



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101707882 A

(43) 申请公布日 2010. 05. 12

(21) 申请号 200880012257. 1

A61K 39/395 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 04. 17

A61P 35/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/923, 979 2007. 04. 17 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 10. 16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/005137 2008. 04. 17

(87) PCT申请的公布数据

W02008/130704 EN 2008. 10. 30

(71) 申请人 伊姆克罗尼责任有限公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 Z·朱 J·沈

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 27 页 附图 22 页

(54) 发明名称

PDGFR β 特异性抑制剂

(57) 摘要

本发明涉及新颖的 PDGFR β 特异性拮抗剂。所述拮抗剂包括抗体, 该抗体可以是双特异性的。用抗体来降低或抑制肿瘤生长或用于治疗血管发生性疾病。本发明还包括用于此类治疗的 PDGFR β 特异性拮抗剂与 VEGFR 拮抗剂的组合。拮抗剂还可与其它抗血管发生药物和抗癌药物组合施用。

2C5 的序列信息:**2C5 VH 的 DNA:**

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCCGGTGAAGGTCTCT
GCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGCCCTGGACA
AGGGCTTGAAGTGGATGGGAAGGATCATCCCTATCCTTGGTATAGCAAACTACGCACAGAAGTTC
CAGGGCAGAGTACGATTACCGGGACAAATCCAGGACAGCCTACATCGAGCTGACGACGC
TGAGATCTGAGGACAGGCGCTCTATTACTGTCCGAGAGATATGGGTCAAGGAATTATTATTA
CTTCTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACGCTCAAGC

2C5 VH 的蛋白质:

QVQLVDSGAEVKKPGSSSLKVSCKASGGTFSSYATSWPQAPGQGLEWMGRILPILGIAN
YADKFDGRVITITADKSTSTAYMELSSLRSEDATVYYCARDIGSFNYTFYWGQSTLVTVSS

2C5 VL 的 DNA:

GAAATTGTCTGACTCAGTCTCCAGCCACCCGTGCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCT
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGGTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGC
TCCCAGGCTCTCATCTATGGTGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTTCAGTGGC
AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTCAGTTT
ATTACTGTGACGAGCGTAGCAACTGGCCTCTCATTTCGGCGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA
ACGA

2C5 VL 的蛋白质:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRYLAHWYQKPGGAPRLIYGASRATGIP
ARFSGSGSDFTLTITSSLEPEDFAYYYCDQSMPITFGGGTKVEIKR

1. 经分离的抗体或其片段,其与血小板衍生生长因子受体- β (PDGFR β) 的结构域2或结构域1和2结合。

2. 权利要求1的经分离的抗体或其片段,其包含在CDRH1上与SEQ ID NO:20;在CDRH2上与SEQ ID NO:22;在CDRH3上与SEQ ID NO:24;在CDRL1上与SEQ ID NO:28;在CDRL2上与SEQ ID NO:30;以及在CDRL3上与SEQ ID NO:32至少大约90%同源的互补决定区。

3. 权利要求2的抗体,其包含SEQ ID NO:18的重链可变结构域氨基酸序列和SEQ ID NO:26的轻链可变结构域氨基酸序列。

4. 经分离的抗体或其片段,其与血小板衍生生长因子受体- β (PDGFR β) 特异性结合,并且其包含在CDRH1上与SEQ ID NO:4;在CDRH2上与SEQ ID NO:6;在CDRH3上与SEQ ID NO:8;在CDRL1上与SEQ ID NO:12;在CDRL2上与SEQ ID NO:14;以及在CDRL3上与SEQ ID NO:16至少大约90%同源的互补决定区。

5. 权利要求4的抗体,其包含SEQ ID NO:2的重链可变结构域氨基酸序列和SEQ ID NO:10的轻链可变结构域氨基酸序列。

6. 权利要求1至5中任一项的抗体,其选自单链抗体、Fab、单链Fv、双抗体、三链抗体和单结构域抗体。

7. 权利要求1至5中任一项的抗体,其是双特异性抗体。

8. 权利要求7的抗体,其与VEGFR受体结合。

9. 权利要求8的抗体,其中所述VEGFR受体选自VEGFR1、VEGFR2和VEGFR3。

10. 经分离的多核苷酸,其编码选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

11. 权利要求10的经分离的多核苷酸,其包含与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:25的核苷酸序列至少70%同一的核苷酸序列。

12. 经分离的多核苷酸,其在严格条件下与包含选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:25的核苷酸序列的核酸分子的互补序列杂交。

13. 表达载体,其包含权利要求10-12中任一项的多核苷酸序列,所述多核苷酸序列与影响所述多核苷酸在宿主细胞中表达的调控控制序列有效相连。

14. 重组宿主细胞,其包含权利要求13的表达载体。

15. 权利要求14的重组宿主细胞,其表达与PDGFR β 结合的抗体。

16. 生产与PDGFR β 结合的抗体的方法,所述方法包括在允许所述抗体表达的条件下培养权利要求15的细胞。

17. 在哺乳动物中调节PDGFR β 活性的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的权利要求1至9中任一项的抗体。

18. 在哺乳动物中抑制血管发生的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的权利要求1至9中任一项的抗体。

19. 在哺乳动物中降低肿瘤生长的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的权利要求1至9中任一项的抗体。

20. 权利要求19的方法,其还包括施用有效量的抗癌剂或辐射。

21. 在哺乳动物中抑制血管发生或降低肿瘤生长的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的血小板衍生生长因子- β (PDGFR β) 的特异性拮抗剂和有效量的VEGFR拮

抗剂。

22. 权利要求 21 的方法,其中所述 PDGFR β 特异性拮抗剂是与 PDGFR β 结合的抗体。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述抗体阻断 PDGFR β 二聚化。

24. 权利要求 22 的方法,其中所述抗体与 PDGFR β 的结构域 2 或结构域 1 和 2 结合。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述抗体包含在 CDRH1 上与 SEQ ID NO:20;在 CDRH2 上与 SEQ ID NO:22;在 CDRH3 上与 SEQ ID NO:24;在 CDRL1 上与 SEQ ID NO:28;在 CDRL2 上与 SEQ ID NO:30;以及在 CDRL3 上与 SEQ ID NO:32 至少大约 90%同源的互补决定区。

26. 权利要求 25 的方法,其中所述抗体包含 SEQ ID NO:18 的重链可变结构域氨基酸序列和 SEQ ID NO:26 的轻链可变结构域氨基酸序列。

27. 权利要求 21 的方法,其中所述 PDGFR β 特异性拮抗剂是双特异性抗体,其与 PDGFR β 和选自 VEGFR1、VEGFR2 和 VEGFR3 的 VEGF 受体结合。

28. 权利要求 27 的方法,其中所述 VEGF 拮抗剂是与 VEGFR2 结合的抗体。

29. 权利要求 21 的方法,其中所述 PDGFR β 特异性拮抗剂是与 PDGFR β 和 VEGFR 配体结合的双特异性抗体。

30. 权利要求 29 的方法,其中所述 VEGFR 配体选自 VEGF 和 PlGF。

31. 权利要求 21 的方法,其中所述 VEGFR 拮抗剂是 VEGF 受体的可溶片段。

32. 权利要求 21 的方法,其还包括施用有效量的抗癌剂或辐射。

PDGFR β 特异性抑制剂

与相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求提交于 2007 年 4 月 17 日的美国临时专利申请 No. 60/923, 979 的申请日的权益, 该申请的公开内容通过引用并入本文。

[0002] 本发明涉及抑制血管发生和肿瘤生长的方法和组合物。本发明展示了对血小板衍生生长因子受体 β (PDGFR β) 的特异性抑制对血管发生的影响, 并且提供了使用 PDGFR β 特异性拮抗剂 (单独或与 VEGF 受体的抑制剂组合) 来对血管发生的治疗。特异性抑制剂可以是抗体或其抗原结合片段。此外, 抑制剂可以是双特异性的。

发明背景

[0003] 血小板衍生生长因子 (PDGFs) 是针对几乎所有间充质源 (mesenchyme-derived) 细胞的有效促细胞分裂原的家族。有四种 PDGF 同工 (isoform) 型——A、B、C 和 D, 它们形成了五种不同的通过二硫化物连接的二体蛋白——PDGF-AA、-BB、-AB、-CC 和 -DD。这些生长因子通过两种结构相关的酪氨酸激酶受体——PDGF 受体 α (PDGFR α) 和 PDGF 受体 β (PDGFR β) 来发挥其细胞作用。(Sandy, J. R., 1998, Br. J. Orthod. 25 :269-74 ; Betsholtz, C. 等人, 2001, Bioessays 23 :494-507)。

[0004] PDGFR α 和 PDGFR β 结构上相似, 并能形成异源二聚体和同源二聚体。PDGF-BB 和 PDGF-DD 是 $\beta\beta$ 同源二聚体受体的主要激活子。PDGF-AA 仅活化 $\alpha\alpha$ 受体二聚体, 而 PDGF-AB、PDGF-BB 和 PDGF-CC 活化 $\alpha\alpha$ 和 $\alpha\beta$ 受体二聚体。二聚体配体分子与两种受体蛋白同时结合, 并且诱导受体二聚化、受体胞质结构域内的特定残基的自身磷酸化和细胞内信号传达。最终, 对 PDGFR β 信号途径的活化诱导多种细胞应答, 包括细胞增殖和迁移。

[0005] 血管发生被认为对肿瘤生长和转移来说都是关键的。血管系统的发育或血管生成 (vasculogenesis) 涉及到两种主要细胞类型——内皮细胞 (EC) 和周细胞 / 血管平滑肌细胞 (SMC) 装配为成熟的血管。PDGF-B 和 PDGFR β 敲除小鼠暗示 PDGF-B/PDGFR β 信号途径参与血管生成。PDGF-B 和 PDGFR β 敲除表型实质上相同, 因为小鼠由于丢失了血管中平滑肌细胞和周细胞的覆盖而表现为出血。研究表明, PDGFR β 参与将周细胞招募至毛细血管和血管中平滑肌细胞的发育。招募周细胞以包覆初生血管对于血管网络的稳定和进一步建立来说是关键的。缺乏足够周细胞覆盖的血管较之良好建立的成熟血管而言对于 VEGF 抑制更加敏感。

[0006] 作为抗肿瘤剂开发的多种酪氨酸激酶抑制剂已被发现能抑制 PDGFR β 。但是, 这些化合物具有多种酪氨酸激酶靶标。例如, 甲磺酸伊马替尼 (**Gleevec®** /ST571) 被开发为 Abelson (Abl) 酪氨酸激酶抑制剂, 但其也抑制 c-kit、PDGFR α 和 PDGFR β 。马来酸舒尼替尼 (**Sutent®** /SU11248) 是广谱可口服的多靶标酪氨酸激酶抑制剂, 其具有针对 VEGFR、PDGFR、c-KIT 和 FLT-3 的活性。CP-673, 451 是 PDGFR α 和 PDGFR β 二者的抑制剂。鉴于这些小分子拮抗剂并不是对这些受体特异性的, 因而无法区分 PDGFR β 信号传导对血管发生 (包括肿瘤相关的血管发生)、肿瘤刺激和生长或与施用此类化合物相关的毒性 (可能是对多种受体的多余靶向导致的) 的作用。

[0007] 因此,本发明提供了 PDGFR β 特异性的拮抗剂,展示了 PDGFR β 在血管发生(包括支持肿瘤生长和存活的血管发生中)的作用,并且提供了治疗肿瘤和血管发生性疾病的方法。本发明还展示了同时抑制经由 PDGFR β 和 VEGFR 的信号转导的优势。

发明内容

[0008] 本发明提供了针对 PDGFR β 介导的信号转导的 PDGFR β 特异性拮抗剂。在本发明的一种实施方式中,PDGFR β 特异性拮抗剂是与血小板衍生生长因子受体- β (PDGFR β) 特异性结合的 PDGFR β 特异性拮抗剂。一种此类抗体具有在 CDRH1 上与 SEQ ID NO:20;在 CDRH2 上与 SEQ ID NO:22;在 CDRH3 上与 SEQ ID NO:24;在 CDRL1 上与 SEQ ID NO:28;在 CDRL2 上与 SEQ ID NO:30;以及在 CDRL3 上与 SEQ ID NO:32 至少大约 90%同源或大约 90%同一的互补决定区。另一此类抗体包含 SEQ ID NO:18 的重链可变结构域氨基酸序列和 SEQ ID NO:26 的轻链可变结构域氨基酸序列。此类抗体的另一实施方式具有在 CDRH1 上与 SEQ ID NO:4;在 CDRH2 上与 SEQ ID NO:6;在 CDRH3 上与 SEQ ID NO:8;在 CDRL1 上与 SEQ ID NO:12;在 CDRL2 上与 SEQ ID NO:14;以及在 CDRL3 上与 SEQ ID NO:16 至少大约 90%同源或大约 90%同一的互补决定区。另一此类抗体包含 SEQ ID NO:2 的重链可变结构域氨基酸序列和 SEQ ID NO:10 的轻链可变结构域氨基酸序列。本发明还包括与上述抗体之一相同或重叠的表位结合的 PDGFR β 特异性抗体。

[0009] 本发明的抗体可以是嵌合的、人源化的或人的。本发明的抗体还可以是抗原结合片段,例如,单链抗体,Fab 和 F(ab')₂ 片段,单链 Fvs 和单结构域抗体。抗体还可包括双抗体和三链抗体。此外,抗体可以是双功能的。

[0010] 本发明还提供了编码此类抗体的经分离的多核苷酸、表达载体和生产抗体的宿主细胞。

[0011] 本发明提供了在哺乳动物中调节血小板衍生生长因子受体- β (PDGFR β) 的活性的方法,所述方法包括向哺乳动物施用有效量的 PDGFR β 特异性拮抗剂。在本发明的一种实施方式中,用有效量的 PDGFR β 特异性拮抗剂来抑制哺乳动物中的血管发生。在另一实施方式中,用有效量的 PDGFR β 特异性拮抗剂来降低哺乳动物中的肿瘤生长。PDGFR β 特异性拮抗剂可以是与 PDGFR β 结合的抗体或者能结合 PDGFR β 或 PDGFR β 配体并且降低或阻断 PDGFR β 介导的信号转导的任何其它物质。治疗方法还可包含共施用 VEGFR 拮抗剂。备选地,治疗方法可利用既是 PDGFR β 特异性拮抗剂又是 VEGFR 拮抗剂的物质,例如,双特异性抗体。

[0012] 根据本发明,对肿瘤和血管发生性病况的治疗还可包括施用抗肿瘤剂,例如化疗或放疗。

附图简述

[0013] 图 1 描述了对抗 PDGFR β 抗体 1B3 的定量受体结合和阻断检验。(A) 将经纯化的 Fab 片段或全长 1B3IgG 加入到涂有 mPDGFR β /Fc 的平板(1 μ g/ml),在 RT 下孵育 1 小时。使用山羊抗人- κ 抗体-HRP 来检测与平板结合的抗体。(B) 将 1B3 抗体或 Fab 先与固定量的 mPDGFR β /Fc(50ng) 混合,在 RT 下孵育 30 分钟。然后将混合物转移至预先涂有 PDGF-BB(0.5 μ g/ml) 的平板,并在 RT 下孵育 1 小时。用山羊抗人 Fc 抗体-HRP 缀合物来检

测与平板结合的 mPDGFR β /Fc。IMC-1121 是针对人 VEGFR2 的抗体。数据代表三份重复样品的平均 $\pm$ SD。

[0014] 图 2 描述了对 PDGF-BB 诱导的受体磷酸化和下游信号传导分子 MAPK 和 Akt (抗体 1B3 与细胞表面 PDGFR β 的结合导致的) 的抑制。(A) 对 NIH/3T3 (成纤维细胞)、D11 (Lewis 肺癌)、4T1 (乳腺癌)、B16 (黑素瘤) 和 H5V (经 PmT 转化的内皮细胞) 细胞 (与抗 PDGFR β 抗体 1B3 和抗人 Fc 抗体 -FITC 缀合物一起孵育) 的 FACS 分析。(B) 对 NIH-3T3 细胞中 PDGF-BB 诱导的受体磷酸化的抑制。(C) 对 D122 细胞中 PDGF-BB 诱导的受体磷酸化的抑制。(D) 对 D122 细胞中 p44/42MAP 激酶和 AKT 的 PDGF-BB 刺激磷酸化的抑制。

[0015] 图 3 显示了用抗 mPDGFR β 抗体 1B3 进行处理对人异种移植肿瘤生长的体内影响。六种异种移植模型, SK-OV-3、OV-CAR-8、BxPC-3、OV-CAR-5、Caki-1 和 NCI-H460 (分别地, A 至 F) 被用于检查 1B3 在无胸腺裸鼠中对异种移植肿瘤的影响。肿瘤 ($\sim 250-300\text{mm}^3$) 建立的小鼠被随机分组, 并通过以指定的剂量每周两次腹膜内注射, 用 1B3、正常人 IgG 或盐水进行处理 (除了 BxPC-3 模型之外, 其中对小鼠进行每周三次处理)。每周测量两次肿瘤体积, 其被表示为平均 $\pm$ SEM。* 1 表示由于严重疾病损失了一只小鼠。1B3 与小鼠的 PDGFR β 结合, 而不与人的 PDGFR β 结合。因此, 观察到的对处理的应答是对宿主细胞的刺激的抑制的结果。

[0016] 图 4 显示了用抗 mPDGFR β 抗体 1B3 和抗 mVEGFR2 抗体 DC101 进行的组合治疗处理对人异种移植肿瘤生长的体内影响。在雌性无胸腺 (nu/nu) 小鼠中建立 BxPC-3 (A) 或 5×10^6 NCI-H460 (B) 的皮下异种移植。当肿瘤达到 $\sim 300-350\text{mm}^3$, 将小鼠随机分入四组 ($n = 12$), 并用 USP 盐水、40mg/kg 的 1B3、40mg/kg 的 DC101 或 40mg/kg 的 1B3 加 40mg/kg 的 DC101 一周处理三次。对肿瘤体积进行一周两次的测量, 其被表示为平均 $\pm$ SEM。* 1 表示由于严重疾病损失了一只小鼠。1B3 与小鼠的 PDGFR β 结合, 而不与人的 PDGFR β 结合。DC101 与小鼠的 VEGFR2 结合, 而不与人的 VEGFR2 结合。因此, 观察到的对处理的应答是对宿主细胞的刺激的抑制导致的。

[0017] 图 5 展示了用 1B3、DC101 或 DC101 加 1B3 处理之后对人异种移植物的免疫组织化学分析的结果。处理后第 34 天 (BxPC3 模型, 图 A 至 C) 或第 50 天 (NCI-H460 模型, 图 D 至 F), 处死来自每组的六只小鼠, 对肿瘤加以操作, 以用于 IHC 分析。对肿瘤切片, 针对血管 (抗 CD31) 和周细胞 SMC 覆盖 (α -SMA, 图 B 和 E) 进行双染色。获得了来自每份切片的肿瘤核心和肿瘤周边的五份数码免疫荧光照片, 针对总 CD31⁺ 血管 (图 A 和 D)、 α -SMA⁺ 血管 (图 B 和 E) 以及双重 CD31⁺/ α -SMA⁺ 在总 CD31⁺ 血管上的百分比 (图 C 和 F) 加以定量。用两种不同的定量方法来测量各肿瘤切片的多血管状态程度: 血管密度 (血管数量/ mm^3) 和血管面积百分比 (总肿瘤面积上的 % 血管面积)。就统计学分析而言, 用双因素 ANOVA 及接着的 Fisher's LSD 方法来进行多重比较 (Sigma Stat 3.1 Systat Software, Inc., Point Richmond, CA)。*: 较之盐水组 $P < 0.05$ 。空心条带是肿瘤周边; 实心条带是肿瘤核心。

[0018] 图 6 描述了 PDGFR β 特异性人抗体 2C5 针对人 PDGFR β 和鼠 PDGFR β 的受体结合和配体 (PDGF-BB) 阻断。将结合和配体阻断与 PDGFR β 特异性抗体 1B3 (其仅与鼠 PDGFR β 结合) 相比较。

[0019] 图 7 是 Western 印迹结果, 其展示了抗 PDGFR β 抗体 2C5 在人 CaKi-1 肿瘤细胞中对配体 (PDGF-BB) 诱导的 PDGFR β 磷酸化的抑制。抗体还抑制 Akt 和 P44/42 的磷酸化。

[0020] 图 8 显示了 Western 印迹结果,其展示了抗 PDGFR β 抗体 2C5 在小鼠 NIH-3T3 和 D122 细胞系中对配体 (PDGF-BB) 诱导的 PDGFR β 的磷酸化的抑制。

[0021] 图 9 描述了在用抗 PDGFR β 抗体 1B3 (特异于鼠 PDGFR β) 和 / 或 2C5 (其与人和鼠 PDGFR β 都能结合) 处理过的裸鼠中六种皮下人异种移植物肿瘤的生长。

[0022] 图 10 描述了在用抗 PDGFR β 抗体 2C5 (其与人和鼠 PDGFR β 都能结合) 和鼠 VEGFR-2 特异性抗体 (DC101) 处理过的裸鼠中六种皮下人异种移植物肿瘤的生长。

[0023] 图 11 显示了基于细胞的迁移检验的结果,这显示 2C5 抑制经 PDGF-BB 刺激的细胞迁移。

[0024] 图 12 显示了 2C5/ 化疗组合和 2C5/ 化疗 /DC101 疗法在肿瘤异种移植物模型中的抗肿瘤活性。

[0025] 图 13 显示了 2C5/3G3 和 2C5/1E10 组合疗法在肿瘤异种移植物模型中的抗肿瘤活性。

[0026] 图 14 显示了 2C5 对 PDGFR β 、PDGF-BB、VEGF 和 FGF 表达的影响。

[0027] 图 15 显示了 2C5 与 PDGFR β 结构域的结合。

[0028] 图 16 显示了 1B3 的可变重链和可变轻链的 DNA 和氨基酸序列,其中 CDR 被下划线示出。

[0029] 图 17 显示了 2C5 的可变重链和可变轻链的 DNA 和氨基酸序列,其中 CDR 被下划线示出。

发明详述

[0030] 本发明提供了特异于 PDGFR β 的抗体或其片段。本发明的抗体包括与 PDGFR β 的结构域 1 和 2 特异性结合的那些。本发明的抗体包括 2C5 和 1B3。

[0031] 本发明还提供了用上文所述的抗体以及用抗 PDGFR β 拮抗剂组合 VEGFR 拮抗剂治疗肿瘤和血管发生疾病的组合物和方法。特别地,本发明提供了通过抗肿瘤和抗血管发生机制对癌症治疗的 PDGF-B/PDGFR β 信号转导途径的特异性靶向。此外,本发明提供了血管发生疾病的疗法。

[0032] 因此,本发明提供了特异于 PDGFR β 的血小板衍生生长因子受体 β (PDGFR β) 拮抗剂。PDGFR β 特异性的拮抗剂是优先抑制 PDGFR β 介导的信号转导的生物分子。根据本发明,PDGFR β 特异性拮抗剂以是对 PDGFR α 的抑制至少 3x 或者至少 5x 或者至少 10x 高来介导对 PDGFR β 介导的信号转导的抑制。测定 PDGFR β 特异性抑制的一种方法是将对 PDGF 诱导的对经工程化以表达 PDGFR β (而非 PDGFR α) 的细胞活化的抑制以及对 PDGF 诱导的对经工程化以表达 PDGFR α (而非 PDGFR β) 的细胞活化的抑制加以比较。另一方法是对使用优先活化 PDGFR β 的 PDGF (例如 PDGF-DD) 和优先活化 PDGFR α 的 PDGF (例如 PDGF-AA) 进行的 PDGF 诱导活化的抑制加以比较。在本发明的一种实施方式中,PDGFR β 特异性拮抗剂是与 PDGFR β 结合的抗体。在本发明的另一实施方式中,PDGFR β 特异性拮抗剂是小分子。

[0033] 靶向 VEGF 受体的抗血管发生手段逐渐因为对抗肿瘤疗法有效而被接受。例如,抗 VEGF 抗体被批准用于治疗某些肿瘤。此外,在鼠异种移植物模型中,抗小鼠 VEGF2 抗体阻断 VEGF/VEGFR2 相互作用,抑制 VEGF 刺激的增殖以及血管内皮细胞的存活。但是,虽然用

抗 VEGFR2 抗体处理导致小鼠中移植的多种肿瘤生长的显著延迟,但是肿瘤的消退却少见。此外,积累的证据表明,在长期治疗期间,一些肿瘤可能变得对 VEGFR2 阻断更不敏感(或者甚至获得抗性)。

