已知的其他检测方法。

[0099] [84] 本发明的抗体也可用作亲和纯化试剂。在这个过程中, 使用本领域中已知的方法将抗体固定在合适的支持物上, 如 Sephadex 树脂或滤纸上。

[0100] [85] 本发明的抗体也可基于其对细胞中 IGF-I 受体的功能的抑制作用, 用作生物学研究中的试剂。

[0101] [86] 为了进行治疗应用, 本发明的抗体或偶联物可以以药学上可接受的剂型施于受试者。它们可通过静脉快速推注或在一段时间内连续输注, 通过肌肉内, 皮下, 关节内, 滑膜内, 鞘内, 口服, 局部或吸入途径被给药。抗体也可通过肿瘤内, 肿瘤旁, 病灶内或病灶旁的途径给药, 发挥局部以及全身的治疗效应。合适的药学上可接受的载体, 稀释剂和赋形剂是为人所熟知的, 可由本领域中的技术人员根据临床情形来确定。合适的载体, 稀释剂和/或赋形剂的实例包括: (1) Dulbecco's 磷酸缓冲盐水, pH 大约 7.4, 含有大约 1mg/ml 至 25mg/ml 人血清白蛋白, (2) 0.9% 盐水 (0.9% w/v NaCl), 和 (3) 5% (w/v) 葡萄糖。本发明的方法可在体外, 体内或离体实施。

[0102] [87] 在其他治疗性处理中, 本发明的抗体, 抗体片段或偶联物可与一种或多种其他的治疗性试剂共同施用。合适的治疗性药剂包括但不限于细胞毒性试剂或细胞生长抑制试剂。紫杉醇是一种优选的治疗性试剂, 也是一种细胞毒性试剂。

[0103] [88] 癌症治疗试剂是指那些可杀死癌症细胞或限制癌症细胞的生长而对宿主产生最小的损害的试剂。因此, 这样的试剂可以利用癌症细胞特性 (例如, 代谢, 血管化作用或细胞表面抗原呈递) 与健康宿主细胞的任何差异。肿瘤形态学的差异是进行干预 (intervention) 的潜在位点: 例如, 第二种治疗物可以是抗体如抗 VEGF 抗体, 它可用于延迟实体肿瘤内部的血管化作用, 由此可减慢其生长速率。其它的治疗试剂包括但不限于辅助物如盐酸格拉司琼 (granisetron HCL), 雄性激素抑制剂如亮丙瑞林乙酸盐 (leuprolide acetate), 抗生素如阿霉素, 抗雌激素药如它莫西芬 (tamoxifen), 抗代谢药如 α 干扰素-2a, 细胞毒性药物如紫杉醇, 酶抑制剂如 ras 法尼基-转移酶抑制剂, 免疫调节剂如阿地白介素 (aldesleukin), 和氮芥衍生物如盐酸美法仑 (melphalan HCl), 以及类似物。

[0104] [89] 当以含水剂型存在而不是被冻干时, 所述抗体典型地以大约 0.1mg/ml 至 100mg/ml 的浓度进行配制, 尽管在这些范围之外的很大范围也是允许的。为了治疗疾病, 抗体或偶联物的合适剂量将依赖于如上面所定义的要治疗的疾病类型, 疾病的严重性和病程, 所述抗体的施用是为了预防还是治疗, 以往治疗的进程, 患者的临床历史和对抗体的反应, 以及主治医生的判断。抗体可以在一次或在多次治疗过程中被适当地给予患者。

[0105] [90] 取决于疾病的类型和严重性, 大约 0.015 至 15mg 抗体/kg 患者体重是给予患者的最初候选剂量, 这可以通过例如一次或多次单独给药, 或者连续输注。对于在几天内或更长的时间内的重复给药, 可以根据病情, 重复治疗直至达到所需要的对疾病症状的抑制。但可使用和不排除其它的给药方案。

[0106] 实施例

[0107] [91] 现通过参考下面的实施例来描述本发明, 其仅仅是说明性的, 而并非限制本发明。

[0108] 实施例 1: 鼠 EM164 抗体

[0109] [92] 在这第一个实施例中, 公开了本发明的鼠源性抗体的完整的一级氨基酸结构和 cDNA 序列, 以及它的结合特性和将其以重组形式表达的方式。因此, 充分且完整地公开了本发明的抗体及其制备, 这样在免疫学领域中的普通技术人员将能够制备所述的抗体, 而不需要过多的实验。

[0110] A. 抗-IGF-I 受体的单克隆抗体杂交瘤的产生

[0111] [93] 应用表达带有 Y1251F 突变的人 IGF-I 受体的细胞系来进行免疫, 因为它可表达大量的 IGF-I 受体 ($\sim 10^7$ /细胞)。在 IGF-I 受体的细胞质结构域中的 Y1251F 突变导致转化和抗凋亡信号传导功能的丧失, 但不影响 IGF-I 结合和 IGF-I 刺激的促有丝分裂信号 (O' Connor, R. 等, 1997, MolCell. Biol, 17, 427-435; Miura, M. 等, 1995, J. Biol. Chem., 270, 22639-22644)。另外, 突变也不影响抗体的产生, 因为本实施例的抗体结合于 IGF-I 受体的细胞外结构域, 该结构域在 Y1251F 突变体和野生型受体中是相同的。

[0112] [94] 用带有 Y1251F 突变的人 IGF-I 受体基因以及嘌呤霉素抗性基因转染 IGF-I 受体缺陷型小鼠的 3T3 样细胞, 产生表达带有 Y1251F 突变的人 IGF-I 受体的细胞系, 用嘌呤霉素 (2.5 微克/mL) 进行选择, 通过 FACS 对 IGF-I 受体的高表达进行筛选 (Miura, M. 等, 1995, J. Biol. Chem., 270, 22639-22644)。具有高水平 IGF-I 受体表达的细胞系进一步用高浓度的嘌呤霉素如 25 微克/mL 进行选择, 这个浓度对大多数细胞是有毒性的。存活的集落被拣出, 并选择那些显示出高水平 IGF-I 受体表达的集落。

[0113] [95] 6 月龄的 CAF1/J 雌鼠在第 0 天用过量表达 Y1251F 突变型人 IGF-I 受体的细胞进行腹膜内免疫 (5×10^5 个细胞, 悬浮于 0.2mL PBS 中)。所述动物用 0.2mL 细胞悬液如下进行促升免疫 (boosted): 第 2 天, 1×10^6 细胞; 第 5 天, 2×10^6 细胞; 第 7, 9, 12 和 23 天, 1×10^7 细胞。在第 26 天, 处死小鼠, 移走其脾脏。

[0114] [96] 脾脏在两块毛玻璃片之间被磨碎以获得单细胞悬液, 用含有青霉素和链霉素的无血清 RPMI 培养基 (SFM) 进行清洗。脾细胞沉淀重悬于 10mL 0.83% (w/v) 氯化铵水溶液中, 置于冰上 10 分钟以裂解红血细胞, 然后用无血清的培养基 (SFM) 清洗。脾细胞 (1.2×10^8) 与来自非分泌性鼠骨髓瘤细胞系 P3X63Ag8.653 (ATCC, Rockville, MD; Cat. #CRL1580) 的骨髓瘤细胞 (4×10^7) 集中在一个试管中, 并用无血清 RPMI-1640 培养基 (SFM) 清洗。去掉上清液, 细胞沉淀重悬于残余的培养基中。该试管置于 37°C 的一烧杯水中, 以 0.5mL/分钟的滴入速率缓慢地加入 1.5mL 聚乙二醇溶液 (50% PEG (w/v), 平均分子量 1500, 在 75mM HEPES 中, pH 8), 同时轻轻振荡试管。等待 1 分钟后, 如下加入 10mL SFM: 第 1 分钟 1mL, 第 2 分钟 2mL, 第 3 分钟 7mL。然后再将 10mL 在 1 分钟内缓缓加入。细胞通过离心被沉淀, 用 SFM 中清洗, 重悬于添加了 5% 胎牛血清 (FBS)、次黄嘌呤/氨蝶呤/胸苷 (HAT)、青霉素、链霉素和 10% 杂交瘤克隆添加剂 (HCS) 的 RPMI-1640 生长培养基中。细胞接种在 96 孔平底组织培养板中, 每孔有 200 μ L 培养物, 其中有 2×10^5 个脾细胞。5-7 天后, 从每孔中移去 100 μ L, 用添加了次黄嘌呤/胸苷 (HT) 和 5% FBS 的生长培养基替换。用于免疫和产生杂交瘤的一般条件的描述可参见 J. Langone 和 H. Vunakis (Eds., Methods in Enzymology, Vol. 121, "Immunochemical Techniques, Part I"; 1986; Academic Press, Florida) 以及 E. Harlow 和 D. Lane ("Antibodies: A Laboratory Manual"; 1988; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)。也可使用本领域中技术人员所熟知的

其它免疫和杂交瘤产生技术。

[0115] [97] 杂交瘤克隆的培养物上清液通过 ELISA 筛选与纯化的人 IGF-I 受体的结合, 通过 ELISA 和 FACS 筛选与过量表达人 IGF-I 受体的细胞的特异性结合和与过量表达人胰岛素受体的细胞的无法结合, 如下所述。对过量表达人 IGF-I 受体的细胞较过量表达人胰岛素受体的细胞显示出更高结合亲和力的克隆被扩增和亚克隆。亚克隆的培养物上清通过上述的结合分析被进一步筛选。通过这个过程, 选择出了亚克隆 3F1-C8-D7 (EM164), 其重链和轻链基因被克隆, 并被测序, 如下所述。

[0116] [98] 为了在针对来自杂交瘤克隆的上清液与 IGF-I 受体的结合而进行的筛选中被应用, 通过如下的方法分离人 IGF-I 受体。用生物素化试剂如硫代 -NHS-LC- 生物素, 硫代 -NHS-SS- 生物素, 或 NHS-PEO₄- 生物素修饰重组的 IGF-I, 制备出生物素化的 IGF-I。生物素化的 IGF-I 在链亲和素 - 琼脂糖珠上被吸收, 并与过量表达人野生型或 Y1251F 突变型 IGFR 的细胞的裂解物一起孵育。用含有 2 至 4M 尿素和去垢剂如 triton X-100 或辛基 - β - 糖苷的缓冲液清洗和洗脱这些珠子。洗脱出的 IGF-I 受体用 PBS 透析, 并通过 SDS-PAGE 在还原条件下分析纯度, 结果显示 IGF-I 受体的 α 和 β 链的条带的对应分子量分别为大约 135kDa 和 95kDa。

[0117] [99] 为了检查杂交瘤上清液与纯化的 IGF-I 受体的结合, Immulon-4HBELISA 板 (Dynatech) 用在 pH 9.5 的 50mM CHES 缓冲液中稀释的纯化人 IGF-I 受体样品 (通过亲和性纯化样品的尿素 / 辛基 - β - 糖苷洗脱物的透析而制备出来) 包被 (100 μ L; 4°C, 过夜)。这些孔用 200 μ L 的封闭缓冲液 (10mg/mL BSA, 含有 50mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.5 和 0.1% tween-20 的 TBS-T 缓冲液) 来封闭, 并与来自杂交瘤克隆的上清液 (100 μ L; 在封闭缓冲液中稀释) 孵育大约 1h 至 12h, 用 TBS-T 缓冲液清洗, 与羊抗鼠 -IgG-Fc- 抗体 - 辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联物 (100 μ L; 在缓冲液中的浓度为 0.8 μ g/mL; Jackson ImmunoResearch Laboratories) 共同孵育, 然后洗涤并用 ABTS/H₂O₂ 底物 (0.5mg/mL ABTS, 0.03% H₂O₂ 在 0.1M 柠檬酸盐缓冲液中, pH 4.2) 在 405nm 处进行检测。典型地, 来自 3F1 杂交瘤亚克隆的上清液在 3 分钟的过程中产生了大约 1.2 个吸光度单位的信号, 与此相比, 从其他一些杂交瘤克隆的上清液中获得的值为 0.0。这种 ELISA 的一般条件类似于如 E. Harlow 和 D. Lane 所述的抗体结合和检测的标准 ELISA 条件 ("Using Antibodies: A Laboratory Manual"; 1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York), 其中的条件也可被应用。

[0118] [100] 用过量表达人 Y1251F-IGF-I 受体的细胞系和过量表达人胰岛素受体的细胞系对杂交瘤上清液进行 ELISA 筛选, 筛选出与人 IGF-I 受体而不与人胰岛素受体特异结合的杂交瘤上清。两种细胞系都是由 IGF-I 受体缺陷型小鼠的 3T3 样细胞产生的。过量表达 IGF-I 受体的细胞和过量表达胰岛素受体的细胞分别从组织培养瓶中通过快速的胰蛋白酶 / EDTA 处理来获取, 然后细胞悬浮在含有 10% FBS 的生长培养基中, 通过离心而被沉淀, 在用 PBS 清洗。将被清洗的细胞 (100 μ L, 大约 $1-3 \times 10^6$ 细胞 / mL) 加入到用植物血球凝集素 (100 μ L, 20 μ g/mL PHA) 包被的 Immulon-2HB 板的孔中, 离心 10 分钟, 使其粘附于 PHA- 包被的孔中。轻轻拍打有细胞的板以去掉 PBS, 然后在 37°C 干燥过夜。用含有 5mg/mL BSA 的 PBS 溶液在 37°C 封闭孔 1h, 然后轻轻地用 PBS 清洗。然后将杂交瘤克隆的等分上清液 (100 μ L; 在封闭缓冲液中稀释) 加入到含有过量表达 IGF-I 受体的细胞和含有过量表达胰岛素受体的细胞的孔中, 并在室温下孵育 1h。所述孔用 PBS 清洗, 用羊抗鼠 -IgG-Fc- 抗

体-辣根过氧化物酶偶联物(100 μ L;0.8 μ g/mL,在封闭缓冲液中)孵育 1h,然后清洗,使用 ABTS/H₂O₂ 底物检测结合。在与过量表达 IGF-I 受体的细胞孵育后,3F1 杂交瘤亚克隆的典型上清液在 12 分钟内产生了 0.88 个吸光度单位的信号,与此相比,与过量表达人胰岛素受体的细胞孵育后获得的值为 0.22 个吸光度单位。

[0119] [101] 为了提供纯化的 EM164 抗体,依照生产厂商的说明书,将杂交瘤在 Integra CL 350 瓶中(Integra Biosciences,Maryland)培养。从 Integra 瓶的收获上清液中获得大约 0.5-1mg/mL 的抗体,这是使用抗体标准品通过 ELISA 和 SDS-PAGE/考马斯亮蓝染色来定量的。在蛋白 A-琼脂糖珠的色谱柱上通过亲和色谱来纯化抗体,所述纯化是在标准的纯化条件下进行,即在含有 3M NaCl 的 100mM Tris 缓冲液, pH 8.9 中上样和清洗,然后用含有 150mM NaCl 的 100mM 醋酸溶液洗脱。含有抗体的洗脱级分用冷的 2M K₂HPO₄ 溶液中和,并用 PBS 在 4℃进行透析。通过测量 280nm 的吸光度(消光系数=1.4mg⁻¹mL cm⁻¹)来测定抗体浓度。纯化的抗体样品在还原条件下通过 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色进行分析,结果显示只有抗体的重链和轻链条带,分别在大约 55kDa 和 25kDa 处。所述纯化抗体的同型体为具有 κ 轻链的 IgG₁。

[0120] B. EM164 抗体的结合特性

[0121] [102] 纯化的 EM164 抗体的特异性结合可使用过量表达人 IGF-I 受体的细胞和过量表达人胰岛素受体的细胞进行荧光激活细胞拣选(FACS)来证实(图 1)。使用过量表达 IGF-I 受体的细胞和过量表达胰岛素受体的细胞(2 $\times$ 10⁵ 个细胞/mL)在圆底的 96 孔板中孵育在 100 μ L 冷 FACS 缓冲液(1mg/mL BSA,在 Dulbecco's MEM 培养基中)中的 EM164 抗体(50-100nM)1h。通过离心细胞将细胞沉淀,用冷的 FACS 缓冲液通过轻轻吹打进行清洗,然后与羊抗鼠-IgG-抗体-FITC 偶联物(100 μ L;10 μ g/mL,在 FACS 缓冲液中)在冰上孵育 1h。细胞被沉淀,清洗,重悬在 120 μ L 的 1%甲醛 PBS 溶液中。使用 FACSCalibur 读数器(BDBiosciences)分析培养板。

[0122] [103] 在过量表达 IGF-I 受体的细胞与 EM164 抗体孵育后,获得了很强的荧光变化,相比,过量表达胰岛素受体的细胞与 EM164 抗体的孵育所产生的变化是可忽略的(图 1),这证明了 EM164 抗体在其与 IGF-I 受体的结合中是有选择性的,并不与胰岛素受体结合。对照抗体,抗-IGF-I 受体抗体 1H7(Santa Cruz Biotechnology)和抗胰岛素受体 α 抗体(BD Pharmingen Laboratories),在与过量表达 IGF-I 受体和胰岛素受体的细胞的孵育后分别产生了荧光的变化(图 1)。使用 EM164 抗体和表达 IGF-I 受体的人乳癌 MCF-7 细胞(Dufourny,B. 等,1997,J. Biol. Chem.,272,31163-31171),通过 FACS 分析也观察到了很强的荧光变化,这说明 EM164 抗体结合于人肿瘤细胞表面上的人 IGF-I 受体。

[0123] [104] 通过 ELISA 滴定抗体在数种浓度下与直接包被的 IGF-I 受体(应用生物素化的 IGF-I 亲和纯化得到,如上)或间接俘获的生物素化 IGF-I 受体的结合,测定 EM164 抗体与人 IGF-I 受体结合的解离常数(K_d)。生物素化的 IGF-I 受体是应用 PEO-马来酰亚胺-生物素试剂(Pierce, Molecular Biosciences)对过量表达 IGF-I 受体的细胞的去垢剂溶解裂解物进行生物素化而制备的,它可应用固定在 NHS-琼脂糖珠上的抗 IGF-I 受体 β 链抗体进行亲和纯化,并用含有 NP-40 去垢剂和 2-4M 尿素的缓冲液洗脱,并用 PBS 透析。

[0124] [105] EM164 抗体与生物素化的 IGF-I 受体结合的 K_d测定是通过将 Immulon-2HB 板用 100 μ L 含有 1 μ g/mL 链亲和素的碳酸盐缓冲液(150mM 碳酸钠,350mM 碳酸氢钠)在 4℃

过夜包被而进行的。链亲和素包被的孔用 200 μ L 封闭缓冲液（含有 10mg/mL BSA 的 TBS-T 缓冲液）进行封闭,用 TBS-T 缓冲液清洗,并与生物素化的 IGF-I 受体（10 至 100ng）在室温下孵育 4h。然后清洗含有间接俘获的生物素化 IGF-I 受体的孔,与 EM164 抗体在不同浓度（ 5.1×10^{-13} M 至 200nM）于封闭缓冲液中室温下孵育 2h,然后在 4℃孵育过夜。接下来用 TBS-T 缓冲液清洗孔,与羊抗鼠 -IgG_{H+L}- 抗体 - 辣根过氧化物酶偶联物（100 μ L ;0.5 μ g/mL,在封闭缓冲液中）共同孵育,然后洗涤,应用 ABTS/H₂O₂ 底物在 405nm 处检测。K_d 的值通过单一位点结合（one-site binding）的非线性回归来估计。

