



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102753581 B

(45) 授权公告日 2015.07.22

(21) 申请号 201080054710.2

A61K 39/00(2006.01)

(22) 申请日 2010.12.06

A61K 39/395(2006.01)

(30) 优先权数据

61/266681 2009.12.04 US

(56) 对比文件

CN 101014625 A, 2007.08.08, 全文.

WO 2007012614 A2, 2007.02.01, 全文.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.06.01

Mei-Yun Zhang et al.. Characterization of a chimeric monoclonal antibody against the insulin-like growth factor-I receptor.. 《mAbs》. 2009, 第5卷(第8期), 摘要, 正文475页左栏第一行-476页右栏最后一行, “Discussion”部分, 图1.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2010/001963 2010.12.06

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2011/066721 EN 2011.06.09

审查员 刘新蕾

(73) 专利权人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

(72) 发明人 章美云

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 孔青 郭文洁

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C12N 5/18(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

序列表17页 附图3页

(54) 发明名称

抗-IGF-IR 抗体及其用途

(57) 摘要

本发明提供与人 IGF-IR 特异性结合的抗体或其结合片段。还提供编码本发明的抗体及结合片段的核酸分子以及含有这些核酸分子的载体和宿主细胞。本公开内容还提供利用本文所述抗体以及含有该抗体、编码该抗体的核酸分子及包含所述核酸分子的宿主细胞和载体的组合物抑制哺乳动物的癌细胞生长和转移的方法。本公开内容的特征还在于使用多肽检测哺乳动物中 IGF-IR 的存在情况, 以及可用作癌症疫苗免疫原的表位。

1. 一种与人胰岛素样生长因子 I 受体 (IGF-IR) 特异性结合的分离抗体, 其中其  $V_H$  区为 SEQ ID NO: 1, 并且其  $V_L$  区为 SEQ ID NO: 2。
2. 权利要求 1 的分离抗体, 其与在癌细胞中表达的人 IGF-IR 特异性结合。
3. 权利要求 1 的分离抗体, 其与人 IGF-IR 的胞外域特异性结合。
4. 权利要求 1 的分离抗体, 其为单克隆抗体。
5. 权利要求 1 的分离抗体, 其包含 Fab、Fab'、 $F(ab')_2$  或 scFv。
6. 权利要求 1 的分离抗体, 其为人源化抗体。
7. 药物组合物, 其包含权利要求 1 的分离抗体和药学上可接受的载体。
8. 核酸分子, 其编码权利要求 1 的分离抗体。
9. 权利要求 8 的核酸分子, 其包含核酸序列 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6。
10. 药物组合物, 其包含权利要求 8 的核酸分子和药学上可接受的载体。
11. 权利要求 1 的分离抗体在制备用于治疗受试者的肿瘤或癌症的药物中的用途。
12. 权利要求 11 的用途, 其中所述受试者是人。
13. 权利要求 11 的用途, 所述癌症包括前列腺癌、乳腺癌、肝癌和结肠癌。
14. 权利要求 9 的核酸分子在制备用于治疗肿瘤或癌症的药物中的用途。
15. 权利要求 14 的用途, 所述癌症包括前列腺癌、乳腺癌、肝癌和结肠癌。

## 抗-IGF-IR 抗体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求保护 2009 年 12 月 4 日提交的美国临时申请顺序号 61/266,681 的权益,该申请通过引用以其整体结合到本文中。

### 技术领域

[0003] 本公开内容总的来讲涉及有效的抗 IGF-IR 的中和单克隆抗体和使用所述抗体用于癌症治疗的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 已经表明胰岛素样生长因子 (IGF) 信号转导系统在瘤形成中起重要作用。胰岛素受体 (IR) 属于 IGF 信号转导网络。IGF 受体 1 型 (IGF-IR) 及其配体 (IGFI 和 IGFII) 在许多类型的实体恶性肿瘤和造血系统恶性肿瘤 (hematopoietic malignancy) 中过量表达,所述恶性肿瘤包括前列腺癌、乳腺癌、肝癌和结肠癌等。有大量的实验和临床证据表明,靶向 IGF-IR 是针对癌症的有前景的治疗策略。

[0006] 减量调节 IGF 信号转导系统的策略包括降低配体生物利用度和抑制受体功能。可使用受体特异性抗体或小分子酪氨酸激酶抑制剂实现对 IGF 受体功能的抑制。合乎要求的 IGF-IR 特异性中和抗体不仅可抑制 IGF-IR 功能,而且还可阻断 IGF-IR 介导的信号转导途径。需要开发可抑制细胞表面 IGF-IR 并阻断 IGF-IR 配体与 IGF-IR 结合的 IGF-IR 特异性抗体,从而抑制配体诱导的受体磷酸化和下游信号转导。特别需要与 IR 无交叉反应性的 IGF-IR 特异性抗体。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供与人胰岛素样生长因子 1 受体 (亦称为人 IGF 受体 1 型) 特异性结合的抗体及其结合片段。在一个实施方案中,本发明提供以下抗体:其与人 IGF-IR 胞外域结合,从而阻断 IGF-I 和 IGF-II 两者与 IGF-IR 结合并抑制导致癌细胞增殖和转移的 IGF-I 和 IGF-II 两者诱导的 IGF-IR 磷酸化和下游信号转导。根据本文提供的本发明描述,本发明的这些优势和其它优势以及本发明的其它特征将清楚了。

[0009] 在一个实施方案中,本发明提供包含选自以下氨基酸序列的分离抗体 (H10) 或其结合片段:H10 V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 1)、H10 V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 2)、H10 H3 (SEQ ID NO: 3)、H10 L3 (SEQ ID NO: 4) 或其组合,其中所述抗体与 IGF-IR 的表位特异性结合。

[0010] 本发明还包括包含本发明抗体的药物组合物、与抗体结合的表位及使用抗体治疗哺乳动物的癌症和检测哺乳动物的 IGF-IR 的方法。

[0011] 另外,本发明提供编码本发明的抗体或其结合片段的分离核酸分子,其包含选自以下的核酸序列:H10 V<sub>H</sub> DNA (SEQ ID NO: 5)、H10 V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 6)、H10 H3 (SEQ ID NO: 7)、H10 L3 (SEQ ID NO: 8) 或其组合,其中所述核酸分子任选呈载体的形式,其中所述核酸分子或载体任选包含在宿主细胞内,其中所述抗体或其结合片段与 IGF-IR 的表位特异性结合。本公开内容还提供含有核酸分子或多肽的药物组合物,以及使用核酸分子或多肽抑制哺乳动物的癌细胞生长和癌症转移的方法。

[0012] 为了实现前述目标和相关目标,本发明包括下文充分描述和权利要求书中特别指出的特征。下面的描述和附图详细给出了本发明的某些说明性方面和实施方案。然而,这些仅说明了其中可应用本发明原理的各种方式的少数方式。当结合附图考虑时,根据本发明的下列详述,本发明的其它目的、优势和新的特征将变得清楚了。

[0013] 附图简述

[0014] 图 1 图示了 H10 抗体各个区的氨基酸序列和编码这些氨基酸序列的核酸序列。按惯例从 N 端到 C 端(从图的左上方到右下方)给出氨基酸序列。HCDR1-3 和 LCDR1-3 的序列加下划线。