[0034] 根据本发明,PDGFR β 特异性抑制显著增强了 VEGFR 拮抗剂抗血管发生活性和抗肿瘤活性二者。因此,本发明提供了通过施用 PDGFR β 特异性拮抗剂以及任选地 VEGFR 拮抗剂来抑制血管发生和降低或抑制肿瘤生长的改进方法。拮抗剂是阻断、调节或妨碍受体酪氨酸激酶(即 PDGFR β 或 VEGFR)介导的信号传导的分子,其包括但不限于抗体、小分子、蛋白、多肽、配体模拟物、反义寡脱氧核苷酸、反义 RNA、小抑制性 RNA、形成三螺旋的核酸、显性负突变体和可溶受体表达。此外,PDGFR β 特异性拮抗剂和 VEGFR 拮抗剂可组合进单种化合物,例如但不限于双特异性抗体。

[0035] PDGFR β 和 VEGF 受体被分类进相同的含激酶插入结构域的受体的家族。但是 VEGF 受体在其细胞外结构域具有 7 个免疫球蛋白样环,与 PDGFR α 和 PDGFR β 中的 5 个不同。此外,VEGF 受体具有更长的激酶插入。来自人和其它哺乳动物的 PDGFR β 和 VEGFRs 的氨基酸序列和编码它们的核酸序列是本领域公知的。人 PDGFR β 的一个非限制性例子的序列由 GenBank 登录号 NM_002609 所提供。核苷酸序列编码具有可切割信号序列的蛋白。成熟蛋白包括含有大约 499 个氨基酸的细胞外部分、23 个氨基酸的跨膜区域以及大约 552 个氨基酸的细胞内部分。VEGFR 序列的非限制性例子包括 NM_002019(人 VEGFR1/F1t1)、NM_002253(人 VEGFR2/KDR/F1k1) 和 NM_182925(人 VEGFR3/F1t4)。这些受体中每种 of 细胞外结构域的 Ig 样结构域结构、跨膜结构域的定位以及细胞内区域(包括酪氨酸激酶结构域)都是本领域公知的。

[0036] 本发明的抗体结合 PDGFR β 。在本文中使用时,“抗体”指免疫球蛋白(Ig)分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分或变体。抗体含有与抗原特异性结合的一个或多个抗原结合位点。抗体包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体和人源化抗体。免疫活性部分包括单价和二价片段,例如 Fv、单链 Fv(scFv)、单可变结构域(sVD)、Fab、Fab'和 F(ab')₂ 片段。免疫活性部分可被包括进多价形式,例如,双抗体、三链抗体等。抗体还包括在噬菌体上展示的抗原结合片段和抗体缀合物。

[0037] “经分离的抗体”是这样的抗体,其(1)已从组分混合物部分、基本或完全纯化;(2)已被鉴定并且从其天然环境的组分中分离和/或回收;(3)是单克隆抗体;(4)不含来自同一物种的其它蛋白;(5)由来自不同物种的细胞表达;或(6)天然不存在。其天然环境的污染性组分是可能干扰抗体的诊断或治疗用途的材料,这可包括酶、激素和其它蛋白性或非蛋白性溶质。经分离的抗体的例子包括已使用 PDGFR β 进行过亲和性纯化的抗 PDGFR β 抗体、已通过杂交瘤或其它细胞系体外制备的抗 PDGFR β 抗体、自文库(例如噬菌体文库)分离的人抗 PDGFR β 以及源于转基因小鼠的人抗 PDGFR β 抗体。

[0038] 通常,天然存在的抗体分子包括两条相同的重链和两条轻链。每条轻链通常通过链间二硫键与重链共价相连,两条重链进一步通过铰链区的多个二硫键相互之间相连。各链折叠为具有相似大小(大约 110–125 个氨基酸)和结构但是具有不同功能的结构域。轻链包含一个可变结构域(V_L)和一个恒定结构域(C_L)。重链包含一个可变结构域(V_H)以及三个或四个恒定结构域(C_{H1}、C_{H2}、C_{H3}和 C_{H4})(取决于抗体的种类和同种型(isotype))。在小鼠和人中,同种型是 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,其中 IgA 和 IgG 被进一步再分为亚类或亚

型。由 V_L 和 V_H 结构域构成的抗体的部分被称为“Fv”，其组成抗原结合位点。单链 Fv (scFv) 是在一条多肽链上含有 V_L 结构域和 V_H 结构域的经工程化蛋白，其中，一个结构域的 N 末端与另一结构域的 C 末端通过弹性接头相连。“Fab”指由 V_L - C_L (即，轻链) 和 V_H - C_H1 (也称为“Fd”) 构成的抗体的部分。

[0039] 本发明的抗体包括单可变结构域 (sVDs) 和包含 sVDs 的抗原结合蛋白。sVD 结合位点可从抗原特异性 Fv 区域 (其既包含 V_H 又包含 V_L 结构域) 获得。通常显示，Fv 区域的结合亲和性和特异性主要是可变结构域之一贡献的。备选地，scFv 可直接获得。sVDs 的直接来源包括天然表达仅含 V_H 结构域的抗体的哺乳动物 (例如骆驼类动物)。此外，可构建仅表达单可变结构域的噬菌体展示文库。例如，人结构域抗体噬菌体展示文库可从 Domantis (Cambridge, UK) 商业获得。

[0040] 抗体可变结构域在抗体相互间显示出相当高的氨基酸序列变化性，特别是在抗原结合位点的地方。被称为“互补决定区”(CDRs) 的三个区域在每种 V_L 和 V_H 中都被发现。抗体的 CDRs 通常被称为“高变区”。

[0041] “Fc”是包含成对重链恒定结构域的抗体部分的名称。在 IgG₁ 抗体中，例如，Fc 包含 C_H2 和 C_H3 结构域。IgA 或 IgM 抗体的 Fc 还包含 C_H4 结构域。Fc 与 Fc 受体结合、对补体介导的细胞毒性的活化和抗体依赖性细胞毒作用相关。对于是多个 IgG 样蛋白的复合体的天然抗体 (例如 IgA 和 IgM) 来说，复合体形成需要 Fc 恒定结构域。

[0042] 最后，“铰链”区域将抗体的 Fab 和 Fc 部分分开，提供了 Fab 相对于相互之间以及相对于 Fc 的可动性，并且包括了多个二硫键用于两条重链的共价连接。因此，本发明的抗体包括但不限于与抗原特异性结合的天然存在的抗体、双价片段 (例如 (Fab')₂)、单价片段 (例如 Fab)、单链抗体、单链 Fv (scFv)、单结构域抗体、多价单链抗体、双抗体、三链抗体等。抗体片段还包括具有与本发明抗体的可变或高变区的氨基酸序列基本相似的氨基酸序列的多肽。基本相同的氨基酸序列在本文中被定义为：按照 Pearson 和 Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448 (1988) 的 FASTA 搜索方法进行测定时，与被比较的氨基酸序列有至少 70%，至少大约 80%，至少大约 90%，至少大约 95% 或者至少大约 99% 同源性或同一性的序列。

[0043] 本发明包括“嵌合”抗体。此类抗体通常包含一种抗体的可变结构域和另一种抗体的恒定结构域。典型地，为使得针对抗体的宿主免疫应答最小化，以及为了增强针对抗体靶标的宿主应答 (通过保留抗体效应器功能)，嵌合抗体的恒定结构域取自于与嵌合抗体将被施用至的物种相同的物种。

[0044] 本发明还包括“人源化”抗体。构建人源化可变结构域，其中包含一个或多个非人来源的互补决定区 (CDRs) 的氨基酸序列被植入至人构架区 (FRs)。例如，见：Jones, P. T. 等人, 1996, Nature 321, 522-25; Riechman, L. 等人, 1988, Nature 332, 323-27 和 Queen 等人的美国专利 No. 5, 530, 101。人源化构建体对消除不利的免疫原性特征特别有用，例如，当想要用来自非人来源的抗原结合结构域在人类中进行治疗时。可变结构域具有高度的结构同源性，这允许容易地在可变结构域中鉴定出对应于 CDRs 和 FRs 的氨基酸残基。见，例如 Kabat, E. A., 等人, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 第 5 版 National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD。因此，可能直接参与抗原结合的氨基酸易于被鉴定出。此外，已经开发了一

些方法,用于保持或增强针对包含植入的 CDRs 的人源化结合结构域抗原的亲合性。一种方法是在接受体的可变结构域中包括进影响 CDR 区域构象的外来构架残基。第二种方法是将外来 CDRs 植入到与外来可变区具有最接近的同源性的人可变结构域上。Queen, C. 等人, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-33。通过首先使用重叠引物(包括想要的 CDR 序列)扩增各 FR 序列,并在随后的扩增反应中,将得到的基因区段连结起来,CDRs 最易于被植入到不同的 FRs 上。将 CDR 植入到不同的可变结构域上还可包括对氨基酸序列中 CDR 相邻的氨基酸残基或者经折叠的可变结构域结构中背向 CDR 包装的氨基酸残基的取代,所述氨基酸残基能影响 CDR 的构象。本发明的人源化可变结构域因此包括包含一种或多种非人 CDRs 的人结构域以及其中制造了额外取代或替换以保持或增强结合特性的此类结构域。

[0045] 本发明的抗体还可利用被制为具有更少免疫原性的可变结构域,这是通过替换表面暴露的残基以使得抗体对免疫系统呈现为自体物质来实现的(Padlan, E. A., 1991, Mol. Immunol. 28, 489-98)。已经通过该工艺对抗体进行了修饰,而没有亲和性损失(Roguska 等人, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 969-973)。由于氨基酸残基在抗原结合位点附近的内部堆积保持不变,亲和性也得以保持。就降低免疫原性的目的根据本发明对表面暴露的残基进行的取代并不意味着对 CDR 残基或影响结合特性的邻近残基的取代。

[0046] 通常优选地,利用本质上是人的可变结构域。人抗体包含人 V_H 和 V_L 构架区(FWs)以及人互补决定区(CDRs)。优选地,整个 V_H 和 V_L 可变结构域都是人的或者源于人序列。抗体可直接从人细胞获得,例如通过产生人杂交瘤来实现。

[0047] 备选地,可从转基因动物获得人抗体,其中已经向所述转基因动物中引入了未经重排的人 Ig 基因区段,并且其中,内源小鼠 Ig 基因已被失活(综述见 Brüggenmann and Taussig, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8, 455-58)。优选的转基因动物含有非常大的连续(contiguous) Ig 基因片段,其大小超过 1Mb(Mendez 等人, 1997, Nature Genet. 15, 146-56),但是可从包含更小基因座的转基因动物获得具有中等亲和性的人 Mabs(见,例如, Wagner 等人, 1994, Eur. J. Immunol. 42, 2672-81; Green 等人, 1994, Nature Genet. 7, 13-21)。

[0048] 还可从抗体 V_H 和 / 或 V_L 结构域的文库获得人抗体。例如,可从人基因组序列或从表达经生产性重排的可变区基因的外周血淋巴细胞获得可变结构域文库。此外,人基因文库可以是合成的。在一种实施方式中,可产生这样的可变结构域文库,其包含具有一个或多个下述 CDRs 的人构架区,所述 CDRs 经合成以包括进随机或部分随机序列。例如,可产生这样的人 V_H 可变结构域文库,其中,成员是人 V_H 基因区段和针对 CDR3H 区域的合成序列(即,合成的 D_H - J_H 基因区段)编码的。类似地,人 V_L 可变结构域可由人 V_L 基因区段和针对 CDR3L 区域的合成序列(即,合成的 J_L 基因区段)编码。在另一实施方式中,人构架可以是合成的,只要它们具有源于已知的人抗体序列或人序列亚组的共有序列即可。在另一备选方案中,通过从表达经重排的可变结构域的人淋巴细胞扩增来获得一个或多个 CDRs,然后将其组合进特定的人构架。

[0049] 为筛选可变结构域的文库,通常利用噬菌体展示文库,其中,人重链和轻链可变结构域的组合被展示于丝状噬菌体表面(见,例如, McCafferty 等人, 1990, Nature 348, 552-54; Aujame 等人, 1997, Human Antibodies 8, 155-68)。可变结构域的组合典型地以 Fabs 或 scFvs 的形式展示于丝状噬菌体上。筛选文库,选出携带有具有想要的抗原结合特

性的可变结构域的组的噬菌体。优选的单个结构域和可变结构域组合展示出针对选定抗原的高亲和性并且针对其它相关抗原几乎没有交叉反应性。通过筛选非常大的抗体片段库（见，例如 Griffiths 等人，1994，EMBO J. 13, 3245-60），分离出高亲和性结合结构域的良好多样性，其中很多预计具有针对想要的抗原的亚纳摩尔亲和性。

[0050] 在生理免疫应答中，对表达的抗体基因的突变和选择导致产生具有针对其靶标抗原的高亲和性的抗体。类似地，可对并入本发明抗体的 V_H 和 V_L 结构域进行体外或体内突变以及筛选流程，以修饰亲和性和 / 或特异性。因此，本发明的结合结构域包括这样的结合结构域，已通过直接突变、亲和性成熟方法或链改组对 CDRs 和 / 或 FW 区域进行了修饰，从而改进了其结合特性。应当理解，作为单结构域抗体结合的主要决定子的氨基酸残基可以在 Kabat 定义的 CDRs 内，但是也可包括其它残基。对于 sVDs 而言，对抗原结合来说重要的残基也可潜在地包括或者将位于 V_H - V_L 异源二聚体交界处的氨基酸。通常，用噬菌体展示来筛选此类突变体，以鉴定出具有想要的结合特性的那些（见例如 Yang 等人，J. Mol. Biol., 254 : 392-403 (1995)）。可以多种方法进行突变。一种方法是随机化各残基或残基组合，以使得在其它方面相同的序列群体中，在特定位置发现全部二十种氨基酸或其子集。备选地，可通过易错 PCR 方法，在 CDR 残基的范围上诱导突变（见，例如 Hawkins 等人，J. Mol. Biol., 226 : 889-896 (1992)）。例如，可在大肠杆菌 (*E. coli*) 的突变体菌株中传播含有重链和轻链可变区基因的噬菌体展示载体（见，例如，Low 等人，J. Mol. Biol., 250 : 359-368 (1996)）。这些诱变方法阐述了本领域技术人员已知的很多方法。

[0051] 本发明还包括从非免疫球蛋白支架改造来的抗原结合蛋白。例如，源于金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 蛋白 A 的免疫球蛋白结合结构域的 affibody 没有二硫键并且展示出可逆折叠。另一例子是纤连蛋白，其具有抗体样结构并且展示出 CDR 样环。与抗体相反，纤连蛋白结构域结构不依赖于二硫键，但仍展示出高的热力学稳定性。可通过例如在特定位点对密码子加以多样化，并针对与想要的抗原结合的筛选，来将结合位点改造进此类支架。密码子可在环、扁平表面、腔或这些位置的组合中被随机化。此外，可插入肽序列，通常是在环中。可使用本领域公知的筛选技术的选择，分离得到的文库的靶标结合变体，所述技术不限于噬菌体展示、核糖体展示、细菌或酵母表面展示等。

[0052] 对于意欲用于治疗抗原结合蛋白而言，可获得多种策略以最小化潜在的免疫原性。可利用人支架，并且可例如通过 PEG 化或 T 细胞表位工程化（即，最小化 T- 细胞反应序列）来最小化免疫原性。

[0053] 通常可以比免疫球蛋白型的蛋白更经济地生产来自非免疫球蛋白支架的抗原结合蛋白。例如，二硫键或游离半胱氨酸不存在允许在细菌胞质的还原环境中表达功能性分子，这通常能提供比周质表达更高的产率，并且比体外重折叠更方便。Binz, H. K. 等人 (Nat. Biotech. 23 : 1257-68, 2005) 公开了多种此类抗原特异性结合蛋白以及开发它们的技术。

[0054] 如前文所述，可提供双特异性抗体作为共施用的替代方案。存在多种双特异性抗体，它们被设计为包括多种想要的特性。例如，双特异性双抗体具有最小的尺寸。具有四个抗原结合位点（每种结合特异性两个）的双特异性载体针对每种靶标的结合亲和力与对应的天然抗体相似。某些双特异性抗体包括进了 Fc 区域，由此保留了天然抗体的效应器功能（例如，补体依赖性细胞毒性 (CDC) 和抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC)）。WO01/90192 描述了

IgG 样四价抗体。WO2006/020258 描述了一种四价抗体,其中包括了两种双抗体并且保留了效应器功能。可利用针对双特异性抗体的抗原结合位点的多种抗原结合抗体片段。这些包括但不限于 Fvs、scFv 和 sVD。

[0055] 阻断 PDGFR β 介导的信号转导的另一途径是经由 PDGFR β 特异性小分子抑制剂来进行。小分子指小的有机化合物,例如杂环、肽、糖、类固醇等。小分子调节剂优选具有小于大约 2000 道尔顿的分子量,优选小于大约 1000 道尔顿,更优选小于大约 500 道尔顿。可对化合物加以修饰,以增强疗效、稳定性、药物相容性等。小分子抑制剂包括但不限于阻断 ATP 结合结构域、底物结合结构域或受体酪氨酸激酶的激酶结构域的小分子。在另一实施方式中,小分子抑制剂与 PDGFR β 的配体结合结构域结合,并阻断 PDGFR β 配体的对受体的活化。可使用高通量生物化学、酶促或基于细胞的检验,针对抑制活性,对小分子文库加以筛选。可对检验加以配置,以检测测试化合物抑制 PDGFR β 而非 PDGFR α 的能力。

[0056] 反义寡脱氧核苷酸、反义 RNAs 和小抑制性 RNAs (siRNA) 提供了 mRNA 的靶向降解,由此阻止了蛋白的翻译。因此,PDGFR β 的表达可被抑制。反义寡核苷酸阻遏基因表达的能力在超过 25 年前就被发现了 (Zamecnik 和 Stephenson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75 : 280-284 (1978))。反义寡核苷酸与 mRNA 和前 mRNAs 配对,其可有效干扰 RNA 加工和信息翻译的若干步骤,包括剪接、聚腺苷化、输出、稳定性和蛋白翻译 (Sazani 和 Kole, J. Clin. Invest. 112 : 481-486 (2003))。但是,两种最有用并且广泛使用的反义策略是 mRNA 或前 mRNA 经由 RNaseH 的降解和经由靶向异常剪接连接处进行的剪接改变。RNaseH 识别 DNA/RNA 异源双链体,并且在 DNA 寡核苷酸的 5' 和 3' 末端之间大约中间的地方切割 RNA。

[0057] 先天 RNA 介导的机制可调控 mRNA 稳定性、信息翻译和染色质组织化 (Mello 和 Conte Nature. 431 : 338-342, 2004)。此外,外源引入的长双链 RNA (dsRNA) 在多种低等生物中是基因沉默的有效工具。但是,在哺乳动物中,长 dsRNAs 引起与病毒感染的作用和干扰素产生相关的高度毒性应答 (Williams, Biochem. Soc. Trans. 25 : 509-513, 1997)。为避免这种应答,Elbashir 和同事 (Elbashir 等人, Nature 411 : 494-498, 2001) 首先使用了用 19-mer 双链体构成的 siRNAs,其每条链上有 5' 磷酸和 2 碱基的 3' 突出端,其引入细胞时选择性降解靶向 mRNAs。

[0058] 干扰性 dsRNA 在哺乳动物中的作用通常涉及两个酶促步骤。首先,Dicer——RNase III 型的酶,将 dsRNA 切割为 21-23mer 的 siRNA 区段。然后,RNA 诱导的沉默复合体 (RISC) 解开 RNA 双链体,将一条链与关联 mRNA 中的互补区域配对,在 siRNA 链 5' 末端上游 10 个核苷酸处启动切割 (Hannon, Nature. 418 : 244-251, 2002)。19-22mer 范围内的短的化学合成的 siRNAs 不需要 Dicer 步骤,其可直接进入 RISC 机制。应当注意,RNA 双链体的任何链可潜在地装载到 RISC 复合体上,但是寡核苷酸的组成可影响到对链的选择。因此,为实现对特定 mRNA 靶标的选择性降解,双链体应当偏好于装载反义链组分,这通过在其 5' 末端具有相对弱的碱基配对来实现 (Khvorova, Cell. 115 : 209-216, 2003)。外源 siRNAs 可作为合成的寡核苷酸来提供,或者可从质粒或病毒载体表达 (Paddison 和 Hannon, Curr. Opin. Mol. Ther. 5 : 217-224, 2003)。在后一情况下,前体分子通常作为含有 4-8 个核苷酸的环和 19-30 个核苷酸的茎的短发夹 RNAs (shRNAs) 被表达,然后这些被 Dicer 切割,形成功能性 siRNAs。

[0059] 用于抑制 PDGFR β 介导的信号转导的其它途径包括但不限于:与受体结合但不活

化受体的 PDGF 模拟物以及降低 PDGFR β 水平或活性的基因或多核苷酸的表达,例如三螺旋抑制剂和显性负 PDGFR β 突变体。、

[0060] 将要根据本发明使用的 RTK 拮抗剂(即,PDGFR β 特异性拮抗剂,VEGFR 拮抗剂)展示出下述性质中的一种或多种:

[0061] 1) 拮抗剂与 RTK(即 PDGFR β 、VEGFR)的外部结构域结合,并且抑制配体结合。可例如通过直接结合检验,使用纯化的或膜结合受体,来测定抑制。。

[0062] 2) 拮抗剂中和受体。配体与受体的外部细胞外结构域的结合(例如,PDGF-BB 或 PDGF-DD 与 PDGFR β ;VEGF 或 PlGF 与 VEGFR)刺激受体和下游信号传导分子(包括 MAPK、Akt 和 IRS-1)的自身磷酸化。对受体的中和包括对信号转导正常相关的那些活性中的一种或多种加以抑制、减小、失活和/或破坏。可使用例如组织、培养的细胞或经纯化的细胞组分,体内、离体或体外测定中和。因此,中和 PDGFR β 和/或 VEGFR 具有多种作用,包括对生长(增殖和分化)、血管发生(血管募集、侵入和转移)和细胞移动和转移(细胞粘附和侵入)的抑制、减小、失活和/或破坏。

[0063] 受体中和的一种量度是对受体的酪氨酸激酶活性的抑制。可使用公知方法来测定酪氨酸激酶抑制;例如,通过测量重组激酶受体的自身磷酸化水平和/或天然或合成的底物的磷酸化。因此,本发明的上下文中,磷酸化检验可用于测定中和受体。可例如,在 ELISA 检验中或在 western 印迹上使用特异于磷酸酪氨酸的抗体,来检测磷酸化。用于酪氨酸激酶活性的一些检验被描述于 Panek 等人, J. Pharmacol. Exp. Thera. 283 :1433-44(1997) 和 Batley 等人, Life Sci. 62 :143-50(1998) 中。本发明的抗体导致应答于配体的细胞中 PDGFR β 的酪氨酸磷酸化减少至少大约 30%,至少大约 50%,至少大约 75%,优选至少大约 85%,更优选至少大约 90%。

[0064] 受体中和的另一量度是对受体的下游底物或其它信号转导组分的磷酸化的抑制。因此,MAPK、Akt、IRS-1 和其它细胞组分磷酸化的水平可被测量。磷酸化的减少为至少大约 40%,其可以是至少大约 60%或者至少大约 80%。

[0065] 此外,可利用用于检测蛋白表达的方法来测定受体中和,其中,被测量的蛋白受到受体酪氨酸激酶活性的调控。这些方法包括用于检测蛋白表达的免疫组织化学(IHC)、用于检测基因扩增的荧光原位杂交(FISH)、竞争性放射性配体结合测定、固体基质印迹技术(例如 Northern 和 Southern 印迹)、逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)和 ELISA。见,例如,Grandis 等人, Cancer, 78 :1284-92(1996);Shimizu 等人, Japan J. Cancer Res., 85 :567-71(1994);Sauter 等人, Am. J. Path., 148 :1047-53(1996);Collins, Glia 15 :289-96(1995);Radinsky 等人, Clin. Cancer Res. 1 :19-31(1995);Petrides 等人, Cancer Res. 50 :3934-39(1990);Hoffmann 等人, Anticancer Res. 17 :4419-26(1997);Wikstrand 等人, Cancer Res. 55 :3140-48(1995)。离体检验也可用于测定受体中和。例如,可在抑制剂存在和不存在的条件下,使用经受体配体刺激的细胞系,通过促细胞分裂测定,观察受体酪氨酸激酶抑制。另一方法包括测试对经转染以表达 PDGFR β 的 RTK 表达肿瘤细胞或细胞系的生长的抑制。还可使用肿瘤模型,例如,注射进小鼠的人肿瘤细胞来观察抑制。