[0125] [106] 类似的结合滴定还通过使用 EM164 抗体的 Fab 片段来进行,该片段是通过木瓜酶消化抗体而制备的,如 E. Harlow 和 D. Lane 所述（" Using Antibodies :A Laboratory Manual " ;1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）。

[0126] [107] EM164 抗体与生物素化人 IGF-I 受体结合的结合滴定曲线产生的 K_d 值为 0.1nM（图 2）。EM164 抗体的 Fab 片段也与人 IGF-I 受体非常紧密地结合,K_d 值为 0.3nM,表明 EM164 抗体与 IGF-I 受体的单体结合也非常强烈。

[0127] [108] EM164 抗体与 IGF-I 受体结合的这种极低的解离常数值部分是由于非常低的 K_{off} 速率造成的,这是通过延迟洗涤与固定的 IGF-I 受体结合的抗体 1-2 天后所观察到的强结合信号所证实的。

[0128] [109] EM 164 抗体可用来免疫沉淀 IGF-I 受体,如通过人乳癌 MCF-7 细胞的去垢剂溶解裂解物与固定在蛋白 G- 琼脂糖珠（Pierce Chemical Company）上的 EM164 抗体的孵育所证实的。EM164 抗体免疫沉淀物的 Western 印迹采用兔多克隆抗 -IGF-I 受体 β 链（C- 末端）抗体（Santa Cruz Biotechnology）和羊抗兔 -IgG- 抗体 - 辣根过氧化物酶偶联物来检测,然后冲洗,进行增强型化学发光（ECL）检测。MCF-7 细胞的 EM164 免疫沉淀物的 Western 印迹显示了与 IGF-I 受体的 β 链对应的条带,在大约 95kDa,以及与原 -IGF-I 受体对应的条带,在大约 220kDa。类似的免疫沉淀也对其他细胞类型实施以检查 EM164 抗体的结合的种属特异性,结果显示该抗体也与来自 cos-7 细胞（非洲绿猴）的 IGF-I 受体结合,但不与 3T3 细胞（鼠）,CHO 细胞（中国仓鼠）或羊成纤维细胞（羊）的 IGF-I 受体结合。在 MCF-7 细胞的裂解物的 Western 印迹中,EM164 抗体不能检测 SDS 变性的人 IGF-I 受体,表明它是与天然的,未变性的人 IGF-I 受体的具有一定构象的抗原决定部位结合。

[0129] [110] EM164 抗体的结合结构域进一步应用截短的 α 链构建物来表征,该构建物含有其侧面带有 L1 和 L2 结构域的富含半胱氨酸的结构域（残基 1-468）,以及与之融合的 16-mer-C 末端片段（残基 704-719）,它的末端是 C- 末端抗原决定部位标记。这种较小的 IGF-I 受体缺少残基 469-703,已经有报道其可结合 IGF-I,尽管与天然的全长 IGF-I 受体相比不太紧密（Molina, L. 等,2000, FEES Letters, 467, 226-230 ;Kristensen, C. 等,1999, J. Biol. Chem. , 274, 37251-37356）。因此,制备了截短的 IGF-I 受体 α 链构建物,其含有残基 1-468 以及与之融合的 C- 末端片断,该片断是残基 704-719,侧面有 C- 末端 myc 抗原决定部位标记。构建了表达这种构建物,也可在人胚胎肾 293T 细胞中暂时表达该构建物的稳定细胞系。观察到 EM164 抗体与这种截短的 IGF-I 受体 α 链构建物的强烈结合。在被检测的两种抗体中,IR3（Calbiochem）也可与这种截短的 α 链结合,但 1H7 抗体（Santa Cruz Biotechnology）不发生结合,表明 EM164 抗体的抗原决定部位与 1H7 抗体明显不同。

[0130] C. EM 164 抗体抑制 IGF-I 与 MCF-7 细胞的结合

[0131] [111] IGF-I 与人乳癌 MCF-7 细胞的结合可被 EM164 抗体抑制 (图 3)。MCF-7 细胞与或者不与 $5 \mu\text{g/mL}$ EM164 抗体在无血清培养基中孵育 2h, 然后与 50ng/mL 生物素化 IGF-I 在 37°C 孵育 20 分钟。然后用无血清培养基洗涤细胞两次, 去掉未结合的生物素-IGF-I, 然后用含有 1% NP-40 和蛋白酶抑制剂的 50mM HEPES, pH 7.4 裂解。Immulon-2HB ELISA 板用鼠单克隆抗-IGF-I 受体 β 链抗体包被, 并将其用于从裂解产物中俘获 IGF-I 受体和结合的生物素-IGF-I。所述包被抗体与 IGF-I 受体 β 链的细胞质 C-端结构域的结合不干扰生物素-IGF-I 与 IGF-I 受体的细胞外结构域的结合。洗涤孔, 并与链亲和素-辣根过氧化物酶偶联物孵育, 再次洗涤, 然后使用 ABTS/ H_2O_2 底物来检测。 $5 \mu\text{g/mL}$ EM164 抗体对 IGF-I 与 MCF-7 细胞结合的抑制实质上是可定量的, 这几乎等价于使用缺少生物素-IGF-I 的对照时获得的 ELISA 本底。

[0132] [112] 除了上述的 EM164 抗体对 IGF-I 与 MCF-7 细胞结合的抑制的分析, 下面的分析证明了 EM164 抗体可高效地替换与 MCF-7 细胞结合的 IGF-I, 这也是在生理条件下所需要的, 即需要拮抗性的抗 IGF-I 受体抗体替换已结合的内源性生理配体 (如 IGF-I 或 IGF-II)。在这个 IGF-I 替换分析中, 在 12 孔板中生长的 MCF-7 细胞是血清饥饿性的 (serum-starved), 与生物素化的 IGF-I ($20\text{--}50\text{ng/mL}$) 在无血清培养基中于 37°C (或 4°C) 孵育 1 至 2h。然后与生物素化 IGF-I 结合的细胞用 EM 164 抗体或对照抗体 ($10\text{--}100 \mu\text{g/mL}$) 在 37°C (或在 4°C) 处理 30min 至 4h。然后细胞用 PBS 洗涤, 用含有 1% NP-40 的裂解缓冲液在 4°C 裂解。ELISA 如上所述进行, 从所述裂解产物中俘获 IGF-I 受体, 然后采用链亲和素-辣根过氧化物酶偶联物检测与所述受体结合的生物素化 IGF-I。该 ELISA 证明了 EM164 抗体在 37°C 能够几乎完全地从细胞上替换以前结合的生物素化 IGF-I (在 30min 内为 90%, 在 4h 内 $\sim 100\%$), 在 4°C 在 2h 中, 替换了大约 50%。在另一个试验中, NCI-H838 肺癌细胞与生物素-IGF-I 一起孵育, 然后洗涤, 与 EM164 抗体在 4°C 孵育 2h, 结果使结合的生物素-IGF-I 减少 80%。因此, EM164 抗体可高效地从癌细胞上替换先结合的 IGF-I, 这在治疗上是非常重要的, 因为可以通过替换已结合的内源性生理配体而拮抗 IGF-I 受体。

[0133] [113] MCF-7 细胞与 EM164 抗体在 4°C 孵育 2h (或在 37°C 孵育 30min), 根据应用了抗 IGF-I 受体 β 链抗体 (Santa Cruz Biotechnology ;sc-713) 的 Western 印迹分析, 这种孵育并不导致 IGF-I 受体的明显下调, 尽管与 EM164 抗体在 37°C 长时间孵育 2h 可引起 IGF-I 受体 25% 的下调。因此, 在这些短期试验中, EM164 抗体在 4°C 和 37°C 抑制 IGF-I 的结合和替换已结合的 IGF-I 均不能通过由于 EM164 抗体的结合引起受体下调来解释。EM164 抗体有效抑制 IGF-I 与 IGF-I 受体的结合和替换以前结合的 IGF-I 的机制很可能是通过结合位点的共享或空间阻遏或变构效应所引起的结合竞争。

[0134] D. 通过 EM164 抗体抑制 IGF-I 受体介导的细胞信号传导

[0135] [114] 用 EM164 抗体处理乳癌 MCF-7 细胞和骨肉瘤 SaOS-2 细胞几乎可以完全抑制细胞内的 IGF-I 受体信号传导, 这表现为 IGF-I 受体自体磷酸化的抑制和其下游效应物如胰岛素受体底物-1 (IRS-1), Akt 和 Erk1/2 的磷酸化的抑制 (图 4-6)。

[0136] [115] 在图 4 中, MCF-7 细胞在 12 孔板的常规培养基中生长 3 天, 然后用 $20 \mu\text{g/mL}$ 的 EM164 抗体 (或抗-B4 对照抗体) 在无血清培养基中处理 3h, 然后用 50ng/mL 的 IGF-I 在 37°C 刺激 20min。然后细胞在冰冷的含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的缓冲液 (50mM HEPES 缓冲液, pH 7.4, 1% NP-40, 1mM 原钒酸钠, 100mM 氟化钠, 10mM 焦磷酸钠, 2.5mM EDTA, $10 \mu\text{M}$

亮肽素, 5 μ M 胃蛋白酶抑制剂, 1mM PMSF, 5mM 苯甲脒和 5 μ g/mL 抑肽酶) 中被裂解。ELISA 板用抗 IGF-I 受体 β 链 C-末端的单克隆抗体 TC123 进行预包被, 与裂解物样本在室温下孵育 5h 以俘获 IGF-I 受体。然后含有被俘获的 IGF-I 受体的孔被洗涤, 与生物素化的抗磷酸酪氨酸抗体 (PY20 ; 0.25 μ g/mL ; BD Transduction Laboratories) 孵育 30min, 然后洗涤, 与链亲和素-辣根过氧化物酶偶联物 (0.8 μ g/mL) 孵育 30min。洗涤孔, 用 ABTS/H₂O₂ 底物检测。抗 B4 对照抗体的应用没有显示出对 IGF-I 刺激的 IGF-I 受体自体磷酸化作用的抑制。相比, 在用 EM164 抗体处理后可获得对 IGF-I 刺激的 IGF-I 受体自体磷酸化作用的完全抑制 (图 4)。

[0137] [116] 为了证明对胰岛素底物 (IRS-1) 的磷酸化作用的抑制, 在应用的 ELISA 中, 使用固定化的抗 -IRS-1 抗体从裂解物中俘获 IRS-1, 然后测定可与磷酸化的 IRS-1 结合的磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI-3-激酶) 的相关 p85 亚基 (Jackson, J. G. 等, 1998, J. Biol. Chem., 273, 9994-10003)。在图 5 中, MCF-7 细胞用 5 μ g/mL 的抗体 (EM164 或 IR3) 在无血清培养基中处理 2h, 然后用 50ng/mL 的 IGF-I 在 37°C 刺激 10min。抗 IRS-1 抗体 (兔多克隆; Upstate Biotechnology) 通过与 ELISA 板上包被的羊抗兔 -IgG 抗体孵育而被间接俘获, 然后抗 IRS-1 抗体通过 4°C 孵育过夜从细胞裂解物样品中俘获 IRS-1。然后孔与鼠单克隆抗 -p85-PI-3-激酶抗体 (Upstate Biotechnology) 孵育 4h, 然后用羊抗鼠 -IgG-抗体-HRP 偶联物处理 30min。然后洗涤孔, 使用 ABTS/H₂O₂ 底物检测 (图 5)。如在图 5 中显示, EM164 抗体较 IR3 抗体更为有效地抑制 IGF-I-刺激的 IRS-1 磷酸化作用, 当在缺少 IGF-I 的情况下与细胞孵育时, EM164 抗体对 IRS-1 磷酸化作用不显示任何激动剂活性。

[0138] [117] 在 SaOS-2 细胞 (图 6) 和 MCF-7 细胞中, 其它下游效应物如 Akt 和 Erk1/2 的活化, 也可以剂量依赖的方式被 EM164 抗体抑制, 如采用裂解物和磷酸化特异性抗体 (兔多克隆抗 -磷酸化 -Ser⁴⁷³Akt 多克隆和抗 -磷酸化 -ERK1/2 抗体; Cell Signaling Technology) 的 Western 印迹所显示。pan-ERK 抗体证实了所有泳道中上样的蛋白量相等 (图 6)。用 EM164 抗体处理 SaOS-2 细胞并不抑制 EGF-刺激的 Erk1/2 磷酸化, 因此证实了 EM164 抗体对 IGF-I 受体信号传导通路抑制作用的特异性。

[0139] E. EM164 抗体对 IGF-I, IGF-II 和血清刺激的人肿瘤细胞的生长和存活的抑制作用

[0140] [118] 检测了几种人肿瘤细胞系在无血清条件下其生长和存活对 IGF-I 的反应。这些细胞系在 IGF-I, IGF-II 或血清存在的情况下用 EM164 抗体处理, 采在 2-4 天后用 MTT 测定测量其生长和存活反应。大约 1500 个细胞被接种在 96 孔板含有血清的常规培养基中, 第二天用无血清的培养基 (添加了铁转运蛋白和 BSA 的无血清 RPMI 培养基, 或者无酚红的培养基, 如 Dufourny, B. 等, 1997, J. Biol. Chem., 272, 31163-31171 所述) 换液。在无血清培养基中生长 1 天后, 细胞用大约 75 μ L 10 μ g/mL 的抗体孵育 30min-3h, 然后添加 25 μ L IGF-I (或 IGF-II 或血清) 溶液获得终浓度为 10ng/mL 的 IGF-I, 或 20ng/mL 的 IGF-II, 或 0.04-10% 血清。在一些试验中, 细胞在加入 EM164 抗体之前先用 IGF-I 刺激 15min, 或一起加入 IGF-I 和 EM164 抗体。然后细胞继续生长 2-3 天。然后加入 MTT 溶液 (3-(4,5)-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐; 25 μ L 5mg/mL 的 PBS 溶液), 细胞放回孵箱 2-3h。然后去掉培养基, 用 100 μ L DMSO 换液并混合, 在 545nm 测量板的吸光度。几种人肿瘤细胞系显示在加入 IGF-I 或 IGF-II 或血清后的生长和存活反应明显被 EM164 抗体抑制, 不管抗

体是在 IGF-I 之前被加入,或 IGF-I 在抗体之前被加入,还是 IGF-I 和抗体一起被加入(表 1)。

[0141] 表 1-EM164 抗体对 IGF-I 刺激的肿瘤细胞生长和存活的抑制作用

[0142]

肿瘤细胞类型	对 IGF-I 作出响应时的生长倍数 (MTT 测定:在无血清培养基中, IGF-I 处理 / 未处理 细胞) ^a	在无血清培养基中, EM164 抗体对 IGF-I 刺激的生长的抑制作用 (百分率)	在 1.25-10%血清中, EM164 抗体对细胞生长 / 存活的抑制作用 ^b
MCF-7(乳房)	1.7-2.8	100%	85%
HT-3(宫颈)	2	70-90%	ND
Colo 205(结肠癌)	2.3	50%	是
HT-29	1.5	60%	是
NCI-H838(肺癌)	3	100%	85-90%
Calu-6	1.6-1.8	85%	是
SK-LU-1	1.4	100%	否
NCI-H596	1.4	100%	微弱
A 549	1.2	80%	ND
A 375(黑素瘤)	1.6	90%	否
SK-Mel-37	1.4	85%	ND
RD(横纹肌肉瘤)	1.7	85-100%	是
SaOS-2(骨肉瘤)	2.5	100%	是
A 431(表皮状瘤)	2.2	85%	是
SK-N-SH(成神经细胞瘤)	2	85%	30-50%

[0143] ^a 在含有 5-10 μ g/mL EM164 抗体的无血清培养基中,受 10ng/mL IGF-I 作用 3 至 4 天的细胞的生长 / 存活的 MTT 测定。

[0144] ^b 基于与对照(有血清但无抗体)的比较,通过 MTT 分析或集落形成分析,分析在 5-10 μ g/mL EM164 抗体存在的情况下 1.25-10%血清中细胞生长所受到的抑制;基于对照(无血清但有抗体,有血清但无抗体),定量测定 MCF-7, NCI-H838 和 SK-N-SH 细胞所受到的抑制的程度以解释细胞的自分泌 / 旁分泌 IGF 刺激作用。ND 表示由于染色的难度而无数数据或数据较差。

[0145] [119]EM164 抗体强烈地抑制 IGF-I 或血清刺激的乳癌 MCF-7 细胞的生长和存活(图 7 和 8)。在一个独立的实验中,EM164 抗体强烈地抑制 IGF-II 刺激的 MCF-7 细胞生长和存活。以前关于应用市售抗体如 IR3 抗体的报道显示仅可微弱地抑制血清刺激的 MCF-7 细胞生长和存活,如在图 7 中 IR3 和 1H7 抗体所证实的(Cullen, K. J. 等, 1990, Cancer Res., 50, 48-53)。相比,EM164 抗体是血清或 IGF 刺激的 MCF-7 细胞生长的强有效抑制剂。如在图 8 中显示, EM164 抗体在很宽的血清浓度范围内(0.04-10%血清)都能同样有效地抑制 MCF-7 细胞的生长和存活。

[0146] [120] 通过细胞计数来测定 EM164 抗体对 MCF-7 细胞的生长抑制。因此,在 12 孔板中,大约 7500 个细胞被接种在含有 10% FBS 的 RPMI 培养基中,其中存在或者缺少 10 μ g/mL 的 EM164 抗体。生长 5 天后,未处理的对照样品的细胞计数为 20.5×10^4 个细胞,相比,

EM164 抗体处理的样品的细胞计数仅有 1.7×10^4 细胞。用 EM164 抗体进行的处理可在 5 天内抑制 MCF-7 细胞的生长大约 12 倍。EM164 抗体的这种抑制作用明显高于已报道的使用 IR3 抗体在一个 6 天的分析中对 MCF-7 细胞产生的 2.5 倍的抑制作用 (Rohlik, Q. T. 等, 1987, Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 276-281)。

[0147] [121] 与对照抗 B4 抗体相比, IGF-I 和血清刺激的非小细胞肺癌系 NCI-H838 的生长和存活也可被 EM164 抗体强烈地抑制 (图 9)。对于 NCI-H838 和 MCF-7 细胞, 在无血清培养基中用 EM164 抗体处理所产生的信号较未处理的样品小, 推测其原因是 EM164 抗体也可抑制这些细胞的自分泌和旁分泌 IGF-I 和 IGF-II 刺激 (图 7 和 9)。HT29 结肠癌细胞的集落大小也在用 EM164 抗体处理后大幅度减小。

[0148] [122] 因此 EM164 抗体在所有已知的抗 IGF-I 受体抗体中是独特的, 它能有效地抑制肿瘤细胞如 MCF-7 细胞和 NCI-H838 细胞的血清刺激性生长超过 80%。