[0015] 图 2 是说明使小鼠单克隆抗体 Fab m590 人源化的示例性方法的图。H:人;m:小鼠。

[0016] 图 3 图示了流式细胞术中乳腺癌 MCF-7 细胞中 H10 与细胞缔合的 IGF-IR 的结合。

[0017] 序列简述

[0018] SEQ ID NO: 1 是本发明 H10 抗体 V<sub>H</sub>区的氨基酸序列。

[0019] SEQ ID NO: 2 是本发明 H10 抗体 V<sub>L</sub>区的氨基酸序列。

[0020] SEQ ID NO: 3 是本发明 H10 抗体 H3 区(V<sub>H</sub>区的 CDR3)的氨基酸序列。

[0021] SEQ ID NO: 4 是本发明 H10 抗体 L3 区(V<sub>L</sub>区的 CDR3)的氨基酸序列。

[0022] SEQ ID NO: 5 是本发明 H10 抗体 V<sub>H</sub>区的核酸序列。

[0023] SEQ ID NO: 6 是本发明 H10 抗体 V<sub>L</sub>区的核酸序列。

[0024] SEQ ID NO: 7 是本发明 H10 抗体 H3 区(V<sub>H</sub>区的 CDR3)的核酸序列。

[0025] SEQ ID NO: 8 是本发明 H10 抗体 L3 区(V<sub>L</sub>区的 CDR3)的核酸序列。

[0026] SEQ ID NO: 9 是本发明 H10 抗体 V<sub>H</sub>区的 CDR1 的氨基酸序列。

[0027] SEQ ID NO: 10 是本发明 H10 抗体 V<sub>H</sub>区的 CDR2 的氨基酸序列。

[0028] SEQ ID NO: 11 是本发明 H10 抗体 V<sub>L</sub>区的 CDR1 的氨基酸序列。

[0029] SEQ ID NO: 12 是本发明 H10 抗体 V<sub>H</sub>区的 CDR1 的核酸序列。

[0030] SEQ ID NO: 13 是本发明 H10 抗体 V<sub>H</sub>区的 CDR2 的核酸序列。

[0031] SEQ ID NO: 14 是本发明 H10 抗体 V<sub>L</sub>区的 CDR1 的核酸序列。

[0032] SEQ ID NO: 15 是按照本发明使用的人胰岛素样生长因子 1 受体(hIGF-IR)的氨基酸序列。

[0033] 发明详述

[0034] 本发明提供抗体或其结合片段,其与 1 型胰岛素样生长因子受体(IGF-IR)的表位特异性结合。本公开内容更特别地提供与 IGF-IR 的胞外域结合的抗体或其结合片段。另外,本公开内容提供被本文所述多肽(例如抗体或其结合片段)识别的表位,该表位可用于开发用于治疗癌症的癌症疫苗免疫原的实施方案中。

[0035] 抗-IGF-IR 抗体可用于癌症治疗,以及检测动物(包括而限于人)的 IGF-IR。还可使用本发明的抗-IGF-IR 抗体检测试验样品中的 IGF-IR。试验样品可以是组织样品、活组织检查样品等。

[0036] 在一个实施方案中,抗-IGF-IR 抗体与人胰岛素样生长因子 I 受体(亦称为人胰岛素样生长因子受体 1 型(IGF-IR))特异性结合。在特定的实施方案中,人 IGF-IR 具有 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列(GenBank 登录号 P08069 ;GI: 124240)。在一个实施方案中,

本发明的抗-IGF-IR抗体与在癌细胞（例如 SKOV-3 和 MCF-7 细胞）中表达的人 IGF-IR 特异性结合。在一个实施方案中，本发明的抗-IGF-IR抗体与在 IGF-IR 稳定转染的 HeLa 细胞中表达的人 IGF-IR 特异性结合。

[0037] 本文所用术语“结合特异性”、“特异性”、“特异性反应”或“特异性相互反应”是指抗体或其它试剂与抗原上存在的表位（例如 IGF-IR 的表位）可检测地结合，同时与其它蛋白质或结构具有相对小的可检测反应性的能力。可采用例如 Biacore 仪器，通过结合测定法或竞争性测定法相对地测定特异性。特异性可表示为与特异性抗原结合相对于与其它无关分子非特异性结合的亲和力/亲合力的比率，例如约 10:1、约 20:1、约 50:1、约 100:1、约 10,000:1 或更大。

[0038] 在一个实施方案中，本公开内容提供包含选自以下氨基酸序列的分离多肽（例如抗体或其结合片段）：H10 V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 1)、H10 V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 2)、H10 H3 (V<sub>H</sub>区的 CDR3) (SEQ ID NO: 3)、H10 L3 (V<sub>L</sub>区的 CDR3) (SEQ ID NO: 4) 或其组合，其中多肽与 IGF-IR 胞外域的表位结合。所述多肽可包含选自以下的序列：(a) SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列；(b) SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列；(c) SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列；或 (d) SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列。

[0039] 在一个实施方案中，抗-IGF-IR抗体 V<sub>H</sub>区的 CDR1 包含 SEQ ID NO: 9。在一个实施方案中，抗-IGF-IR抗体 V<sub>H</sub>区的 CDR2 包含 SEQ ID NO: 10。在一个实施方案中，抗-IGF-IR抗体 V<sub>H</sub>区的 CDR3 包含 SEQ ID NO: 3。在特定的实施方案中，抗-IGF-IR抗体的 V<sub>H</sub>区包含 SEQ ID NO: 1。在一个实施方案中，抗-IGF-IR抗体 V<sub>L</sub>区的 CDR1 包含 SEQ ID NO: 11。在一个实施方案中，抗-IGF-IR抗体 V<sub>L</sub>区的 CDR2 包含 GTS。在一个实施方案中，抗-IGF-IR抗体 V<sub>L</sub>区的 CDR3 包含 SEQ ID NO: 4。在特定的实施方案中，抗-IGF-IR抗体的 V<sub>L</sub>区包含 SEQ ID NO: 2。

[0040] 本公开内容还提供编码多肽或其结合片段的分离核酸分子，其包含 H10 V<sub>H</sub> DNA (SEQ ID NO: 5)、H10 V<sub>L</sub> DNA (SEQ ID NO: 6)、H10 H3 DNA (SEQ ID NO: 7)、H10 L3 DNA (SEQ ID NO: 8) 或其组合，其中所述核酸分子任选呈载体的形式，其中所述核酸分子或载体任选包含在宿主细胞内。在某些实施方案中，所述核酸分子可编码包含以下氨基酸序列的多肽：(a) SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列；(b) SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列；(c) SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列；或 (d) SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列。

[0041] 在一个实施方案中，抗-IGF-IR抗体 V<sub>H</sub>区的 CDR1 由包含 SEQ ID NO: 13 的序列编码。在一个实施方案中，抗-IGF-IR抗体 V<sub>H</sub>区的 CDR2 由包含 SEQ ID NO: 13 的序列编码。在一个实施方案中，抗-IGF-IR抗体 V<sub>H</sub>区 CDR3 的由包含 SEQ ID NO: 7 的序列编码。在特定的实施方案中，抗-IGF-IR抗体的 V<sub>H</sub>区由包含 SEQ ID NO: 5 的序列编码。在一个实施方案中，抗-IGF-IR抗体 V<sub>L</sub>区的 CDR1 由包含 SEQ ID NO: 14 的序列编码。在一个实施方案中，抗-IGF-IR抗体 V<sub>L</sub>区的 CDR2 由包含 5' ggcacgtcc3' 的序列编码。在一个实施方案中，抗-IGF-IR抗体 V<sub>L</sub>区的 CDR3 由包含 SEQ ID NO: 8 的序列编码。在特定的实施方案中，抗-IGF-IR抗体的 V<sub>L</sub>区由包含 SEQ ID NO: 6 的序列编码。多肽可以是任何合适的多肽。例如，在一个实施方案中，所述多肽是抗体。抗体包括多克隆抗体和单克隆抗体两者。除完整的免疫球蛋白分子以外，还包括这些免疫球蛋白分子的片段或聚合物，以及人或人源化

