



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201319085 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：101124372

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 07 月 05 日

(51)Int. Cl.：

C07K16/18 (2006.01)

C07K16/46 (2006.01)

C12N15/13 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2011/07/05

中國大陸

201110186469.5

(71)申請人：賽諾菲（中國）投資有限公司（中國大陸）（CN）

中國大陸

上海交通大學（中國大陸）SHANGHAI JIAOTONG UNIVERSITY（CN）

中國大陸

(72)發明人：李 大偉 LI, DAWEI (US)；武正華 WU, ZHENGHUA (CN)；郭昊 GUO, HAO (CN)；朱奇 ZHU, QI (CN)；馬紹司 達西利 S MASHAUSI, DHAHIRI S. (TZ)

(74)代理人：陳翠華

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：26 共 73 頁

(54)名稱

A G R 2 阻斷抗體及其用途

(57)摘要

本發明涉及一種 AGR2 阻斷性單株抗體，尤其是阻斷 AGR2 的人源化單株抗體。本發明還涉及包含該抗體的藥物組合物，製備方法及用途。該抗體可用於阻斷腫瘤生長和轉移。

ELISA檢測AGR2專一性

1: 1000 1: 2000 1: 4000 1: 10⁴ 1: 10⁵ 1: 10⁶





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201319085 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：101124372

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 07 月 05 日

(51)Int. Cl.：

C07K16/18 (2006.01)

C07K16/46 (2006.01)

C12N15/13 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2011/07/05

中國大陸

201110186469.5

(71)申請人：賽諾菲（中國）投資有限公司（中國大陸）（CN）

中國大陸

上海交通大學（中國大陸）SHANGHAI JIAOTONG UNIVERSITY（CN）

中國大陸

(72)發明人：李 大偉 LI, DAWEI (US)；武正華 WU, ZHENGHUA (CN)；郭昊 GUO, HAO (CN)；朱奇 ZHU, QI (CN)；馬紹司 達西利 S MASHAUSI, DHAHIRI S. (TZ)

(74)代理人：陳翠華

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：26 共 73 頁

(54)名稱

A G R 2 阻斷抗體及其用途

(57)摘要

本發明涉及一種 AGR2 阻斷性單株抗體，尤其是阻斷 AGR2 的人源化單株抗體。本發明還涉及包含該抗體的藥物組合物，製備方法及用途。該抗體可用於阻斷腫瘤生長和轉移。

ELISA檢測AGR2專一性

1: 1000 1: 2000 1: 4000 1: 10⁴ 1: 10⁵ 1: 10⁶



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明涉及一種遺傳免疫及分子生物技術領域的單株抗體，具體涉及一種AGR2阻斷抗體及其用途。

【先前技術】

Anterior gradient-2 (AGR2) 最早在雌激素受體表現 (express) 的人乳腺癌細胞株中通過分化篩選發現 (Kuang, W.W. 等人, *Nucleic Acids Res.*, 1998. 26(4): p. 1116-23.), 隨後得到全長cDNA株, 比較後發現與蟾蜍XA-2發育相關蛋白同源並命名為hAG-2 (Thompson, D.A.與R.J. Weigel, hAG-2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998. 251(1): p. 111-6)。AGR2與蛋白二硫化物異構酶 (PDI) 有較高的同源性 (Persson, S.等人, *Mol. Phylogenet. Evol.* 2005 36(3): p.734-40.), 並且具有PDI活性 (Park, S.W.等人, *PNAS*, 2009. 106(17): p. 6950-5.)。AGR2有PDI的活性位點「CXXS」, 這與正常PDI的位點「CXXC」有所區別, 通過其他PDI蛋白的研究表明「CXXS」活性位點具有重拍二硫鍵的功能, 但缺失二硫鍵的合成功能。這也就意味著AGR2有擾亂正常細胞生長的功能, 而缺失回復其功能的能力 (Anelli, T.等人, *EMBO J.*, 2002. 21(4): p. 835-44.、Anelli, T.等人, *EMBO J.*, 2003. 22(19): p. 5015-22.)。