[0149] [123] EM164 抗体引起处于细胞周期的 G0/G1 期的细胞发生生长停滞, 消除了 IGF-I 的促有丝分裂效应。为了进行细胞周期分析, 在存在或不存在 EM164 抗体 (20 μ g/mL) 的情况下用 IGF-I (20ng/mL) 处理 MCF-7 细胞 1 天, 然后通过碘化丙啶染色和流式细胞仪进行分析。如在图 25 中所示, 在缺少 EM164 时对 IGF-I 刺激作出反应的细胞的周期进程 (41% 细胞处于 S 期, 50% 处于 G0/G1 期) 在 EM164 处理的细胞 (仅有 9% 处于 S 期, 77% 细胞处于 G0/G1 期) 中就会被抑制。

[0150] [124] 除了对细胞增殖的抑制作用以外, EM164 抗体的处理可导致细胞的凋亡。为了测定细胞凋亡, 在存在或缺少 EM164 的情况下, 用 IGF-I 或血清孵育 NCI-H838 肺癌细胞 1 天, 测定 caspase (天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶) 对细胞角蛋白 CK18 蛋白的切割 (图 26)。在缺少 EM164 时, 相对于无 IGF-I 的对照, 添加 IGF-I 或血清产生了更低的 caspase 切割的 CK18 信号, 这表明 IGF-I 和血清可防止 caspase 的活化。EM164 的处理可抑制 IGF-I 和血清的抗凋亡效应, 这可由在有 EM 164 存在时所获得的被切割的 CK18 水平较缺少 EM164 时要高来说明 (图 26)。

[0151] F. EM164 抗体与其它细胞毒性试剂和细胞生长抑制剂对人肿瘤细胞生长和存活的协同抑制作用

[0152] [125] EM164 抗体与紫杉醇的联合施用较紫杉醇单独施用对非小细胞肺癌 Calu6 细胞明显更有抑制作用。同样, EM164 抗体与喜树碱的联合较喜树碱单独施用对结肠癌 HT29 细胞的生长和存活明显更有抑制作用。因为并不期望单独的 EM164 抗体像有机化学毒性药物一样对细胞有毒性, 所以在临床条件下, EM164 抗体突出的细胞生长抑制效应和化学毒性药物的细胞毒性效应的协同在癌症的联合治疗中是非常有效的。

[0153] [126] EM164 抗体与抗 EGF 受体抗体 (KS77) 的联合效应较单独的 EM164 抗体或 KS77 抗体对数种肿瘤细胞系如 HT-3 细胞, RD 细胞, MCF-7 细胞和 A431 细胞的生长和存活具有更明显的抑制作用。因此, 将针对两种生长因子受体如 IGF-I 受体和 EGF 受体的中和抗体联合起来所产生的协同效应在临床的癌症治疗中也是有用的。

[0154] [127] EM164 抗体与细胞毒性药物的偶联物在将所述细胞毒药物向过量表达 IGF-I 受体的肿瘤进行靶向输送的过程中也是有价值的。EM164 抗体与放射性标记或其它标记的偶联物可用于过量表达 IGF-I 受体的肿瘤的治疗和成像。

[0155] G. EM164 作为单一试剂或与抗癌试剂联合进行处理时对免疫缺陷小鼠中人癌症异

种移植物的影响

[0156] [128] 人非小细胞肺癌 Calu-6 异种移植物是通过在免疫缺陷小鼠中皮下注射 1×10^7 个 Calu-6 细胞而建立的。如在图 10 中显示,含有已建立的 100mm^3 Calu-6 异种移植物的这些小鼠单独用 EM164 抗体处理(静脉注射 6 次,每次 $0.8\text{mg}/\text{小鼠}$,每周两次)或单独用紫杉醇处理(腹腔注射 5 次紫杉醇;每两天 1 次;每次 $15\text{mg}/\text{kg}$),或联合紫杉醇和 EM164 抗体进行处理,或单独给予 PBS($200\mu\text{L}/\text{小鼠}$,6 次注射,每周 2 次,静脉注射),每个处理组使用 5 只小鼠。与 PBS 对照相比,用 EM164 抗体处理可明显延缓肿瘤的生长。基于小鼠体重的测量,没有观察到 EM164 抗体的毒性。尽管单独的紫杉醇的有效性持续到 14 天,但到那时肿瘤才开始消退。然而,与单独用紫杉醇进行处理的这组相比,在紫杉醇和 EM164 抗体联合处理的那组中肿瘤的生长明显被延缓。

[0157] [129] 人胰腺癌异种移植物是通过向 5 周龄的雌性 SCID/ICR 小鼠(Taconic)皮下注射含有 10^7 个 BxPC-3 细胞的 PBS 而建立的(0 天)。然后带有 80mm^3 的已建立肿瘤的小鼠用 EM164 单独处理(13 次注射,每次 $0.8\text{mg}/\text{小鼠}$,尾侧静脉注射,在第 12,16,19,23,26,29,36,43,50,54,58,61 和 64 天进行注射),用吉西他滨(gemcitabine)单独处理(腹腔注射两次,每次 $150\text{mg}/\text{kg}/\text{小鼠}$,在第 12 和 19 天),用吉西他滨和 EM164 按照上述方案进行联合处理,单独给予 PBS,和单独给予对照抗体(使用与 EM164 相同的方案),这 5 个处理组中的每一个都使用 5 只小鼠。如在图 27 中所示,EM164 的单独处理或与吉西他滨的联合处理都在一开始便导致肿瘤异种移植物的总体遏制,在 EM164 处理组的 5 只动物中有 4 只,在联合处理组的所有 5 只动物中出现了这样的遏制。仅在 EM164 组中的第 43 天和联合处理组中的第 68 天见到一只以上的动物发生可测量到的肿瘤再生,而在第 74 天得到的平均肿瘤体积与对照处理组相比要明显减小(P 分别为 0.029 和 0.002;双尾 T-检验;图 27)。在另一项研究中,EM164 抗体的处理(单独使用或与抗 EGF 受体抗体联合使用;腹腔注射)可抑制小鼠中已建立的 BxPC-3 异种移植物的生长。

[0158] H. EM164 抗体轻链和重链的克隆和测序

[0159] [130] 从 EM164 杂交瘤细胞中纯化出总 RNA。使用 $4\text{--}5\mu\text{g}$ 总 RNA 和寡聚 dT 或随机六聚物引物进行逆转录酶反应。

[0160] [131] 采用 Co 等人所述的 RACE 方法(J. Immunol., 148, 1149-1154(1992))和 Wang 等人所述的简并引物(J. Immunol. Methods, 233, 167-177(2000))进行 PCR 反应。RACE PCR 方法需要一个中间步骤来将多聚 G 尾添加至第一条 cDNA 链的 3' 末端上。用 Qianeasy(Qiagen)柱纯化 RT 反应,用 $50\mu\text{L}$ 的 1XNEB 缓冲液 4 洗脱。用 0.25mM CoCl_2 , 1mM dGTP 和 5units 的末端转移酶(NEB)在 1X NEB 缓冲液 4 中对所述洗脱液进行 dG 加尾反应。混合物在 37°C 孵育 30 分钟,然后将 1/5 的反应($10\mu\text{L}$)直接加入到 PCR 反应中作为模板 DNA。

[0161] [132] 除了引物和模板的差异以外,RACE 和简并 PCR 反应是完全相同的。对于 RACE PCR 是直接使用末端转移酶反应物作为模板,而简并 PCR 反应是直接使用 RT 反应混合物。

[0162] [133] 在 RACE 和简并 PCR 反应中,使用相同的 3' 轻链引物:

[0163] HindKL-tatagagctcaagcttgatggtgggaagatggatacagttggtgc (SEQ ID NO:14) 和 3' 重链引物:

[0164] Bgl12IgG1-ggaagatctatagacagatgggggtgtcgttttggc (SEQ ID NO:15)。

[0165] [134] 在 RACE PCR 中,1 个多聚 C 5' 引物同时用于重链和轻链:

[0166] EcoPolyC-TATATCTAGAATTCCCCCCCCCCCCCCCC (SEQ ID NO:16),而简并 5' 末端 PCR 引物为:对于轻链,为 Sac1MK-GGGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA (SEQ ID NO:17);对于重链,为下列引物的等量混合物:

[0167] EcoR1MH 1-CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC (SEQ ID NO:18) 和

[0168] EcoR1MH2-CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG (SEQ ID NO:19)。

[0169] [135] 在上述的引物序列中,混合碱基如下定义:H = A+T+C, S = g+C, Y = C+T, K = G+T, M = A+C, R = A+g, W = A+T, V = A+C+G。

[0170] [136] 采用下列的程序进行 PCR 反应:1) 94°C 3 分钟,2) 94°C 15 秒,3) 45°C 1 分钟,4) 72°C 2 分钟,5) 返回 #2 步,循环 29 次,6) 在 72°C 10 分钟完成最后的延伸步骤。

[0171] [137] 采用限制性酶将通过 PCR 引物产生的 PCR 产物克隆进 pBluescript II SK+ (Stratagene)。

[0172] [138] 通过常规的方法对几个独立的轻链和重链克隆测序以鉴定和避免聚合酶产生的可能的序列错误(图 12 和 13)。使用 Chothia 典型分类定义(Chothia canonical classification definitions),鉴定出三个轻链和重链 CDR(图 12-14)。

[0173] [139] NCBI IgBlast 数据库的搜索表明,抗-IGF-I 受体抗体的轻链可变区可能来自小鼠 IgVκ Cr1 胚系基因,而重链可变区可能来自 IgVh J558. c 胚系基因(图 15)。

[0174] [140] 鼠 EM164 抗体蛋白被测序以证实图 12 和 13 中显示的序列。纯化的 EM164 抗体的重链和轻链条带从凝胶(SDS-PAGE,还原条件)转移至 PVDF 膜上,从该 PVDF 膜上切下,通过蛋白测序进行分析。所述轻链的 N-末端序列通过 Edman 测序测定为:DVLMTQTPLS (SEQ ID NO:20),这与从 EM164 杂交瘤获得的克隆轻链基因的 N-端序列相匹配。

[0175] [141] 为了进行 Edman 蛋白测序,重链的 N-末端被封闭。质量为 1129.5 (M+H⁺, 单同位素) 的重链胰蛋白酶消化肽片段通过源后衰减(PSD) 分成片段,其序列测定为 GRPDYYGSSK (SEQ ID NO:21)。质量为 2664.2 (M+H⁺, 单同位素) 的另一个重链胰蛋白酶消化肽片段也通过源后衰减(PSD) 分成片段,其序列鉴定为:SSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYFAR (SEQ ID NO:22)。这两个序列都与从 EM164 杂交瘤获得的克隆重链基因的 CDR3 和框架 3 (FR3) 的序列完全匹配。

[0176] I. EM164 抗体的重组表达

[0177] [142] 轻链和重链成对序列被克隆进单个哺乳动物表达载体中(图 16)。人可变序列的 PCR 引物建立了一些限制性位点,它们可让人信号序列进入 pBluescriptII 克隆载体的同时能够让其进行连接,所述可变序列被克隆进哺乳动物表达质粒中,轻链或重链的克隆分别使用了 EcoRI 和 BsiWI 或 HindIII 和 ApaI 位点(图 16)。轻链可变序列按同一读码框架(in-frame)被克隆到人 IgK 恒定区上,重链可变序列被克隆到人 Igγ 恒定区序列中。在最终的表达质粒中,人 CMV 启动子可驱动轻链和重链 cDNA 序列的表达。根据本领域中熟知的方法进行重组鼠 EM164 抗体的表达和纯化。

[0178] 实施例 2:EM164 抗体的人源化形式

[0179] [143] 大体上根据美国专利 5,639,641 和如下公开的原理和方法进行 EM164 抗体的表面重构,以提供适合作为治疗或诊断试剂的人源化抗体形式。

[0180] A. 表面预测

[0181] [144] 为了预测鼠抗 IGF-I 受体抗体 (EM164) 可变区的表面残基,应用了一组具有溶解结构的抗体的可变区残基的可溶性 (溶剂可及性, solvent accessibility)。127 个独特抗体结构文件 (表 2) 的氨基酸可溶性用 MC 软件包来进行计算 (Pedersen 等人, 1994, J. Mol. Biol., 235, 959-973)。从这 127 个结构中通过序列比对确定出 10 条最相似的轻链和重链氨基酸序列。计算每个可变区残基的平均溶剂可及性 (averagesolvent accesibility), 具有超过 30% 的平均可及性的位点被认为是表面残基。对于具有两个完全相同的侧面残基的那些结构, 通过计算各个残基的可及性来进一步检验平均可及性在 25% 和 35% 之间的位点。

[0182] 表 2 来自 Brookhaven 数据库的用来预测抗 IGF-I 受体抗体 (EM164) 的表面的 127 个抗体结构

[0183] 用于表面预测的 127 个 Brookhaven 结构文件

[0184]

2rcs	3hfl	3hf	1aif	1a3r	1bbj	43c9	4fab	6fab	7fab
		-m							
2gfb	2hlp	2hfl	1a6t	1axt	1bog	2hrp	2jel	2mc	2pcp
								p	
lyuh	2bfv	2cgr	8fab	1ae6	1bvl	2dbl	2f19	2fb4	2fbj
1sm	1tet	1vfa	glb2	1a4j	1cly	1vge	1yec	1yed	lyee
3									
1nsn	1opg	1osp	1aj7	1ayl	1clz	1plg	1psk	1rmf	1sbs
1ncd	1nfd	1ngp	1acy	1afv	1cbv	1nld	1nm	1nm	1nqb
							a	b	
1mc	1mf	1mi	15c8	1a5f	1axs	1mlb	1mp	1nbv	1ncb
p	b	m					a		
1jrh	1kb5	1kel	1ap2	1b2	1adq	1kip	1kir	1lve	1mam
w									
ligi	ligm	ligt	1ad0	1baf	1cfv	ligy	likf	1jel	1jhl
lgpo	1hil	1hyx	1a0q	1bjm	1clo	1iai	1ibg	1igc	1igf
1fpt	1frg	1fvc	1aqk	1bln	1d5	1gaf	1ggi	1ghf	1gig
					b				
1fai	1fbi	1fdl	1ad9	1bbd	1f58	1fgv	1fig	1flr	1for
1dbl	1dfb	1a3l	1bfo	1eap	1dsf	1dvf			

[0185] B. 分子建模:

[0186] [145] 鼠 EM164 的分子模型采用 Oxford 分子软件包 AbM 来产生。抗体构架 (framework) 的建立是来自具有最相似的氨基酸序列的抗体的结构文件, 对于轻链, 文件是 2jel, 对于重链则是 1nqb。通过搜索含有非冗余溶解结构 (non-redundant solved structures) 的 C- α 结构数据库可建立非正式的 CDR (non-canonical CDRs)。CDR 的 5 Å 范围内的残基被确定。

[0187] C. 人 Ab 选择

[0188] [146] 将鼠 EM164 的表面位置与 Kabat 数据库 (Johnson, G. 和 Wu, T. T. (2001) Nucleic Acids Research, 29 :205-206) 中人抗体序列的相应位置进行比较。应用抗体数据库管理软件 SR (Searle 1998) 从天然的重链和轻链人抗体对中提取和比对抗体表面残基。特别考虑到进入 CDR 的 5 Å 范围内的位点, 选择了具有最相同的表面残基的人抗体表面, 以替换鼠抗 IGF-I 受体抗体的表面残基。

[0189] D. PCR 诱变

[0190] [147] 在鼠 EM164 cDNA 克隆 (见上) 上进行 PCR 诱变以构建表面重构的人 EM164 (在此标为 huEM164)。引物组被设计, 以产生 huEM164 的所有受测形式所需的 8 个氨基酸变化, 额外的引物被设计, 以选择性地产生两种 5 残基的变化 (表 3)。PCR 反应按下面的程序来执行: 1) 94°C 1 分钟, 2) 94°C 15 秒, 3) 55°C 1 分钟, 4) 72°C 1 分钟, 5) 返回 #2 步骤, 循环 29 次, 6) 最后在 72°C 进行最后的延伸步骤 4 分钟。PCR 产物用其相应的限制性酶消化, 如上所述地克隆进 pBluescript 克隆载体。克隆被测序以证实所需的氨基酸变化。

[0191] 表 3 用来构建 4 种人源化 EM164 抗体的 PCR 引物

[0192]

引物	序列	SEQ ID NO :
Em164hevv	CAGGTGTACACTCCCAGGTCCAAGTGGTGC AGTCTGGGGCTGAAGTGGTGAAGCCTG	23
Em164hcqqgol1	CAATCAGAAGTTCCAGGGGAAGGCCACAC	24
Em164hcqqgol2	CCTTCCCCTGGAAGTTCTGATTGTAGTTAGT ACG	25
Em164lcv3	CAGGTGTACACTCCGATGTTGTGATGACCC AAAGTCC	26
Em164lc13	CAGGTGTACACTCCGATGTTTGTGATGACCCA AAGTCC	27
Em164lcp18	GACTAGATCTGCAAGAGATGGAGGCTGGAT CTCCAAGAC	28
Em164lcbgl2	TTGCAGATCTAGTCAGAGCATAGTACATAG TAATG	29
Em164r45	GAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCT CCAAGGCTCCTGATCTAC	30
Em164a67ol1	GTGGCAGTGGAGCAGGGACAGATTTCAC	31
Em164a67ol2	GAAATCTGTCCCTGCTCCACTGCCACTG	32

[0193] E. 可变区表面残基

[0194] [148] 由 Pedersen 等人 (J. Mol. Biol., 235, 959-973, 1994) 和 Roguska 等人 (Protein Eng., 9, 895-904, 1996) 描述的抗体表面重构技术是从预测鼠抗体可变序列的表面残基开始的。表面残基被定义为其总表面积的至少 30% 可与水分子接触的氨基酸。

[0195] [149] 在这 127 个抗体结构文件中 10 个最同源的抗体被鉴定出 (图 17 和 18)。将这些被比对的序列中的每个 Kabat 位置的溶剂可及性进行平均化, 各个残基的相对可及性的分布显示在图 19 中。轻链和重链均有 26 个残基的平均相对可及性至少为 30% (图 19): 因此这些残基是 EM164 的预测的表面残基。有数个残基的平均可及性在 25% 和 35% 之间, 这些残基被进一步检验, 也即是可及性的平均化仅在所述残基两侧带有两个完全相同的残基的抗体中进行 (表 4 和 5)。在进行这样的附加分析后, 上面最初鉴定出的表面残基仍然没有改变。

[0196] 表 4 EM164 抗体轻链和重链可变序列的表面残基和平均可及性 (ave. acc.)