形式的免疫球蛋白分子或其片段,只要分子保持与 IGF-IR 的表位结合的能力即可。可采用本文所述体外测定法或通过类似方法,针对其所需要的活性对抗体进行测定,此后可按照已知的临床测试方法,证实并定量其体内治疗活性和 / 或诊断活性。

[0042] 在另一个实施方案中,所述多肽是单克隆抗体或其结合片段。单克隆抗体是指这样的抗体:其中群内的各个抗体是相同的。

[0043] 术语“多肽”包括天然或人工蛋白质、蛋白质片段和蛋白质序列的多肽类似物。多肽可以是单体的或聚合的。根据其衍生起源或来源,术语“分离多肽”是以下多肽:其(1)不与在其天然状态下与之相伴的天然缔合的组分缔合,(2)基本上不含同一物种的其它蛋白质,(3)由不同于其中天然产生蛋白质的物种的细胞表达,或(4)天然不存在。化学合成的多肽或在不同于其天然来源的细胞的细胞系统中合成的多肽亦视为从其天然缔合的组分中“分离”。还可采用众所周知的纯化技术,通过分离提供基本上不含天然缔合的组分的多肽。

[0044] 单克隆抗体可采用本领域已知的任何方法制备。例如,本发明的单克隆抗体可采用杂交瘤方法制备,例如 Kohler 等人所述方法(Nature, 256, 495-497 (1975)),该文献通过引用结合到本文中。单克隆抗体还可通过重组 DNA 方法制备,例如美国专利 4,816,567 中描述的方法,该专利通过引用结合到本文中。采用常规方法(例如通过使用与编码鼠抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针),可容易地分离编码所公开的单克隆抗体的 DNA 并进行测序。抗体或活性抗体片段文库还可采用噬菌体展示技术产生和筛选,例如美国专利 5,804,440 和美国专利 6,096,441 中所述,两份专利均通过引用结合到本文中。

[0045] 体外方法也适于制备单价抗体。消化抗体以产生其片段、特别是 Fab 片段可采用本领域常规技术完成。例如,可使用木瓜蛋白酶进行消化。国际专利申请 WO 94/29348 和美国专利 4,342,566 中描述了木瓜蛋白酶消化的实例,两份专利均通过引用结合到本文中。抗体的木瓜蛋白酶消化通常产生 2 个相同的抗原结合片段 - Fab 片段和残余 Fc 片段。每个 Fab 片段具有单个抗原结合部位。胃蛋白酶处理产生具有 2 个抗原结合部位并且仍能够与抗原交联的片段。

[0046] 本公开内容包括具有双重或多重抗原或表位特异性的嵌合抗体和杂合抗体、单链抗体和片段,例如 Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fab、scFv 等,包括杂合片段。这类抗体和片段可采用本领域已知技术制备,并且可按照用于制备抗体和针对特异性和活性来筛选抗体的通用方法(参见例如 Harlow 和 Lane, Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, New York, (1988),该文献通过引用结合到本文中),针对特异性和活性进行筛选。

[0047] 本公开内容还包括人抗体和 / 或人源化抗体。许多非人抗体(例如来源于小鼠、大鼠或兔的抗体)在人中是天然抗原性的,因此,当给予人时可产生不良免疫应答。因此,在本文所述方法中使用人抗体或人源化抗体,以减少给予人抗体时引起不良免疫应答的可能性。

[0048] 本文所述人抗体和人源化抗体可通过任何已知技术制备。用于人单克隆抗体制备的技术的实例包括 Boerner 等, J. Immunol., 147(1), 86-95 (1991) 描述的技术,该文献通过引用结合到本文。本文所述人抗体(及其片段)还可采用噬菌体展示文库制备(参见例如 Marks 等, J. Mol. Biol., 222, 581-597 (1991)),该文献通过引用结合到本文中。也

可从转基因动物中获得本文所述的人抗体。例如,已描述了在响应免疫时能够产生完整人抗体库 (repertoire) 的转基因突变型小鼠 (参见例如 Jakobovits 等, PNAS, 90, 2551-255 (1993); 以及 Jakobovits 等, Nature, 362, 255-258 (1993)), 所述所有文献均通过引用结合到本文中。

[0049] 用于使非人抗体人源化的方法是本领域已知的。例如,可通过将啮齿动物互补决定区 (CDR) 或 CDR 序列替换为相应的人抗体序列来产生人源化抗体。详述方法公开于 Jones 等, Nature, 321, 522-525 (1986); Riechmann 等, Nature, 332, 323-327 (1988); Verhoeyen 等, Science, 239, 1534-1536 (1988), 所述所有文献均通过引用结合到本文中。

[0050] 美国专利 4, 816, 567、美国专利 5, 565, 332、美国专利 5, 721, 367、美国专利 5, 837, 243、美国专利 5, 939, 598、美国专利 6, 130, 364 和美国专利 6, 180, 377 中还描述了可用于产生人源化抗体的方法; 所述所有文献均通过引用结合到本文中。

[0051] 本发明的多肽还包括二价抗体以及融合分子和与可增强多肽抑制作用的其它分子的缀合物。融合分子 (例如蛋白质) 和缀合物的产生 (例如通过物理或化学缀合) 为本领域普通技术人员所掌握, 并且可涉及限制性内切酶或重组克隆技术的使用 (参见例如美国专利 5, 314, 995, 其通过引用结合到本文中)。

[0052] 融合分子 (例如蛋白质和核酸分子) 或缀合物可包含与任何合适的第二分子组合的 SEQ ID NO: 1-8 中的一个或多个。例如, 融合分子或缀合物可包含与中和 scFv 抗体片段或 Fab 片段 (例如与 IGF-IR 的表位结合的片段) 组合的 SEQ ID NO: 1-8 中的一个或多个。

[0053] 毒素是一般由植物、动物或微生物产生的有毒物质, 其足量时是致命的。用于本文所述的融合分子或缀合物的优选毒素包括假单胞菌属 (Pseudomonas) 毒素、白喉毒素、破伤风类毒素、蓖麻毒蛋白、霍乱毒素、志贺样毒素 (SL T-I、SL T-II、SL T-10 IIV)、L T 毒素、C3 毒素、志贺菌毒素、百日咳毒素、破伤风毒素、假单胞菌属外毒素、alorin、肥皂草毒蛋白、塑莲根毒蛋白 II 和 gelatin。多肽 (例如抗体或其结合片段) 可以若干方式与毒素连接。如果杂交分子通过融合基因表达而产生, 则肽键用作毒素与多肽之间的连接。