[0066] 本发明的拮抗剂不限于任何特定的受体中和机制。本发明的拮抗剂可在外部与细胞表面受体结合,阻断配体的结合以及随后经由受体相关酪氨酸激酶介导的信号转导,并且防止 PDGFR β 和信号转导级联系统中其它下游蛋白的磷酸化。

[0067] 3) 拮抗剂对受体进行下调节。细胞表面存在的 RTK 的量取决于受体蛋白产生、内在化和降解。细胞表面存在的受体的量可通过检测与受体结合的分子或受体的内在化来间接测量。例如,可通过接触细胞与受体特异性的经标记的抗体来测量受体内在化。然后膜结合的抗体被去除、收集和计数。通过裂解细胞和测量裂解物中的标记来测定内在化的抗体。

[0068] 另一方法是用抗 RTK 抗体或其它物质处理之后直接测量细胞上存在的受体的量,例如通过对针对 RTK 的表面表达染色的细胞进行荧光活化的细胞分选分析来实现。经染色的细胞被孵育于 37°C,测量随时间的荧光强度。染色群体中的部分可孵育于 4°C (受体内在化停止的条件下) 作为对照。

[0069] 可使用特异于 PDGFR β 并且不对测试抗体的结合阻断或与其竞争的不同抗体来检测和测量细胞表面 RTK。在某些实施方式中,应答于 RTK 拮抗剂的处理,细胞表面 RTK 降低至少大约 50%,或者至少大约 75%,或者至少大约 90%。通常可观察到至少 4 个小时的显著减少。

[0070] 对下调节的另一量度是细胞中存在的总受体蛋白的降低,其反应了内部受体的降解。因此,用本发明的抗体处理细胞 (特别是癌细胞) 导致总的细胞 RTK 的降低。在某些实施方式中,应答于 RTK 拮抗剂的处理,细胞表面 RTK 降低至少大约 50%,或者至少大约 75% 或者至少大约 90%。

[0071] 抗体特异性指抗体针对抗原特定表位的选择性识别。天然抗体,例如,是单特异性的。双特异性抗体 (BsAbs) 是具有两种不同抗原结合特异性或位点的抗体。当抗原结合蛋白具有超过一种特异性时,识别的表位可与单种抗原或与超过一种抗原结合。

[0072] 优选地,本发明的抗体以与受体的天然配体至少一样强的强度结合受体。抗原与抗体解离的平衡常数 (K_d) 所示的亲合性测量了抗原决定簇与抗体结合位点之间的结合强度。亲和力是对抗体和其抗原之间结合强度的量度。亲和力与表位与抗体上的其抗原结合位点之间的亲和性和抗体价都相关。价表示免疫球蛋白针对特定表位所具有的抗原结合位点的数量。例如,单价抗体针对特定表位具有一个结合位点。抗原决定簇或表位是给定抗体在抗原上结合的位点。 K 的典型值是 10^5 至 10^{11} 升 / 摩尔。任何小于 10^4 升 / 摩尔的 K 被认为代表着结合是非特异性的。 K 的倒数被称为 K_d 。(K_d 还可被称为解离常数)。 K_d 的值越小,抗原决定簇和抗体结合位点之间的结合强度就越强。

[0073] 本发明的抗体包括与 PDGFR β 特异性结合并且降低或抑制受体介导的信号转导的任何抗体。在某些实施方式中,抗体以小于大约 $10^{-8}M^{-1}$ 或小于大约 $10^{-9}M^{-1}$ 或小于大约 $3 \times 10^{-10}M^{-1}$ 的 K_d 与其各自受体结合。本文中公开和 / 或例示了特定的 PDGFR β 特异性抗体的非限制性例子。本发明的两种特定抗体的核酸序列和氨基酸序列,1B3 和 2C5 描述于表 1 中。

[0074] 在一种优选的实施方式中,抗体的一个、两个、三个、四个、五个或全部六个互补决定区 (CDR) 具有选自 1B3 的 CDR 中任何一种的序列。在一种备选的优选实施方式中,抗体的一个、两个、三个、四个、五个或全部六个互补决定区 (CDR) 具有选自 2C5 的 CDR 中任何一种的序列。

[0075] 在另一优选的实施方式中,本发明的抗体具有与 1B3 或 2C5 的重链可变区基本相同的重链可变区序列和 / 或与 1B3 或 2C5 的轻链可变区基本相同的轻链可变区序列。“基

本相同”表示氨基酸序列与参照序列至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一。

[0076] 在本发明的一种实施方式中,PDGFR β 特异性抗体包括包含 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的重链可变结构域和包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的轻链。在本发明的另一实施方式中,PDGFR β 特异性抗体包括包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重链可变结构域和包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列的轻链。本发明的 PDGFR β 特异性抗体还包括与前述抗体竞争的那些(即,与相同或重叠的表位结合的那些)。

[0077] 本发明还包括具有与前述抗体的可变或高变区的氨基酸序列基本相同的氨基酸序列的抗体。基本相同的氨基酸序列在本文中被定义为:通过 Pearson 和 Lipman(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-8(1998)) 的 FASTA 搜索方法测定时,与另一氨基酸序列具有至少 80%或者至少大约 90%或者至少大约 95%的同源性或同一性的序列。还预计,可在构架区中制造多种取代,特别是着眼于构架区中观察到的来自体内突变和选择的频繁突变。但是,还预计到,某些 CDR 位置处的突变也将被允许。例如,并非所有 CDR 氨基酸都与抗原直接接触。预计:在非接触 CDR 位置处的氨基酸改变,特别是保守改变,将影响结合亲和性,潜在地是以使其更好的方式,而非取消结合到一起。现在的技术允许本领域技术人员容易地通过设计或随机方式制造序列变化,并且测试他们的结果。保守氨基酸取代被定义为通过改变肽、多肽或蛋白或其片段中一个或数个氨基酸而产生的氨基酸组成中的改变。取代是用具有通常相似性质(例如,酸性、碱性、芳香性、大小、带正电荷或负电荷、极型、非极性)的氨基酸进行的,使得取代不实质上改变肽、多肽或蛋白特性(例如,电荷、等电点、亲和性、亲和力、构象、溶解度)或活性。可进行来用于此类保守氨基酸取代的典型取代可以是下述氨基酸组中进行的:甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)和异亮氨酸(I);天冬氨酸(D)和谷氨酸(E);丙氨酸(A)、丝氨酸(S)和苏氨酸(T);组氨酸(H)、赖氨酸(K)和精氨酸(R);天冬酰胺(N)和谷氨酰胺(Q);苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)。

[0078] 根据本发明,PDGFR β 特异性抗体可单独施用,与抗 VEGFR 抗体一起施用,或者可以是与 PDGFR β 和 VEGFR 两者均结合的双特异性抗体。VEGFR 特异性抗体的例子也被提供。如关于 PDGFR β 特异性抗体所讨论的一样,公开的 VEGFR 抗体是非限制性例子。

[0079] 本发明还提供了与 PDGFR β 的某些结构域结合的抗体。与 PDGFR β 的结构域 1 和 2 结合的抗体、与结构域 1 结合的抗体以及与结构域 2 结合的抗体均在本发明的范围内。2C5 是与 PDGFR β 的结构域 2 结合以及与结构域 1 和 2 结合的抗体的例子。

[0080] 本发明的抗体的每个可变结构域可以是完整的免疫球蛋白重链或轻链可变结构域,或者其可以是天然存在的结构域的功能等价物或突变体或衍生物,或者构建的合成结构域,例如,使用技术体外构建的(例如 WO 93/11236(Medical Research Council/Griffiths 等人)所公开的一种技术)。例如,可包括进对应于抗体可变结构域的、包括氨基酸取代、缺失、添加、氨基末端截短和羧基末端截短的结构域,使得这些突变提供保留了抗原结合活性的蛋白或蛋白片段。该重要的特性特征是每种可变结构域与互补可变结构域结合以形成抗原结合位点的能力。

[0081] 本发明的抗体和片段可与额外的氨基酸残基连接或融合。此类氨基酸残基可以是肽标签,可能用于协助分离。用于将抗体导航到特定器官或组织的其它氨基酸残基也可考虑。

[0082] 在本发明的另一方面,可将抗体或抗体片段以化学方式或生物合成方式连接至

抗肿瘤剂或可检测的信号产生剂,特别是当抗体被内在化的时候。与抗体连接的抗肿瘤剂包括破坏或损伤与抗体结合的肿瘤或抗体所结合的细胞环境中的肿瘤的任何物质。例如,抗肿瘤剂是毒剂,例如,化疗剂或放射性同位素。合适的化疗剂是本领域技术人员已知的,其包括蒽环霉素 (anthracyclines) (例如道诺霉素 (daunomycin) 和多柔比星 (doxorubicin))、甲氨蝶呤、长春地辛 (vindesine)、新制癌菌素 (neocarzinostatin)、顺铂 (cis-platinum)、苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、阿糖胞苷 (cytosine arabinoside)、5- 氟尿苷、美法仑 (melphalan)、蓖麻毒 (ricin) 和加利车霉素 (calicheamicin)。使用传统方法将化疗剂与抗体缀合 (见例如, Hermentin 和 Seiler, Behring Inst.Mitt.82 : 197-215(1988))。

[0083] 可检测的信号产生剂可体内和体外用于诊断目的。信号产生剂产生了可测量到的信号,可通过外部手段,通常是测量电磁辐射来对其加以检测。对于大部分情况而言,信号产生剂是酶或发色团,或者通过荧光、磷光或化学发光来发射光。发色团包括在紫外或可见区吸收光的染料,并且可以是酶催化的反应的底物或降解产物。

[0084] 本发明还涉及与靶标连接或报道子部分相连的抗体。靶标部分是结合对的第一成员。例如抗肿瘤剂与此类对的第二成员缀合,由此被引向抗原结合蛋白所结合的位点。此类结合对的一个常见例子是抗生物素蛋白和生物素。在一种优选的实施方式中,生物素与本发明的抗原结合蛋白缀合,由此提供了抗肿瘤剂或与抗生物素蛋白或链亲和素缀合的其它部分的靶标。备选地,生物素或另一此类部分与本发明的抗原结合蛋白相连,并且用作为报道子,例如在诊断系统中,其中可检测的信号产生剂与抗生物素蛋白或链亲和素缀合。

[0085] 用作为抗肿瘤剂的合适放射性同位素也是本领域技术人员已知的。例如,使用 ^{131}I 或 ^{211}At 。使用传统技术将这些同位素与抗体相联结 (见,例如 Pedley 等人, Br. J. Cancer 68 :69-73(1993))。备选地,与抗体相联结的抗肿瘤剂是活化前体药物的酶。以这种方式,施用前体药物,其保留为无活性形式,直到到达肿瘤位点,一旦施用了抗体复合物,其在肿瘤位点转化为其细胞毒素形式。实践中,向患者施用抗体-酶缀合物,令其定位于待被治疗的组织区域。然后向患者施用前体药物,使得在待被治疗的组织区域发生向细胞毒性药物的转化。备选地,与抗体缀合的抗肿瘤剂是细胞因子,例如白介素-2 (IL-2)、白介素-4 (IL-4) 或肿瘤坏死因子 α (TNF- α)。抗体将细胞因子靶向至肿瘤,使得细胞因子介导对肿瘤的损伤或破坏,而不影响其它组织。使用传统的重组 DNA 技术,在 DNA 水平上将细胞因子融合至抗体。

[0086] 本发明还提供了编码前文所述的抗体或其片段的经分离的多核苷酸。本发明包括具有下述序列的核酸,所述序列编码 PDGFR β 特异性抗体和包含表 1 中所示的一个、两个、三个、四个、五个和 / 或全部六个 CDRs 的抗原结合片段。

[0087] 因此,本发明提供了在严格杂交条件下与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :25 特异性杂交 (或特异性结合) 的核酸。本发明还包括下述核酸,它们将与前述序列特异性结合,但是是因为核酸密码子的简并性。核酸可以足够长到足以编码完整的蛋白 (例如完整的 V_H 或 V_L) 或其片段。

[0088] 严格条件下的杂交指这样的条件,探针将在所述条件下优先与其靶标亚序列杂交,与其它序列完全不杂交或杂交程度较低。还应当理解,在核酸杂交实验,例如 southern 和 northern 杂交的上下文中,严格杂交条件和严格杂交洗涤条件是序列依赖性的,它们在

不同环境参数下有所不同。本领域公知：对杂交和洗涤溶液内容物和温度加以调节，从而获得严格杂交条件。严格度取决于使用的探针的核苷酸含量和大小等参数。关于一般性描述和例子，参见 Sambrook 等人，1989，Molecular Cloning--A Laboratory Manual（第 2 版）卷 1-3，Cold Spring Harbor Laboratory，Cold Spring Harbor Press，NY 和其它来源。关于核酸杂交的其它指导可见 Tijssen，1993，Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes，第 1 部分第 2 章，Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays，Elsevier，N. Y.

[0089] 优选的严格条件是下述这些，它们允许探针与和探针超过大约 90% 互补的序列杂交，而不与少于大约 70% 互补的序列杂交。通常，高度严格杂交和洗涤条件被选用为：在给定的离子强度和 pH 下，比针对特定序列的热解链温度 (T_m) 低大约 5°C。 T_m 是靶序列中的 50% 与完美匹配的探针杂交时的温度（给定离子强度和 pH 下）。非常严格的条件被选用为与针对特定探针的 T_m 相等。

[0090] 在 Southern 或 northern 印迹中的滤膜中，用于具有超过 100 个互补残基的互补核酸杂交的严格杂交条件是 42°C 下 50% 甲酰胺与 1mg 肝素，杂交进行过夜。高度严格洗涤条件的一个例子是 72°C 下 0.15M NaCl 中进行大约 15 分钟。严格洗涤条件的一个例子是在 65°C 下 0.2 倍 SSC 中进行 15 分钟洗涤（见 Sambrook 等人，1989）。通常，高严格度洗涤之前是低严格度条件，以除去背景探针信号。用于双链体，例如超过 100 个核苷酸的双链体的中等严格度洗涤的一个例子是 45°C 下 1 倍 SSC 中 15 分钟。用于双链体，例如超过 100 个核苷酸的双链体的低严格度洗涤的一个例子是 40°C 在 4-6 倍 SSC 中 15 分钟。通常，是在特定杂交检验中使用不相关探针时所观察到的两倍（或更高）的信噪比指示检测到特异性杂交。

[0091] 如果其所编码的多肽基本上相同的话，严格条件下互相不杂交的核酸也仍是基本相同的。这发生在，例如，当使用遗传密码所允许的最大密码子简并性来产生核酸时。因此，本发明的核苷酸序列包括与 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:17 或 SEQ ID NO:25 至少大约 70%，优选至少大约 80%，更优选至少大约 90% 同一的核苷酸序列。本发明还提供了含有本发明核酸的重组载体。载体可以是表达载体，其中核酸与控制序列（例如启动子以及任选地，增强子序列）有效相连。已经开发了多种表达载体，用于在原核和真核系统中有效合成抗体多肽，表达载体包括但不限于酵母和哺乳动物细胞培养系统。

[0092] 可使用任何合适的表达载体。可用于本发明的表达载体含有与待表达的 DNA 序列或片段有效相连的至少一种表达控制序列。控制序列插入载体中，以控制和调控克隆的 DNA 序列的表达。有用的表达控制序列的例子是 lac 系统、trp 系统、tac 系统、trc 系统、噬菌体 λ 的主要操纵子和启动子区域、fd 外被蛋白的控制区域、酵母的糖分解启动子（例如，3-磷酸甘油酸激酶的启动子）、酵母酸性磷酸酶的启动子（例如 Pho5）、酵母 α -交配因子的启动子和源于多瘤、腺病毒、逆转录病毒和猿猴病毒的启动子（例如 SV40 的早期和晚期启动子）以及已知控制原核或真核细胞和它们的病毒的基因表达的其它序列或其组合。

[0093] 可选择的标记是编码在选择性培养基中生长的经转化的宿主细胞存活或生长所必需的蛋白的基因。典型的可选择标记编码下述蛋白，所述蛋白 (a) 赋予对抗生素或其它毒素，例如，氨基青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素的抗性，(b) 补足营养缺陷型缺陷或

(c) 提供从复合培养基无法获得的关键营养物质,例如,编码用于芽孢杆菌的 D- 丙氨酸消旋酶的基因。特别有用的可选择标记赋予对甲氨蝶呤的抗性。例如,首先通过在含有甲氨蝶呤 (Mtx) (DHFR 的竞争性拮抗剂) 的培养基中培养所有转化子,鉴定出经 DHFR 选择性基因转化过的细胞。当利用野生型 DHFR 时,合适的宿主细胞是按照 Urlaub 和 Chasin(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 所述制备和繁殖的 DHFR 活性缺陷的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系。然后将经转化的细胞暴露给水平增加的甲氨蝶呤。这导致合成了 DHFR 基因的多个拷贝,以及相伴地,包含表达载体的其它 DNA 的多个拷贝,例如,编码抗体或抗体片段的 DNA。

[0094] 如果想要在酵母中表达基因构建体,用于在酵母中使用的合适的选择基因的例子是酵母质粒 YRp7 中存在的 *trp1* 基因。Stinchcomb 等人 (1979) Nature, 282, 39; Kingsman 等人 (1979) Gene 7, 141。Trp1 基因针对缺乏在色氨酸中生长的能力的酵母突变体菌株 (例如 ATCC No. 44076 或 PEP4-1) 提供了选择标记。Jones (1977) Genetics 85, 12。trp1 损害在酵母宿主细胞基因组中的存在由此提供了有效的环境,用于通过在缺乏色氨酸时的生长来检测转化。类似地,Leu2 缺陷酵母菌株 (ATCC 20,622 或 38,626) 被携带 Leu2 基因的已知质粒补足。可用于酵母中的载体的例子是 2 μ 质粒。

[0095] 原核克隆载体的例子包括来自大肠杆菌的质粒,例如 colE1、pCR1、pBR322、pMB9、pUC、pKSM 和 RP4。原核载体还包括噬菌体 DNA 的衍生物,例如 M13,以及其它丝状单链 DNA 噬菌体。使用在每条多肽链的开头处包含细菌分泌信号序列的 DNA 构建体,在大肠杆菌中方便地生产某些抗体。多种细菌信号序列是本领域已知的。一种优选的信号序列来自胡萝卜软腐欧文氏菌 (*Erwinia carotovora*) 的 *pelB* 基因。

[0096] 用于在哺乳动物细胞中表达的合适载体包括 SV40 的公知衍生物,源于腺病毒、逆转录病毒的 DNA 序列以及源于功能性哺乳动物载体的组合的穿梭载体,例如上文所述的那些,以及功能性质粒和噬菌体 DNA。编码抗体的 DNA 片段可被克隆进,例如,利用人巨细胞病毒 (HCMV) 启动子和增强子的载体,以在哺乳动物细胞中高水平表达 (见,例如 Bendig, 等人, U. S. Patent 5,840,299; Maeda, 等人 (1991) Hum. Antibod. Hybridomas 2, 124-34; P. J. Southern 和 P. Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1:327-41 (1982); Subramani 等人, Mol. Cell. Biol. 1:854-64 (1981); Kaufmann 和 Sharp, " Amplification And Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene, " J. Mol. Biol. 159:601-21 (1982); Kaufmann 和 Sharp, Mol. Cell. Biol. 159:601-64 (1982); Scahill 等人, " Expression And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells, " Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4654-59 (1983); Urlaub 和 Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20, (1980))。

[0097] 本发明还提供了含有前述重组或表达载体的重组宿主细胞。特别优选的细胞系是基于高水平的表达、感兴趣的蛋白的组成型表达和来自宿主蛋白的污染最小来选择的。可用的原核宿主包括,例如大肠杆菌,例如大肠杆菌 SG-936、大肠杆菌 HB 101、大肠杆菌 W3110、大肠杆菌 X1776、大肠杆菌 X2282、大肠杆菌 DHI 和大肠杆菌 MRC1,假单胞菌属 (*Pseudomonas*),芽孢杆菌属 (*Bacillus*),例如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*)。可用作为表达宿主的哺乳动物细胞系是本领域公知的,其包括很多

无限增殖化细胞系,例如但不限于 COS-7 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、幼仓鼠肾 (BHK) 细胞、PER. C6 细胞和很多其它细胞,包括淋巴来源的细胞系,例如,淋巴瘤、骨髓瘤或杂交瘤细胞。合适的其它真核细胞包括酵母和其它真菌。

[0098] 通过本领域已知的方法在含有可吸收碳源(例如碳水化合物,例如葡萄糖或乳糖)、氮源(例如氨基酸、肽、蛋白或其降解产物,例如蛋白胨、铵盐等)和无机盐(例如,钠、钾、镁和钙的硫酸盐、磷酸盐和 / 或碳酸盐)的液体培养基中培养经转化的宿主细胞。培养基还含有,例如,生长促进物质,例如,痕量元素,例如铁、锌、锰等。

[0099] 本发明还提供了生产抗体的方法,所述方法包括在允许抗体表达的条件下培养上述宿主细胞。在保持于合适培养基中的宿主细胞中表达之后,可通过本领域已知的方法从培养基分离抗体,并加以纯化。

[0100] 本发明还提供了包含本发明的抗体、核酸、载体或宿主细胞以及可药用载体的药物组合物。

[0101] 本发明还涉及治疗或抑制肿瘤生长、在哺乳动物中治疗或控制血管发生依赖性病况(例如,肿瘤生长)或治疗血管发生性疾病的方法,所述方法包括施用 PDGFR β 特异性拮抗剂。在一种实施方式中,拮抗剂阻断 PDGFR β 介导的对肿瘤细胞的刺激。在另一实施方式中,拮抗剂作用于抑制或防止血管发生,由此治疗或控制血管发生依赖性病况。典型地,血管内皮被来自其它来源(例如肿瘤细胞)的生长因子以旁分泌形式刺激。因此,PDGFR β 拮抗剂能有效治疗具有血管化肿瘤或赘生物 (neoplasms) 的受试者。

[0102] 对疾病的“治疗”包括:(1) 防止疾病在可能易患疾病但还没有经历或展示出疾病症状的哺乳动物中发生;例如,防止临床症状爆发;(2) 抑制疾病,例如,阻止或延迟其发展,或(3) 减轻疾病,例如,使得疾病症状消退。

[0103] 可被治疗的肿瘤包括原发性肿瘤和转移性肿瘤以及顽固性肿瘤 (refractory tumor)。顽固性肿瘤包括无法应答单独用化疗剂、单独用抗体、单独用放射或其组合进行的治疗或对这些治疗有抗性的肿瘤。顽固性肿瘤还包括看起来能被这些物质的治疗所抑制但是治疗停止后多至五年内复发,一些情况下多至十年或更长时间内复发的肿瘤。

[0104] PDGFR β 特异性拮抗剂以足以基本使得靶标受体或其配体饱和的剂量和给药频率施用。基本饱和是被靶向的受体的至少大约 50%,或至少大约 80%,或至少大约 95% 的饱和。PDGFR β 特异性拮抗剂以足以在给药间间隔保持基本饱和的至少大约 50%,或者至少大约 70%,或者至少大约 90% 的频率施用。在本发明的一种实施方式中,PDGFR β 特异性拮抗剂是抗体。就疗法而言,剂量方案为大约 5mg/m² 至大约 700mg/m²。在另一实施方式中,剂量方案是大约 10mg/m² 至大约 250mg/m²。本领域技术人员可容易地确定合适的剂量和方案,例如,使用获得体外受体饱和或中和所需的浓度,或者通过分析拮抗剂的血清浓度来进行。

[0105] 在本发明的一种实施方式中,PDGFR β 特异性拮抗剂与化疗剂一起施用。可基于其靶标或作用模式,将本领域已知的或被评估的化疗剂分入各类。例如,烷基化剂包括但不限于,顺铂、环磷酰胺 (Cyclophosphamide)、美法仑 (melphalan) 和达卡巴嗪 (dacarbazine)。抗代谢物的例子包括但不限于多柔比星 (doxorubicin)、柔红霉素 (daunorubicin) 和紫杉醇 (paclitaxel)、吉西他滨 (gemcitabine) 和拓扑异构酶抑制剂伊立替康 (irinotecan) (CPT-11)、氨基喜树碱 (aminocamptothecin)、喜树碱 (camptothecin)、DX-8951f 和