[0197]

EM 164 表面残基					
轻链			重链		
EM164	Kabat #	Ave. Acc.	EM164	Kabat #	Ave. Acc.
D	1	45.89	Q	1	58.19
L	3	41.53	Q	3	34.08
T	7	31.40	Q	5	34.36
L	9	50.08	A	9	38.01
L	15	35.45	L	11	47.72
Q	18	39.79	K	13	46.51
R	24	34.36	P	14	31.49
S	26	32.63	G	15	31.42
Q	27	34.35	K	19	34.41
N	28	36.38	K	23	31.23
P	40	43.05	T	28	36.24
G	41	46.56	P	41	44.01
Q	42	34.92	G	42	42.62
K	45	30.58	Q	43	46.85
S	52	30.40	E	61	46.68
S	56	41.46	K	62	44.87
G	57	42.41	K	64	38.92
D	60	45.96	R	65	40.06
S	67	38.20	K	73	35.92
R	77	42.61	S	74	48.91
E	81	38.46	S	82B	32.72
V	95E	34.83	S	84	35.21
K	103	31.10	E	85	39.62
K	107	36.94	D	98	36.00
R	108	60.13	A	106	37.65
A	109	53.65	S	113	43.42

[0198] 表 5

[0199]

边界表面残基					
轻链			重链		
EM164	Kabat #	Ave. Acc.	EM164	Kabat #	Ave. Acc.
T	5	28.68	Q	3	31.62
T	7	30.24	Q	5	36.07
P	12	26.59	P	14	29.88
G	16	25.20	G	15	30.87
D	17	25.73	S	17	25.64
S	20	25.37	K	19	35.06
R	24	36.73	K	23	31.48
S	26	31.00	G	26	30.53
Q	27	32.29	S	31	27.12
S	27A	29.78	R	56	NA
V	27C	29.05	T	68	27.71
V	29	NA	T	70	24.65
Q	42	34.92	S	75	18.80
K	45	32.24	S	82B	32.87
S	52	30.02	P	97	NA
R	54	29.50	Y	99	NA
D	70	26.03	V	103	NA
R	74	NA	T	111	25.95
E	79	26.64			
A	80	29.61			
V	95E	42.12			
G	100	29.82			
K	103	31.10			
E	105	25.78			

[0200] 平均可及性在 25% 和 35% 之间的残基被进一步分析, 通过对在所述疑问残基两侧有两个完全相同的残基的一部分抗体进行平均。这些临界表面位置及其新的平均可及性值被给出。NA 是指在这 10 个最相似的抗体中没有相同侧面残基的残基。

[0201] F. 用分子建模来确定在 CDR 的 5 Å 之内的残基

[0202] [150] 对上述用 AbM 软件包产生的分子模型进行分析, 以确定在 CDR 的 5 Å 范围内的 EM164 表面残基。为了重构鼠 EM164 抗体, 在 CDR 之外的所有表面残基都应该变为在人类中的对应物 (counterparts), 但在 CDR 的 5 Å 范围之内的残基要被特别对待, 因为它们对

抗原特异性也有贡献。因此,后者的这些残基必须被鉴定出,并在整个人源化过程中都要对它们进行特别考虑。在表面重构中被使用的 CDR 定义结合了重链 CDR2 的 AbM 定义和剩余的 5 个 CDR 的 Kabat 定义(图 14)。表 6 显示了在 EM164 模型的轻链或重链序列内,处于 CDR 的残基的 5 Å 范围内的残基。

[0203] 表 6 在 CDR 的 5 Å 范围内的 EM164 抗体构架表面残基 CDR 的 5 Å 内的 EM164 表面残基

[0204]

轻链	重链
D1	T28
L3	K73
T7	S74
P40	
Q42	
K45	
G57	
D60	
E81	

[0205] G. 鉴定最同源的人表面

[0206] [151] 用于重构 EM164 表面的候选人抗体表面在 Kabat 抗体序列数据库中用 SR 软件鉴定出来,该软件仅基于抗体数据库来搜索特定的残基位点。为了保留天然的配对,轻链和重链的表面残基一起进行比较。来自 Kabat 数据库的最同源的人表面按照序列同一性的等级次序进行排列。最顶端的 5 个表面在表 7 中给出。然后比较这些表面以鉴定出它们中的哪一个在 CDR 的 5 Å 之内需要的变化最小。白血病 B 细胞抗体,CLL 1.69,要求的表面残基变化数目最小(总共 10 个),而在这些残基中仅有 2 个位于 CDR 的 5 Å 内。

[0207] [152] EM164 的全长可变区序列也可与 Kabat 人抗体数据库进行比对,CLL 1.69 再次被鉴定为最相似的人可变区序列。这些序列比较将人白血病 B 细胞抗体 CLL 1.69 鉴定为 EM164 的人表面的优选选择。

[0208] 表 7 从 Kabat 数据库中提取出的最同源的 5 个人类序列

[0209]

5个最同源的人抗体表面		
抗体	轻链	SEQ ID NO:
MuEM164	<u>D</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>A</u>	33
CLL1.69	D V T L L P P G Q R G D A R E K K R -	34
MSL5	D Q S L I P P G Q K G D S R D K K R A	35
CDP571	D M S S V R P G Q K G S S S D K K R -	36
LC3aPB	E V S G P R P G Q R G D S R E K K R -	37
SSbPB	E V S G P R P G Q R G D S R E K K R -	38
抗体	轻链	SEQ ID NO:
MuEM164	Q Q Q A L K P G K K T P G Q E K K R <u>K</u> S S S E A S	39
CLL1.69	Q Q V A V K P G K K T P G Q Q K Q G K S S S E Q S	40
MSL5	Q Q Q P L K P G K K T P G K D D K G T S N N E Q S	41
CDP571	Q Q V A V K P G K K T P G Q Q K K G K S S S E Q S	42
LC3aPB	- Q V A V K P G K K T P G Q Q K Q G K S S S E Q S	43
SSbPB	- Q V A V K P G K K T P G Q Q K Q G E S S S E Q S	44

[0210] 通过SR进行比对(Pedersen 1993)。位于CDR 5 Å内的EM164表面残基被划线标记。

[0211] H. 构建人源化EM164基因

[0212] [153] 使用如上所述的PCR诱变技术对EM164的10个表面残基(表7)进行变化。因为CLL 1.69的8个表面残基不在CDR的5 Å之内,因此这些残基在所有形式的人源化EM164中均从鼠源性转变为人源性(表8和9)。在CDR的5 Å内的两个轻链表面残基(在位点3和45)被改变为人源性或保留为鼠源性。这些选择一共构建出4种EM164人源化形式(图22和23)。

[0213] [154] 在这4种人源化形式中,1.0型具有所有的10个人源性表面残基。就CDR附近的改变而言,最保守的形式是1.1型,它保留了在CDR的5 Å之内的所有鼠源性表面残基。所有4种人源化EM164抗体基因都被克隆进抗体表达质粒中(图16)以便用于暂时的和稳定的转染。

[0214] 表8制备人源化EM164抗体1.0-1.3型时的残基变化

[0215]

所有形式中均有的变化						
轻链: muQ18至huP18; muS67至huA67						
重链: muQ5 至 huV5; muL11 至 huV11; muE61 至 huQ61; muK64 至 huQ64						
muR65至huG65; muA106至huQ106						
HuEM164变化						
	轻链aa3		轻链aa45		总数, 在5 Å内	
	Mu	Hu	mu	hu	鼠源性残基	
V1.0		V		R	0	
V1.1	L		K		2	
V1.2	L			R	1	
V1.3		V	K		1	

[0216] I. 比较人源化 EM164 抗体与鼠源性 EM164 抗体对全长 IGF-I 受体和截短的 IGF-I 受体 α 链结合的亲和性

[0217] [155] 人源化 EM164 抗体 1.0-1.3 的亲和性与鼠源性 EM164 抗体的亲和性是通过结合竞争分析 (binding competition assays) 来比较的, 其中使用了生物素化全长人 IGF-I 受体或 myc- 表位标记的截短的 IGF-I 受体 α 链, 如上所述。通过在人胚胎肾 293T 细胞中暂时转染合适的表达载体来获得人源化 EM164 抗体样本, 抗体浓度通过 ELISA 利用纯化的人源化抗体标准品进行测定。为了进行 ELISA 结合竞争测定, 将人源化抗体样本和多种浓度的鼠 EM164 抗体的混合物与间接俘获的生物素化全长 IGF-I 受体或 myc- 表位标记的截短的 IGF-I 受体 α 链一起孵育。平衡后, 使用羊抗人 Fab' ₂- 抗体-辣根过氧化物酶偶联物检测结合的人源化抗体。就 ([结合的鼠 Ab]/[结合的人源化 Ab]) vs ([鼠 Ab]/[人源化 Ab]) 进行作图, 它理论上产生一条直线, 斜率 = $(K_{d \text{ 人源化 Ab}}/K_{d \text{ 鼠 Ab}})$, 由此可以确定人源化抗体和鼠抗体的相对亲和性。

[0218] [156] 竞争分析的一个实例在图 11 中显示。Immulon-2HB ELISA 板按每孔 100 μ L 5 μ g/mL 的链亲和素在室温用碳酸盐缓冲液包被 7h。链亲和素包被的孔用 200 μ L 封闭缓冲液 (10mg/mL BSA, 在 TBS-T 缓冲液中) 封闭 1h, 用 TBS-T 缓冲液清洗, 与生物素化 IGF-I 受体 (每孔 5ng) 4°C 孵育过夜。然后含有间接俘获的生物素化 IGF-I 受体的孔被洗涤, 与人源化 EM164 抗体 (15.5ng) 和鼠抗体 (0ng, 或 16.35ng, 或 32.7ng, 或 65.4ng, 或 163.5ng) 的混合物在 100 μ L 的封闭缓冲液中室温孵育 2h, 然后在 4°C 孵育过夜。然后用 TBS-T 缓冲液清洗各孔, 并与羊抗人 Fab' ₂- 抗体-辣根过氧化物酶偶联物 (100 μ L; 1 μ g/mL, 在封闭缓冲液中) 孵育 1h, 然后多次洗涤, 使用 ABTS/H₂O₂ 底物在 405nm 处检测。

[0219] [157] ([结合的鼠 Ab]/[结合的人源化 Ab]) 对 ([鼠 Ab]/[人源化 Ab]) 的曲线产生一条直线 ($r^2 = 0.996$), 斜率 (= $K_{d \text{ 人源化 Ab}}/K_{d \text{ 鼠 Ab}}$) 为 0.52。因此人源化抗体 1.0 型较鼠

EM164 抗体与 IGF-I 受体的结合更紧密。对于人源化 EM164 抗体 1.0, 1.1, 1.2 和 1.3 型与鼠 EM164 抗体对全长 IGF-I 受体或截短的 IGF-I 受体 α 链的结合竞争, 可获得类似的值, 梯度范围为大约 0.5 至 0.8, 这表明所有的 EM164 抗体人源化形式都具有相似的亲和性, 它们都高于作为母本的鼠 EM164 抗体的亲和性。在重链中带有 92F $\rightarrow$ C 突变的 EM164 抗体的嵌合形式在与鼠 EM164 抗体的一个类似的结合竞争中显示出大约为 3 的斜率, 表明 EM164 的 92F $\rightarrow$ C 突变体结合 IGF-I 受体的亲和性较鼠 EM164 抗体低 3 倍。人源化 EM164.1.0 型抗体显示出对 IGF-I 刺激的 MCF-7 细胞生长和存活的抑制作用, 这与鼠 EM164 抗体相似 (图 24)。人源化 EM164.1.0 型抗体对血清刺激的 MCF-7 细胞生长和存活的抑制作用与鼠 EM164 抗体的抑制作用相似。

[0220] 表 9

[0221]

片段	轻链	重链
FR1	1-23 (在 0 处偶尔有一个残基, 在 V _L 链中的 10 处有一个 删除)	1-30 (在 0 处偶尔有一个残基)
CDR1	24-34 (含有可能的插入物, 编号为 27A, B, C, D, E, F)	31-35 (含有可能的插入物, 编号 为 35A, B)
FR2	35-49	36-49
CDR2	50-56	50-65 (含有可能的插入物, 编号 为 52A, B, C)
FR3	57-88	66-94 (含有可能的插入物, 编号 为 82A, B, C)
CDR3	89-97 (含有可能的插入物, 编号为 95A, B, C, D, E, F)	95-102 (含有可能的插入物, 编号 为 100A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K)
FR4	98-107 (含有可能的插入物, 编号为 106A)	103-113

[0222] 将 Kabat 编号系统用于不同形式的 EM164Ab 的轻链和重链可变区多肽。根据在多肽链中的位置, 将氨基酸残基分组为构架 (FR) 和互补性决定区 (CDR)。

[0223] 取自 Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, 1991, NTH Publication No. 91-3242

[0224] J. 以在此所述的鼠源性和人源化抗体序列作为开始来提供改良的抗 IGF-I 受体抗体的过程

[0225] [158] 抗 IGF-I 受体抗体 EM164 及其人源化变体的氨基酸和核酸序列被用来开发其他的具有改良特性的抗体, 它们也在本发明的范围内。所述改良的特性包括与 IGF-I 受体的亲和性增加。几个研究已经基于初始抗体 (primary antibody) 序列的知识, 调查了在抗体序列的不同位点导入一个或多个氨基酸变化对其特性如结合作用和表达水平的影响 (Yang, W. P. 等, 1995, J. Mol Biol, 254, 392-403; Rader, C. 等, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 8910-8915; Vaughan, T. J. 等, 1998, Nature Biotechnology, 16, 535-539)。

[0226] [159] 在这些研究中, 初始抗体的变体已经通过在 CDR1, CDR2, CDR3 或构架区中改变重链和轻链基因的序列而产生, 采用的方法如寡核苷酸介导的位点定向诱变, 盒式诱变, 易错 PCR, DNA 重排, 或利用大肠杆菌的增变株 (Vaughan, T. J. 等, 1998, Nature Biotechnology, 16, 535-539; Adey, N. B. 等, 1996, 16 章, 277-291 页, 在 " Phage Display of Peptides and Proteins ", Kay, B. K. 等人主编, Academic Press)。改变初始抗体的序列的这些方法加上标准的筛选技术的应用已经获得了亲和性增加的次级抗体 (secondary antibodies) (Gram, H. 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3576-3580; Boder, E. T. 等, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 10701-10705; Davies, J. 和 Riechmann, L., 1996, Immunotechnology, 2, 169-179; Thompson, J. 等, 1996, J. Mol. Biol., 256, 77-88; Short,

M. K. 等, 2002, J. Biol. Chem., 277, 16365-16370; Furukawa, K. 等, 2001, J. Biol. Chem., 276, 27622-27628)。

[0227] [160] 通过可以改变抗体的一个或多个氨基酸残基的一种相似的定向策略, 在本发明中所述的抗体序列可以被用来开发具有改良功能的抗 IGF-I 受体抗体, 如具有合适基团的抗体, 例如在方便进行共价修饰的连接点处加上游离氨基基团或硫醇基团, 这可以在例如治疗试剂的连接中被应用。

[0228] K. 鼠的, 嵌合的和其它的抗 IGF-I 受体抗体的可供选择的表达系统

[0229] [161] 也可利用那些与用来表达人源化抗体的表达质粒 (上述) 相类似的哺乳动物表达质粒来表达鼠抗 IGF-I 受体抗体。具有鼠恒定区, 包括轻链 κ 和重链 $\gamma-1$ 序列的表达质粒是已知的 (McLean 等, 2000, Mol Immunol., 37, 837-845)。这些质粒被设计用来接受任何抗体的可变区, 如通过简单的限制性消化和克隆鼠抗 IGF-I 受体抗体。为了建立与表达质粒相容的限制性, 通常需要对抗 IGF-I 受体抗体进行额外的 PCR 方法。

[0230] [162] 表达完整鼠抗 IGF-I 受体抗体的一种可选择的方法是在嵌合的抗 IGF-I 受体抗体表达质粒中替换人恒定区。利用可变区的序列盒以及轻链和重链恒定区的序列盒来构建嵌合表达质粒 (图 16)。正如抗体可变区可通过限制性消化被克隆进这个表达质粒中一样, 单独的限制性消化被用于任何恒定区序列的克隆。 κ 轻链和 $\gamma-1$ 重链 cDNA 被克隆, 所述克隆例如源自鼠杂交瘤 RNA, 如所述的用于克隆抗 IGF-I 抗体可变区的 RNA。同样, 合适的引物可以利用 Kabat 数据库中获得的序列进行设计 (见表 10)。例如, 应用 RT-PCR 来克隆恒定区序列, 并创造出将这些片段克隆进嵌合抗 IGF-I 受体抗体表达质粒中所需的限制性位点。然后这个质粒被用于在标准的哺乳动物表达系统如 CHO 细胞系中完整的鼠抗 IGF-I 受体抗体。

[0231] 表 10 被设计用来分别克隆鼠 $\gamma-1$ 恒定区和鼠 κ 恒定区的引物

[0232]

鼠恒定区引物		
引物名称	引物序列	SEQ ID NO:
MuIgG1 C3endX	TTTGTAGCTCTTATTTACCAGGAGAG TGGGAGA GGCTCTT	45
MuIgG1 C5endH	TTTTAAGCTTGCCAAAACGACACCC CCATCTG TCTAT	46
MuIgKap C3endB	TTTTGGATCCTAACACTCATTCTGT TGAAGC	47
MuIgKap C5endE	TTTTGAATTCGGGCTGATGCTGCACC AACTG	48

[0233] 引物根据 Kabat 数据库中获得的序列进行设计 (Johnson, G 和 Wu, T. T. (2001) Nucleic Acids Research, 29:205-206)。

[0234] 保藏声明

[0235] [163] 根据布达佩斯条约的条款, 能产生鼠 EM164 抗体的杂交瘤于 2002 年 6 月 14

日保藏于美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection), PO Box 1549, Manassas, VA 20108, 保藏登记号 (Accession Number) 为 PTA-4457。

[0236] [164] 在本公开中引用到了某些专利和已印制的出版物,其教导的内容在此分别以其整体引入作为参考。

[0237] [165] 尽管本发明已经根据其具体的实施方案作了详细描述,但对于本领域的专业技术人员,明显的是,对其所作的各种变化和修饰不背离其精神和范围。

[0001]

序列表

<110> 伊缪诺金公司 (Immunogen, Inc.)