[0054] 或者, 毒素和多肽可分别产生, 并且稍后偶联 (例如通过非肽共价键)。例如, 共价键可呈二硫键的形式。在这种情况下, 编码多肽的核酸分子可任选含有额外的半胱氨酸密码子。可使半胱氨酸密码子定位, 从而不干扰分子的结合活性。毒素分子可用与修饰多肽的半胱氨酸反应的巯基衍生化。在肽毒素的情况下, 这任选可通过将编码半胱氨酸密码子的 DNA 插入编码毒素的核酸分子中来实现。在另一个备选方法中, 可采用固相多肽技术将巯基本身或作为半胱氨酸残基的部分引入本发明的多肽中。此外, 本文所述多肽可与已在使用中的其它众所周知的治疗联合。本文所述多肽和一种或多种其它治疗剂的组合可提供比仅任一种药剂大的治疗效果, 优选与现有治疗一起产生相加效应或协同效应。例如, 本发明的多肽可与靶向 IGF-IR、Her2 或 IGF 信号转导网络中的其它组分的其它治疗和细胞因子免疫增强治疗 (白介素 (IL)-2、IL-12、CD40L + IL-12、IL-7 和干扰素 (IFN)) 组合, 所述其它组分包括 IGF-I、IGF-II、IGF 结合蛋白, 例如抗 -Her 2 单克隆抗体赫赛汀 (herceptin)、抗 -IGF-IR 单克隆抗体 CP751, 871 (Pfizer)、MK-0646 (Pierre-Fabre/Merck)、AmG479 (Amgen)、IMC-A12 (ImClone)、R1507 (Hoffmann LaRoche)、robatumumab (Schering-Plough)。以现已用于提供治疗效果的已知治疗的方式给予所述治疗。本发明

的多肽可以是可用于癌症治疗的抗 IGF-IR 的中和抗体。在一个实施方案中,本发明的抗体(或其结合片段)抑制 IGF-IR 功能,并抑制 IGF-IR 介导的信号转导。本发明的抗体(或其结合片段)具有针对 IGF-IR 的高亲和力,并且对 IGF-IR 有特异性。

[0055] 在一个实施方案中,抗体或其结合片段与其它分子(例如抗-IGF-IR 抗体、抗 Her2 抗体)物理上缔合以抑制 IGF-IR 介导的和 Her2 介导的信号转导。换句话说,多肽与其它靶分子(例如 IGF-I、-II、IGF 结合蛋白)特异性结合、特异性反应或特异性相互作用。在备选实施方案中,多肽基本上不与其它分子物理上缔合。

[0056] 被本文所述多肽识别的表位可用作癌症疫苗免疫原、癌症疫苗免疫原的活性部分和 IGF 信号转导网络抑制剂的靶标。例如,本文所述表位(或包含表位的多肽)可用作靶标以分离与本文所述表位结合的非本文所述抗体的抗体。这些抗体可用于治疗和诊断癌症。

[0057] 虽然可给予(例如作为疫苗)被呈纯的形式或基本纯的形式本发明的抗体识别的表位(或包含表位的多肽),但是可将表位制成药物组合物、制剂(formulation 或 preparation)。因此,本公开内容包括含有被本文所述抗体识别的表位(或包含表位的多肽)的组合物。所述组合物还可含有一种或多种药学上可接受的载体(如本文所述)和任选其它治疗成分。包含这类表位的组合物可在治疗上使用或以别的方式产生免疫应答。

[0058] 例如,提供疫苗以提高患者自身对因肿瘤发生(tumorigenesis)而存在的抗原的免疫应答。用作免疫原的这类疫苗任选可以是含有表位或其类似物的部分纯的或基本纯的重组多肽。包含表位的多肽可与一种或多种脂蛋白缀合,以脂质体形式给予或与佐剂一起给予。本公开内容还包括利用本文所述表位开发疫苗或免疫原组合物的方法。

[0059] 本公开内容还涉及在哺乳动物中减量调节 IGF-IR 和抑制 IGF-IR 介导的信号转导的方法。所述方法包括将有效量的多肽(例如与人 IGF-IR 特异性结合的抗体或其结合片段)、编码多肽的核酸分子、包含核酸(nucleic)分子的载体、包含核酸分子和/或载体的细胞或包含上述成分的组合物给予哺乳动物,其中癌细胞生长和癌症转移减慢或受抑制。在一个实施方案中,所述哺乳动物是人。

[0060] 在一个实施方案中,本发明提供将多肽(例如与人 IGF-IR 特异性结合的抗体或其结合片段)、核酸分子、含有编码多肽的核酸的载体或含有上述任一种的细胞(例如宿主细胞)给予哺乳动物。

[0061] 在一个实施方案中,本发明提供用于治疗肿瘤或癌症的方法,所述方法包括将有效量的分离抗体或其结合片段给予需要所述治疗的受试者。在另一个实施方案中,本发明包括给予本发明的核酸分子、载体和宿主细胞用于肿瘤或癌症治疗。在特定的实施方案中,本发明可用来治疗或改善前列腺癌、乳腺癌、肝癌和结肠癌。

[0062] 本文所用术语“治疗”或其任何语法变化形式包括但不限于改善或缓解疾病或病况的症状、减缓、阻抑、抑制、减少或影响病况的进程、严重程度和/或范围。

[0063] 本文所用术语“受试者”是指生物,包括哺乳动物,例如灵长类动物,可用本发明的组合物向其提供治疗。可获益于所公开的治疗方法的哺乳动物种类包括但不限于猿、黑猩猩、猩猩、人、猴和驯养动物,例如狗、猫、马、牛、猪、绵羊、山羊、鸡、小鼠、大鼠、豚鼠和仓鼠。

[0064] 载体包括例如核酸载体,例如裸 DNA 和质粒及病毒载体,例如反转录病毒载体、基于细小病毒的载体(例如基于腺病毒的载体和基于腺伴随病毒(AAV)的载体)、慢病毒载体(例如基于单纯疱疹病毒(HSV)的载体)和杂合病毒载体或嵌合病毒载体,例如带有慢



病毒组分的腺病毒骨架（参见例如 Zheng 等，Nat. Biotech., 18(2),176-80 (2000)；国际专利申请 WO 98/22143；国际专利申请 WO 98/46778 和国际专利申请 WO 00/17376）和带有 AAV 组分的腺病毒骨架（参见例如 Fisher 等，Hum. Gene Ther., 7,2079-2087 (1996)），所述这些均通过引用结合到本文中）。载体和载体构建是本领域已知的（参见例如 Sambrook 等，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1989)；以及 Ausubel 等，Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994)，两者均通过引用结合到本文中）。

[0065] 载体可含有任何合适的启动子和其它调节序列（例如对宿主类型有特异性的转录和翻译起始密码子和终止密码子）以控制编码多肽的核酸序列表达。启动子可以是与上述核酸分子有效连接的 (operably linked) 天然或非天然的启动子。包括各种组成型启动子和可调节启动子在内的启动子的选择为普通技术人员所掌握。

[0066] 可调节启动子的实例包括诱导型启动子、阻抑型启动子和组织特异性启动子。具体实例包括病毒启动子，例如腺病毒启动子和 AAV 启动子。另外，将上述核酸与启动子连接在本领域技术范围内。