AGR2是原發性和繼發性腫瘤的標識蛋白, 並且可在腫瘤患者循環系統中檢出, 並且與腫瘤的發生和轉移密切相關。AGR2具有促進乳腺癌細胞轉化和遷移的作用 (Liu D等人, *Cancer Res*, 2005, 65(9): 3796-3805.)。AGR2可以增加胰腺癌細胞的侵襲能力, 從

而促進腫瘤轉移(Ramachandran V等人, *Cancer Res*, 2008, 68(19): 7811-7818.)。AGR2在前列腺癌的轉移中起到重要作用(Zhang Y, et al. *Cancer Res*, 2010, 70(1): 240-248.)。直到2010年, Kathryn等人提到了用AGR2多株抗體可抑制乳腺癌細胞的生長(Kathryn E Vanderlaag等人, *breast cancer*, 2010, 12.)。

【發明內容】

本發明涉及如下技術方案：

一種專一性結合AGR2蛋白的抗體，該抗體能與鼠抗人AGR2蛋白單株抗體(monoclonal antibody) 18A4結合基本上相同的AGR2蛋白表位(epitope)。

項1所述的抗體，該抗體是鼠抗人AGR2單株抗體18A4或其人源化形式或嵌合形式。

項1或2所述的抗體，其中該表位係位於AGR2蛋白二硫鍵異構酶活性結構域(domain)。

項1-4任一項所述的抗體，其中該抗體結合的AGR2活性結構域為CPHS；較佳該抗體與PLMIIHHLDE CPHSQALKKV FA(Seq ID No. 12)所示的必要結合區結合。

上述項任一所述的抗體，包含選自如下的至少一種序列：包含Seq ID No. 8所示的重鏈CDR1胺基酸序列，包含Seq ID No. 9所示的重鏈CDR2胺基酸序列，包含Seq ID No. 10所示的重鏈CDR3胺基酸序列，包含Seq ID No. 11所示的輕鏈CDR1胺基酸序列，包含Seq ID No. 12所示的輕鏈CDR2胺基酸序列和包含Seq ID No. 13所示的

輕鏈CDR3胺基酸序列。

項5所述的抗體，其包含：如DYNMD (Seq ID No.8) 所示的重鏈CDR1胺基酸序列，如DINPNYDTTSYNQKFQG (Seq ID No.9) 所示的重鏈CDR2胺基酸序列，如SMMGYGSPMDY (Seq ID No. 10) 所示的重鏈CDR3胺基酸序列，如RASKSVSTSGYSYMH (Seq ID No. 11) 所示的輕鏈CDR1胺基酸序列，如LASNLES (Seq ID No. 12) 所示的輕鏈CDR2胺基酸序列和如QHIRELPRT (Seq ID No. 13) 所示的輕鏈CDR3胺基酸序列。

項6所述的抗體，其特徵是，該抗體的重鏈可變區胺基酸序列如Seq ID No. 2所示，該抗體的輕鏈可變區胺基酸序列如Seq ID No. 1所示。

項6所述的抗體，其特徵是，該抗體的重鏈可變區胺基酸序列如Seq ID No. 4所示，該抗體的輕鏈可變區胺基酸序列如Seq ID No. 3所示。

項1-8任一項所述的抗體，其為人源化抗體，較佳為人源化的完整IgG1抗體。

項1-9任一項所述的抗體，其為抗體片段，較佳為Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、線性抗體、單鏈抗體，更佳為Fab片段。

一種藥物組合物，包含項1-10任一項所述的抗體和可藥用載體。

一種分離的核酸，其編碼項1-10任一項所述的抗體。

一種載體，包含項12所述的核酸。

一種宿主細胞，包含項13所述的載體。

生產人源化抗體的方法，包括培養項14所述的宿主細胞，以便表現）該核酸並產生該抗體。

項15所述的方法，還包括從該宿主細胞培養物中回收該抗體。

使用項1-10任一項的抗體用於治療與哺乳動物中的病理性血管生成相關的病症的方法，該方法包括給藥該哺乳動物該抗體的步驟。

項17的方法，其中該病症是癌症。

項18的方法，其中該癌症選自乳腺癌、卵巢癌、骨肉瘤、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、腎癌、頭頸癌、黑素瘤和多發性骨髓瘤。