托泊替康 (topotecan) (拓扑异构酶 I) 和依托泊苷 (etoposide) (VP-16) 和替尼泊苷 (teniposide) (VM-26) (拓扑异构酶 II)。其它合适的化疗剂是本领域技术人员已知的, 其包括甲氨蝶呤、长春地辛 (vindesine)、新制癌菌素 (neocarzinostatin)、苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、阿糖胞苷 (cytosine arabinoside)、5- 氟尿苷、美法仑 (melphalan)、蓖麻毒 (ricin) 和加利车霉素 (calicheamicin)。PDGFR β 拮抗剂和化疗剂以能有效抑制血管发生和 / 或降低肿瘤生长的量施用给患者。PDGFR β 拮抗剂还可与其它治疗方案组合施用, 例如, 与放射性疗法等疗法组合施用。为进行放射, 源可以是被治疗的患者外部的 (外波束放射疗法——EBRT) 或内部的 (近距离放射疗法——BT)。

[0106] 施用的抗癌剂的剂量取决于多种因素, 包括, 例如, 物质的类型、被治疗的肿瘤的类型和严重性以及物质施用的途径。但是应当强调, 本发明不受限于任何特定剂量。

[0107] 在本发明的一种实施方式中, PDGFR β 特异性拮抗剂与 VEGFR 拮抗剂组合施用。VEGFR 拮抗剂的例子包括与 VEGFR2/KDR 结合的抗体, 例如 IMC-2C6 (V_H 的核苷酸和氨基酸序列: SEQ ID NO: 33 和 34, V_L 的核苷酸和氨基酸序列: SEQ ID NOS: 35 和 36) (见 W003/075840) 和 IMC-1121 (V_H 的核苷酸和氨基酸序列: SEQ ID NO: 33 和 34, V_L 的核苷酸和氨基酸序列: SEQ ID NO: 37 和 38) (见 W003/075840)。与 VEGFR1/Flt-1 结合的抗体的例子包括 6.12 (V_H 的核苷酸和氨基酸序列: SEQ ID NO: 39 和 40, V_L 的核苷酸和氨基酸序列: SEQ ID NO: 41 和 42) 和 IMC-18F1 (V_H 的核苷酸和氨基酸序列: SEQ ID NO: 43 和 44, V_L 的核苷酸和氨基酸序列: SEQ ID NO: 45 和 46)。VEGF 特异性抗体的一个例子是 **Avastin®**。

[0108] 如上文针对 PDGFR β 特异性抗体公开的那样, VEGFR 拮抗剂降低或抑制 VEGF 受体介导的信号转导。抑制机制包括但不限于, 配体阻断, 受体二体或多聚体形成, 受体内在化, 对酶活性的抑制 (例如, 对受体底物的修饰, 自身磷酸化) 等。

[0109] 在某些实施方式中, 本发明的抗体具有双重特异性, 其能同时结合两种不同的抗原。不同的抗原可位于不同的细胞上或位于相同的细胞上。抗原交联可体外验证, 例如通过: 提供固体支持物, 其上结合有第一抗原, 加入针对第一抗原特异的双特异性抗体, 加入结合蛋白也有特异性的第二抗原, 并检测结合的第二抗原的存在。

[0110] 本发明的优选抗体能阻断两种受体及其各自配体之间的相互作用。例如, 针对 PDGFR β 和 KDR 具有特异性的抗体能抑制 PDGF-BB 诱导的细胞活化以及 VEGF 或 PlGF 诱导的细胞迁移。较之单特异性的抗体, 双特异性抗体可能是细胞功能的更为有效的抑制剂。

[0111] 在本发明的一个方面中, PDGFR β 拮抗剂与 VEGFR 拮抗剂共施用。该方法能有效治疗实体瘤或非实体瘤, 包括并没有血管化的或者还没有实质上血管化的肿瘤。

[0112] 可用 PDGFR β 拮抗剂单独治疗或与 VEGFR 拮抗剂组合治疗的肿瘤和赘生物包括, 例如, 恶性肿瘤和赘生物, 例如, 胚细胞瘤、癌或肉瘤以及高度血管性的肿瘤和赘生物。可通过本发明的方法治疗的癌症包括, 例如, 脑、泌尿生殖道、淋巴系统、胃、肾、结肠、喉、肺和骨的癌症。非限制性例子还包括表皮样瘤、鳞状肿瘤 (例如头和颈肿瘤)、结直肠肿瘤、前列腺肿瘤、乳腺肿瘤、肺肿瘤 (包括肺腺癌和小细胞和非小细胞肺肿瘤)、胰腺肿瘤、胸腺肿瘤、卵巢肿瘤和肝肿瘤。组合物还可用于治疗血管化的皮肤癌, 包括鳞状细胞癌、基底细胞癌和可通过阻遏恶性角质形成细胞 (例如人恶性角质形成细胞) 的生长来治疗的皮肤癌。可被治疗的其它癌症包括卡波西肉瘤, CNS 赘生物 (神经母细胞瘤、毛细血管成血管细胞瘤、脑膜瘤和脑转移), 黑素瘤, 胃肠道和肾的癌及肉瘤, 横纹肌肉瘤, 胶质母细胞瘤, 包括多形性

胶质母细胞瘤和平滑肌肉瘤。

[0113] 非实体瘤的例子包括白血病、多发性骨髓瘤和淋巴瘤。白血病的一些例子包括急性髓性白血病 (AML)、慢性髓性白血病 (CML)、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、红细胞白血病或单核细胞白血病。淋巴瘤的一些例子包括霍奇金和非霍奇金淋巴瘤。

[0114] 本发明的组合物还可用于治疗或预防特征在于过量血管发生的病理性病况,其包括,例如,血管化和 / 或炎症,例如,动脉粥样硬化、类风湿性关节炎 (RA)、新生血管性青光眼、增殖性视网膜病变 (包括糖尿病增殖性视网膜病变)、黄斑变性、血管瘤、血管纤维瘤和牛皮癣。非瘤性血管发生性疾病的其它非限制性实施例是早产儿视网膜病变 (晶状体后成纤维化),角膜移植排斥,胰岛素依赖性的糖尿病,多发性硬化,重症肌无力,Chron's 病,自身免疫性肾炎,原发性胆汁性肝硬化,急性胰腺炎,allograft 排斥,过敏性炎症,接触性皮炎和延迟性超敏反应,炎性肠病,败血症性休克,骨质疏松症,骨关节炎,神经元炎症诱发的认知缺陷,Osler-Weber 综合征,视网膜变性 (retinosis) 以及真菌、寄生虫和病毒感染,包括巨细胞病毒感染。

[0115] 对此类疾病的鉴定是本领域技术人员能力和知识范围内公知的。例如,遭受临床显著的瘤性或血管发生性疾病或者有发展出临床显著症状的奉献的人类个体是适于施用 PDGFR β 拮抗剂的,任选地,与 VEGFR 拮抗剂组合。本领域临床技术人员可容易地测定个体是否是此类治疗的候选者,例如通过使用临床测试、身体检查和医药 / 家族史来测定。

[0116] 本发明的拮抗剂组合物可以以足以预防、抑制或降低肿瘤或病理学病况进展的量,施用给患有肿瘤或血管发生相关的病理学病况的患者,用于治疗性治疗。进展包括,例如,肿瘤或病理学病况的生长、侵入、转移和 / 或复发。足以实现此的量被定义为治疗有效量。对于该用途有效的量将取决于疾病的严重性和患者自身免疫系统的一般状况。剂量方案还将随疾病状况和患者状态变化,典型地在以下范围内:从单次推注剂量或连续输注到每天多次施用 (例如,每 4-6 小时),或者可由治疗医师和患者病况来指示。但是应当注意,本发明并不局限于任何特定的剂量。

[0117] 向哺乳动物施用的方法包括,例如,口服、静脉内、腹膜内、皮下或肌肉内施用。

[0118] PDGFR β 特异性和 VEGFR 特异性抗体可与用于治疗疾病的其它物质 (例如抗肿瘤剂 (antineoplastic agent) 或抗血管发生剂) 以化学方式或生物合成方式缀合。与抗体连接的抗肿瘤剂包括破坏或损伤与抗体结合的肿瘤或抗体所结合的细胞环境中的肿瘤的任何物质。例如,抗肿瘤剂是毒剂,例如,化疗剂或放射性同位素。可使用传统方法将化疗剂与抗体缀合 (见,例如,Hermentin 和 Seiler (1988) Behring Inst. Mitt. 82, 197-215), 包括通过肽或非肽接头。

[0119] 本发明的 PDGFR β 特异性抗体还可与可体内和体外用于诊断目的的可检测的信号产生剂相连。信号产生剂产生可通过外部手段 (通常是测量电磁辐射) 测量到的信号。对于大部分情况而言,信号产生剂是酶或发色团,或者通过荧光、磷光或化学发光来发射光。发色团包括在紫外或可见区吸收光的染料,并且可以是酶催化的反应的底物或降解产物。

[0120] 本发明还包括此类抗体与并入第二试剂的治疗或诊断剂的用途。例如,结合对的一个成员与本发明的抗体相连。抗肿瘤剂,例如与此对的第二成员缀合,由此被引向抗体结合的位点。在一种优选的实施方式中,生物素与本发明的抗体缀合,由此为与抗生物素蛋白或

链亲和素缀合的抗癌剂或其它部分提供了靶标。备选地,生物素或其它此类部分与本发明的抗体相连并用作报道子,例如,在下述诊断系统中,其中,可检测到的信号产生剂与亲和素或链亲和素缀合。

[0121] 本发明的 PDGFR β 拮抗剂,任选与 VEGFR 拮抗剂组合,可与一种或多种合适的佐剂组合施用,所述佐剂例如,细胞因子(例如 IL-10 和 IL-13)或其它免疫刺激剂,例如但不限于,趋化因子、肿瘤相关抗原和肽。但是应当理解,单独施用抗体足以以治疗有效的方式预防、抑制或降低肿瘤的进展。

[0122] 在某些实施方式中,可能想要将与 RTK 结合并且阻断配体结合的本发明抗体和与配体结合的另一抗原结合蛋白组合施用。与配体结合的抗体是本领域已知的,其包括例如抗 VEGF (**Avastin®**; 贝伐单抗 (bevacizumab))。

[0123] 根据本发明,PDGFR β 特异性拮抗剂与 VEGFR 拮抗剂的共施用还伴随施用抗癌剂,例如,化疗剂或放射性同位素。可使用的抗癌剂的离子包括上文关于与 PDGFR β 特异性拮抗剂共施用而描述的那些。

[0124] 在组合疗法中,PDGFR β 拮抗剂和 VEGFR 拮抗剂可以以同样或不同的方案分别或一起共施用。任选地,拮抗剂可组合进单剂量。任选地,拮抗剂可组合进单活性体(例如,双特异性抗体)。PDGFR β 拮抗剂 / VEGFR 拮抗剂疗法在其它药物的治疗开始之前、期间或之后以及其任何组合(即,抗癌剂的治疗开始之前和期间,之前和之后,期间和之后,或者之前、期间和之后)时施用。例如,为治疗肿瘤或瘤性疾病,PDGFR β 拮抗剂 / VEGFR 拮抗剂疗法可在开始放射疗法前 1 至 30 天,优选 3 至 20 天,更优选 5 至 12 天期间施用。根据本发明,化疗或放疗在 PDGFR β 拮抗剂 / VEGFR 拮抗剂疗法同时、之前或之后施用。

[0125] 在本发明中,可使用任何合适的方法或途径来施用本发明的抗体,以及任选地,共施用抗癌剂、受体拮抗剂或其它药物组合物。例如,根据本发明利用的抗癌剂方案包括被认为最适于治疗患者的瘤性病况的任何方案。不同的恶性肿瘤可能需要使用特定的抗肿瘤抗体和特定的抗癌剂,这可根据患者与患者的基础来决定。施用途径包括,例如,口服、静脉内、腹膜内、皮下或肌内施用。施用的抗癌剂的剂量取决于多种因素,包括,例如,抗癌剂的类型、被治疗的肿瘤的类型和严重性以及抗癌剂的施用途径。但是应当强调,本发明并不局限于任何特定的施用方法和途径。

[0126] 应当理解,本发明的抗体,用于哺乳动物中用于预防或治疗目的时,将以额外包含可药用载体(carrier)的组合物的形式施用。合适的可药用载体包括,例如,水、盐水、磷酸缓冲的盐溶液、葡萄糖、甘油、乙醇等及其组合中的一种或多种。可药用载体还可包含少量的辅助物质,例如,湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,它们用于增强结合蛋白的保质期或有效期。如本领域中所已知的,注射的组合物可被配制来在施用给哺乳动物后提供快速的、持续或延迟的活性成分释放。

[0127] 本发明还包括抑制肿瘤生长和 / 或血管发生的试剂盒,其包含治疗有效量的本发明的 PDGFR β 特异性拮抗剂。在本发明的一种实施方式中,试剂盒还包括 VEGFR 拮抗剂(例如 VEGF、PlGF、VEGFR-1/Flt-1、VEGFR-2/Flk-1/KDR 或 VEGFR3/Flt-4 的拮抗剂)。VEGF 拮抗剂可以是,例如,小分子、配体结合受体片段或抗体。当施用给人的拮抗剂是抗体时,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体是优选的。试剂盒还可含有任何合适的拮抗剂,例如,肿瘤形成或血管发生中所涉及的另外的生长因子受体(例如,EGFR、IGFR、NGFR、FGFR 等,如上文所

述)的拮抗剂。备选地或额外地,本发明的试剂盒还可包含抗癌剂。本发明上下文中,合适的抗癌剂的例子已在本文中描述过。本发明的试剂盒还可包含佐剂,其例子已在上文描述过。

[0128] 本发明范围内还包括本发明的抗体体内或体外用于调查或诊断方法的用途,这些方法是本领域公知的。诊断方法包括含有本发明抗体的试剂盒。

[0129] 因此,本发明的受体结合抗体可体内或体外用于调查、诊断、预防或治疗方法,所述方法是本领域公知的。当然应当理解和想到,本领域技术人员可对本文公开的本发明的原则加以变动,这些改动也意欲被包括于本发明的范围内。

[0130] 本文提到的所有参考文献都通过引用以其整体并入本文。

实施例

[0131] 下述实施例进一步阐述了本发明,它们不应被解释为以任何方式限制本发明。对传统方法,例如载体和质粒构建、将编码多肽的基因插入此类载体和质粒、将质粒引入宿主细胞以及对基因和基因产物的表达和其测定中使用的那些传统方法,可从数篇公开文件获得,包括 Sambrook, J. 等人, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, ColdSpring Harbor Laboratory Press 和 Coligan, J. 等人 (1994) *Current Protocols in Immunology*, Wiley&Sons, Incorporated。

[0132] 噬菌体展示文库。使用被固定的 mPDGFR β -Fc, 在之前描述的流程之后 (Lu, D. 等人, 2002, *Int. J. Cancer* 97:393-9; Zhu, Z. 等人, 1998, *Cancer Res.* 58:3209-14) 用含有 3.7×10^{10} 克隆的人 Fab 噬菌体展示文库 (de Haard, H. J. 等人, 1999, *J. Biol. Chem.* 274:18218-30) 来筛选抗 mPDGFR β 抗体。通过 ELISA, 针对与固定的 mPDGFR β -Fc 的结合, 检查第2和3轮选择后回收的各噬菌体克隆。为生产可溶 Fab, 各个结合子的质粒被用于转化非阻抑物大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 宿主 HB2151。按照厂商方案, 使用 G 蛋白柱 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 通过亲和色谱, 从周质提取物纯化可溶 Fab 蛋白。

[0133] 定量受体结合和阻断检验。在结合检验中, 将多种量的 1B3 IgG 或 Fab 加入至包被有 mPDGFR β 的板 ($50 \mu\text{l}$, $1 \mu\text{g/ml}$), RT 下孵育 1 小时, 之后用 PBST 洗板三次。然后将板与山羊抗人 κ 抗体-辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合物 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 在 RT 下再孵育 1 小时。按前文所述, 对板洗涤并显色 (Lu, D. 等人, 2002; Zhu, Z. 等人, 1998)。在阻断检验中, 首先将多种量的经纯化的抗体与固定量的 mPDGFR β (50ng , $0.5 \mu\text{g/ml}$) 混合, 并在 RT 下孵育 30 分钟。然后将混合物转至预先用 PDGF-BB ($0.5 \mu\text{g/ml}$) 涂过的 96 孔板, 在 RT 下孵育 1 小时。用 PBST 洗三次后, 将板与山羊抗人 Fc 抗体-HRP 缀合物 (Jackson ImmunoResearch) 孵育 1 小时, 按照所述进行显色 (Lu, D. 等人, 2002; Zhu, Z. 等人, 1998; Loizos, N. 等人, 2005)。测定 IC_{50} , 这是对 mPDGFR β 与其配体的结合造成 50% 阻断的抗体浓度。

[0134] 抗体亲和性测定。使用 BIAcore 3000 生物传感器 (BIAcore, Inc., Uppsala, Sweden), 测定了多种 Fab 和 IgG 与 mPDGFR β 的结合动力学。简言之, 将 mPDGFR β 固定到传感器芯片上, 以 1.5nM 至 100nM 范围内的浓度注射可溶抗体。在每个浓度获得传感图, 使用程序 BIAevaluation 2.0 来对其加以评价。从解离速率 (k_{off}) / 结合速率 (k_{on}) 之比来计算亲和性常数 K_d (Lu, D. 等人, 2002; Zhu, Z. 等人, 1998; Loizos, N. 等人, 2005)。

[0135] 对人抗 mPDGFR β 抗体的选择。随机挑出来自第二轮的总共 190 个克隆和来自第三轮的 95 个克隆,通过噬菌体 ELISA 和可溶 FabELISA 针对 mPDGFR β 结合和阻断活性对其加以测试。发现,超过 72%的来自第二轮的克隆和超过 98%的来自第三轮的克隆与 mPDGFR β 特异性结合,这表明选择程序是高效的。配体阻断检验揭示,结合子中大约 2.5%还阻断 mPDGFR β 与其配体 PDGF-BB 结合。

[0136] 所有 7 条 Fab 片段与 mPDGFR β 特异性结合,并以不同的效力阻断 mPDGFR β 与其配体 PDGF-BB 结合。IC₅₀ 值(即,阻断 PDGFR β /PDGF-BB 相互作用的 50%所需的抗体浓度)在大约 4nM 至 > 33nM 的范围内(图 1B)。具有最好的受体结合效率和受体/配体阻断效力的克隆是克隆 1B3(表 1),其被选用来进行进一步的研究。

表 1: 抗体可变结构域和 CDR 的 SEQ ID NO (核苷酸/氨基酸)								
抗体名	VH	CDRH1	CDRH2	CDRH3	VL	CDRL1	CDRL2	CDRL3
1B3	1/2	3/4	5/6	7/8	9/10	11/12	13/14	15/16
2C5	17/18	19/20	21/22	23/24	25/26	27/28	29/30	32/32

[0137] 全长 IgG 抗体克隆和表达。编码首要克隆 1B3 的重链和轻链基因的 DNA 序列被 PCR 扩增出来,并被克隆进含有人 κ 轻链恒定区域和人 $\gamma 1$ 重链恒定区域的表达载体。将表达载体转染进 NS0 骨髓瘤细胞,选择表达 1B3 的细胞的稳定克隆。在不含血清的培养基中培养细胞,通过蛋白 A 亲和色谱 (Poros A, Applied Biosystems, Foster City, CA),从细胞培养物上清液纯化全长 1B3 IgG。

[0138] 如所预计的,1B3 IgG 显示出比其 Fab 片段好得多的与固定的 mPDGFR β 结合的效率。1B3 IgG 的 IC₅₀ 值是 0.34nM,而 1B3 Fab 的是 1.3nM(图 1A)。通过 BIAcore 设备上的表面等离子共振进行的结合动力学分析解释,1B3 结合 mPDGFR β 的亲合性较之其 Fab 形式增加了大约 57 倍(对 Fab 而言 5.1nM,对 IgG 而言 0.09nM)。无论是作为可溶重组蛋白或人肿瘤细胞系上的细胞表面表达的受体,当针对与人 PDGFR β 的结合测试 1B3 抗体时,没有观察到交叉反应活性。此外,1B3 不与人和小鼠 PDGFR α 结合(数据未示出)。在阻断检验中,1B3 抑制 mPDGFR β 与其配体 PDGF-BB 的结合(其中 IC₅₀ 为 1.2nm),而其 Fab 具有 4.1nM 的 IC₅₀(图 1B)。

[0139] 1B3 在基于细胞的检验中抑制 PDGF-BB 刺激的受体磷酸化和下游信号传导。使用 1B3 作为测试剂,通过 FACS 分析,针对 PDGFR β 表达,测试了若干种小鼠细胞系,包括 NIH/3T3(成纤维细胞)、D122(Lewis 肺癌)、4T1(乳腺癌)、B16(黑素瘤)和 H5V(经 PmT 转化的内皮细胞)。将细胞以每孔~1x10⁶ 个等分进 96 孔板的孔中,与 1B3(10 μ g/ml)在 4℃孵育 1 小时,接着与抗人 Fc 抗体-FITC 缀合物 (JacksonImmunoResearch) 在 4℃再孵育 1 小时。用冷的 PBS 洗若干次之后,使用 FACSyantage SE 流式细胞仪 (BD Biosciences, San Jose, CA) 对细胞加以分析。来自 R&D 的抗 mPDGFR β 抗体被用作为阳性对照(数据未示出)。FACS 结果(图 2A)显示,NIH/3T3 和 D122 以中等水平表达 PDGFR β ,4T1 和 B16 以低水平表达受体,H5V 不产生任何染色。

[0140] 针对 NIH/3T3 和 D122 细胞测定受体磷酸化。将细胞放到 6cm 的平皿上,培养至 70-80%汇合,之后在 PBS 中洗两次细胞,并在不含血清的培养基中培养过夜。首先将细

胞与多种抗体在 RT 下孵育 30 分钟,接着用 PDGF-BB 在 37℃ 刺激 15 分钟。在裂解缓冲液(50mM Tris-HCl pH7.4,150mM NaCl,1% TritonX-100,1mM EDTA,1mM 苯基甲基磺酰氟,0.5mM Na_3VO_4 1 $\mu\text{g/ml}$ 亮抑酶肽,1 $\mu\text{g/ml}$ 抑胃酶肽和 1 $\mu\text{g/ml}$ 牛胰蛋白酶抑制剂)中裂解细胞 1 小时,接着在 4℃ 以 12,000rpm 对裂解物进行 10 分钟的离心。通过抗 mPDGFR β 抗体(R&D Systems Inc)将受体从细胞裂解物上清液免疫沉淀出来,接着加入 20 μl ProA/G-琼脂糖珠粒。在 4-12% NuPAGE Bis-Tris 凝胶上解析沉淀的受体蛋白,并转到聚偏二氟乙烯膜上。使用抗磷-酪氨酸抗体-HRP 缀合物(Santa Cruz Biotech,SantaCruz,CA),在印迹上检测磷-mPDGFR β 蛋白。用 mPDGFR β 的抗体来检验上样到凝胶上的总受体蛋白。

[0141] 为研究下游信号传导,通过 4-12% NuPAGE Bis-Tris 凝胶解析来自上述处理的细胞裂解物。分别使用抗磷-Akt 和抗磷-p44/p42MAPK 和 p44/p42MAPK(eBioscience, San Diego, CA) 检测磷酸化的 Akt 和 p44/42 促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)。

[0142] 1B3 在 NIH/3T3 和 D122 细胞中都以剂量依赖性方式抑制 PDGF-BB 刺激的受体磷酸化(图 2B 和 2C)。在 D122 细胞中,抗体还有效抑制 PDGF-BB 刺激的 Akt 和 p44/42MAP 激酶的磷酸化(图 2D)。

[0143] 抗 mPDGFR β 抗体在肿瘤异种移植模型中的抗肿瘤活性。用六种人异种移植肿瘤模型,包括三种卵巢癌(SK-OV-3、OV-CAR-5 和 OV-CAR-8)、一种胰腺癌(BxPC3)、一种肺癌(NCI-H460)和一种肾癌(Caki-1)体内评估 1B3 的抗肿瘤活性。无胸腺(nu/nu)小鼠(雌性,7-8 周龄)在异种移植前放置 7-10 天。每只小鼠被皮下注射 $3-10 \times 10^6$ 个 SK-OV-3、OVCAR-5、OVCAR-8、Caki-1、BxPC3 或 NCI-H460 肿瘤细胞。当肿瘤达到大约 $250-300\text{mm}^3$,将小鼠随机分组,每组 10-12 只动物,通过每周用 1B3、DC101 或 1B3 组合 DC101 进行 2-3 次腹膜内注射来处理小鼠。人 IgG 和 USP 盐水被用作为对照组。每周测量两次肿瘤大小和小鼠体重。用公式来计算肿瘤体积: $\pi/6 \times (\text{长度} \times \text{宽度}^2)$,其中,长度=最长直径,宽度=垂直于长度的直径。计算处理组与对照组的平均肿瘤体积之比(T/C%)。通过学生 t-检验来进行统计分析。