[0067] 本公开内容还提供含有上述多肽或编码所述多肽的核酸分子（任选呈载体形式）的细胞（例如分离的宿主细胞）。可以使用任何合适的细胞。实例包括宿主细胞，例如大肠杆菌 (*E. coli*)（例如大肠杆菌 Tb-1、TG-2、DH5a、XL-Blue MRF' (Stratagene)、SA2821 和 Y1090)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷菌 (*Serratia marcescens*)、假单胞菌属（例如铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)）、*N. grassa*、昆虫细胞（例如 Sf9、Ea4）、酵母（酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)）细胞和来源于哺乳动物的细胞，包括人细胞系。合适的真核宿主细胞的具体实例包括 VERO、HeLa、3T3、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、W138 BHK、COS-7 和 MDCK 细胞。或者，来自待按照本文所述方法治疗的哺乳动物（例如人）的细胞可用作宿主细胞。

[0068] 将载体导入分离的宿主细胞及体外培养和选择经转化宿主细胞的方法是本领域已知的，包括采用氯化钙介导的转化、转导、接合、三亲交配、DEAE、葡聚糖介导的转染、感染、与脂质体的膜融合、DNA 包被的微弹高速度轰击、直接显微注射入单个细胞和电穿孔（参见例如 Sambrook 等，Molecular Biology: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1989)；Davis 等，Basic Methods in Molecular Biology (1986)；以及 Neumann 等，EMBO J. 1,841 (1982)，所有这些均通过引用结合到本文中）。在一个实施方案中，细胞所含载体或核酸分子被细胞有效地转录和翻译。

[0069] 核酸分子、载体、细胞和多肽可单独给予哺乳动物，或与药学上可接受的载体组合给予。药学上可接受的意指不是生物上不良的物质或在其它方面不良的物质（例如可与核酸、载体、细胞或多肽一起给予哺乳动物而又不引起不良生物作用或不以有害方式与药物组合中所含其它组分相互作用的物质）。选择载体使药剂的降解降到最低，并使在哺乳动物中的不良副作用降到最低。载体的选择为本领域普通技术人员所熟知。

[0070] 合适的载体及其制剂可参见 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (第19版)，主编 A. R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA (1995)。药用载体的实例包括无菌水、盐水、林格液、葡萄糖溶液和生理 pH 下的缓冲溶液。

[0071] 适量的药学上可接受的盐通常用于制剂中以赋予该制剂等渗性。在一个实施方案中,溶液的 pH 为约 5-约 8 (例如约 5.5、约 6、约 6.5、约 7、约 7.5 和包括这些量之中任一个的范围),但可采用该范围以外的 pH。在另一个实施方案中,pH 为约 7-约 7.5。

[0072] 本发明的药物组合物还可包括缓释制剂,例如含有多肽的固体疏水聚合物的半渗透基质,所述基质呈成型制品的形式(例如膜、脂质体或微粒的形式)。对本领域技术人员将清楚明了的是,依例如给药途径和待给予组合物的浓度而定,某些载体可更优选。

[0073] 含有核酸分子、载体、细胞或多肽的组合物(例如药物组合物)的实例可包括载体、增稠剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂、表面活性剂等。所述组合物还可包括一种或多种活性成分,例如抗-IGF-I 抗体、抗-IGF-II 抗体、化疗药物等。本文所述组合物可经美国 FDA 或其它国家等同机构批准使用。含有核酸、分子、载体、细胞或多肽的组合物(例如药物组合物)可以任何合适的方式给予,这取决于是需要局部治疗还是需要全身治疗,并取决于待治疗的部位。

[0074] 如果所述组合物经胃肠外给予,则一般通过注射给予。注射剂可按常规形式制备成液体溶液剂或混悬剂、适于注射前配成溶液剂或混悬剂的固体形式或者制备成乳剂。另外,胃肠外给予可涉及制备慢释或缓释系统,使得保持恒定的剂量(参见例如美国专利 3,610,795,其通过引用结合到本文中)。胃肠外给予的制剂包括无菌水性或非水性溶液剂、混悬剂和乳剂。非水溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇、植物油(例如橄榄油)和注射用有机酯(例如油酸乙酯)。水性载体包括水、醇溶液/水溶液、乳剂或混悬剂,包括盐水和缓冲介质。胃肠外溶媒包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖(Ringer's dextrose)、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏液或非挥发油。静脉内溶媒包括流体和营养补充剂、电解质补充剂(例如基于林格氏葡萄糖的那些)等。也可存在防腐剂和/或其它添加剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0075] 所述组合物可呈酸加成盐或碱加成盐的形式,其可通过与无机酸(例如盐酸、氢溴酸、高氯酸、硝酸、硫氰酸、硫酸和磷酸)或与有机酸(例如甲酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、乳酸、丙酮酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸和富马酸)反应获得,或者可通过与无机碱(例如氢氧化钠、氢氧化铵、氢氧化钾)和有机碱(例如单烷基胺、二烷基胺、三烷基胺和芳胺及取代乙醇胺)反应获得。

[0076] 所述核酸分子、载体或多肽可与药学上可接受的载体一起给予,并且可通过本领域众所周知的多种机制(例如裸 DNA 摄取、脂质体融合、通过基因枪肌内注射 DNA、胞吞等),体内和/或离体递送给哺乳动物细胞。

[0077] 治疗癌症需要的组合物的确切量可根据以下而变化:哺乳动物的种类、年龄、性别、体重和一般状况;所使用的特定多肽、核酸、载体或细胞;给药途径以及方案中是否包括其它药物。因此,不可能规定每种组合物的精确量。然而,本领域普通技术人员可仅用本文教导中给出的常规实验方法来确定适当的合适量。用于给予所述组合物的剂量范围是大到足以产生所需效果的量;然而,剂量不应大到引起不良副作用,例如不需要的交叉反应、过敏反应等。剂量可变化,并且可每日一剂或多剂(例如 2 剂以上、3 剂以上、4 剂以上或 5 剂以上)给予达一天或更多天(或者促进治疗的任何合适期间)。所述组合物可在癌症确定时立即给予,并且可持续或间隔给予。

[0078] 本文所用术语“有效量”是指能够治疗或改善疾病或病况或者以别的方式能够产

生预期的治疗效果的量。在一个实施方案中,有效量是可用于治疗或改善肿瘤或癌症的量。在一个实施方案中,有效量能够抑制或减缓受试者的癌细胞生长或转移。用于给予本文所述治疗剂和组合物的有效剂量和方案可凭经验确定,所述决定的做出是本领域普通技术人员的例行工作。

[0079] 本领域技术人员要了解的是,多肽的剂量根据以下而变化:例如上述给药途径、要采用的特定多肽、待给予的其它药物及受试者的年龄、状况、性别和疾病严重性。本文所述多肽的有效剂量的范围一般介于约  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  体重至  $100 \text{mg}/\text{kg}$  体重之间。该剂量范围的实例为例如约  $1 \mu\text{g}$ - $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、约  $100 \mu\text{g}$ - $1 \text{mg}/\text{kg}$ 、约  $1 \text{mg}/\text{kg}$ - $10 \text{mg}/\text{kg}$  或约  $10 \text{mg}$ - $100 \text{mg}/\text{kg}$ ,一月一次、一周一次、两周一次、一日一次或一日 2-4 次。