<120> 抗IGF-I受体抗体

<130> CPUSZ42525

<140> PCT/US03/16211

<141> 2003-06-12

<150> US10/170,390

<151> 2002-06-14

<160> 96

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体重链互补性决定区

<400> 1

Ser Tyr Trp Met His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体重链互补性决定区

<400> 2

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

1 5 10 15

Arg

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体重链互补性决定区

<400> 3

Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10 15

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体轻链互补性决定区

<400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

[0002]

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体轻链互补性决定区

<400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体轻链互补性决定区

<400> 6

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体重链

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Arg Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Phe
 85 90 95

Ala Arg Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp Tyr Phe Asp
 100 105 110

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0003]

<220>
<223> 抗体轻链

<400> 8

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 9
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化轻链可变区

<400> 9

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

[0004]

Arg

<210> 10
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化轻链可变区

<400> 10

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 11
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化轻链可变区

<400> 11

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

[0005]

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

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

Arg

<210> 12
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化轻链可变区

<400> 12

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 13
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化重链可变区

<400> 13

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

[0006]

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Phe
85 90 95

Ala Arg Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 简并3' 轻链PCR引物 - HindKL

<400> 14
tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tggatgc 46

<210> 15
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 简并3' 重链PCR引物 - Bgl2IgG1

<400> 15
ggaagatcta tagacagatg ggggtgtcgt tttaggc 36

<210> 16
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 多聚C 5' PCR引物 - EcoPolyC

<400> 16
tatatctaga attcccccc ccccccccc 30

<210> 17
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 简并5' 轻链PCR引物 - SacIMK

<400> 17
gggagctcga yattgtgmts acmcarwctm ca 32

<210> 18
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 简并5' 重链PCR引物 - EcoR1MH1

[0007]

[0008]

<210>	24	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR引物	
<400>	24	
	caatcagaag ttccagggga aggccacac	29
<210>	25	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR引物	
<400>	25	
	ccttccctg gaacttctga ttgtagttag tacg	34
<210>	26	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR引物	
<400>	26	
	caggtgtaca ctccgatgtt gtgatgaccc aaactcc	37
<210>	27	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR引物	
<400>	27	
	caggtgtaca ctccgatgtt ttgatgaccc aaactcc	37
<210>	28	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR引物	
<400>	28	
	gactagatct gcaagagatg gaggctggat ctccaagac	39
<210>	29	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR引物	
<400>	29	
	ttgcagatct agtcagagca tagtacctag taatg	35
<210>	30	
<211>	48	
<212>	DNA	

[0009]

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物

<400> 30

gaatggtacc tgcagaaacc aggccagtct ccaaggctcc tgatctac

48

<210> 31

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物

<400> 31

gtggcagtgg agcagggaca gatttcac

28

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物

<400> 32

gaaatctgtc cctgctccac tgccactg

28

<210> 33

<211> 19

<212> PRT

<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 33

Asp Leu Thr Leu Leu Gln Pro Gly Gln Lys Gly Asp Ser Arg Glu Lys
1 5 10 15

Lys Arg Ala

<210> 34

<211> 18

<212> PRT

<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 34

Asp Val Thr Leu Leu Pro Pro Gly Gln Arg Gly Asp Ala Arg Glu Lys
1 5 10 15

Lys Arg

<210> 35

<211> 19

<212> PRT

<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 35

Asp Gln Ser Leu Ile Pro Pro Gly Gln Lys Gly Asp Ser Arg Asp Lys
1 5 10 15

Lys Arg Ala

[0010]

<210> 36
<211> 18
<212> PRT
<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 36

Asp Met Ser Ser Val Arg Pro Gly Gln Lys Gly Ser Ser Ser Asp Lys
1 5 10 15 .

Lys Arg

<210> 37
<211> 18
<212> PRT
<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 37

Glu Val Ser Gly Pro Arg Pro Gly Gln Arg Gly Asp Ser Arg Glu Lys
1 5 10 15

Lys Arg

<210> 38
<211> 18
<212> PRT
<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 38

Glu Val Ser Gly Pro Arg Pro Gly Gln Arg Gly Asp Ser Arg Glu Lys
1 5 10 15

Lys Arg

<210> 39
<211> 25
<212> PRT
<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 39

Gln Gln Gln Ala Leu Lys Pro Gly Lys Lys Thr Pro Gly Gln Glu Lys
1 5 10 15

Lys Arg Lys Ser Ser Ser Glu Ala Ser
20 25

<210> 40
<211> 25
<212> PRT
<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 40

Gln Gln Val Ala Val Lys Pro Gly Lys Lys Thr Pro Gly Gln Gln Lys
1 5 10 15

Gln Gly Lys Ser Ser Ser Glu Gln Ser
20 25

[0011]

<210> 41
<211> 25
<212> PRT
<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 41

Gln Gln Gln Pro Leu Lys Pro Gly Lys Lys Thr Pro Gly Lys Asp Asp
1 5 10 15

Lys Gly Thr Ser Asn Asn Glu Gln Ser
20 25

<210> 42
<211> 25
<212> PRT
<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 42

Gln Gln Val Ala Val Lys Pro Gly Lys Lys Thr Pro Gly Gln Gln Lys
1 5 10 15

Lys Gly Lys Ser Ser Ser Glu Gln Ser
20 25

<210> 43
<211> 24
<212> PRT
<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 43

Gln Val Ala Val Lys Pro Gly Lys Lys Thr Pro Gly Gln Gln Lys Gln
1 5 10 15

Gly Lys Ser Ser Ser Glu Gln Ser
20

<210> 44
<211> 24
<212> PRT
<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 44

Gln Val Ala Val Lys Pro Gly Lys Lys Thr Pro Gly Gln Gln Lys Gln
1 5 10 15

Gly Glu Ser Ser Ser Glu Gln Ser
20

<210> 45
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引物

<400> 45
ttttgagctc ttatttacca ggagagtggg agaggctctt

40

<210> 46
<211> 37
<212> DNA

[0012]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 46	
ttttaagctt gccaaaacga caccceccatc tgtctat	37
<210> 47	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 47	
ttttggatcc taacactcat tcctgttgaa gc	32
<210> 48	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 48	
ttttgaattc gggtgatgc tgcaccaact g	31
<210> 49	
<211> 396	
<212> DNA	
<213> 小家鼠(Mus musculus)	
<220>	
<221> CDS	
<222> (1)..(396)	
<400> 49	
atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct	48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala	
1 5 10 15	
tcc agt agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc	96
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val	
20 25 30	
agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc att	144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile	
35 40 45	
gta cat agt aat gta aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca	192
Val His Ser Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro	
50 55 60	
ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct	240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser	
65 70 75 80	
ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca	288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
85 90 95	
ctc agg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga att tat tac tgc	336
Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys	
100 105 110	
ttt caa ggt tca cat gtt cct ccg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg	384
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu	
115 120 125	

[0013]

gaa atc aaa cgg Glu ile Lys Arg 130	396
<210> 50 <211> 132 <212> PRT <213> 小家鼠(Mus musculus)	
<400> 50	
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala 1 5 10 15	
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val 20 25 30	
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile 35 40 45	
Val His Ser Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro 50 55 60	
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser 65 70 75 80	
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr 85 90 95	
Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys 100 105 110	
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 115 120 125	
Glu Ile Lys Arg 130	
<210> 51 <211> 429 <212> DNA <213> 小家鼠(Mus musculus)	
<220> <221> CDS <222> (1)..(429)	
<400> 51	
atg gga tgg agc tat atc atc ctc ttt ttg gta gca aca gct aca gaa Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Glu 1 5 10 15	48
gtc cac tcc cag gtc caa ctg cag cag tct ggg gct gaa ctg gtg aag Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys 20 25 30	96
cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgt aag gct tct ggc tac acc ttc Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe 35 40 45	144
acc agc tac tgg atg cac tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ctt Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu 50 55 60	192
gag tgg att gga gag att aat cct agc aac ggt cgt act aac tac aat	240

[0014]

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 gag aag ttc aag agg aag gcc aca ctg act gta gac aaa tcc tcc agc 288
 Glu Lys Phe Lys Arg Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 aca gcc tac atg caa ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc 336
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 tat tac ttt gca aga gga aga cca gat tac tac ggt agt agc aag tgg 384
 Tyr Tyr Phe Ala Arg Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp
 115 120 125
 tac ttc gat gtc tgg ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 429
 Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 52
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 52

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Glu
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Arg Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Phe Ala Arg Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp
 115 120 125
 Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 53

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
 1 5 10

<210> 54
 <211> 10

[0015]

<212> PRT
 <213> 小家鼠(Mus musculus)
 <400> 54
 Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn
 1 5 10
 <210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 小家鼠(Mus musculus)
 <400> 55
 Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10 15
 <210> 56
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> 小家鼠(Mus musculus)
 <400> 56
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro
 100
 <210> 57
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> 小家鼠(Mus musculus)
 <400> 57
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

[0016]

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 58
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成抗体结构

<400> 58

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 59
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成抗体结构

<400> 59

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

[0017]

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

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

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

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

Arg

<210> 60
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成抗体结构

<400> 60

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 61
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成抗体结构

<400> 61

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

[0018]

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 62
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成抗体结构

<400> 62

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 63
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

[0019]

<220>

<223> 合成抗体结构

<400> 63

Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 64

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成抗体结构

<400> 64

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Gln Thr Ile Leu Leu Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

[0020]

Arg

<210> 65
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成抗体结构

<400> 65

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 66
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成抗体结构

<400> 66

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

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

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

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

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

[0021]

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

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

Arg

<210> 67
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成抗体结构

<400> 67

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Val Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ser His Ala Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 68
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成抗体结构

<400> 68

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

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

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

[0022]

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

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

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

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

Arg

<210> 69
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成抗体结构

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> "X"可以是任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (101)..(101)
 <223> "X"可以是任何氨基酸

<400> 69

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 70
 <211> 124
 <212> PRT

[0023]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成抗体结构

<400> 70

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Arg Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Phe
85 90 95

Ala Arg Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 71

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成抗体结构

<400> 71

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

[0024]

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 72
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成抗体结构

<400> 72

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 73
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成抗体结构

<400> 73

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Gly Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Pro Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

[0025]

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Leu Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Gly Val Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 74
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成抗体结构

<400> 74

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Val Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
20 25 30

Trp Ile His Trp Ala Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Val Asp Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Arg Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 75
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成抗体结构

<400> 75

Gln Val Gln Phe Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Leu Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

[0026]

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Asn Val Val Thr Lys Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Tyr Ala Tyr Cys Arg Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 76
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成抗体结构

<400> 76

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Lys Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 77
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成抗体结构

<400> 77

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

[0027]

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Gly Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly His Ser Tyr Tyr Phe Tyr Asp Gly Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 78
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成抗体结构

<400> 78

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Met Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Lys Thr Thr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 79
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0028]

<220>
 <223> 合成抗体结构
 <400> 79
 Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Gly Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly His Ser Tyr Tyr Phe Tyr Asp Gly Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 80
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成抗体结构
 <400> 80
 Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr Trp
 20 25 30
 Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr His Glu Arg Phe Lys
 50 55 60
 Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80
 Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Gly Val Tyr Tyr Cys Leu
 85 90 95
 His Gly Asn Tyr Asp Phe Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser

[0029]

115

<210> 81
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成抗体结构

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> "X"可以是任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (34)..(34)
 <223> "X"可以是任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (43)..(43)
 <223> "X"可以是任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(50)
 <223> "X"可以是任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (52)..(52)
 <223> "X"可以是任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (54)..(54)
 <223> "X"可以是任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (57)..(57)
 <223> "X"可以是任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (59)..(59)
 <223> "X"可以是任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (99)..(99)
 <223> "X"可以是任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (100)..(100)
 <223> "X"可以是任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (103)..(108)
 <223> "X"可以是任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (116)..(116)
 <223> "X"可以是任何氨基酸

<400> 81

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

[0030]

Ser Val Lys Xaa Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Xaa His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Xaa Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Xaa Ile Xaa Pro Xaa Ser Gly Xaa Thr Xaa Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Val Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 82
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 小家鼠(Mus musculus)
 <400> 82
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 83
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人源化EM164抗体

[0031]

<400> 83

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 84

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化EM164抗体

<400> 84

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Arg

[0032]

<210> 85
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人源化EM164抗体

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

<210> 86
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人源化EM164抗体

 <400> 86
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

[0033]

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

Arg

<210> 87
<211> 123
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 87

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Arg Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Phe
85 90 95

Ala Arg Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 88
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化EM164抗体

<400> 88

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

[0034]

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Phe
85 90 95

Ala Arg Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 89
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化EM164抗体的可变区 - 轻链

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(339)

<400> 89
gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga 48
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

gat cca gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ata gta cat agt 96
Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

aat gta aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca ggc cag tct 144
Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

cca agg ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt gga gca ggg aca gat ttc aca ctc agg atc 240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga att tat tac tgc ttt caa ggt 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

tca cat gtt cct ccg acg ttc ggt gga ggc acc aaa ctg gaa atc aaa 336
Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

cgt 339
Arg

<210> 90
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的构建物

<400> 90

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

[0035]

	20	25	30	
Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	35	40	45	
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	50	55	60	
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile	65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly	85	90		95
Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	100	105		110
Arg				
<210> 91				
<211> 369				
<212> DNA				
<213> 人工序列				
<220>				
<223> 人源化EM164抗体的可变区 - 重链				
<220>				
<221> CDS				
<222> (1).. (369)				
<400> 91				
cag gtc caa ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg gtg aag cct ggg gct				48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala	5	10	15	
1				
tca gtg aag ctg tcc tgt aag gct tct ggc tac acc ttc acc agc tac				96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	20	25	30	
tgg atg cac tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ctt gag tgg att				144
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	35	40	45	
gga gag att aat cct agc aac ggt cgt act aac tac aat cag aag ttc				192
Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe	50	55	60	
cag ggg aag gcc aca ctg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac				240
Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	65	70	75	80
atg caa ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac ttt				288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Phe	85	90	95	
gca aga gga aga cca gat tac tac ggt agt agc aag tgg tac ttc gat				336
Ala Arg Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp Tyr Phe Asp	100	105	110	
gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc				369
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser	115	120		
<210> 92				
<211> 123				

[0036]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的构建物

<400> 92

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Phe
85 90 95

Ala Arg Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Lys Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 93
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化EM164 v1.1抗体的轻链可变区

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(339)

<400> 93

gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga 48
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

gat cca gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ata gta cat agt 96
Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

aat gta aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca ggc cag tct 144
Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt gga gca ggg aca gat ttc aca ctc agg atc 240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga att tat tac tgc ttt caa ggt 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

[0037]

	85		90		95	
tca cat gtt cct ccg acg ttc ggt gga ggc acc aaa ctg gaa atc aaa						336
Ser His Val Pro Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys						
	100		105		110	
cgt						339
Arg						
<210>	91					
<211>	113					
<212>	PRT					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	合成的构建物					
<400>	94					
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly						
1	5		10		15	
Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser						
	20		25		30	
Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser						
	35		40		45	
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro						
	50		55		60	
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile						
65	70		75		80	
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly						
	85		90		95	
Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys						
	100		105		110	

Arg

<210>	95
<211>	339
<212>	DNA
<213>	人工序列

<220>
<223> 人源化EM164 v1.2抗体的轻链可变区

<400>	95	
gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tccagcctcc	60	
atctcttgca gatctagtca gagcatagta catagtaatg taaacacctt tttagaatgg	120	
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaagg ctctgtatct acaaagtctt caaccgattt	180	
tctggggctc cagacagggt cagtggcagt ggagcaggga cagatttcac actcaggatc	240	
agcagagtgg aggctgagga tciggggaatt tattactgct ttcaaggttc acatgttctt	300	
cgcacgttgc gtggaggcac caaactggaa atcaaacgt	339	

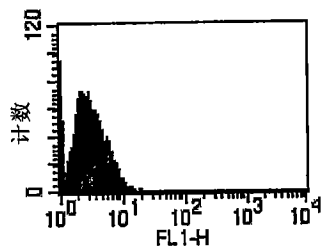
<210> 96

<211>	339	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人源化EM164 v1.3抗体的轻链可变区	
<400>	96	
gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tccagcctcc		60
atctcttgca gatctagtca gagcatagta catagtaatg taaacaccta tttagaatgg		120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtffc caaccgattt		180
tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggagcaggga cagatttcac actcaggatc		240
agcagagtgg aggctgagga tctgggaatt tattactgct ttcaaggttc acatgttcct		300
ccgacgttcg gtggaggcac caaactggaa atcaaacgt		339

Y1251FIGF-I 受体细胞

胰岛素受体细胞

仅仅羊抗鼠-IgG-FITC



仅仅羊抗鼠-IgG-FITC

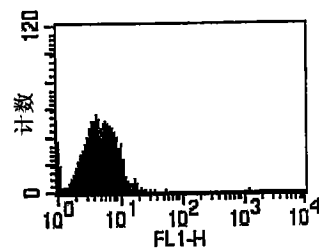
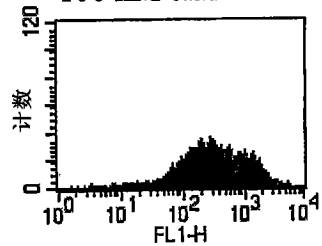
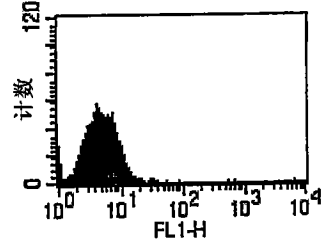
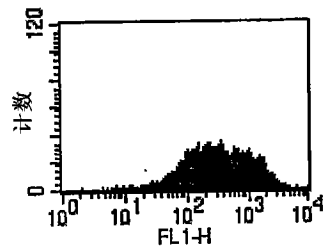
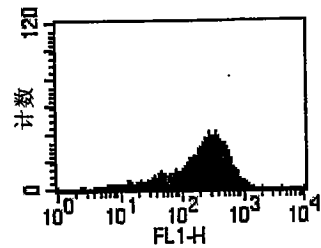
100 nM α EM164100 nM α EM164100 nM α 1H7100 nM α IR