[0144] 为研究单用抗 PDGFR β 抗体治疗的抗肿瘤作用,通过腹膜内注射用 1B3、正常人 IgG 或盐水每周处理小鼠两次。在 SK-OV-3 模型中,以 6、20 或 60mg/kg 的剂量向携带肿瘤的小鼠给予 1B3。在用两种较低剂量的 1B3 处理过的小鼠中没有观察到肿瘤生长抑制(图 3A)。在 60mg/kg 时,直到处理开始后 29 天,1B3 完整阻断肿瘤生长($P = 0.0028$),之后,尽管有持续的抗体处理,肿瘤仍开始以与经人 IgG 处理的对照组相似的速率迅速生长(图 3A)。1B3(60mg/kg 的剂量)也显示出 OV-CAR-8 和 NCI-H460 异种移植模型中的显著的抗肿瘤活性:其在处理期间几乎完全阻断了 OV-CAR-8 肿瘤的生长(图 3B)($P = 0.0022$),并且显著减慢了 NCI-H460 肿瘤的生长(图 3F)($P < 0.05$)。另一方面,在 BxPC3、OV-CAR-5 和 Caki-1 异种移植模型中,1B3(40mg/kg 每周三次或 60mg/kg 每周两次)没能显示出任何抗肿瘤活性(图 3C、3D 和 3E)。检查的全部 6 种模型中,1B3 处理都没有导致任何明显的毒性,包括体重和动物行为改变。

[0145] 在肿瘤异种移植模型中,1B3 使得抗 VEGFR2 抗体、DC101 的抗肿瘤和抗血管发生活性增强。已在多种动物模型中展示了抗 VEGFR2 抗体的抗肿瘤和抗血管发生活性(Prewett, M. 等人,1999, Cancer Res. 59:5209-18)。现在,我们使用两种异种移植模型 BxPC-3(胰腺癌)和 NCI-H460(非小细胞肺癌)展示,1B3 能增强 DC101 的抗肿瘤和抗血管

发生活性。将带有 300-350mm³ 大小的异种移植肿瘤的无胸腺裸鼠随机分入四个处理组 (n = 12/ 组), 通过用盐水、1B3 (40mg/kg)、DC101 (40mg/kg) 或 1B3 (40mg/kg) 加 DC101 (40mg/kg) 每周腹膜内注射三次, 来处理小鼠。如所预计的, DC101 的处理显著抑制了 BxPC3 和 NCI-H460 异种移植物的生长 (分别地, $P = 0.0001$ 和 < 0.0001) (图 4A 和 4B)。单用 1B3 的疗法在 NCI-H460 模型中展示出适度的抗肿瘤活性 (处理后第 22 天, $T/C\% = 66\%$, $P = 0.0062$), 但是在 BxPC3 异种移植物中没有显示出任何抗肿瘤活性。1B3 和 DC101 的组合在 BxPC3 模型中带来了显著增强的肿瘤抑制: 在接受抗体组合的小鼠中, 治疗末尾 $T/C\%$ 为 27.3%, 而单独用 DC101 处理的小鼠中为 38.7% ($P = 0.0346$)。此外, 在抗体组合组中, 12 只小鼠中有 7 只观察到了肿瘤消退 (58.3%), 而在单独用 DC101 时 11 只小鼠仅有 2 只 (18.2%), 而在仅接受 1B3 的小鼠中没有消退。在 NCI-H460 模型中, 1B3 加 DC101 还产生了比 1B3 或 DC101 单独使用有效得多的肿瘤抑制活性: 处理后第 22 天, 1B3 加 DC101 组中 $T/C\%$ 为 22%, 而 1B3 组中为 66% ($P < 0.0001$); 研究末尾 (处理后第 50 天), 抗体组合组中平均肿瘤体积是单独 DC101 的组的一半 ($813.9 \pm 127.8\text{mm}^3$ 对 $1660.9 \pm 554.4\text{mm}^3$) ($P = 0.025$)。实验期间, 抗体组合组中没有死亡, 而 DC101 组中 12 只小鼠有 2 只死亡 (第 22 天死亡一只, 第 43 天死亡另一只)。

[0146] 肿瘤切片的免疫组织化学。通过针对血管密度和血管上周细胞的覆盖进行免疫组织化学染色, 来检查来自经抗体处理的小鼠的肿瘤异种移植物。在处理第 34 天 (BxPC3 模型) 或第 50 天 (NCI-H460 模型), 对来自单用 DC101 治疗和 DC101/1B3 组合治疗组的每组六只小鼠施行安乐死。移出肿瘤, 固定于 10% 中性缓冲福尔马林中, 4°C 过夜, 并嵌入石蜡。用 Leica RM2135 切片机以 6 μm 的厚度对固定的肿瘤切片, 接着针对血管和周细胞/SMC 覆盖进行双染色。

[0147] 用抗 CD31 抗体 (用于血管染色) 和抗 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 抗体 (用于周细胞染色) 对肿瘤切片染色。首先将切片与大鼠抗小鼠 PECAM-1 (抗 CD31 抗体, Pharmingen, San Diego, CA) 在 4°C 孵育过夜, 接着与经生物素-SP 标记的驴抗大鼠 IgG 抗体孵育, 然后是链亲和素-Cy3 缀合物 (都来自 Jackson ImmunoResearch)。然后用抗 α -SMA 抗体-FITC 缀合物 (Sigma) 对切片进一步染色。最后, 用 ToPro (MolecularProbe, Leiden, Netherlands) 在 RT 下对切片进行 5 分钟的复染色。

[0148] 使用 EZ-C12.20 软件, 通过与共焦显微镜 (Nikon Eclipse TE2000U) 相连的数码相机, 获得免疫荧光图像 (200x 放大率)。使用 Image Pro Plus 软件 (MediaCybernetics, Silver Spring, MD) 来进行计算机辅助的形态定量, 从每片切片分析。

[0149] 针对总 CD31⁺ 血管、 α -SMA⁺ 血管、成熟血管 (双重 CD31⁺ 和 α -SMA⁺) 以及双重 CD31⁺/ α -SMA⁺ 血管在总 CD31⁺ 血管上的百分比, 对来自每片切片的五张肿瘤周边和肿瘤核心的图像加以计数。使用两种不同的定量方法来测量各肿瘤切片的血管化程度: 血管密度 (血管数/mm³) 和血管面积百分比 (总肿瘤面积上的 % 血管面积)。使用 Image Pro Plus 软件进行计算机辅助的形态定量。就统计学分析而言, 用双因素 ANOVA 及接着的 Fisher's LSD 方法来进行多重比较 (Sigma Stat 3.1 Systat Software, Inc., Point Richmond, CA)。

[0150] DC101 处理显著降低了 BxPC3 肿瘤异种移植物中 CD31⁺ 血管的密度, 主要是肿瘤核心区域中 (图 5A), 但对 α -SMA⁺ 血管密度却仅显示出较弱的作用 (图 5B)。向 DC101 加入 1B3 虽然不能进一步降低肿瘤核心中的血管化, 但却显著提高了对肿瘤周边血管密度的降

低（图 5A）。1B3 单独使用没有显示出对总的肿瘤血管密度的显著作用（图 5A），但是在肿瘤周边降低了 α -SMA 染色（图 5B），导致 CD31/ α -SMA 双阳性（成熟）血管的百分比降低（图 5C）。这表明，肿瘤中 PDGFR β 阳性周细胞被选择性抑制。有趣的是，DC101 单独使用以及 DC101 加 1B3 处理的肿瘤中，CD31⁺ 血管的降低程度都与肿瘤核心和周边两者中 α -SMA⁺ 周细胞覆盖的降低直接相关（图 5A 和 B）。从而，肿瘤周边和核心二者中，成熟血管的百分比，即，双重 CD31⁺/ α -SMA⁺ 血管与总 CD31⁺ 血管的比例，在来自用盐水、DC101 单独或 DC101 加 1B3 处理的小鼠的肿瘤间看起来没有显著不同（图 5C）。还在 NCI-H460 肿瘤异种移植植物中观察到了相似的现象（图 5D-F）。最后，当用测量血管面积在总肿瘤面积上的百分比的备选记分方法来测定肿瘤血管化程度时，在两种肿瘤异种移植植物中都获得了几乎相同的观察（未示出）。

[0151] 对人抗 hPDGFR β 抗体的选择。针对与人 PDGFR β 结合的噬菌体 -Fab，筛选上文所述的噬菌体展示文库。如针对 1B3 所述，通过 PCR 扩增编码首要的 hPDGFR β 结合克隆 2C5 的重链和轻链基因的 DNA 序列（表 1），将其克隆进含有人 κ 轻链恒定区域和人 γ 1 重链恒定区域的表达载体中。将表达载体转染进 NS0 骨髓瘤细胞，选择表达 2C5 抗体的稳定克隆。

[0152] 如 BIAcore 分析所测定的，2C5 以与 1B3 结合 mPDGFR β 的相似结合特性与 hPDGFR β 结合。与 1B3 一样，2C5 对 PDGFR β 有特异性，其不结合 hPDGFR α 。但是，虽然 1B3 结合鼠 PDGFR β 而不结合人 PDGFR β ，2C5 却两种蛋白都结合（图 6）。在一种实验中，通过表面等离子共振测定的 2C5 的 IC_{50} 值针对 hPDGFR β 为 $1.36 \times 10^{-11} M$ ，针对 mPDGFR β 为 $6.05 \times 10^{-11} M$ 。1B3 与 hPDGFR β 结合的 IC_{50} 为 $4.17 \times 10^{-11} M$ 。

[0153] 2C5 还阻断 PDGF-BB 与人和小鼠 PDGFR β 的结合，如图 6 所示。针对 hPDGFR β 的 IC_{50} 值为 0.55nM，针对 mPDGFR β 为 0.35nM。

[0154] 在基于细胞的检验中，2C5 抑制 PDGF-BB 刺激的受体磷酸化以及下游信号传导。针对人 Caki-1 肿瘤细胞（图 7）和小鼠 NIH/3T3 和 D122 细胞系（图 8）来测定 2C5 阻断 PDGFR β 磷酸化的能力。甚至在测试的低浓度下，2C5 仍能阻断受体磷酸化（ $IC_{50} \ll 1.8 \mu g/ml$ ）。2C5 还在 Caki-1 细胞（图 7）和 D122 细胞（图 8）中有效抑制 PDGF-BB 刺激的 Akt 和 p44/42MAP 激酶两者的磷酸化。

[0155] 抗 PDGFR β 抗体在肿瘤异种移植植物模型中的抗肿瘤活性。用上文所述的五种人异种移植植物肿瘤模型（OVCAR-5 和 OVCAR-8、BxPC3、NCI-H460 和 Caki-1）来体内评估 2C5 抗肿瘤活性。将结合并抑制肿瘤的人 PDGFR β 受体和血管系统的小鼠受体的 2C5 与仅结合小鼠血管系统的 1B3 相比较。在 SKOV-3、OVCAR-8 和 NCI-H460 模型中观察到肿瘤生长的中等降低，而在 OVCAR-5、BxPC3 和 Caki-1 模型中没有观察到（图 9；表 2）。

表2-抗PDGFR β 抗体单一治疗					
异种移植瘤	肿瘤体积				MFI
	1B3		2C5		(FACS)
	T/C%	P 值	T/C%	P 值	
SKOV-3 (天 ²⁹)	57	0.0028	-	-	2
BxPC3	100	>0.05	100	>0.05	1
OVCAR-5	92	0.7	84	0.06	1
Caki-1	65	0.1004	91 49	0.6303 0.0733	10
OVCAR-8	43	0.0022	39	0.0014	5
NCI-H460	60	0.0235	60	0.0115	2

[0156] 抗 PDGFR β (2C5) / 抗 mVEGFR2 (DC101) 抗体组合在肿瘤异种移植模型中的抗肿瘤活性。还组合对小鼠 VEGFR2 特异性的抗体 (DC101), 针对对肿瘤生长的抑制, 测试了与人和小鼠 PDGFR β 受体 (即, 鼠宿主中, 人异种移植瘤血管系统和肿瘤两者上的 PDGFR β 受体) 结合的 2C5。异种移植瘤细胞系是 BxPC-3、MIA-PaCa-2、Detroit-562、HCT-8、NCI-H460、NCI-H292 和 HCT-116。共施用 2C5 和 DC101 导致对肿瘤生长的抑制显著高于单独施用每个抗体 (图 10 和表 3)。

表3 - 抗PDGFR β 抗体组合抗VEGFR2抗体				
抗体	异种移植瘤	肿瘤模型	肿瘤体积 (Combo / DC101 %)	P 值
1B3 + DC101	BxPC-3	胰腺	65	0.0346
	NCI-H460	NSCLC	48	0.1088
2C5 + DC101	Detroit562	鳞状	65 (天 ⁴⁰) 40 (天 ⁷⁴)	0.1146
	BxPC-3	胰腺	31	<0.0001
	MIA-PaCa2	胰腺	49	0.1078
	MIA-PaCa2	胰腺	75	0.4164
	MIA-PaCa LP (同位)	胰腺	200 (重量)	0.1975
	HCT-8	结肠	48 (天 ³⁹) 121 (天 ⁴¹) 36 (天 ⁴⁹)	- 0.001 -
	HCT-116	结肠	80	0.001
	NCI-H460	NSCLC	61	<0.0001
	NCI-H292	NSCLC	73	0.3832

[0157] 在基于细胞的迁移检验中, 2C5 抑制 PDGF-BB 刺激的细胞迁移。使用 NCI-H460、OVCAR8、WS-1 和 U-118 细胞系, 用双室 (two-chamber) 技术来测定 2C5 在细胞迁移中的抑制能力。向上室 (100 μ l) 和下室 (150 μ l) 中加入胶原 (100 μ g/ml), 在 37°C 孵育 1 小时。用 PBS 洗室两次后, 向上室中加入 100 μ l 饥饿细胞 (在不含血清的培养基中, 大约 $0.5-1 \times 10^6$ /

ml), 向下室中加入 150 μ l 不含血清的培养基, 然后在 37°C 孵育 4 小时。为进行 PDGF-BB 刺激, 向下室中加入 PDGF-BB, 至终浓度 100ng/ml。在 2C5 孔中, 向上室中加入 2C5, 至终浓度为 30 μ g/ml。从膜上刮走上室中的未迁移细胞。用 PBS 洗三次之后, 用 4% 福尔马林固定下室侧的膜上的迁移的细胞, 用 Hoechst (4 μ g/ml) 染色。在荧光显微镜下获取结果, 对细胞加以计数。在 30 μ g/ml 的浓度时, 2C5 在检验中使用的全部 4 种细胞系中都完全抑制了 PDGF-BB 刺激的细胞迁移 (图 11)。

[0158] 抗 PDGFR β (2C5)/ 化疗 (chemo) 或抗 PDGFR β (2C5)/ 化疗 / 抗 mVEGFR2 (DC101) 抗体组合在肿瘤异种移植模型中的抗肿瘤活性。当其组合化疗 (吉西他滨) 或化疗 (吉西他滨、紫杉醇或奥沙利铂) 加抗 VEGFR2 抗体 (DC101) 时, 针对对肿瘤生长的抑制, 对抗 PDGFR β 抗体 2C5 加以测试。异种移植细胞系是 NCI-H292、MIA-PaCa-2、NCI-H460 和 GEO。共施用 2C5 和吉西他滨导致比 2C5 或吉西他滨单独使用时更好的对肿瘤生长的抑制。共施用 2C5、化疗和 DC101 导致比化疗 / DC101 的组合更好的对肿瘤生长的抑制 (图 12 和表 4)。

表4-抗PDGFR β 抗体组合化疗和DC101/化疗				
组合 (ref-ctl)	异种移植植物	肿瘤模型	肿瘤体积 (Combo / ref-ctl %)	p 值
吉西他滨	NCI-H292	NSCLC	63	0.1753
DC101 + 吉西他滨	NCI-H292	NSCLC	90	0.5976
DC101 + 奥沙利铂	GEO	结肠	90	0.1759
DC101 + 紫杉醇	NCI-H460	NSCLC	78	0.2692
DC101 + 吉西他滨	MIA-PaCa2	胰腺	52	0.2399

[0159] 抗 PDGFR β (2C5)/ 抗 PDGFR α (对 hPDGFR α 特异性的 3G3 或对 mPDGFR α 特异性的 1E10) 抗体组合在肿瘤异种移植模型中的抗肿瘤活性。还组合抗 PDGFR α 抗体, 针对对肿瘤生长的抑制, 测试了抗 PDGFR β 抗体 2C5。异种移植细胞系是 Caki-1、HPAC 和 U-118MG。共施用 2C5 和 3G3 导致比单独使用抗体显著更好的对肿瘤生长的抑制 (图 13 和表 5)。

表5-抗PDGFR β 抗体组合抗PDGFR α 抗体				
组合 (ref-ctl)	异种移植植物	肿瘤模型	肿瘤体积 (Combo / ref-ctl %)	p 值
1E10 (抗 -mPDGFR α)	Caki-1	肾	104	0.9037
	HPAC	胰腺	56	0.0052
3G3 (抗 -hPDGFR α)	U-118MG	成胶质细胞瘤	45	0.0024
	U-118MG	成胶质细胞瘤	61	0.1346

[0160] 2C5 抗体对 PDGFR β 、PDGF-BB 和 VEGF 表达的影响。将 NCI-H460 细胞悬浮液 (5×10^5 个细胞 / 小鼠) s. c. 注射进雌性无胸腺小鼠。当肿瘤达到 $\sim 250 \text{mm}^3$, 小鼠被随机分进四个处理组 (对于 USP 盐水、2C5、DC101 和 2C5+DC101, 每个 n = 35)。在第 3 天、第 7 天和第 14 天, 处死来自每个组的六只动物, 获取它们的肿瘤。用肿瘤裂解物进行 ELISA 分析, 评估 PDGFR β 、PDGF-BB、mVEGFR2、mVEGF、hVEGF、FGF 和 HIF-1 α 的水平 (图 14)。

[0161] 2C5 结合 PDGFR β 的结构域 1 (D1) 和结构域 2 (D2)。首先通过结构域交换, 从 N- 末端到 C- 末端, 用 PDGFR β 结构域替换 PDGFR α 结构域, 来制备 PDGFR β 和 PDGFR α 的多种嵌合构建体。针对 2C5 结合的能力, 测试 PDGFR β / α 嵌合体。然后制备 PDGFR β 的更短版本, 包括 D1D2、D2D3 和 D1D2D3, 以验证 PDGFR β 上的 2C5 结合结构域。结果表明, 2C5 通过受体的 D1 和 D2 二者与 PDGFR β 结合 (图 15 和表 6)。表 6- 抗 PDGFR β 抗体的表位图谱定位

表6-抗PDGFR β 抗体的表位图谱定位												
	1 β 4 α	2 β 3 α	3 β 2 α	4 β 1 α	h5 β	m5 β	h5 α	h2 β / α	m2 β / α	β 1-2	β 1-3	β 2-3
2C5	X	√	√	√	√	√	X	X	X	√	√	X
PDGF-AA	√	√ (弱)	X	X	X	X	√	√ (弱)	√ (弱)	X	X	X
PDGF-BB	X	√	√	√	√	√	√	√ (弱)	√ (弱)	X	√	X