[0080] 选择抗-IGF-IR 抗体(例如本文所述多肽)的合适剂量的指导参见有关抗体治疗应用的文献(参见例如 Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone 等主编, Nokes Publications, Park Ridge, N. J., (1985);以及 Smith 等, Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber 等主编, Raven Press, New York (1977),所有这些均通过引用结合到本文中。所用多肽的典型日剂量的范围可为约每日  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  体重-高达约  $100 \text{mg}/\text{kg}$  体重以上,这取决于上述因素。例如,所述范围可为约  $100 \text{mg}/\text{剂}$ -约  $1 \text{g}/\text{剂}$ 。可给予核酸、载体和宿主细胞,从而导致所产生多肽的水平相当。

[0081] 本公开内容还包括试剂盒,其包括多肽、核酸分子、载体、细胞、表位或前述成分的组合物。所述试剂盒可包括不同的容器,其装有合适的载体、稀释剂或赋形剂。所述试剂盒还可包括佐剂、细胞因子、抗病毒剂、免疫测定试剂、PCR 试剂、放射性标记等。另外,所述试剂盒可包括用于混合或混匀成分和/或给予的说明书。

[0082] 本公开内容还提供检测哺乳动物的 IGF-IR 的方法,所述方法包括使获自哺乳动物的样品与本文所述多肽接触。如果哺乳动物中存在多肽可与之结合的抗原,则在所述多肽和抗原之间形成复合物形式。检测到复合物则表明哺乳动物中存在升高的 IGF-IR。

[0083] 来自哺乳动物的样品可以是检测 IGF-IR 存在情况的任何合适的样品。复合物可通过任何合适的方式检测。可通过向本文所述多肽中引入放射性物质,例如  $^{1125}\text{I}$ 、 $^{1131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$  (氚)、 $^{14}\text{C}$  等;各种酶试剂,例如过氧化物酶(POX)、胰凝乳蛋白酶原、羧肽酶原、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、淀粉酶、磷酸化酶、脱氧核糖核酸酶、P-Nase、 $\alpha$ -半乳糖苷酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、鸟氨酸脱羧酶等,而将本文所述多肽用作标记分子应用于放射免疫测定法(RIA)或酶免疫测定法(EIA)、特别是酶联免疫吸附测定(ELISA)。可按常规方式引入放射性物质。例如放射性碘  $^{1125}\text{I}$  的引入可通过使用氯胺 T 的氧化电离方法进行(参见例如 Hunter 等, Nature, 194, 495-496 (1962))或通过使用 Bolton-Hunter 试剂( $^{1125}\text{I}$ -碘化对羟苯丙酸 N-羟基-琥珀酰亚胺酯)进行,该文献通过引用结合到本文中。

[0084] 用于该方法的标记可以是本领域已知的任何合适的标记,例如生物素化蛋白质或多肽。

## 实施例

[0085] 流式细胞术中 H10 与乳腺癌 MCF-7 细胞中细胞缔合的 IGF-IR 的结合

[0086] 将表达 IGF-IR 的 MCF-7 细胞与含有 1% FBS 的 PBS 缓冲液(填充曲线)或与  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  重组 H10 (空白曲线)一起在  $4^\circ\text{C}$  下孵育 1 小时。使用与山羊抗人 IgG, F(ab')<sub>2</sub> (1:500)

(ImmunoJackson) 缀合的藻红蛋白检测结合抗体。将FACSArray 酶标仪 (plate reader) (BD biosciences) 用于荧光激活细胞分选术 (FACS), 而 FlowJo 软件用于数据解读。结果见图 3。

[0087] 除了的操作实施例中, 或者其中另有说明, 否则说明书和权利要求书中使用的提及成分的量、反应条件等的所有数字、数值和 / 或表述应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。

[0088] 虽然根据某些实施方案对本发明进行了解释, 但要理解的是在阅读说明书时, 对于本领域技术人员而言, 其各种修改将变得清楚明了。因此, 要理解的是, 本文公开的本发明意欲涵盖落入所附权利要求书范围内的这类修改。

[0089] 本文提及或引用的所有专利、专利申请、临时申请和出版物均通过引用以其整体予以结合, 包括所有附图和表格, 其程度与该说明书明确教导一致。

[0090] 应当了解的是, 本文所述实施例和实施方案仅用于说明目的, 本领域技术人员由此可提出各种修改或变化, 这些修改或变化包括在本申请的精神和范围内以及所附权利要求书的范围内。另外, 本文所公开的任何发明或其实施方案的任何要素或限制可与本文公开的任何其它发明或其实施方案的任何和 / 或所有其它要素或限制 (单个地或以任何组合) 组合, 所有这类组合均包括在本发明的范围内而非对其限制。

- <110> 香港大学  
章美云
- <120> 抗-IGF-IR 抗体及其用途
- <130> UHK. 153X
- <150> 61/266,681
- <151> 2009-12-14
- <160> 15
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> H10 抗体的 VH 区的氨基酸序列
- <400> 1

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

Ser Val Arg Val Ser Cys Gln Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr  
                                20    25    30

Tyr Val Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met  
                                35    40    45

Gly Gly Ile Asn Pro Asp Asn Gly Gly Asn Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50	55	60																	
His Gly Arg Val Thr Phe Ile Ala Asp Glu Ser Thr Arg Thr Val His																			
65	70	75	80																
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys																			
	85	90	95																
Ala Lys Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Asp Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Val																			
	100	105	110																
Trp Gly Gln Gly Thr Ala Val Thr Val Phe Ser Ser																			
	115	120																	
<210> 2																			
<211> 107																			
<212> PRT																			
<213> 人工序列																			
<220>																			
<223> H10 抗体的 VL 区的氨基酸序列																			
<400> 2																			
Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly																			
1	5	10	15																
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu																			
	20	25	30																
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu Asn																			
	35	40	45																

Gly Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> H10 抗体的 H3 区的氨基酸序列

<400> 3

Ala Lys Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Asp Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
 1 5 10 15

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> H10 抗体的 L3 区的氨基酸序列

<400> 4

Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr  
1 5

<210> 5

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> H10 抗体的 VH 区的核酸序列

<400> 5

gaggtgcagc tgctcgagtc tggggctgag gtgaagaggc ctgggtcctc ggtgagagtc	60
tcctgccaag tttctgggta ctcattcact gcctactacg tcagttgggt gcgacagacc	120
cctggacacg ggcttgagtg gatgggaggg attaatcctg acaatgggtg taacaactac	180
gcacagaagt ttcacggccg agtgacattt atcgccgacg agtccacgag gacagtccac	240
atggaactgc gcagcctgag atctgaggac acggccgtct atttttgtgc aaagtcaacc	300
tcctatgatt acgacgggta ctgggtacttc gatgtctggg gccaaaggac cgcggtcacc	360
gttctctcct ca	372

<210> 6

<211> 320

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> H10 抗体的 VL 区的核酸序列



<400> 6  
 gagctccaga tgaccagtc tccatcttc gtgtctgcat ctgtcggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgtc gggcgagttc aagtgtaagt tacttagcct ggtatcagca gaaaccaggg 120  
 aaagecceta agtcctgat caatggcacg tccagtttgc aaagtggggt cccatcaagg 180  
 ttcageggca gtggatctgg gacagatttc actctacca tcagcagcct gcagcctgaa 240  
 gatttgcgac ttactattgt cagcaaagga gtagttacc attcacgttc ggcggaggga 300  
 ccaagtgga gatcaaacga 320

<210> 7  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> H10 抗体的 H3 区的核酸序列