图 1

EM164 抗体与生物素化人 IGF-I 受体的结合滴定曲线

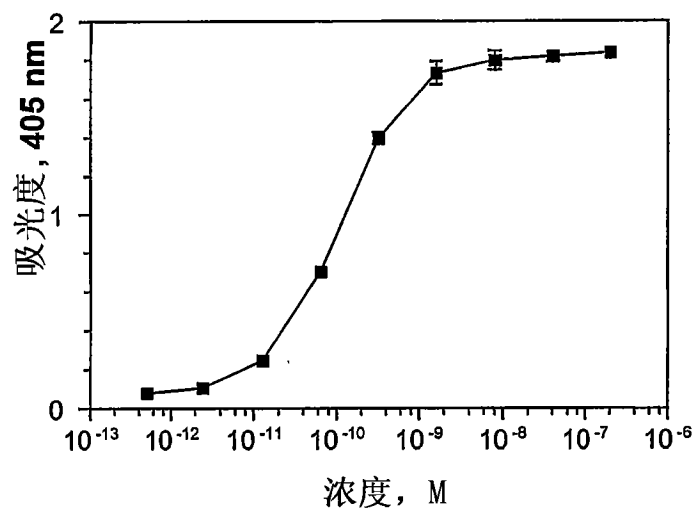


图 2

EM164 抗体对生物素化 IGF-I 与 MCF-7 细胞结合的抑制

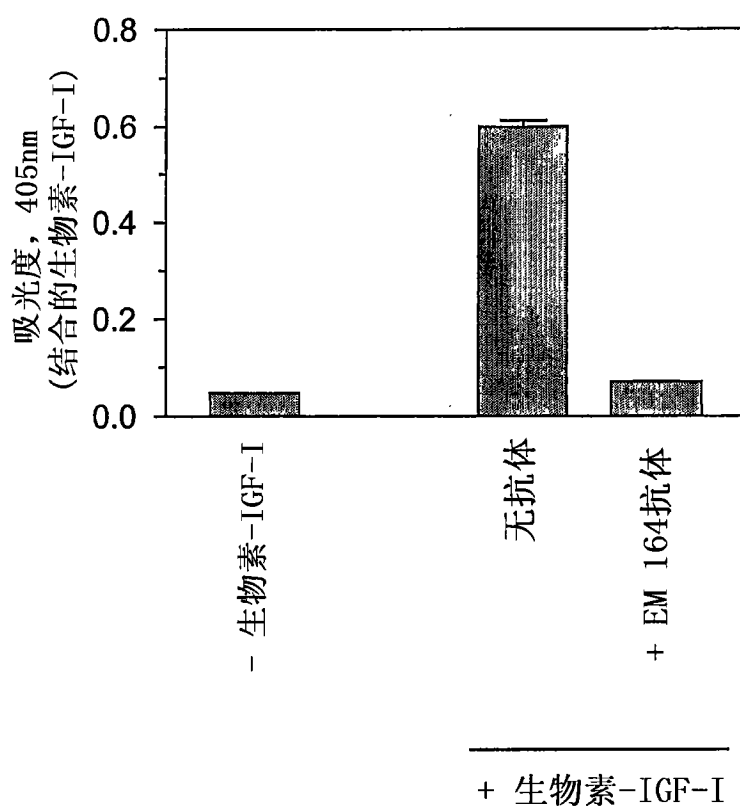


图 3

EM164 抗体对 MCF-7 细胞中 IGF-I 刺激的 IGF-I 受体自体磷酸化的抑制

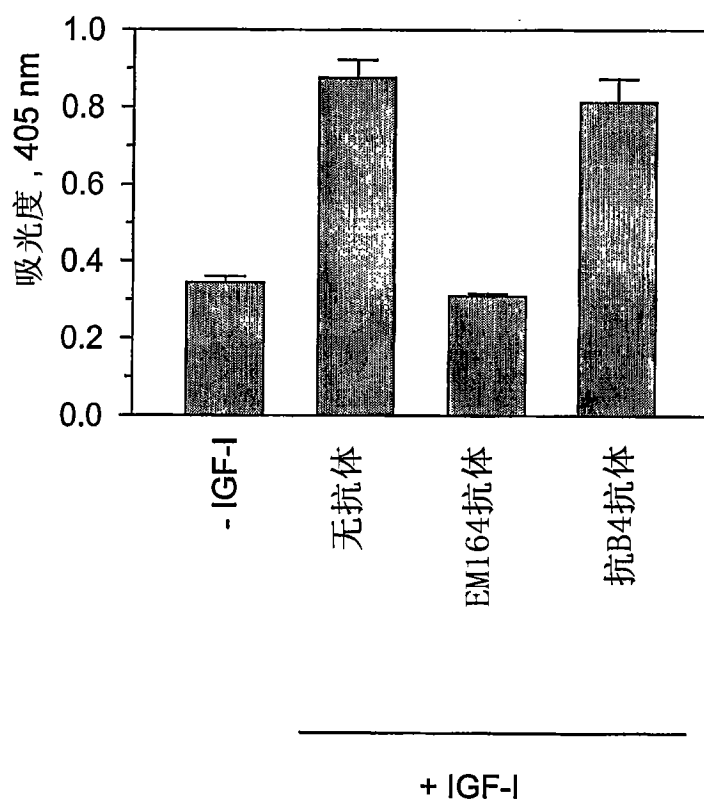


图 4

EM164 抗体对 MCF-7 细胞中 IGF-I 刺激的 IRS-I 磷酸化的抑制

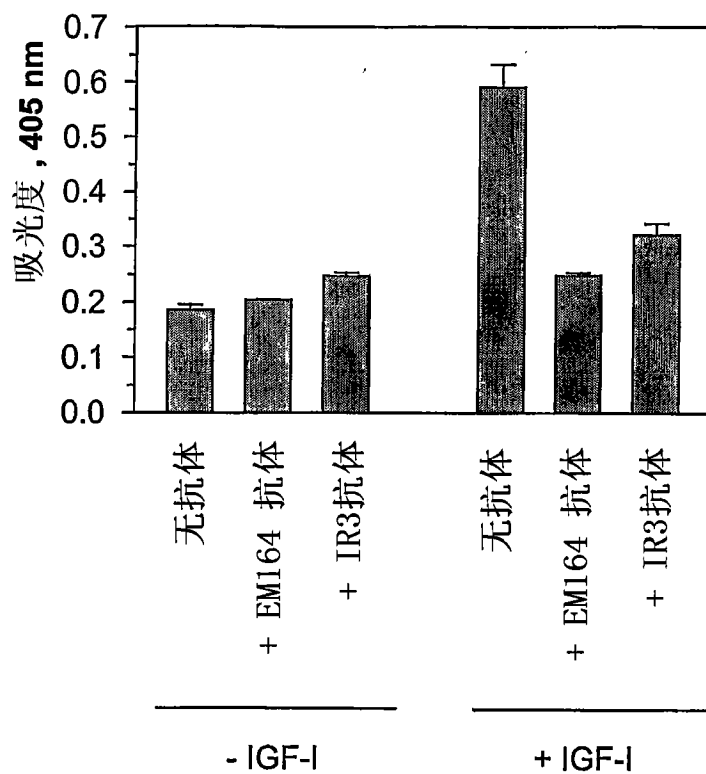


图 5

EM164 抗体对 SaOS-2 细胞中 IGF-I 刺激的信号转导的抑制

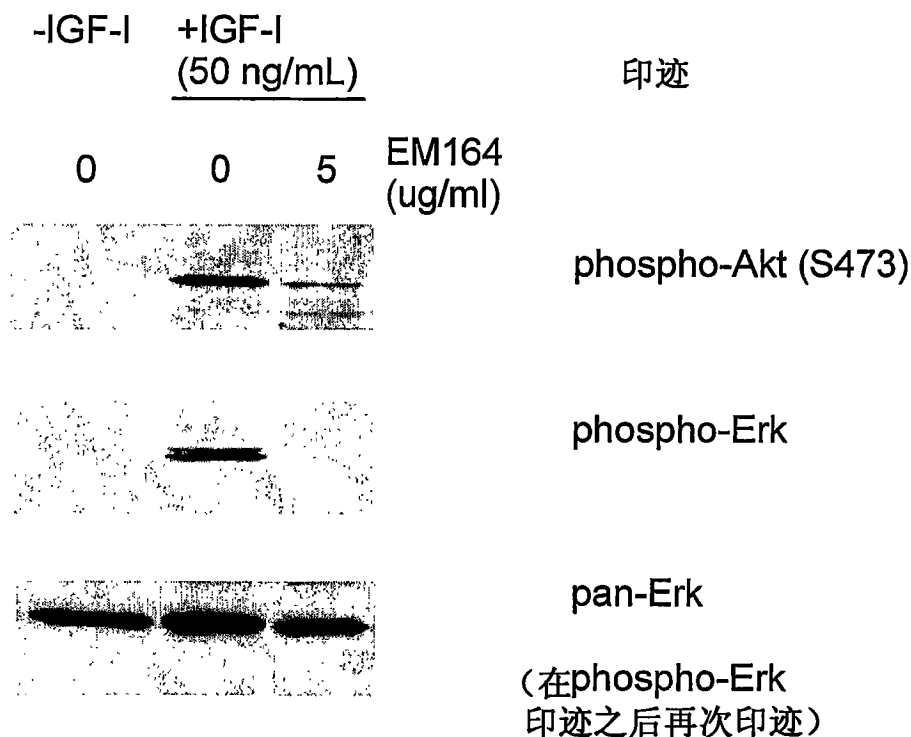


图 6

在无血清, +IGF-I, 或 +1.25% 血清的条件下, 抗体对 MCF-7 细胞的生长和存活的影响

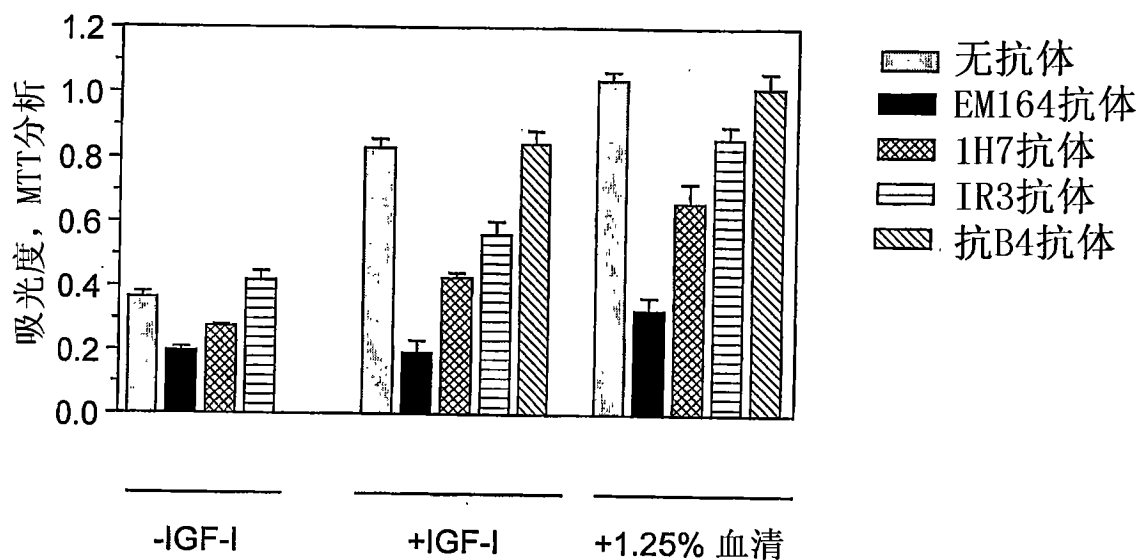
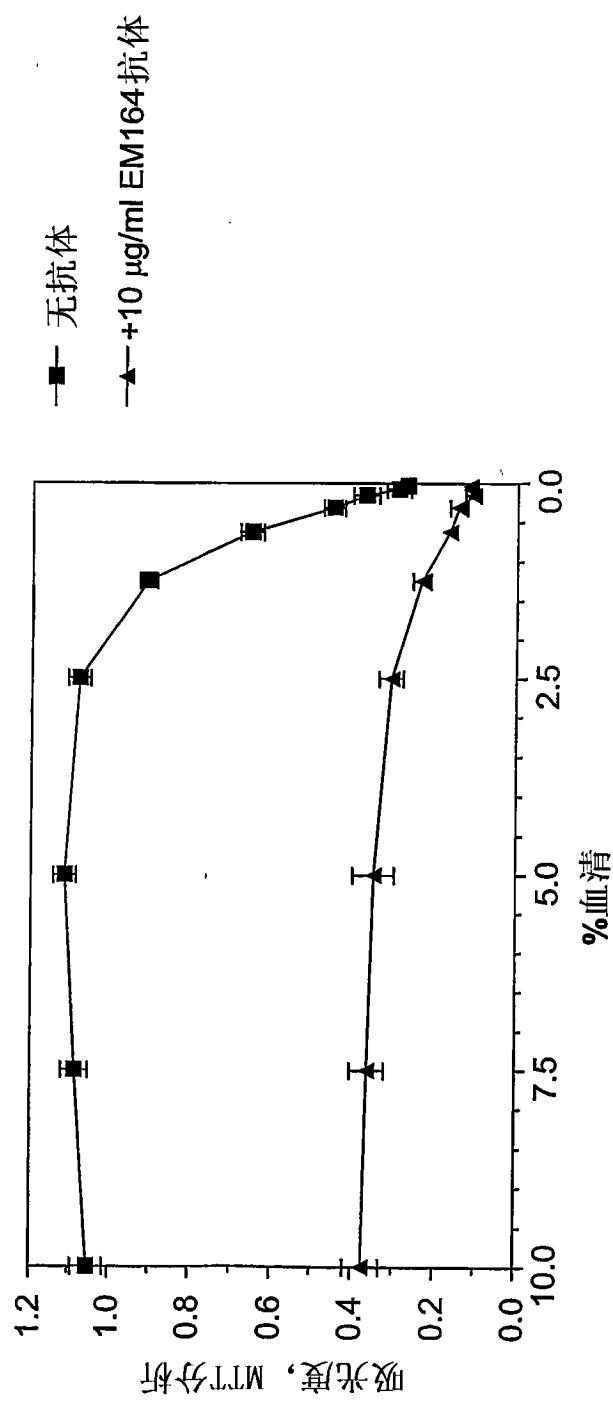


图 7

图8

在有0.04-10%血清存在的情况下EM164抗体
对MCF-7细胞的生长和存活的影响



对 IGF-I 和血清刺激的 NCI-H838 细胞生长和存活的抑制作用

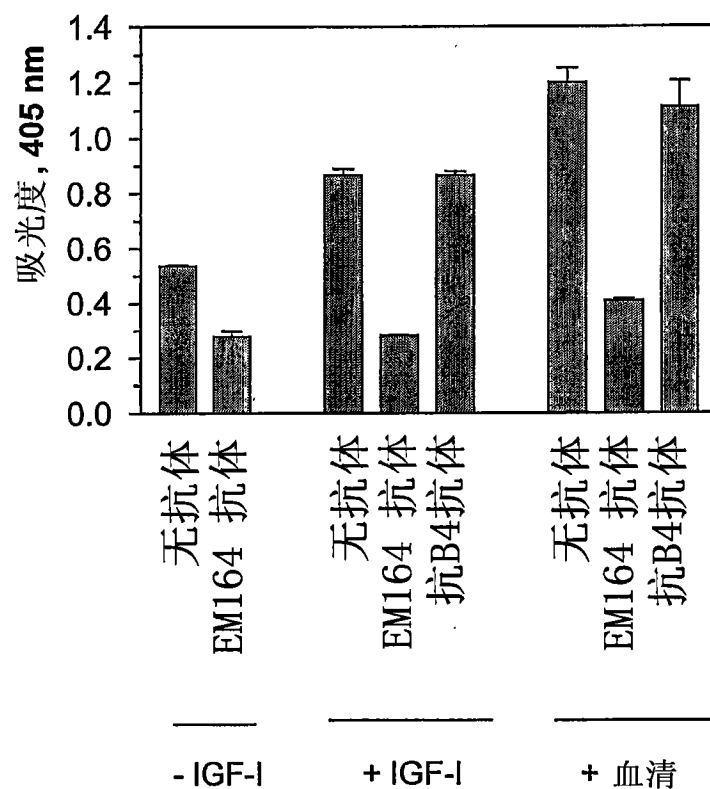


图 9

EM164 抗体, 或紫杉醇或 EM164 抗体和紫杉醇的联合处理对小鼠中 Calu-6 肺癌异种移植生长的影响

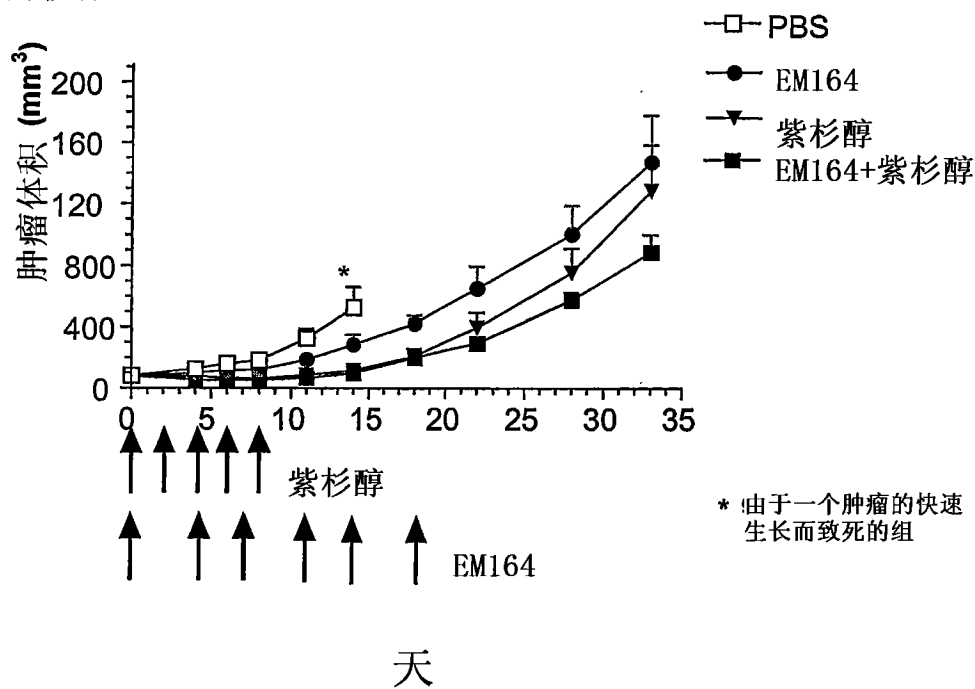


图 10

人源化 EM164 抗体 (1.0 型) 与固定的生物素化 IGF-I 受体的结合对鼠 EM164 抗体 (1.06-10.6 倍摩尔浓度范围) 的结合竞争

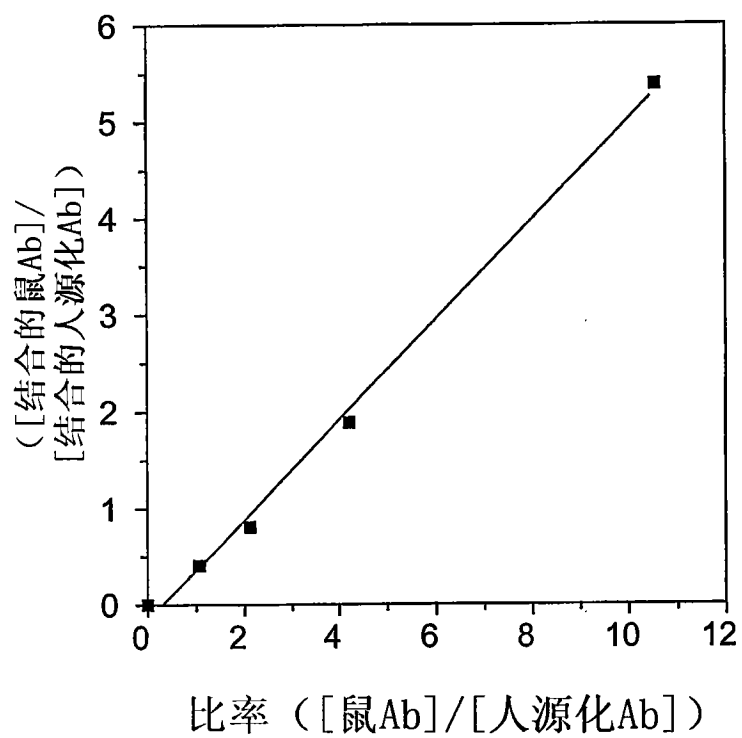


图 11



鼠EM164轻链

```

1 atgaagttgcctgttaggctgttggtgctgatgttctggattcct
1  M K L P V R L L V L M F W I P

46 gcttccagtagtgatgttttgatgacccaaactccactctccctg
16  A S S S D V L M T Q T P L S L
    Lvk

91 cctgtcagtccttgagatcaagcctccatctcttgacagatctagt
31  P V S L G D Q A S I S C R S S
                               CDR1

136 cagagcattgtacatagtaatgtaaacacctatttagaatggtag
46  Q S I V H S N V N T Y L E W Y
                               CDR1

181 ctgcagaaaccaggccagtcctcaaagctcctgatctacaaagtt
61  L Q K P G Q S P K L L I Y K V
                               CDR2

226 tccaaccgattttctgggggtcccagacagggttcagtggcagtgga
76  S N R F S G V P D R F S G S G
                               CDR2

271 tcaggacagatttcacactcaggatcagcagagtggaggctgag
91  S G T D F T L R I S R V E A E

316 gatctgggaatttattactgctttcaagggttcacatgttcctccg
106 D L G I Y Y C F Q G S H V P P
                               CDR3

361 acgttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgg
121 T F G G G T K L E I K R