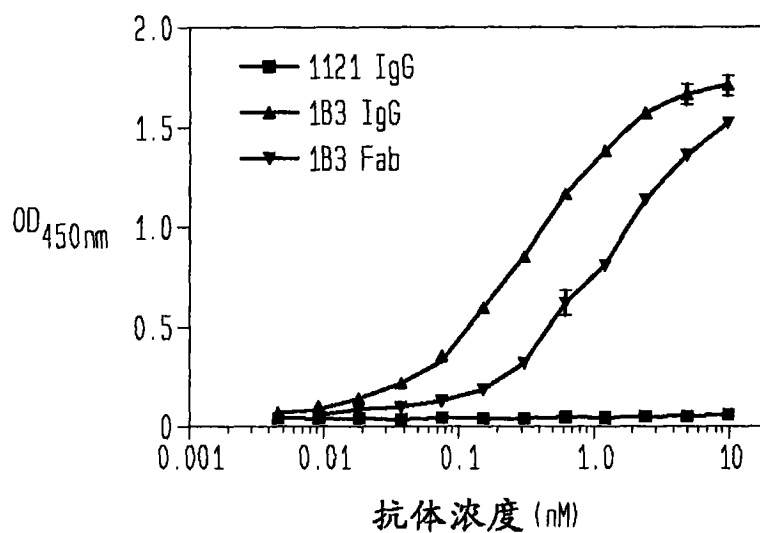


图 1A

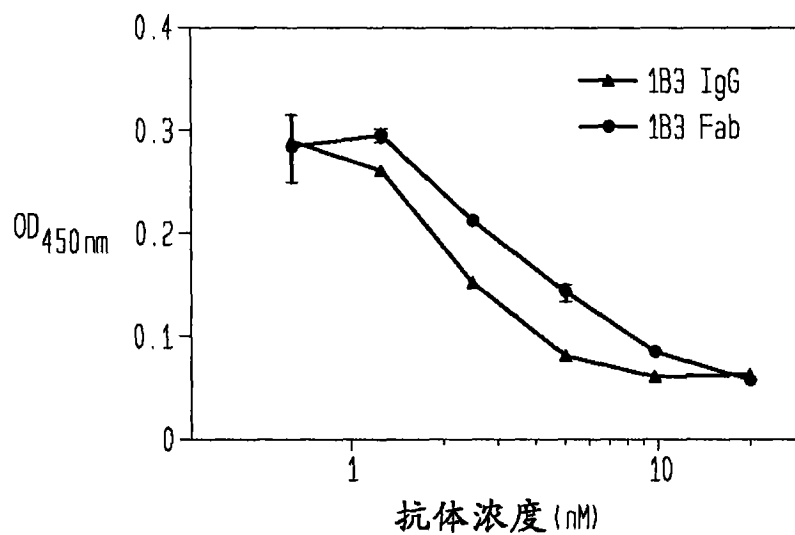


图 1B

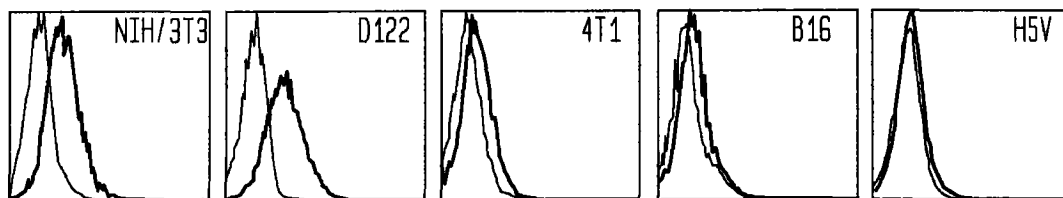


图 2A

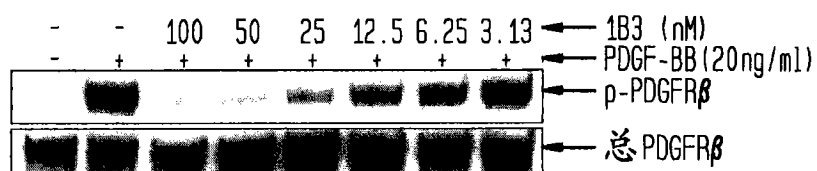


图 2B

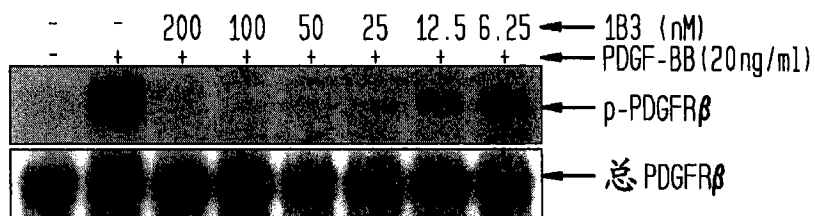


图 2C

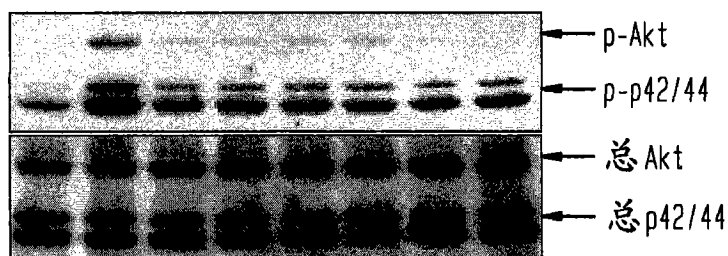


图 2D

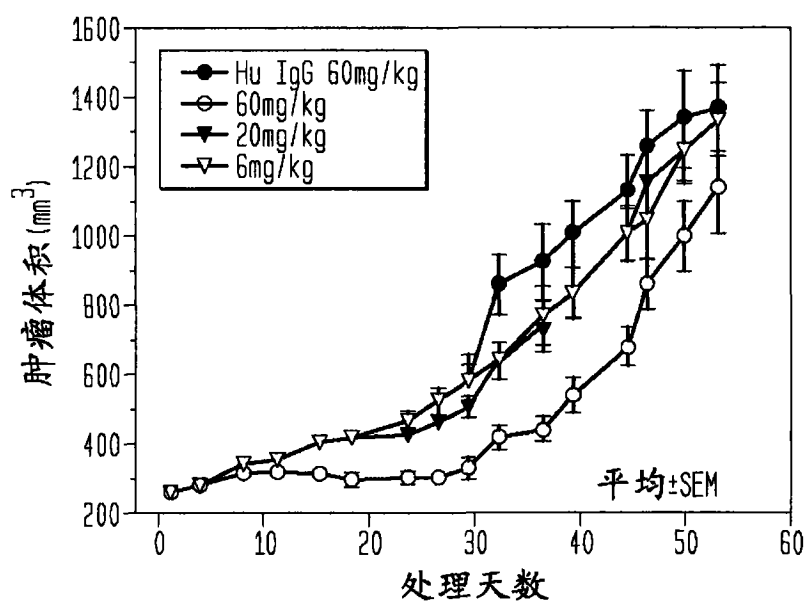


图 3A

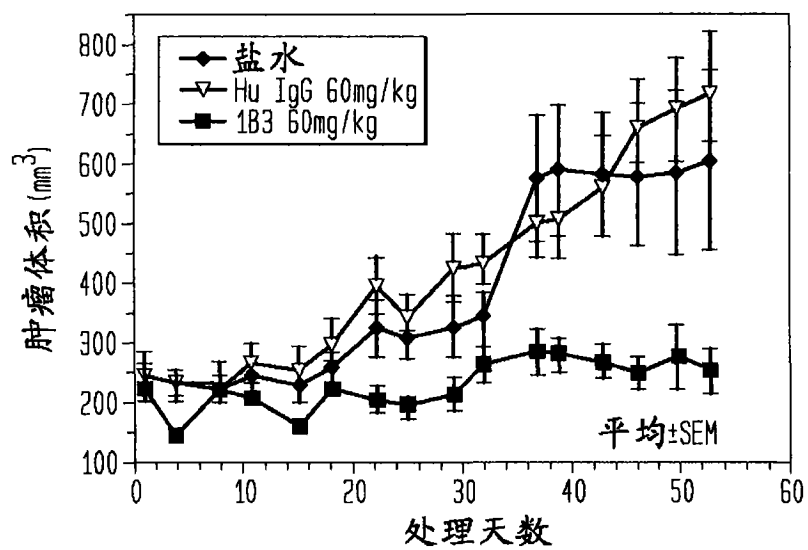


图 3B

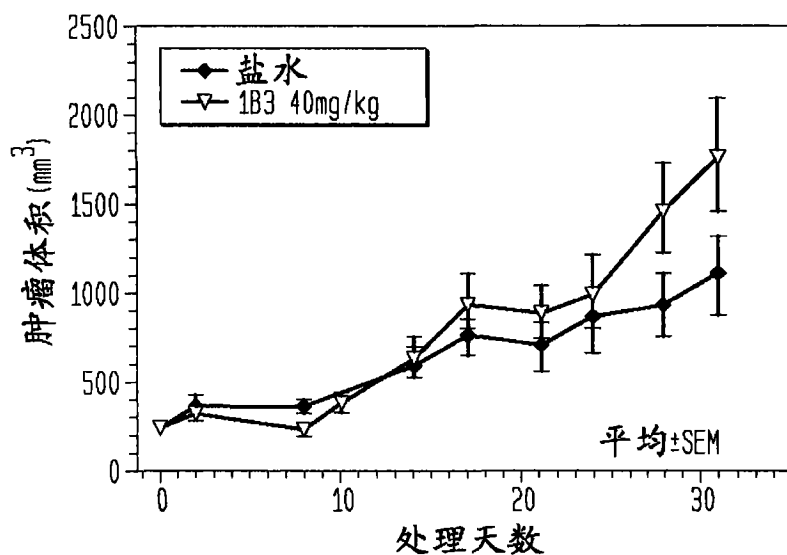


图 3C

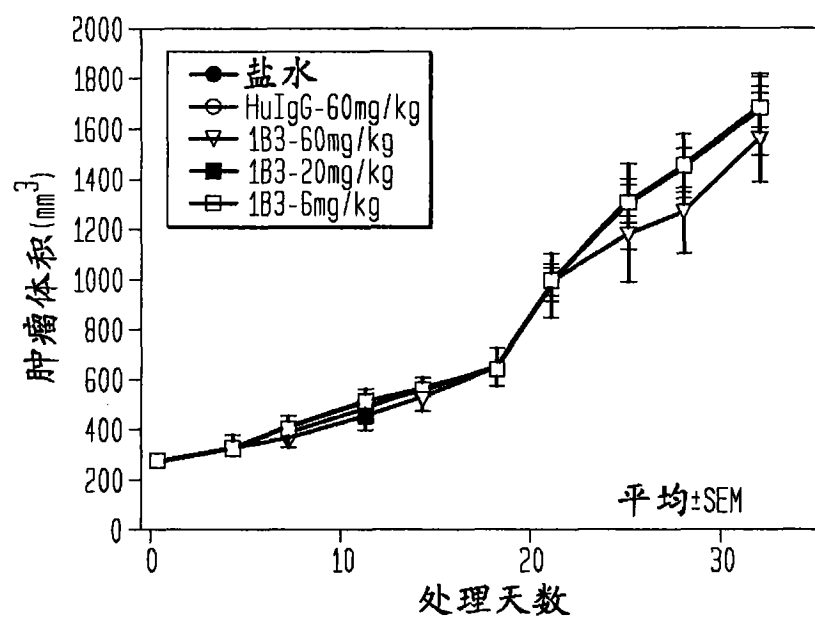


图 3D

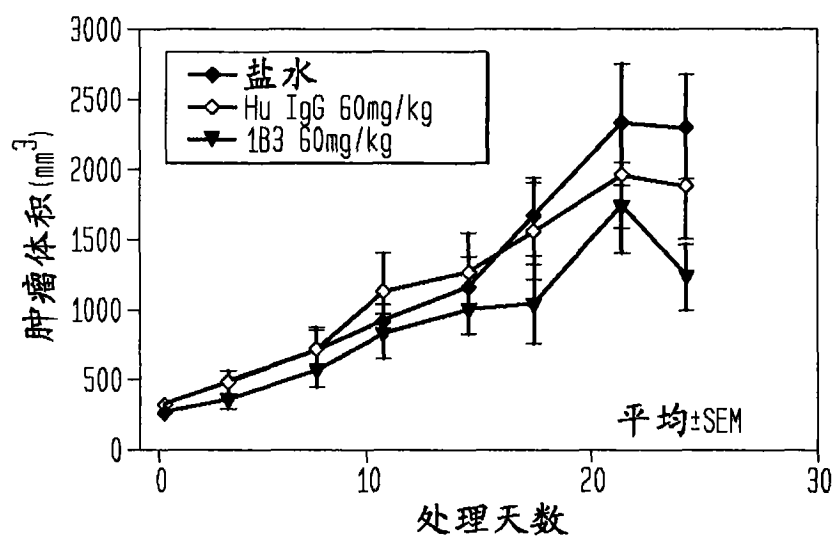


图 3E

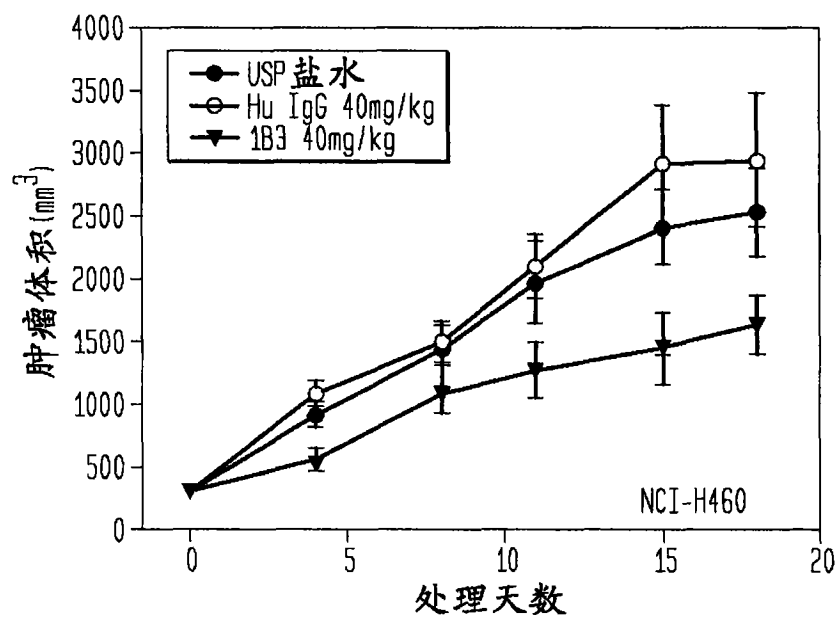


图 3F

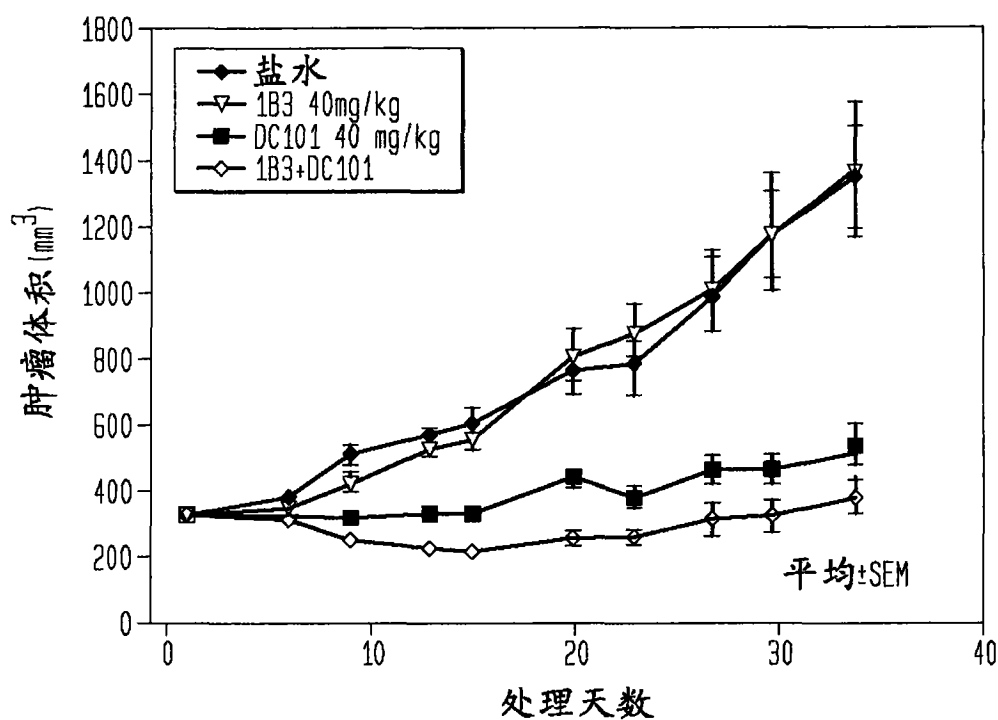


图 4A

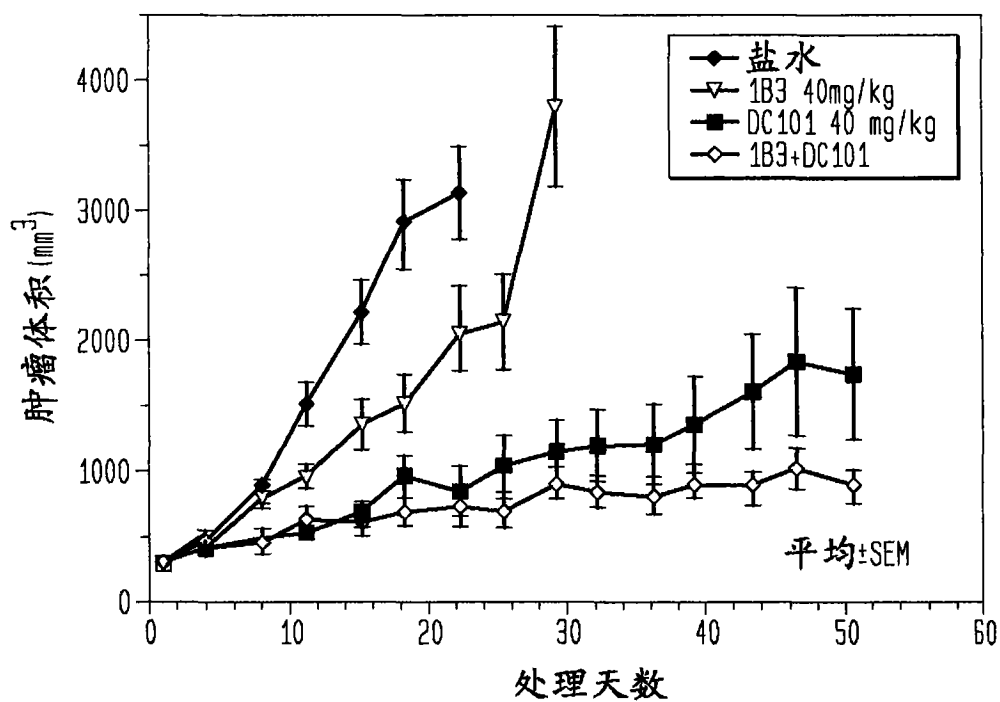


图 4B

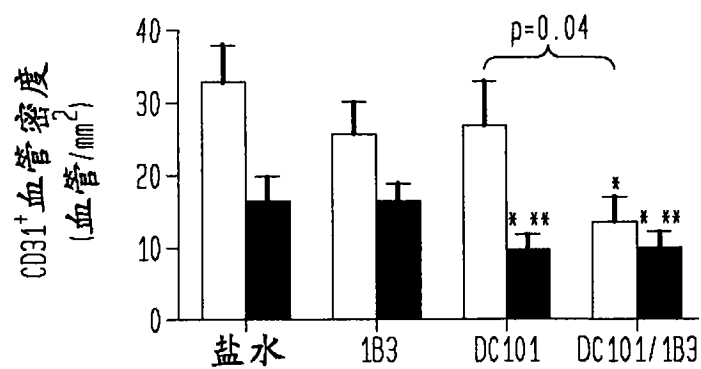


图 5A

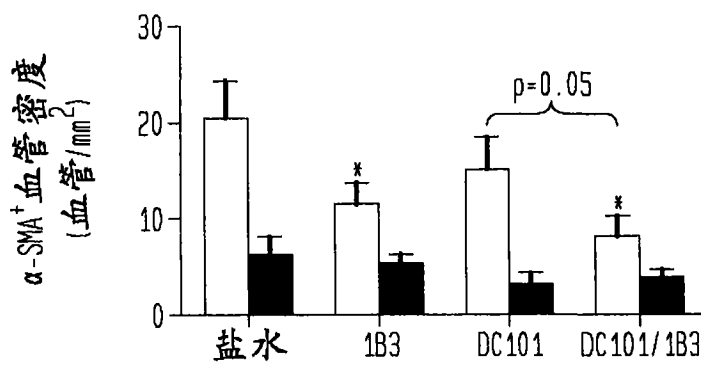


图 5B

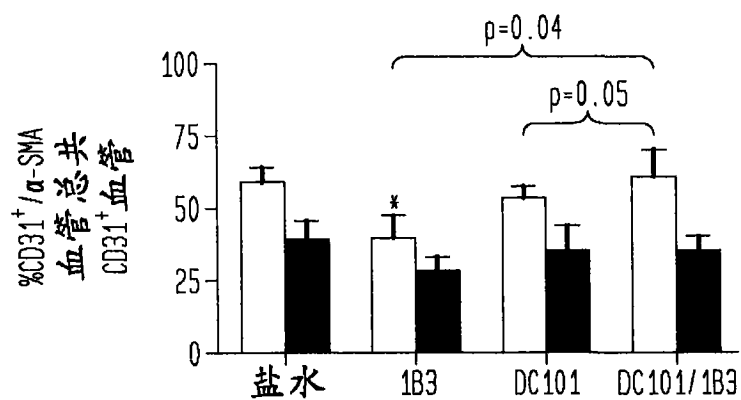


图 5C

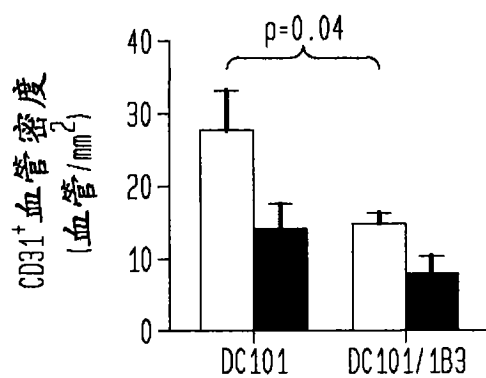


图 5D

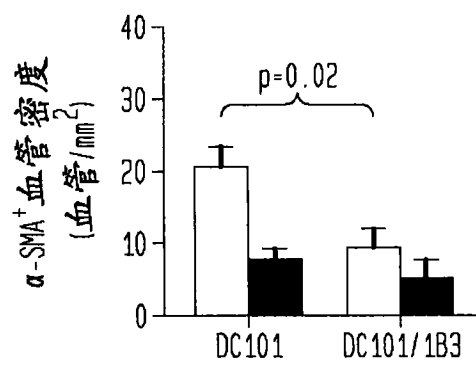


图 5E

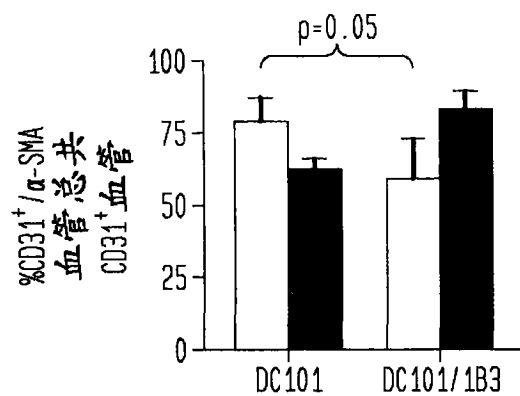


图 5F

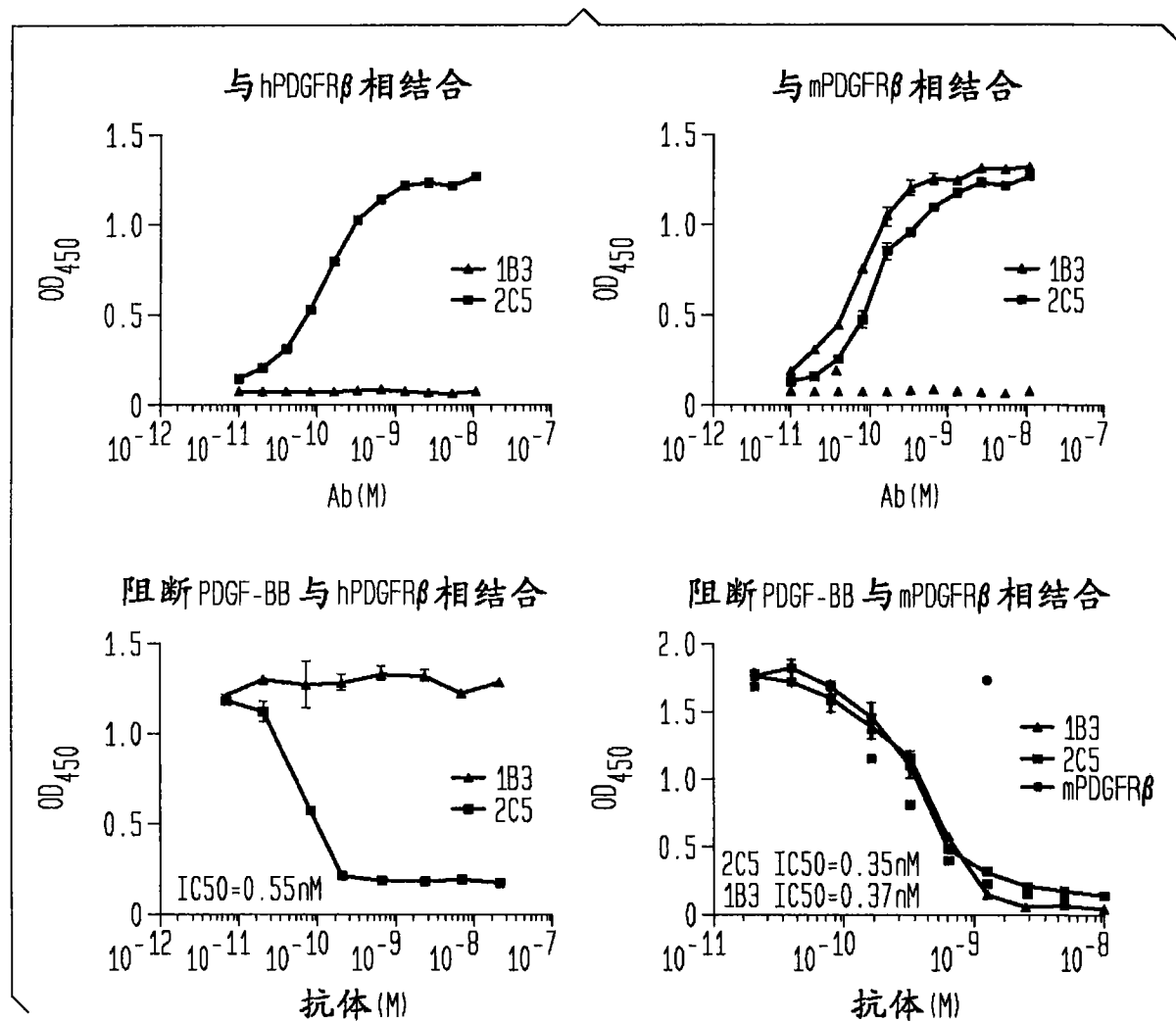


图 6

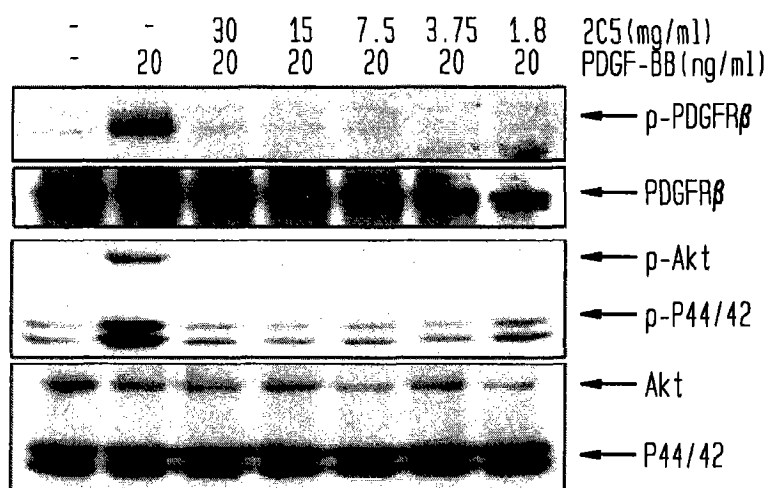


图 7

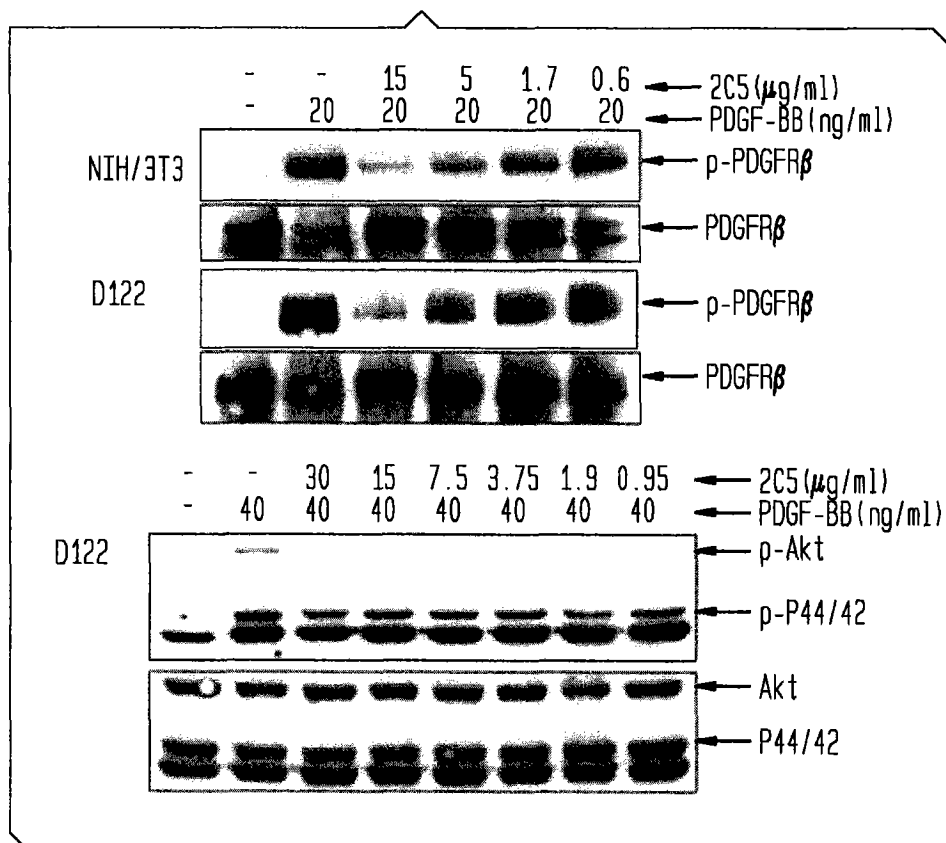


图 8

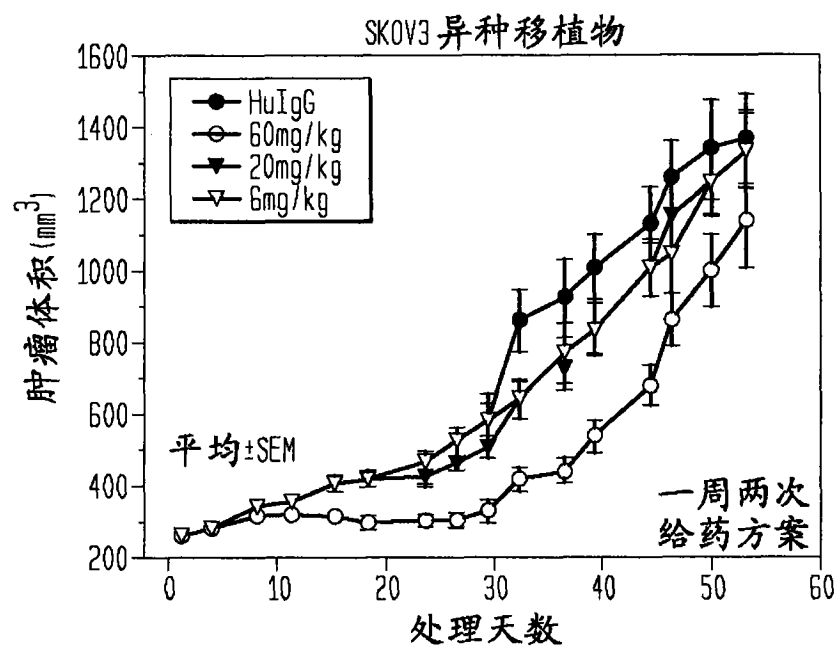


图 9A

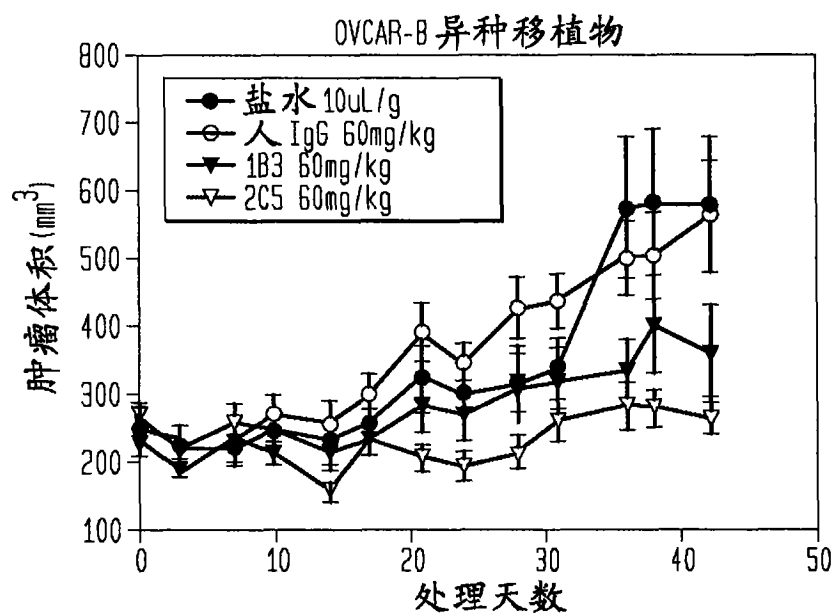


图 9B

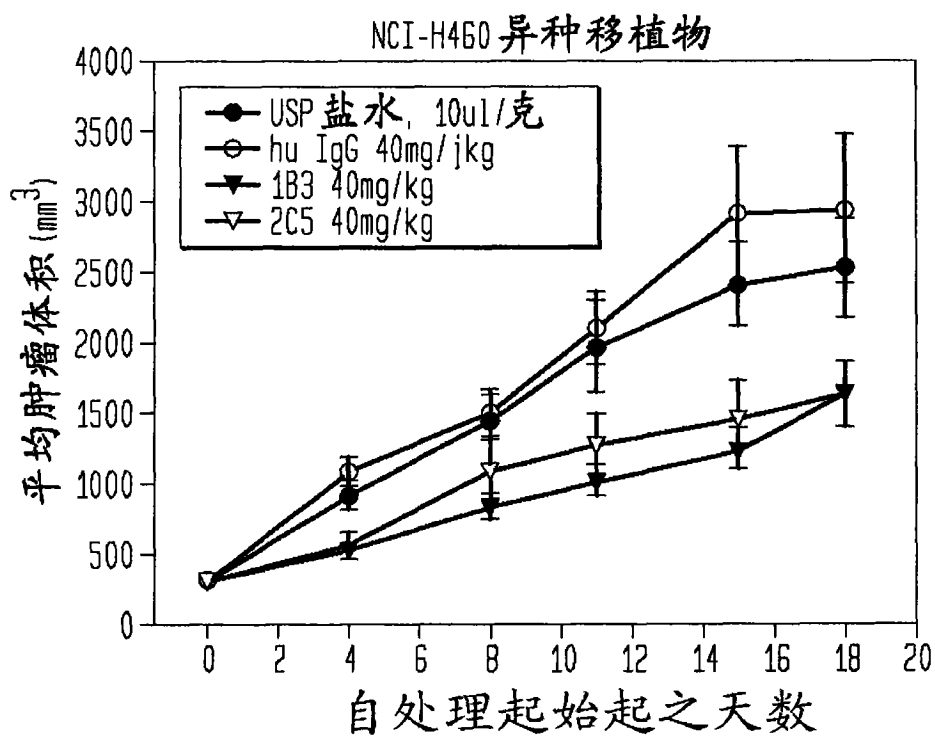


图 9C

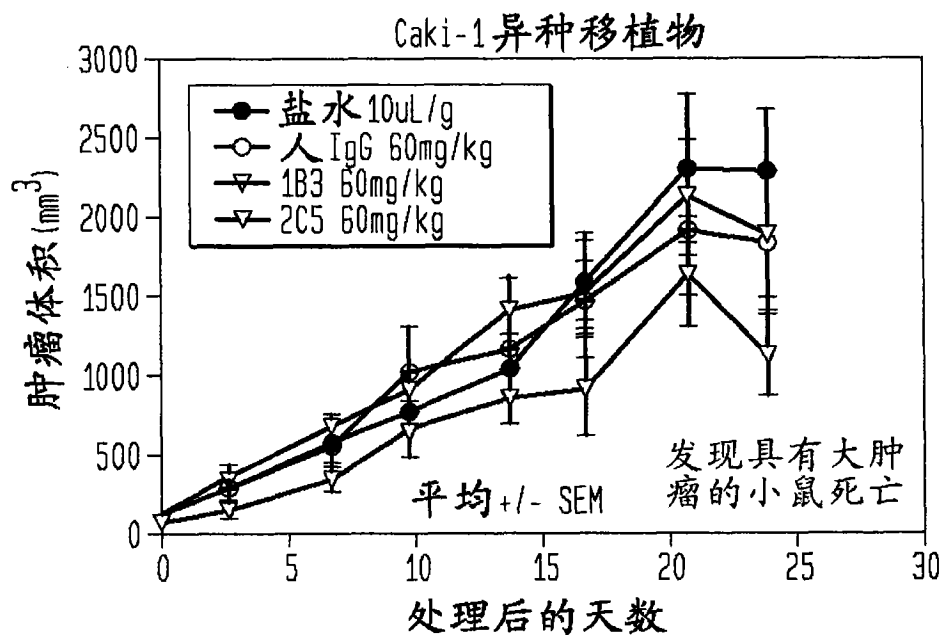


图 9D

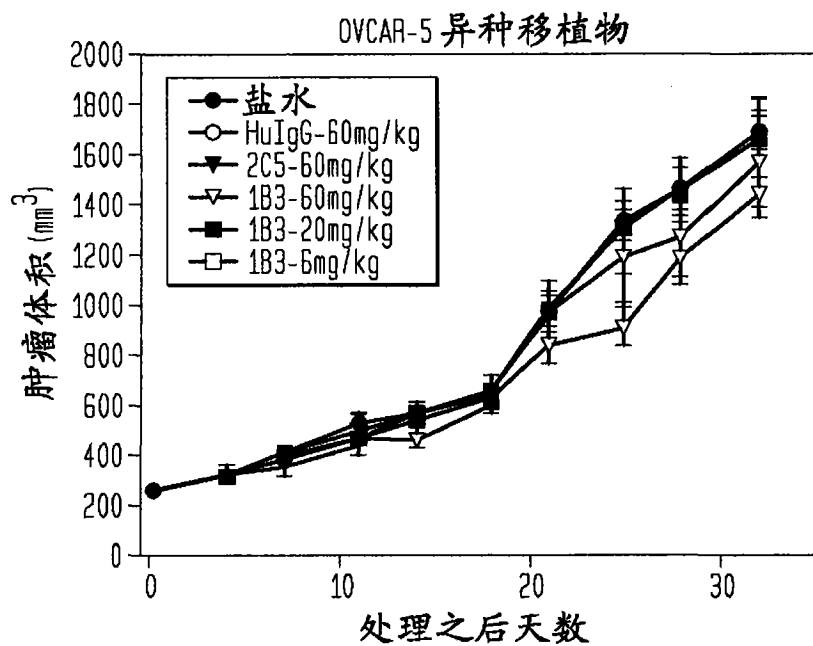


图 9E

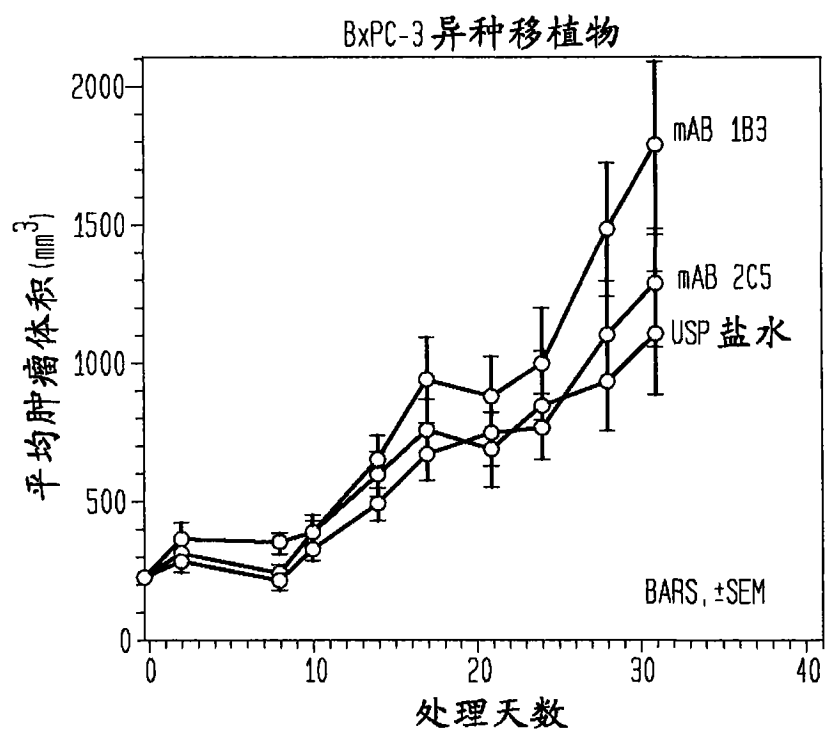