<400> 7  
 gcaaagteaa cctcctatga ttacgacggt tactggtact tegatgtc 48

<210> 8  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> H10 抗体的 L3 区的核酸序列

<400> 8  
 cagcaaagga gtagttacc attcacg 27

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> H10 抗体的 VH 区 CDR1 的氨基酸序列

<400> 9

Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr Tyr

1

5

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> H10 抗体的 VH 区 CDR2 的氨基酸序列

<400> 10

Ile Asn Pro Asp Asn Gly

1

5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> H10 抗体的 VL 区 CDR1 的氨基酸序列

<400> 11

Ser Ser Val Ser Tyr Leu

1

5

<210>	12	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	H10 抗体的 VH 区 CDR1 的核酸序列	
<400>	12	
	ggttactcat tcaactgccta ctac	24
<210>	13	
<211>	13	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	H10 抗体的 VH 区 CDR2 的核酸序列	
<400>	13	
	attaatcctg aca	13
<210>	14	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	H10 抗体的 VL 区 CDR1 的核酸序列	
<400>	14	
	tcaagtgtaa gttac	15

<210> 15  
 <211> 1367  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 15

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu  
 1                    5                    10                    15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile  
                   20                    25                    30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg  
                   35                    40                    45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile  
                   50                    55                    60

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

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu  
                   85                    90                    95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe  
                   100                    105                    110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile  
                   115                    120                    125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu  
 130 135 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile  
 145 150 155 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys  
 165 170 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys  
 180 185 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr  
 195 200 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys  
 210 215 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser  
 225 230 235 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr  
 245 250 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu  
 260 265 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala  
 275 280 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met  
 290 295 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr  
 305 310 315 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys  
 325 330 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly  
 340 345 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn  
 355 360 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val  
 370 375 380

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser  
 385 390 395 400

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly  
 405 410 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp  
 420 425 430

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe  
 435 440 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu  
450 455 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg  
465 470 475 480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr  
485 490 495

Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr  
500 505 510

Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys  
515 520 525

Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys  
530 535 540

Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys  
545 550 555 560

Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln  
565 570 575

Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp  
580 585 590

His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala

595	600	605
Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser		
610	615	620
Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn		
625	630	635
Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr		
	645	650
		655
Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys		
660	665	670
Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys		
675	680	685
Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys		
690	695	700
Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys		
705	710	715
Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu		
	725	730
		735
Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser		
740	745	750



Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro  
755 760 765

Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn  
770 775 780

Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg  
785 790 795 800

Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser  
805 810 815

Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp  
820 825 830

Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile  
835 840 845

Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met  
850 855 860

Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val  
865 870 875 880

Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu  
885 890 895

Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly  
900 905 910

Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr  
 915 920 925

Gly Tyr Glu Asn Phe Ile His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala Val  
 930 935 940

Leu Leu Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met Leu Tyr Val Phe His Arg  
 945 950 955 960

Lys Arg Asn Asn Ser Arg Leu Gly Asn Gly Val Leu Tyr Ala Ser Val  
 965 970 975

Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp  
 980 985 990

Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Ser Arg Glu Leu Gly Gln Gly  
 995 1000 1005

Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys Gly Val Val Lys  
 1010 1015 1020

Asp Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Val Asn Glu Ala  
 1025 1030 1035

Ala Ser Met Arg Glu Arg Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser Val  
 1040 1045 1050

Met Lys Glu Phe Asn Cys His His Val Val Arg Leu Leu Gly Val  
 1055 1060 1065

Val Ser Gln Gly Gln Pro Thr Leu Val Ile Met Glu Leu Met Thr  
1070 1075 1080

Arg Gly Asp Leu Lys Ser Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu Met  
1085 1090 1095

Glu Asn Asn Pro Val Leu Ala Pro Pro Ser Leu Ser Lys Met Ile  
1100 1105 1110

Gln Met Ala Gly Glu Ile Ala Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala  
1115 1120 1125

Asn Lys Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Val  
1130 1135 1140

Ala Glu Asp Phe Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Thr Arg  
1145 1150 1155

Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly Lys Gly Leu  
1160 1165 1170

Leu Pro Val Arg Trp Met Ser Pro Glu Ser Leu Lys Asp Gly Val  
1175 1180 1185

Phe Thr Thr Tyr Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp  
1190 1195 1200

Glu Ile Ala Thr Leu Ala Glu Gln Pro Tyr Gln Gly Leu Ser Asn

1205	1210	1215
Glu Gln Val Leu Arg Phe Val Met Glu Gly Gly Leu Leu Asp Lys		
1220	1225	1230
Pro Asp Asn Cys Pro Asp Met Leu Phe Glu Leu Met Arg Met Cys		
1235	1240	1245
Trp Gln Tyr Asn Pro Lys Met Arg Pro Ser Phe Leu Glu Ile Ile		
1250	1255	1260
Ser Ser Ile Lys Glu Glu Met Glu Pro Gly Phe Arg Glu Val Ser		
1265	1270	1275
Phe Tyr Tyr Ser Glu Glu Asn Lys Leu Pro Glu Pro Glu Glu Leu		
1280	1285	1290
Asp Leu Glu Pro Glu Asn Met Glu Ser Val Pro Leu Asp Pro Ser		
1295	1300	1305
Ala Ser Ser Ser Ser Leu Pro Leu Pro Asp Arg His Ser Gly His		
1310	1315	1320
Lys Ala Glu Asn Gly Pro Gly Pro Gly Val Leu Val Leu Arg Ala		
1325	1330	1335
Ser Phe Asp Glu Arg Gln Pro Tyr Ala His Met Asn Gly Gly Arg		
1340	1345	1350

---

Lys Asn Glu Arg Ala Leu Pro Leu Pro Gln Ser Ser Thr Cys  
1355 1360 1365

**H10 VH (SEQ ID No: 1):**

EVQLLESGAEVKRPGSSVRVSCQVSGYSFTAYYVSWVRQTPGHGLEWMGGINPDNG  
GNNYAQKFHGRVTFIADESTRTVHMELRSLRSEDTAVYFCAKSTSYDYDGYWYFDVW  
GQGTAVTVFSS

**H10 VL (SEQ ID NO: 2):**

ELQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASSSVSYLAWYQQKPGKAPKLLINGTSSLQSGVP  
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQRSSYPFTFGGGTKVEIKR

**H10 H3 (SEQ ID No: 3): AKSTSYDYDGYWYFDV****H10 L3 (SEQ ID NO: 4): QQRSSYPFT****H10 VH DNA (SEQ ID NO: 5):**

gagggcagctgctcgagctctggggctgagggaagaggcctgggtcctcggtgagagtctcctgccaagttctggttact  
cattcactgcctactacgtcagttgggtgcgacagaccctggacacgggctgagtggatgggagggattaatcctgaca  
atggtggttaacaactacgcacagaagttcagggccgagtgacatttatcgccgacgagtccaagggacagtccacat  
ggaactgcgcagcctgagatctgaggacacggccgtctattttgtgcaaagtcaacctcctatgattacgacggttactggt  
acttcgatgctctggggccaagggaccgcggtcaccgtcttctcctca