```

图 12



鼠EM164重链

1 atgggatggagctatatcatcctctttttggtagcaacagctaca
1 M G W S Y I I L F L V A T A T

46 gaagtccactcccaggtccaactgcagcagtctggggctgaactg
16 E V H S Q V Q L Q Q S G A E L
└VH

91 gtgaagcctggggcttcagtgaagctgtcctgtaaggcttctggc
31 V K P G A S V K L S C K A S G

136 tacaccttcaccagctactggatgcactgggtgaagcagaggcct
46 Y T F T S Y W M H W V K Q R P
CDR1

181 ggacaaggccttgagtggattggagagattaatcctagcaacggt
61 G Q G L E W I G E I N P S N G
CDR2

226 cgtactaactacaatgagaagttcaagaggaaggccacactgact
76 R T N Y N E K F K R K A T L T
CDR2

271 gtagacaaatcctccagcacagcctacatgcaactcagcagcctg
91 V D K S S S T A Y M Q L S S L

316 acatctgaggactctgcggtctattactttgcaagaggaagacca
106 T S E D S A V Y Y F A R G R P
CDR3

361 gattactacggtagtagcaagtgggtacttcgatgtctggggcgca
121 D Y Y G S S K W Y F D V W G A
CDR3

406 gggaccacgggtcaccgtctcctca
136 G T T V T V S S

图 13

鼠EM164 CDRs

轻链

CDR1: R S S Q S I V H S N V N T Y L E

CDR2: K V S N R F S

CDR3: F Q G S H V P P T

重链

CDR1: S Y W M H

CDR2: E I N P S N G R T N Y N E K F K R

CDR3: G R P D Y Y G S S K W Y F D V

AbM重链

CDR1: G Y T F T S Y W M H

CDR2: E I N P S N G R T N

CDR3: G R P D Y Y G S S K W Y F D V

图 14

胚系序列比较

轻链		50
Cr1	- DVLMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPK	
muEM164	- -----V-----	
		100
Cr1	- LLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVP	
muEM164	- -----R-----I-----	
重链		50
J558.c	- QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGQLEWIGE	
muEM164	- -----S-----	
		98
J558.c	- INPSNGRTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCAR	
muEM164	- -----R-----L-----F--	

图 15

克隆和哺乳动物表达质粒图谱

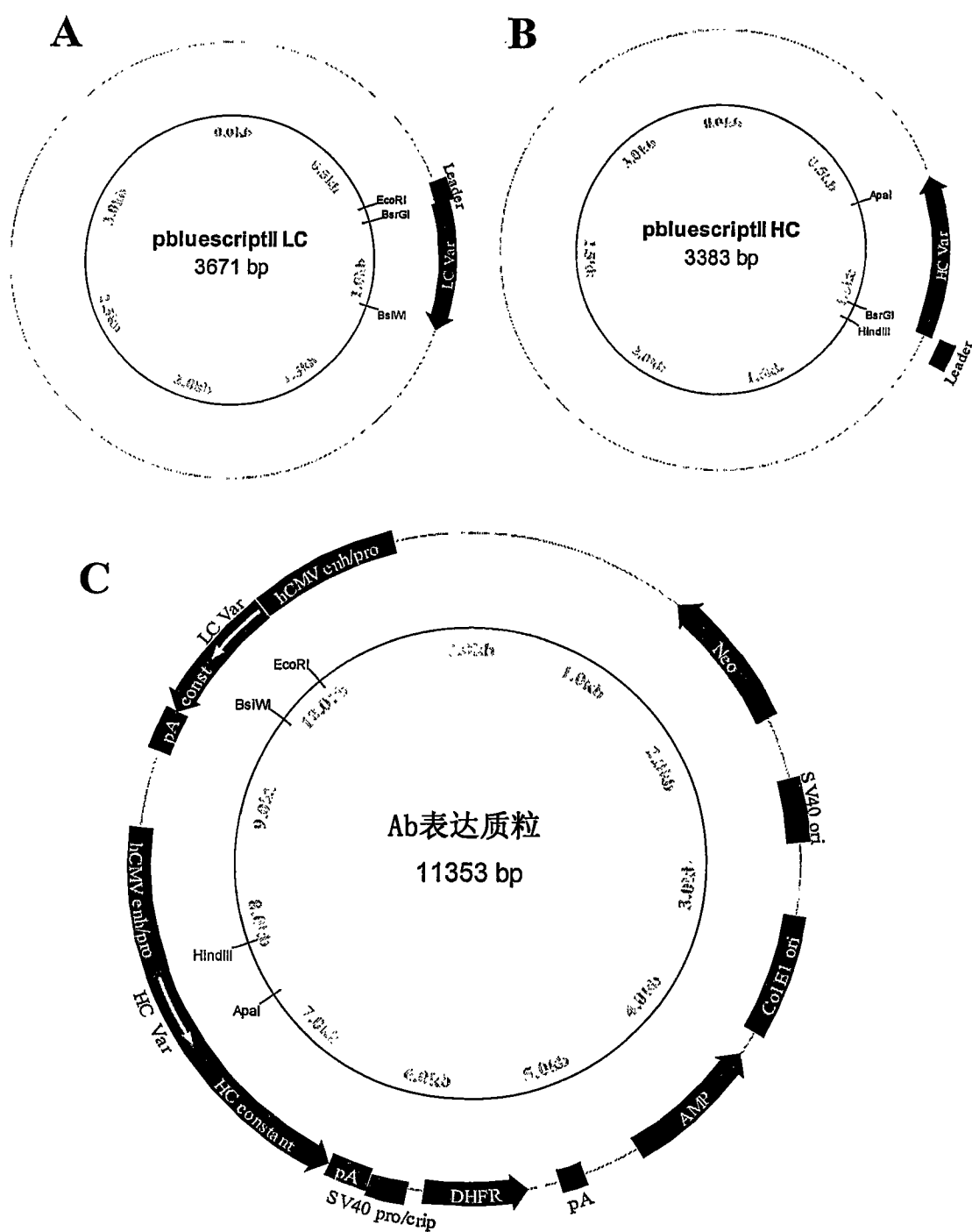


图 16

10 个最同源轻链序列的比对

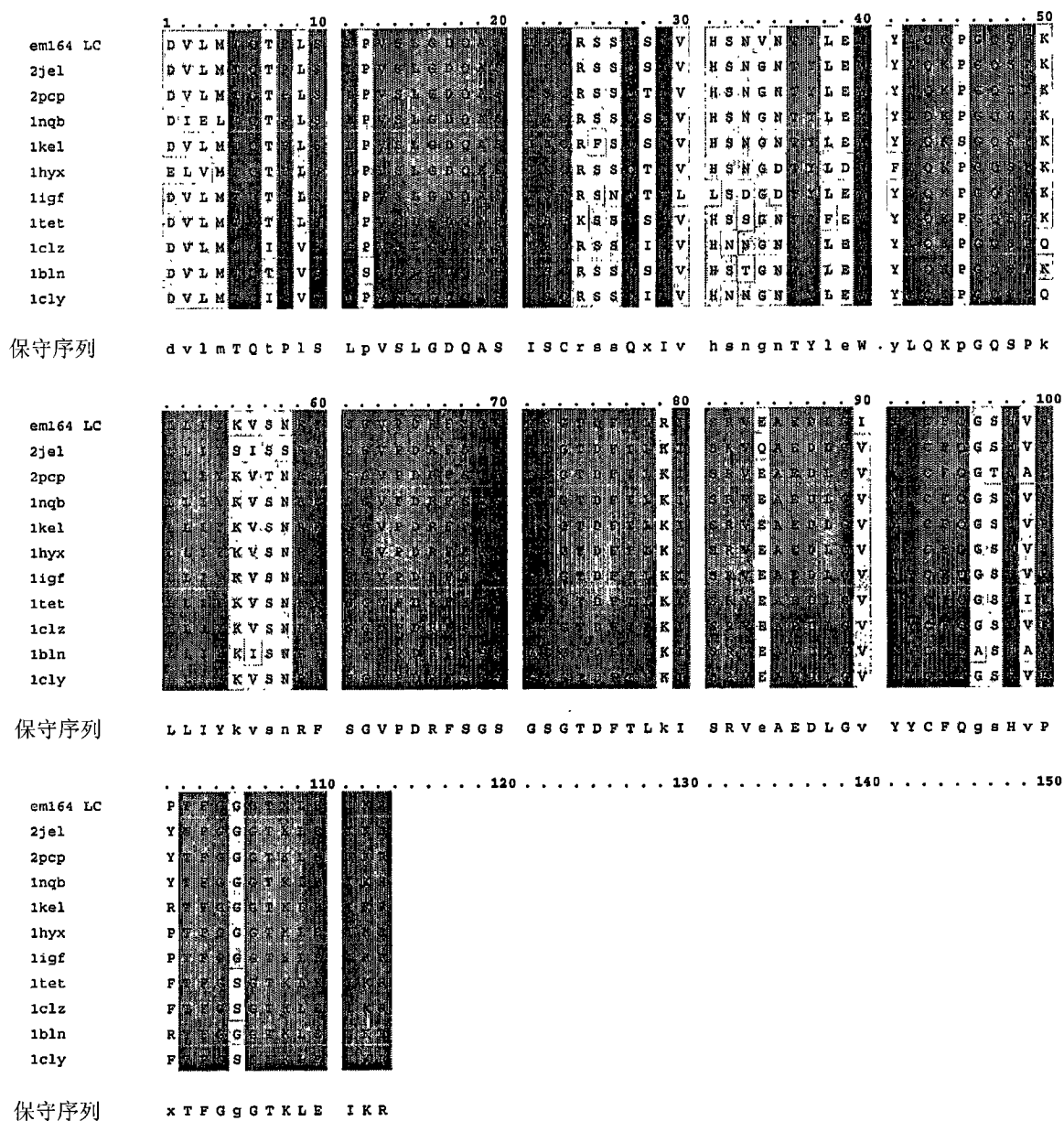


图 17

10 个最同源重链序列的比对

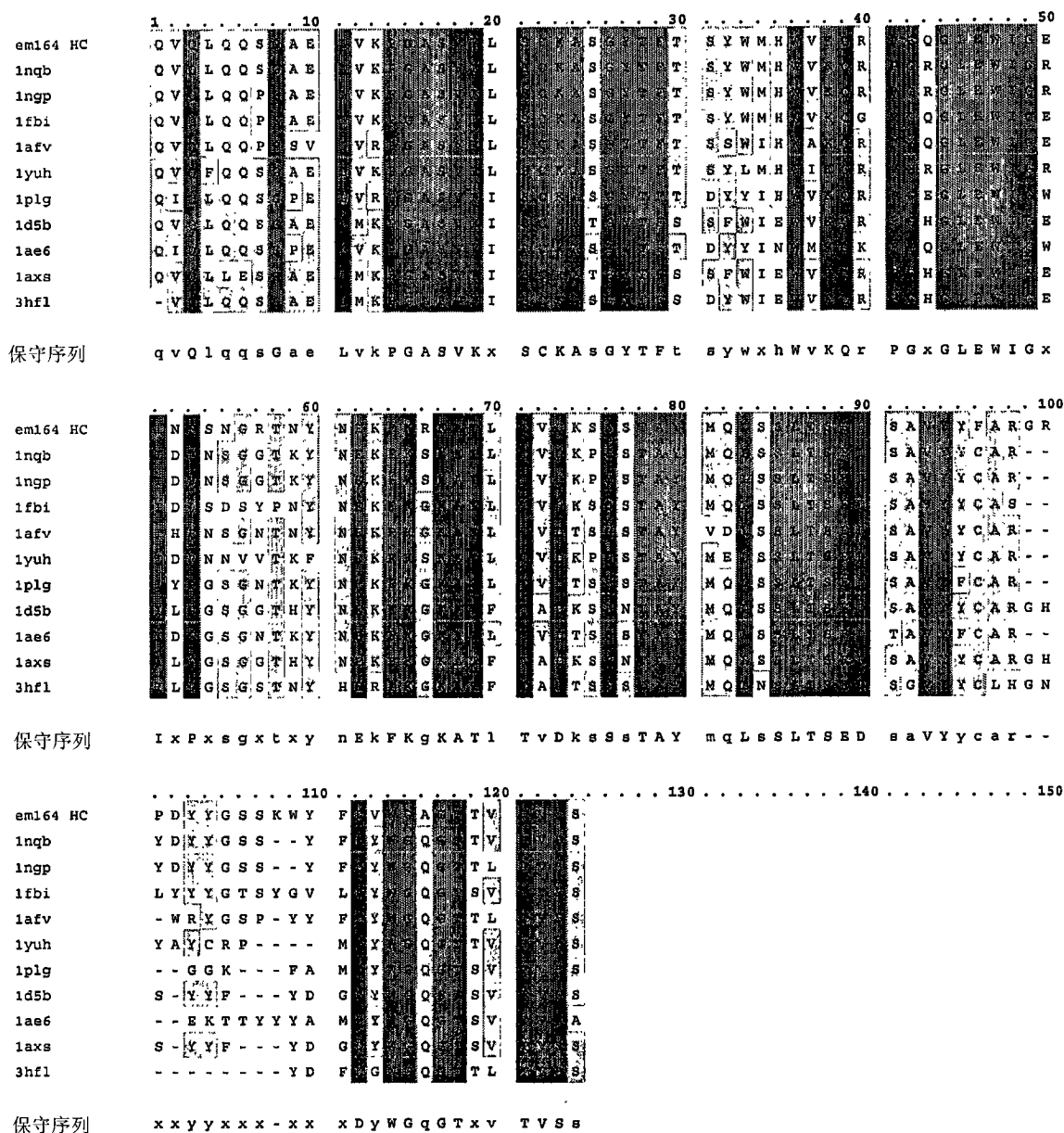


图 18

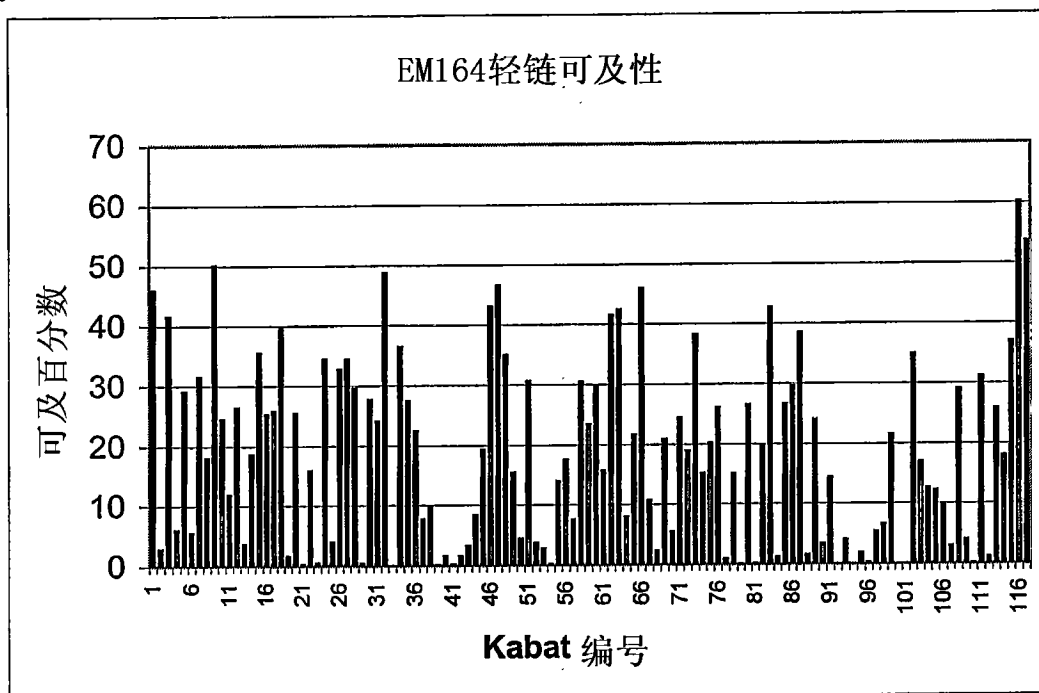
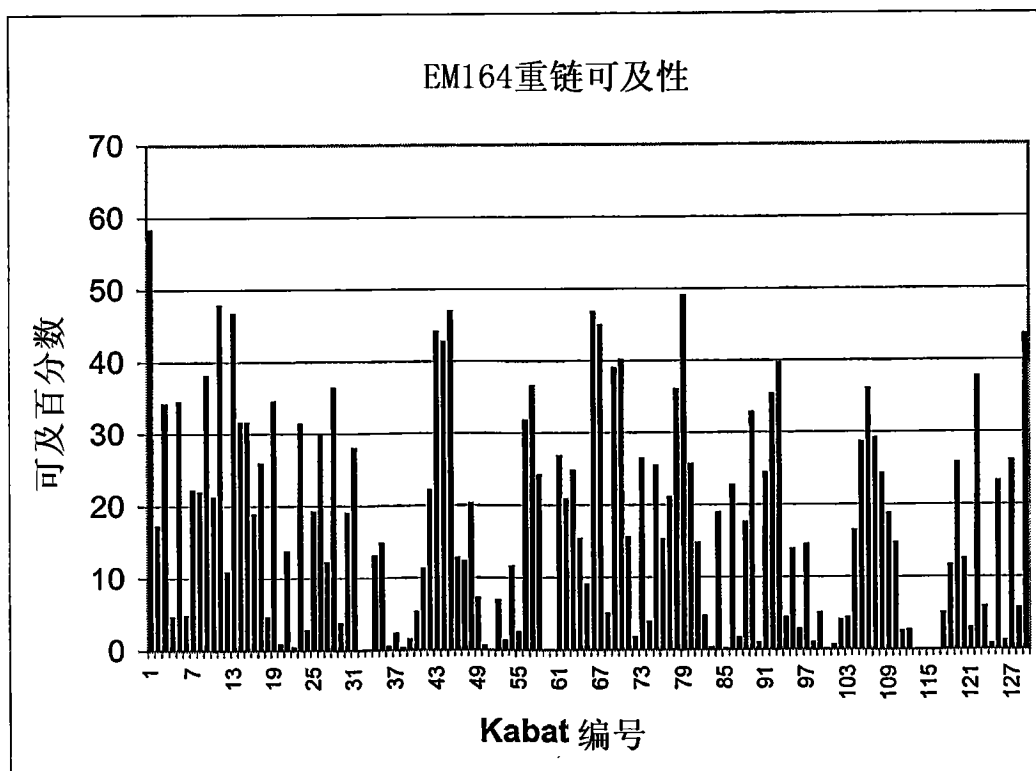
A.**B.**

图 19

鼠和人源化的 EM164 抗体的轻链可变区氨基酸序列

Kabat #	1	10	20	27c	35	45
muEM164	DVLMTQTPLS	LPVSLGDQAS	ISCRSSQSIV	HSNVNTYLEW	YLQKPGQSPK	
huEM164 v1.0	DVVMQTPLS	LPVSLGDPAS	ISCRSSQSIV	HSNVNTYLEW	YLQKPGQSPR	
huEM164 v1.1	DVLMTQTPLS	LPVSLGDPAS	ISCRSSQSIV	HSNVNTYLEW	YLQKPGQSPK	
huEM164 v1.2	DVLMTQTPLS	LPVSLGDPAS	ISCRSSQSIV	HSNVNTYLEW	YLQKPGQSPR	
huEM164 v1.3	DVVMQTPLS	LPVSLGDPAS	ISCRSSQSIV	HSNVNTYLEW	YLQKPGQSPK	
变化	*		*			*