图 9F

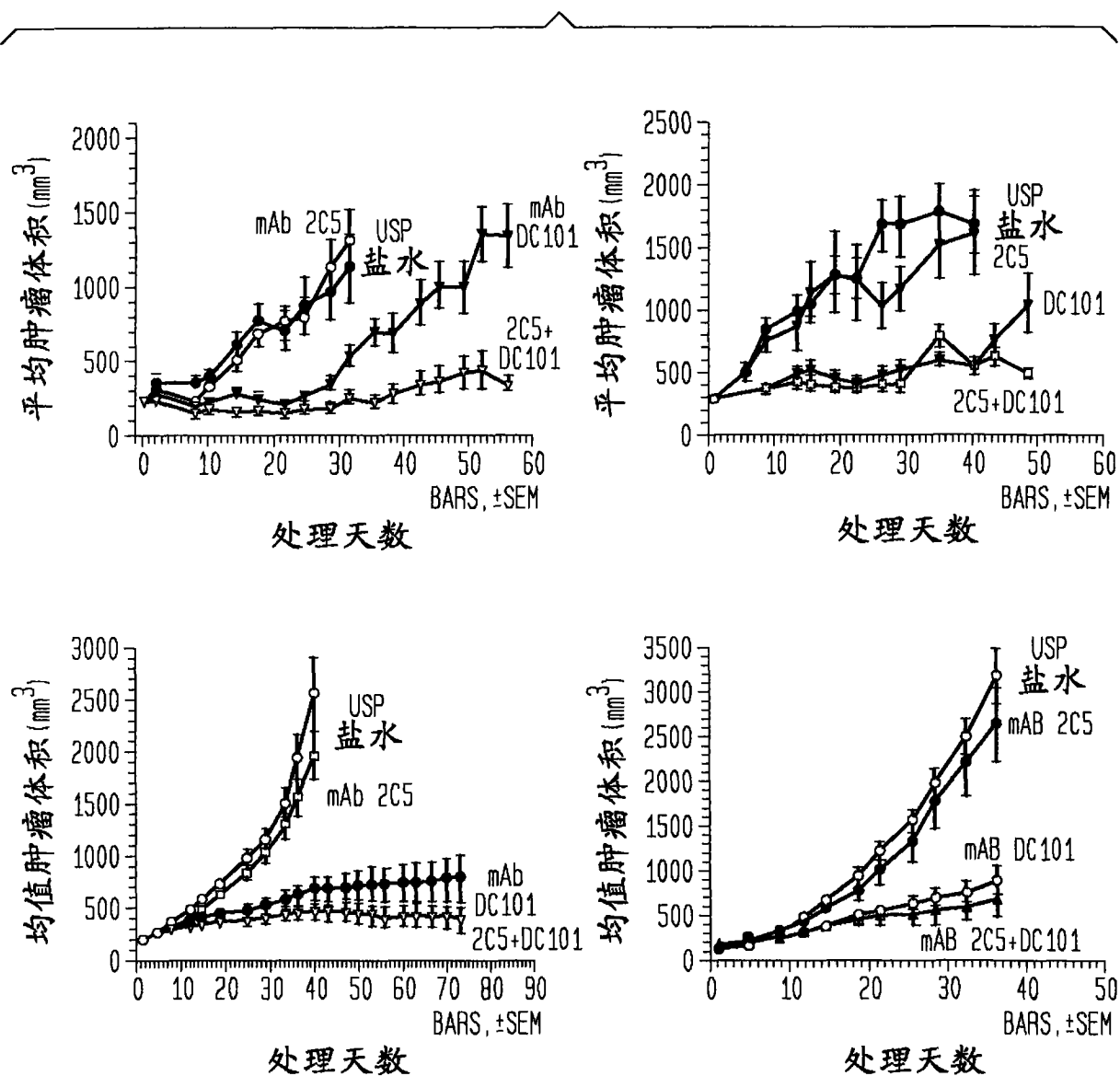


图 10A

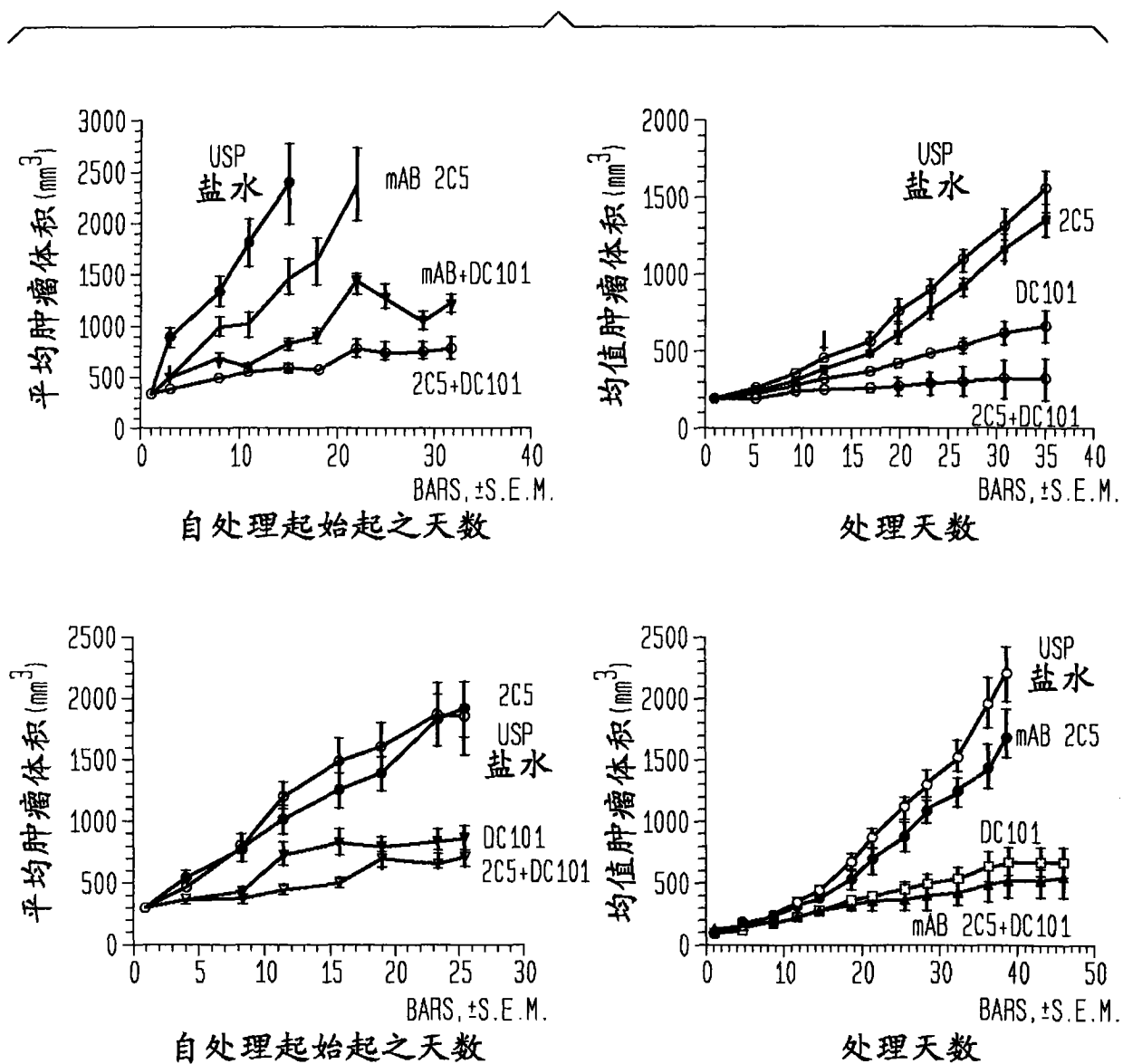


图 10B

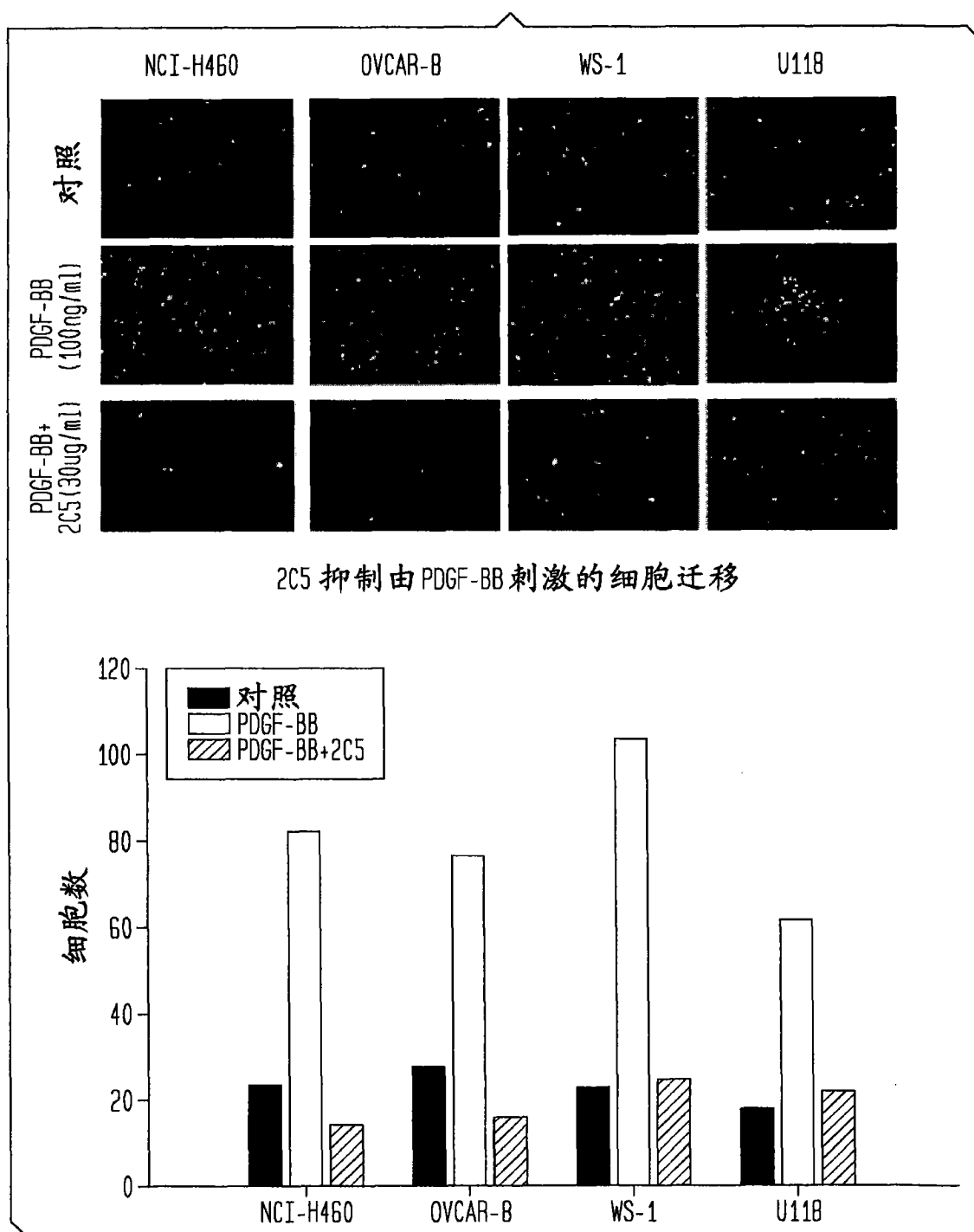


图 11

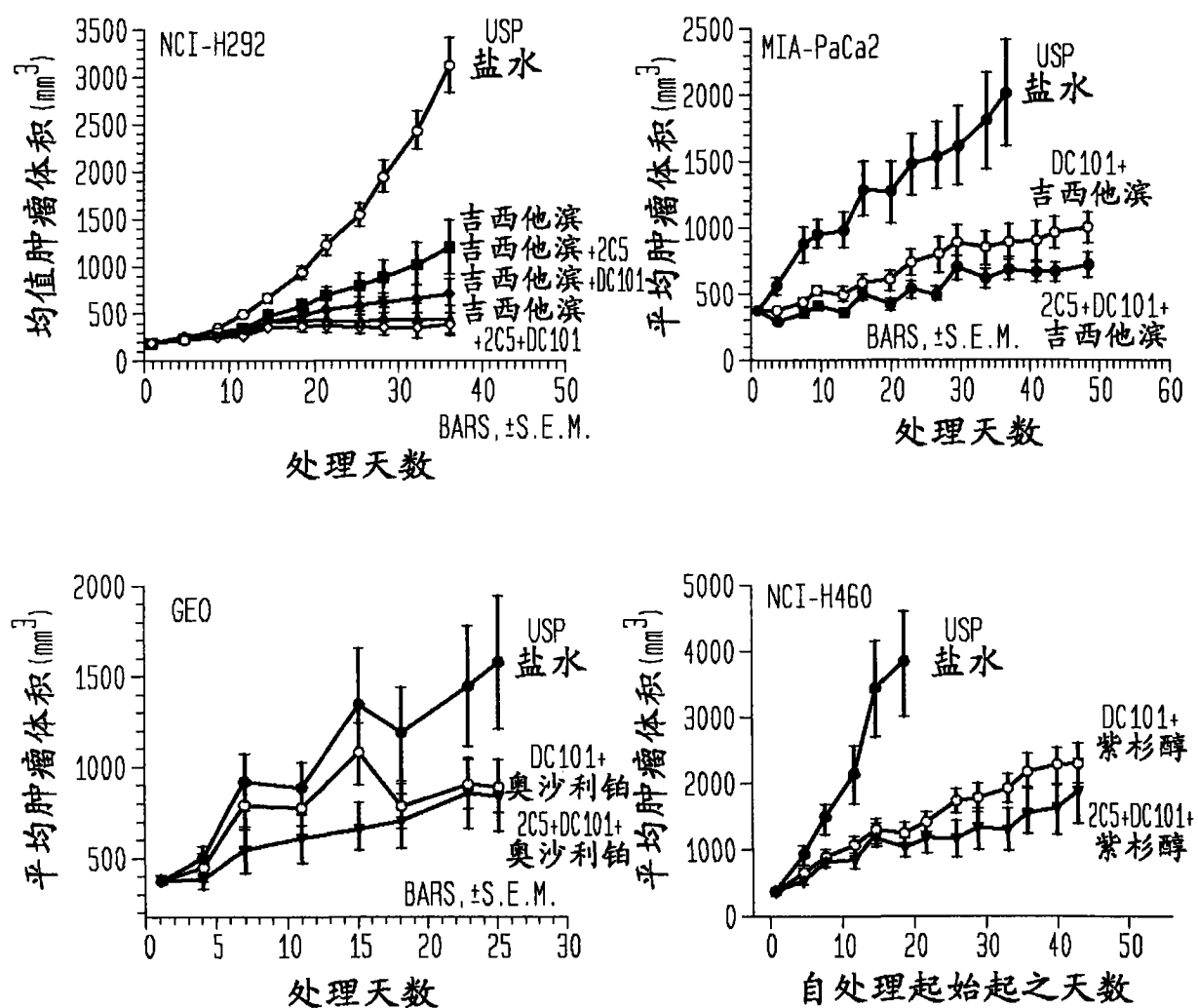


图 12

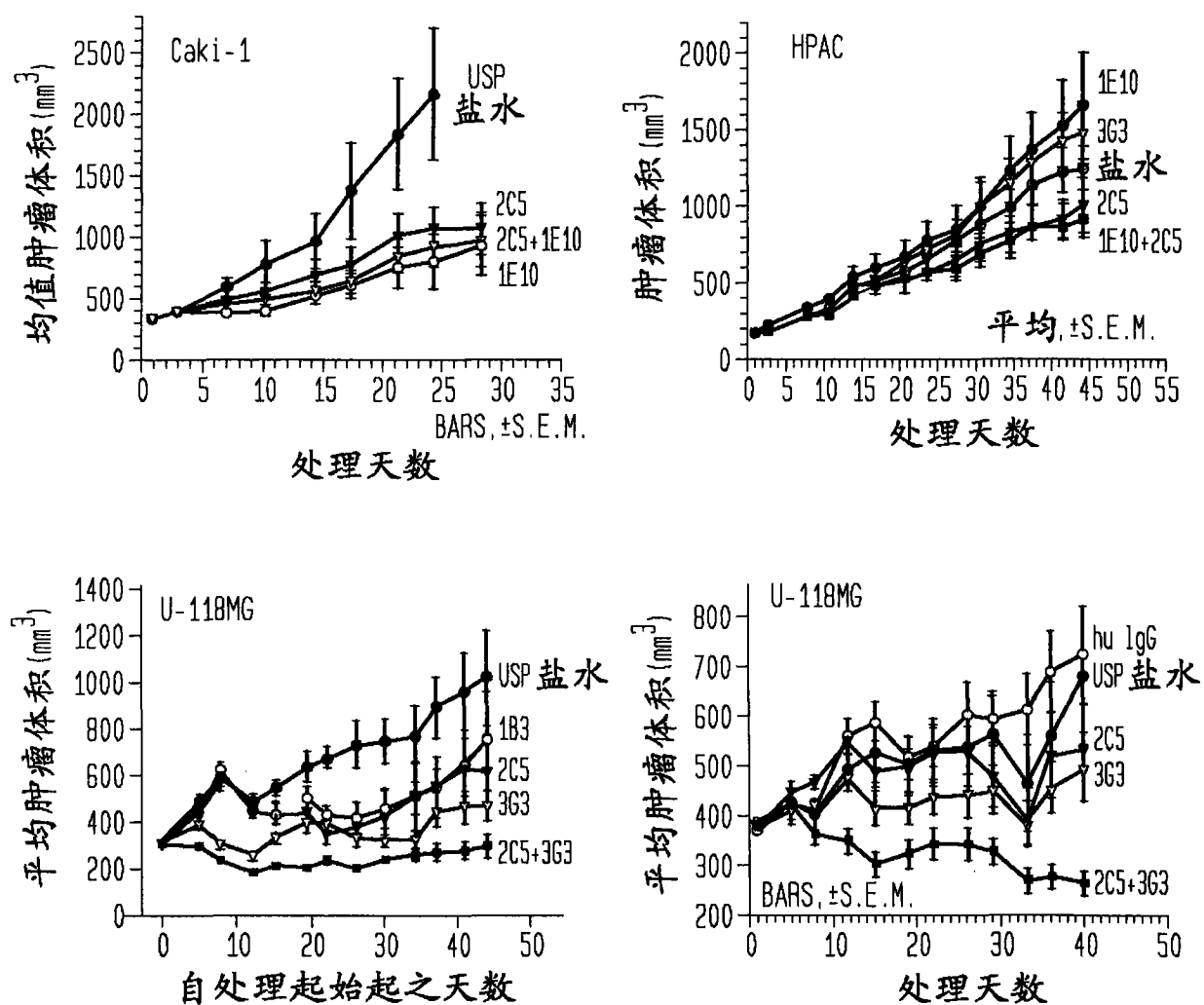


图 13

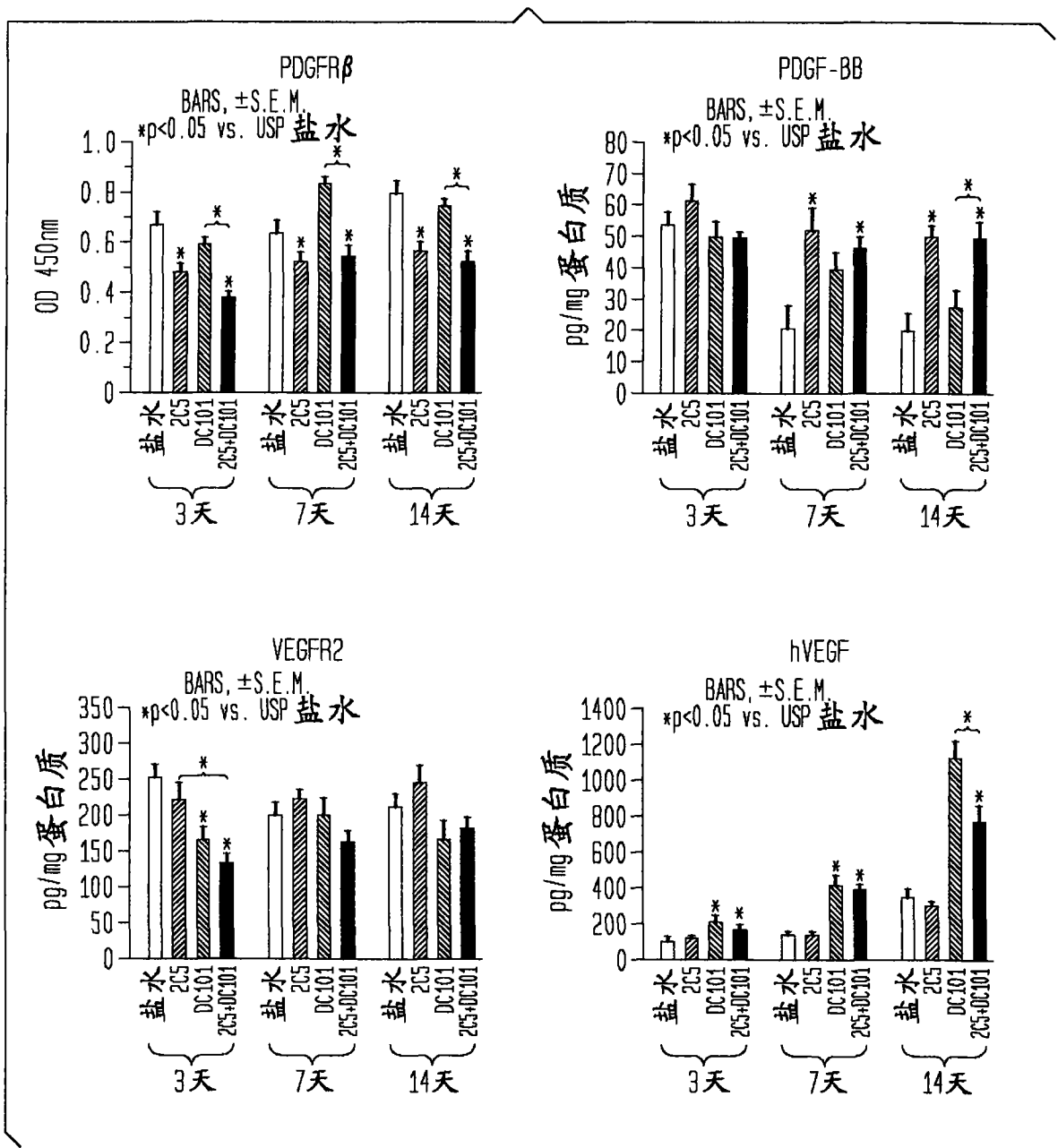


图 14A

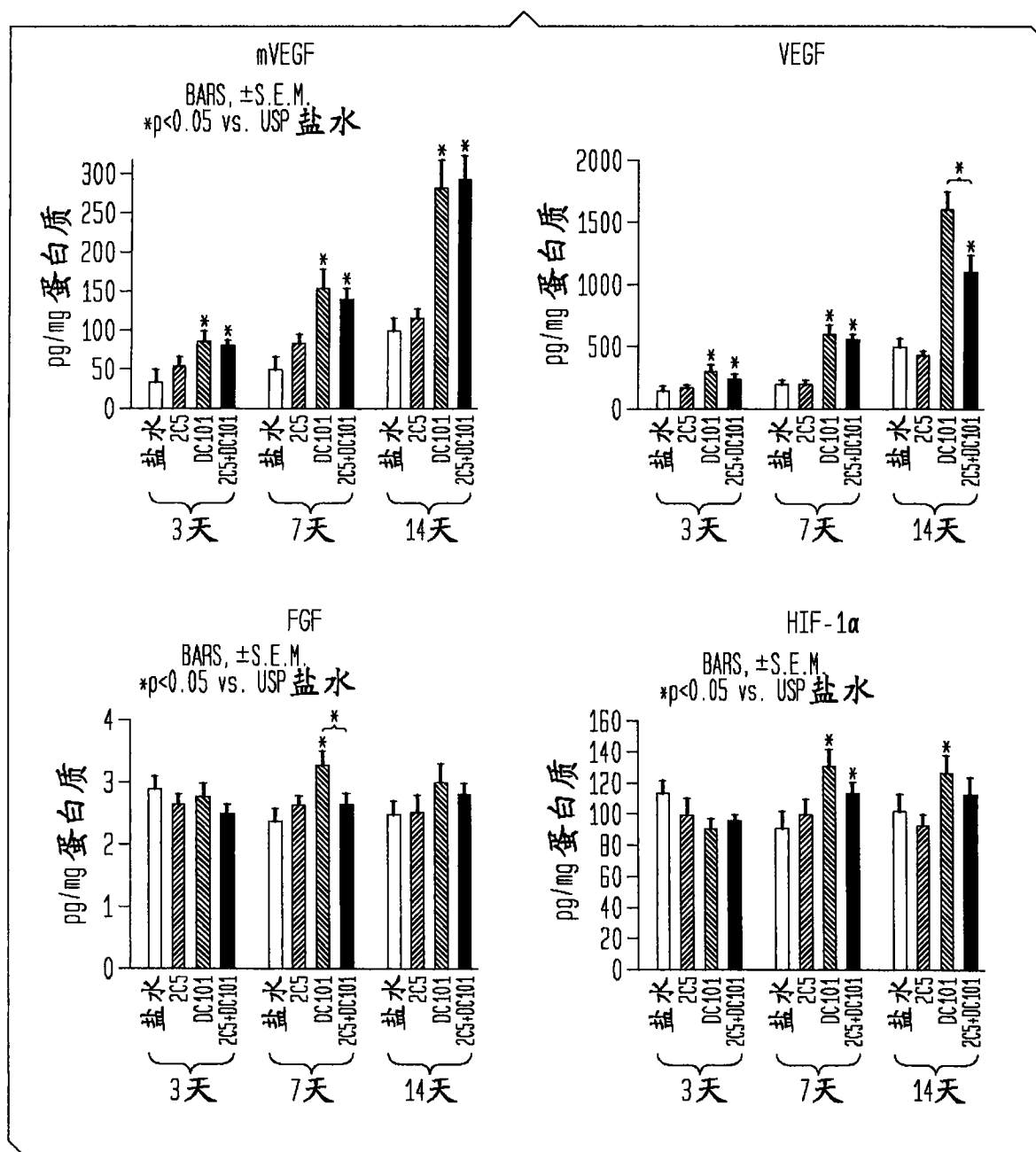


图 14B

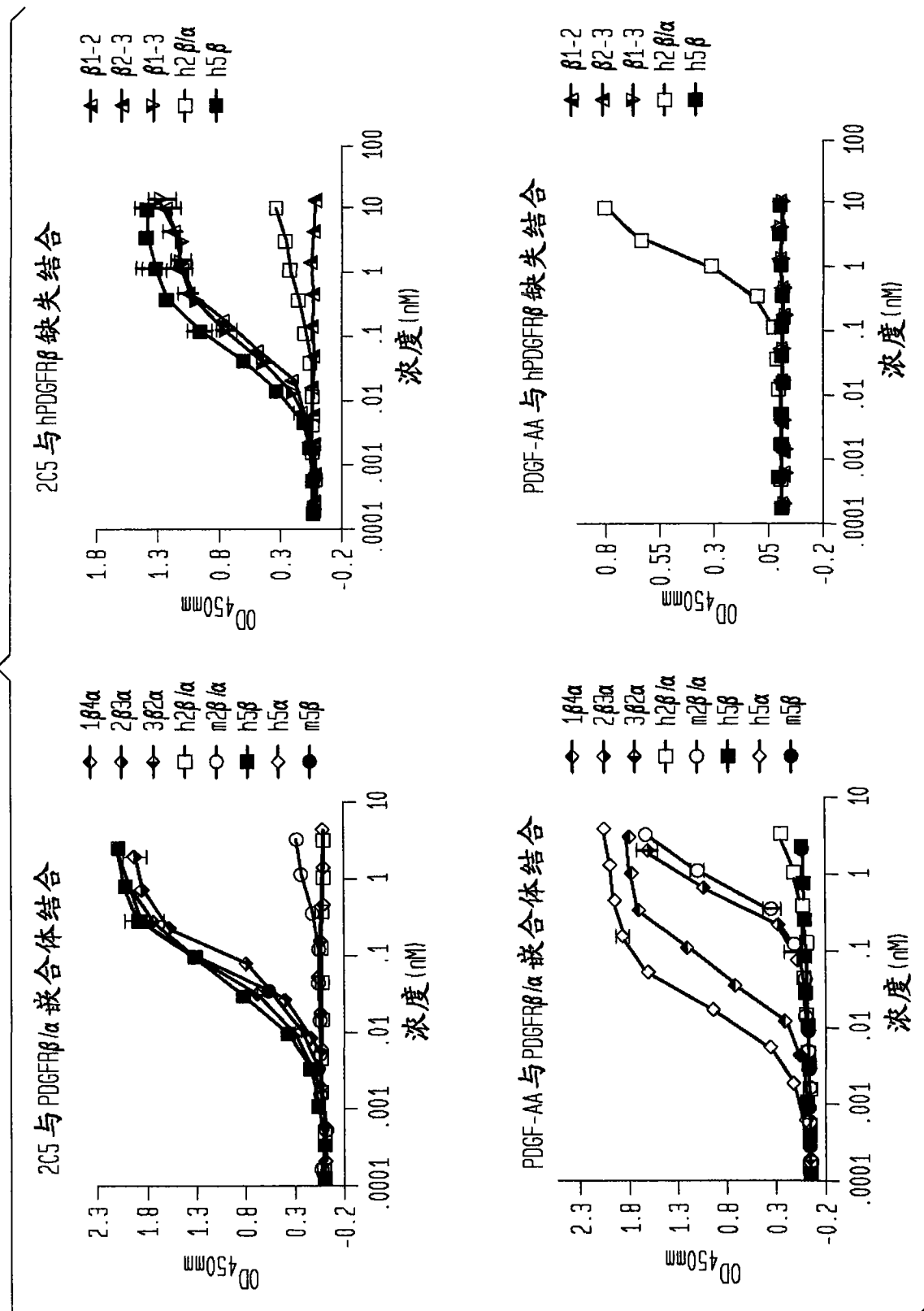


图 15A

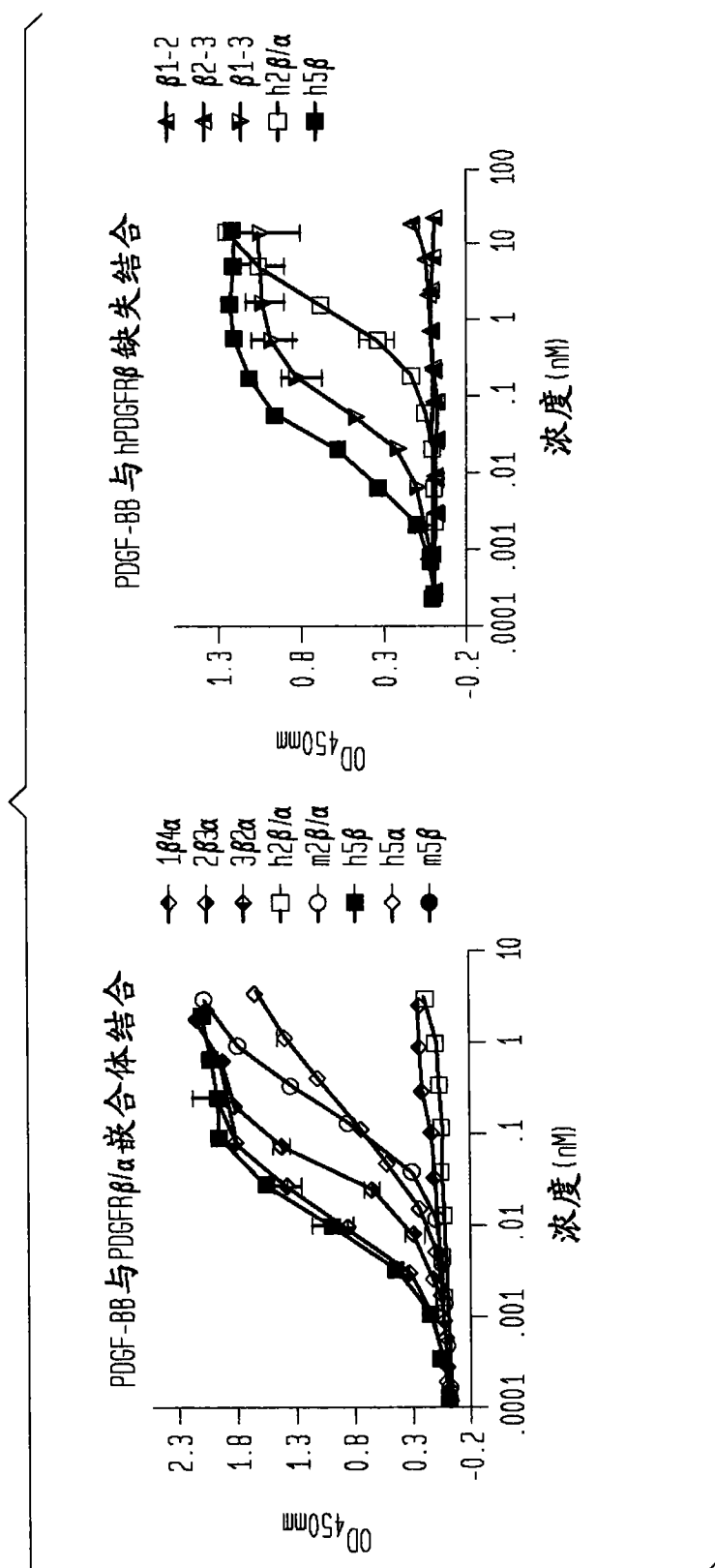


图 15B

1B3 的序列信息:**1B3 VH 的 DNA:**

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT
GTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATAGCATGAAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA
GGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTACATATACTACGCAGACTCCGTG
AAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
TGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAAAGGGGGCGCCGCTCTAGTCTTTGA
CTTCTGGGGCCAGGGAACCTTGGTCACCGTCTCAAGC

1B3 VH 的蛋白质:

QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS**SYSHN**WVRQAPGKGLEWVS**SISSSSSYIY**
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAK**GGRP LLVFDF**WGQGLVTVSS

1B3 VL 的 DNA:

GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA
GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAAGAGGGCCACCGGCATCCAGCCAGGTTCACT
GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCACCCCTAGAGTCTGAAGATTCTGCAG