**H10 VL DNA (SEQ ID NO: 6):**

gagctccagatgacccagctcctcctccgtgtctgcatctgtcggagacagagtaccatcactgtcgggcgagttcaa  
gtgtaagttacttagcctggatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatcaatggccagtcagttgcaaa  
gtggggtccatcaaggtcagcggcagtgatctgggacagattcactctaccatcagcagcctgcagcctgaagatt  
ttcgacttactattgtcagcaaaggagtagttacccattcaggtcggcggagggaaccaaggtggagatcaacga

**H10 H3 DNA (SEQ ID NO: 7): gcaaagtcaacctcctatgattacgacggttactgggtacttcgatgctc****H10 L3 DNA (SEQ ID NO: 8): cagcaaaggagtagttaccattcagc**

图 1

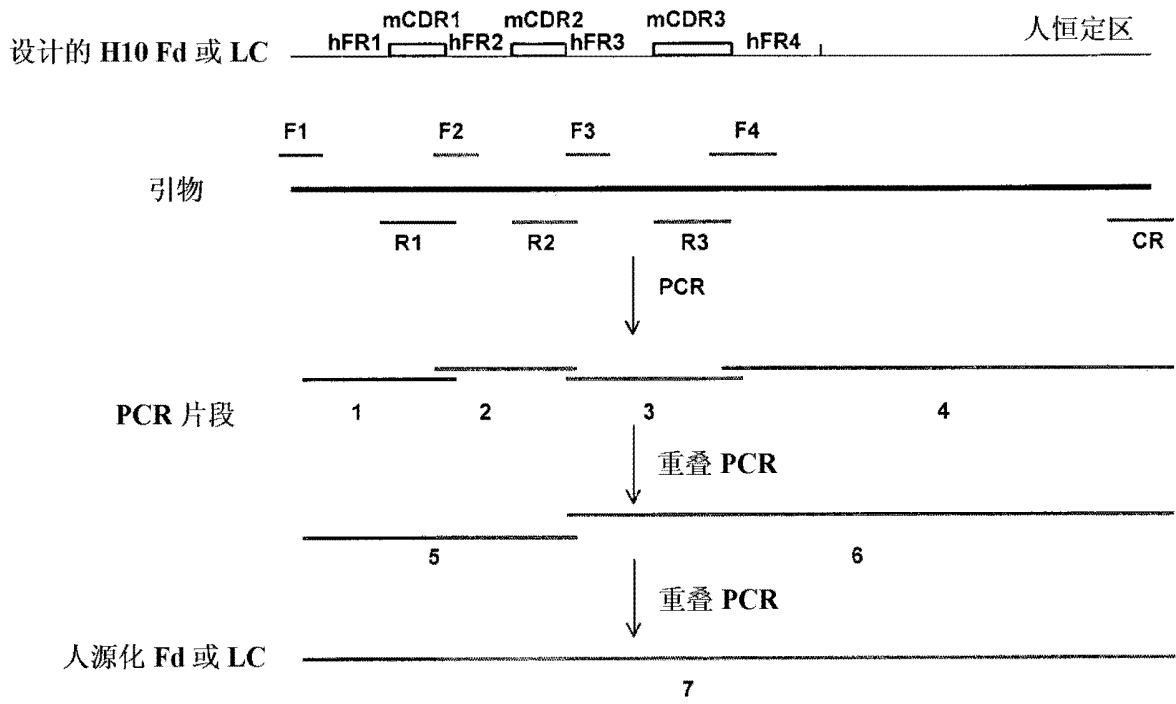
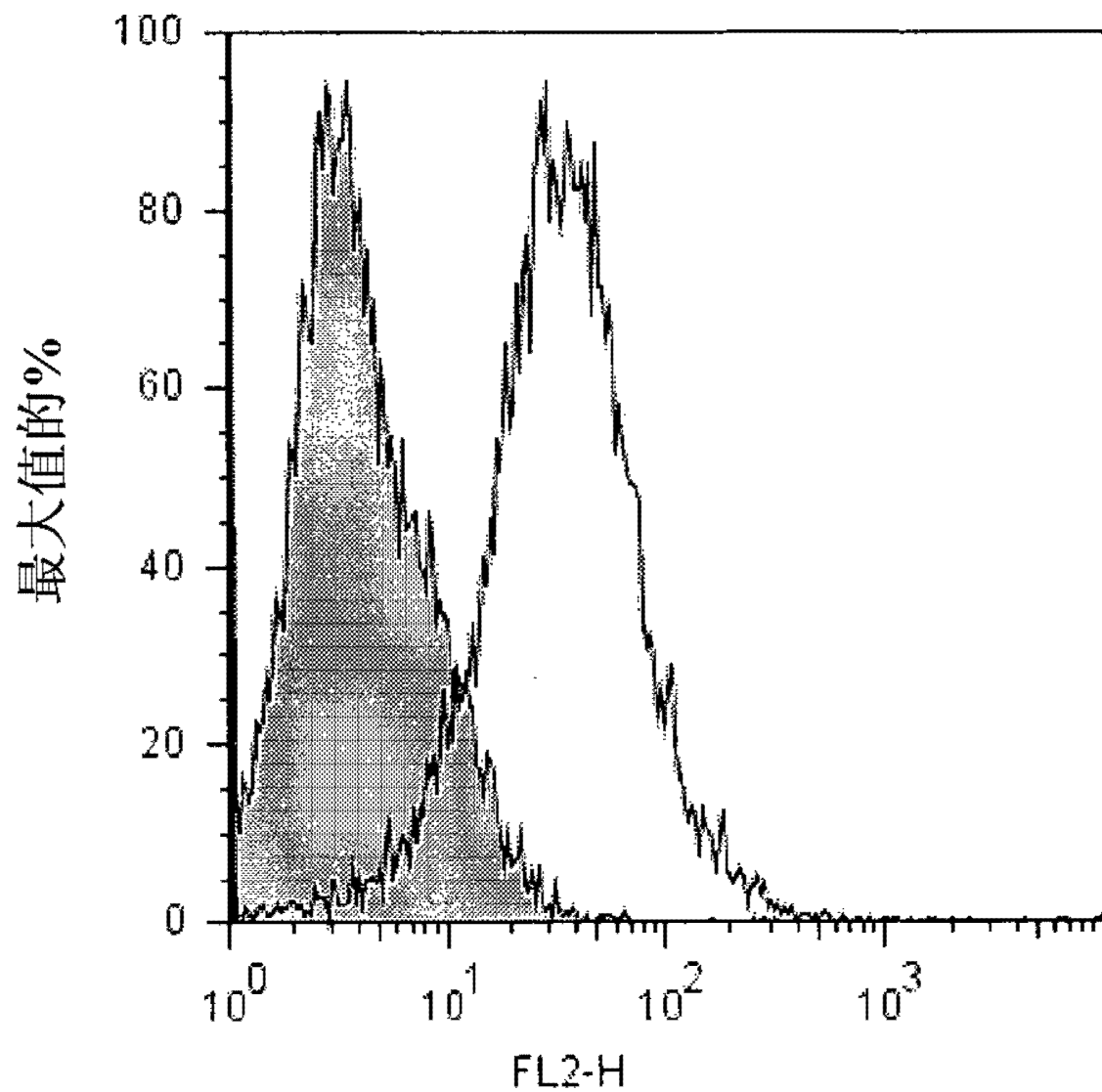


图 2



填充的曲线：第二抗体对照

空白曲线：10  $\mu\text{g/ml}$  的重组 H10

图 3