Kabat #	46	55	65	75	85	95f
muEM164	LLIYKVSNR	SGVPDRFSGS	GSGTDFTLRI	SRVEAEDLGI	YYCFQGSHVP	
huEM164 v1.0	LLIYKVSNR	SGVPDRFSGS	GAGTDFTLRI	SRVEAEDLGI	YYCFQGSHVP	
huEM164 v1.1	LLIYKVSNR	SGVPDRFSGS	GAGTDFTLRI	SRVEAEDLGI	YYCFQGSHVP	
huEM164 v1.2	LLIYKVSNR	SGVPDRFSGS	GAGTDFTLRI	SRVEAEDLGI	YYCFQGSHVP	
huEM164 v1.3	LLIYKVSNR	SGVPDRFSGS	GAGTDFTLRI	SRVEAEDLGI	YYCFQGSHVP	
变化			*			

Kabat #	96	105	108
muEM164	PTFGGGTKLE	IKR	
huEM164 v1.0	PTFGGGTKLE	IKR	
huEM164 v1.1	PTFGGGTKLE	IKR	
huEM164 v1.2	PTFGGGTKLE	IKR	
huEM164 v1.3	PTFGGGTKLE	IKR	
变化			

图 20

鼠和人源化的 EM164 抗体的重链可变区氨基酸序列

Kabat #	1	10	20	30	40	50
muEM164	QVQLQQSGAE	LVKPGASVKL	SCKASGYTFT	SYWMHWVKQR	PGQGLEWIGE	
huEM164	QVQLVQSGAE	VVKPGASVKL	SCKASGYTFT	SYWMHWVKQR	PGQGLEWIGE	
变化	*	*				

Kabat #	51	59	69	79	86	96
muEM164	INPSNGRTNY	NEKFKRKATL	TVDKSSSTAY	MLSSSLTSED	SAVYYFARGR	
huEM164	INPSNGRTNY	NQKFQKATL	TVDKSSSTAY	MLSSSLTSED	SAVYYFARGR	
变化		*	**			

Kabat #	97	100f	109	113
muEM164	PDYYGSSKWY	FDVWGAGTTV	TVSS	
huEM164	PDYYGSSKWY	FDVWGQGTTV	TVSS	
变化		*		

图 21

huEM164v1.0 的可变区 DNA 和氨基酸序列

轻链

```

1 gatgttgtgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtctt
1 D V V M T Q T P L S L P V S L

46 ggagatccagcctccatctcttgcagatctagtccagagcatagta
16 G D P A S I S C R S S Q S I V

91 catagtaatgtaaaccacctaatttagaatggtaacctgcagaaacca
31 H S N V N T Y L E W Y L Q K P

136 ggccagtctccaaggctcctgatctacaaagtttccaaccgattt
46 G Q S P R L L I Y K V S N R F

181 tctgggggtcccagacaggttcagtggcagtgaggcagggacagat
61 S G V P D R F S G S G A G T D

226 ttcacactcaggatcagcagagtggaggctgaggatctgggaatt
76 F T L R I S R V E A E D L G I

271 tattactgctttcaaggttcacatgttcctccgacgttcggtgga
91 Y Y C F Q G S H V P P T F G G

316 ggcaccaaactggaaatcaaacgt
106 G T K L E I K R

```

重链

```

1 cagggtccaactgggtgcagtctggggctgaagtgggtgaagcctggg
1 Q V Q L V Q S G A E V V K P G

46 gcttcagtgaagctgtcctgtaaggcttctggctacaccttcacc
16 A S V K L S C K A S G Y T F T

91 agctactggatgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggcctt
31 S Y W M H W V K Q R P G Q G L

136 gagtggattggagagattaatcctagcaacgggtcgtactaactac
46 E W I G E I N P S N G R T N Y

181 aatcagaagttccaggggaaggccacactgactgtagacaaatcc
61 N Q K F Q G K A T L T V D K S

226 tccagcacagcctacatgcaactcagcagcctgacatctgaggac
76 S S T A Y M Q L S S L T S E D

271 tctgcggtctattactttgcaagaggaagaccagattactacggt
91 S A V Y Y F A R G R P D Y Y G

316 agtagcaagtggtaacttcgatgtctggggccaagggaccacggtc
106 S S K W Y F D V W G Q G T T V

361 accgtctcctca
121 T V S S

```

图 22

huEM164 v1.1, 1.2, 1.3的轻链可变区DNA和氨基酸序列

v1.1

```
1 gatgttttgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtctt
1 D V L M T Q T P L S L P V S L
46 ggagatccagcctccatctcttgagatctagtcagagcatagta
16 G D P A S I S C R S S Q S I V
91 catagtaatgtaaacacctatttagaatggtacctgcagaaacca
31 H S N V N T Y L E W Y L Q K P
136 ggccagtctccaaagctcctgatctacaaagtttccaaccgattt
46 G Q S P K L L I Y K V S N R F
181 tctggggtcccagacaggttcagtggcagtgaggcagggacagat
61 S G V P D R F S G S G A G T D
226 ttcacactcaggatcagcagagtggaggctgaggatctgggaatt
76 F T L R I S R V E A E D L G I
271 tattactgctttcaagggtcacatgttcctccgacgttcggtgga
91 Y Y C F Q G S H V P P T F G G
316 ggcaccaaactggaaatcaaacgt
106 G T K L E I K R
```

v1.2

```
1 gatgttttgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtctt
1 D V L M T Q T P L S L P V S L
46 ggagatccagcctccatctcttgagatctagtcagagcatagta
16 G D P A S I S C R S S Q S I V
91 catagtaatgtaaacacctatttagaatggtacctgcagaaacca
31 H S N V N T Y L E W Y L Q K P
136 ggccagtctccaaaggctcctgatctacaaagtttccaaccgattt
46 G Q S P R L L I Y K V S N R F
181 tctggggtcccagacaggttcagtggcagtgaggcagggacagat
61 S G V P D R F S G S G A G T D
226 ttcacactcaggatcagcagagtggaggctgaggatctgggaatt
76 F T L R I S R V E A E D L G I
271 tattactgctttcaagggtcacatgttcctccgacgttcggtgga
91 Y Y C F Q G S H V P P T F G G
316 ggcaccaaactggaaatcaaacgt
106 G T K L E I K R
```

图23

(图23, 续)

v1.3

```
1 gatgttgtgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtctt
1 D V V M T Q T P L S L P V S L

46 ggagatccagcctccatctcttgcagatctagtcagagcatagta
16 G D P A S I S C R S S Q S I V

91 catagtaatgtaaacacctatttagaatggtacctgcagaaacca
31 H S N V N T Y L E W Y L Q K P

136 ggccagtctccaaagctcctgatctacaaagtttccaaccgat
46 G Q S P K L L I Y K V S N R F

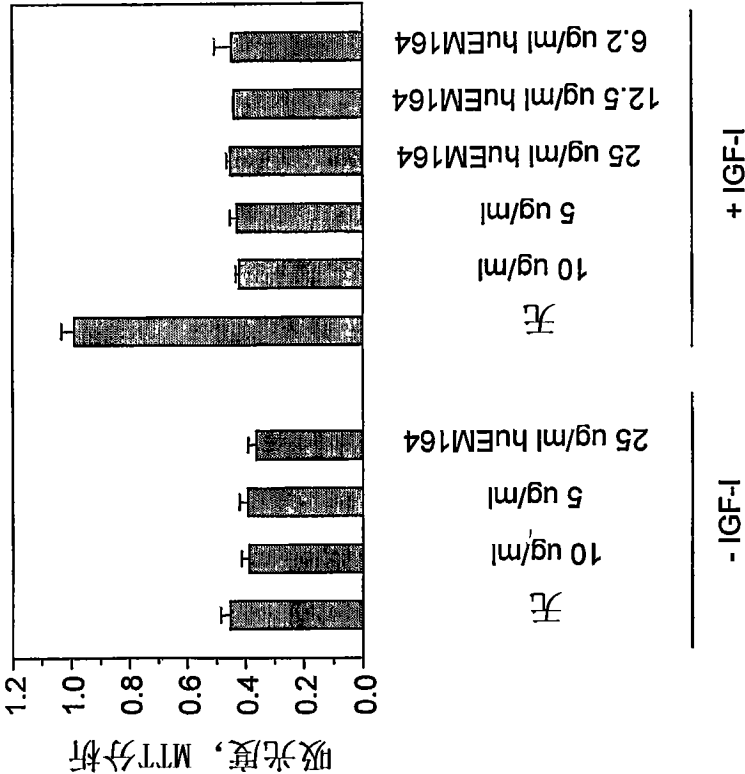
181 tctgggggtcccagacaggttcagtggcagtggagcagggacagat
61 S G V P D R F S G S G A G T D

226 ttcacactcaggatcagcagagtggaggctgaggatctgggaatt
76 F T L R I S R V E A E D L G I

271 tattactgctttcaagggttcacatgttccctccgacgttcggtgga
91 Y Y C F Q G S H V P P T F G G

316 ggcaccaaactggaaatcaaacgt
106 G T K L E I K R
```

图24
人源化EM164 v1.0抗体(6-25微克/毫升)和鼠EM164抗体(5-10微克/毫升)
对IGF-I刺激的MCF-7细胞生长和存活的抑制作用的比较



EM164 抗体对 MCF-7 细胞的细胞周期阻遏

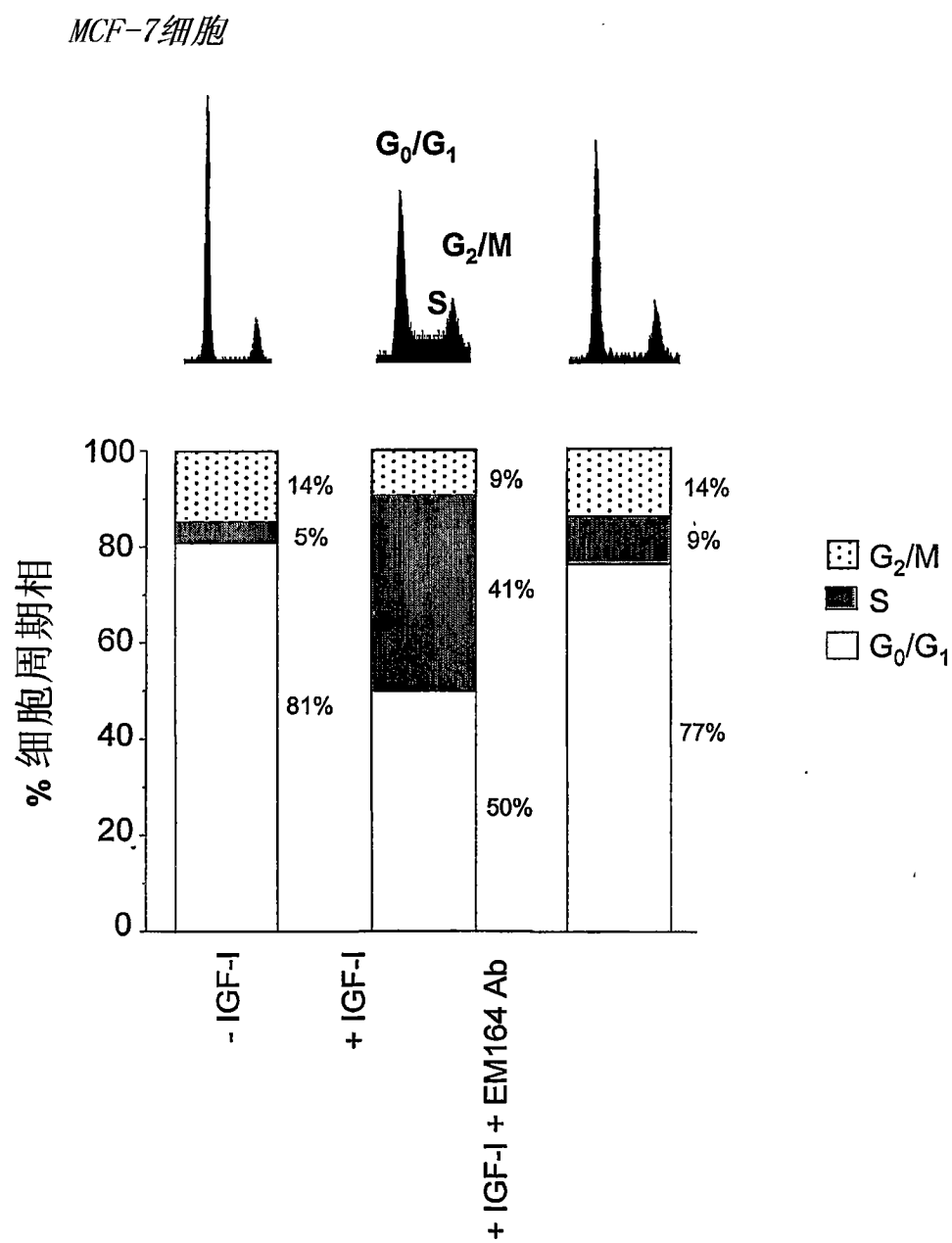


图 25

图26

EM164抗体对NCI-H838肺癌细胞的调亡的诱导
(通过caspase对细胞角蛋白CK18蛋白的切割来进行测定)

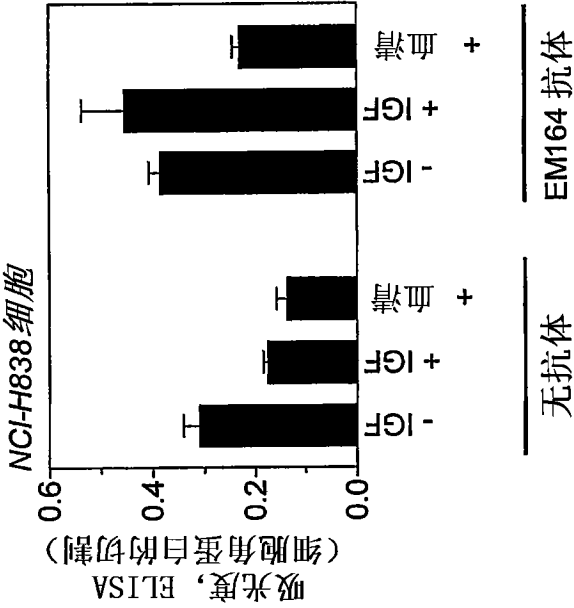
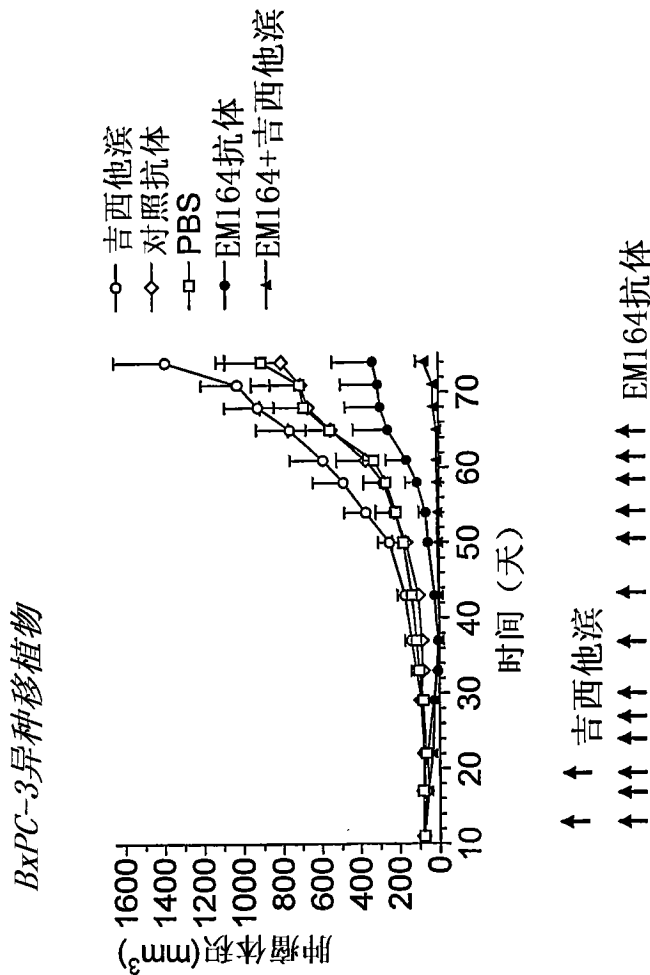


图27

EM164抗体作为单一试剂或者与吉西他滨联合进行处理
对小鼠中人BxPC-3胰腺癌异种移植物生长的抑制



专利名称(译)	抗IGF-I受体抗体		
公开(公告)号	CN1678633B	公开(公告)日	2012-08-29
申请号	CN03813742.9	申请日	2003-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	伊缪诺金公司		
申请(专利权)人(译)	伊缪诺金公司		
当前申请(专利权)人(译)	伊缪诺金公司		
[标]发明人	R辛格 DJ塔瓦雷斯 NE达地吉恩		
发明人	R·辛格 D·J·塔瓦雷斯 N·E·达地吉恩		
IPC分类号	C07K16/00 A61K39/395 C07H21/04 C12N15/00 C12P21/00 G01N33/534 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/18 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/06 C12N5/10 C12N5/16 C12N15/09 C12N15/13 C12N15/62 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	A61K47/48569 C07K2317/565 C07K2317/92 A61K39/39558 A61K31/337 A61K39/3955 C07K16/2863 A61K39/39541 A61K2039/505 A61K31/4745 C07K2317/55 C07K2316/96 C07K2317/24 C07K2317/56 A61K45/06 C07K2317/73 C07K2317/76		
代理人(译)	路小龙		
审查员(译)	吴永庆		
优先权	10/170390 2002-06-14 US		
其他公开文献	CN1678633A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

可特异结合并抑制胰岛素样生长因子-I受体的抗体、人源化抗体、表面重构抗体、抗体片段、衍生抗体和与细胞毒性试剂形成的偶联物，它们可拮抗IGF-I、IGF-II和血清对肿瘤细胞生长和存活的效应，并且它们实质上不存在激动剂活性。所述的抗体及其片段可以用于治疗IGF-I受体表达水平升高的肿瘤，如乳癌，结肠癌，肺癌，前列腺癌，卵巢癌，滑膜肉瘤和胰腺癌，所述的衍生抗体可用于IGF-I受体表达水平升高的肿瘤的诊断和成像。

本发明公开了一种抗IGF-I受体的抗体、人源化抗体、表面重构抗体、抗体片段、衍生抗体和与细胞毒性试剂形成的偶联物，它们可拮抗IGF-I、IGF-II和血清对肿瘤细胞生长和存活的效应，并且它们实质上不存在激动剂活性。所述的抗体及其片段可以用于治疗IGF-I受体表达水平升高的肿瘤，如乳癌，结肠癌，肺癌，前列腺癌，卵巢癌，滑膜肉瘤和胰腺癌，所述的衍生抗体可用于IGF-I受体表达水平升高的肿瘤的诊断和成像。