TTTATTACTGTAGCAACGTGGCTACTGGCCTCCCATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGA
GATTAACGA

1B3 VL 的蛋白质:

EIVMTQSPGTLSPGERATLSC**RASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAPRLLIY**DASKRATGI**
PARFSGSGSGTDFTLTISTLESDSAVYYC**QQRGYMPPIIT**FGQGRLEIKR

图 16

2C5 的序列信息:**2C5 VH 的 DNA:**

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCT
GCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACA
AGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATCATCCCTATCCTTGGTATAGCAAAC TACGCACAGAAGTTC
CAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCC
TGAGATCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCGAGAGATATGGGTTC AAGGAATTATTATTA
CTTCTACTGGGGCCAGGGAACCTTGGTCACCGTCTCAAGC

2C5 VH 的蛋白质:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS**SYAIS**WVRQAPGQGLEWM**GRIIPILGIAN**
YAKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR**DMGSRNYYYFY**WGQGLVTVSS

2C5 VL 的 DNA:

GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCAGGTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGC
TCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTCACTGGC
AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTT
ATTACTGTACGAGCGTAGCAACTGGCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA
ACGA

2C5 VL 的蛋白质:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQSVGRYLA**WYQQKPGQAPRLLIY**GASNRATGIP**
ARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC**QQRSMPL**TFGGGTKVEIKR

图 17