項19的方法，其中所述治療包含將第二治療劑與該抗體同時或順序給藥的步驟。

項20的方法，其中該第二治療劑選自：抗-血管生成劑、化療劑和細胞毒劑。

項1-10任一項的抗體在製備用於治療與哺乳動物中的病理性血管生成相關的病症的藥物中的用途，較佳該病症是癌症，更較佳該癌症選自乳腺癌、卵巢癌、骨肉瘤、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、腎癌、頭頸癌、黑素瘤和多發性骨髓瘤。

本發明還涉及項1-10任一項的抗體在檢測患者組織、細胞樣品中的AGR2表現的用途。

本發明還涉及項1-10任一項的抗體在製備檢測患者組織、細胞

樣品中的AGR2表現的試劑、試劑盒或製品中的用途。

本發明涉及融合瘤（hybridoma）細胞株18A4。該融合瘤細胞株於2009年1月19日寄存於中國典型培養物保藏中心（CCTCC），寄存編號為CCTCC-C200902，寄存地址為中國湖北省武漢市武昌珞珈山，武漢大學。

本發明透過上述方法製備得到的抗體與AGR2的結合可採用本領域的通常技術，例如ELISA來測定。

所述的製備具體包括以下步驟：

步驟1：融合瘤細胞培養液的收集。

步驟2：單株抗體的純化。

本發明涉及上述方法製備得到的抗體，可用於阻斷AGR2促進腫瘤生長和轉移，具體為體外抑制乳腺癌腫瘤細胞的生長速率（相對於正常組織來說為異常速率）和體外抑制腫瘤細胞轉移，進一步為體外抑制乳腺癌腫瘤細胞T47D的生長、遷移和侵襲性轉移；可體外抑制乳腺癌腫瘤細胞T47D的細胞週期。

所述的異常生長速率是指超過了正常體內穩態所需和超過了相同來源的正常組織生長速率的生長速率。

所述的抑制或阻斷是指：活性效力的減低或消失。

所述的體外抑制乳腺癌腫瘤細胞的生長速率是指：體外腫瘤細胞數目增或減。腫瘤細胞生長的體外調控可藉由本領域已知的方法來確定，例如實施例所示的MTT實驗。

所述的體外抑制腫瘤細胞轉移是指：體外腫瘤細胞遷移和侵襲

性轉移減緩。腫瘤細胞轉移的體外調控可藉由本領域已知的方法來確定，例如實施例中所述的腫瘤侵襲小室實驗。

【實施方式】

較佳實施態樣的詳細描述

I. 定義

術語「AGR2」和「人前梯度蛋白2」在本文中可互換使用，是指上文所述具有來自人的任何AGR2的全長天然胺基酸序列的分子家族及AGR2所屬的PDI超家族（superfamily），包括潛在形式及前驅物和成熟AGR2（「潛在AGR2」）的結合（associated）或未結合（unassociated）複合物。本文所涉及的這類AGR2應理解為指目前鑒定以及將來鑒定形式中的任一種人AGR2種類，包括衍生自任何已知AGR2的序列且與該序列至少約75%，較佳至少約80%，更佳至少約85%，仍更佳至少約90%，且甚至更佳至少約95%同源的多肽。術語「agr2」指編碼人AGR2的基因。較佳的agr2為天然序列人agr2。

本文中術語「抗體」使用其最廣泛的含義，具體係覆蓋完整單株抗體、多株抗體、由至少兩種完整抗體形成的多專一性抗體（如雙專一性抗體）、和抗體片段，只要它們顯示所需生物學活性。

「結合」目的抗原，如AGR2抗原的抗體指能夠以足夠親和力結合抗原的抗體，以便該抗體可用作靶向表現該抗原的細胞的治療劑。如果抗體是結合AGR2的抗體，那麼它通常優先結合AGR2，而非AGR家族的其他成員，並且可以是不與這類家族的其他蛋白質，諸如BMP、啟動蛋白等發生顯著交叉反應的抗體。具有指定

抗體，諸如命名為18A4的單株抗體的「生物學特性」的抗體指具有該抗體的一種或多種生物學特性的抗體，它與其他抗體的區別在於它結合相同抗原（如AGR2）。例如，具有18A4的生物學特性的抗體可阻斷AGR2的活化和/或結合與18A4所結合的相同AGR2胞外域（ectodomain）表位。

術語「單株抗體」在用於本文時指由基本上同質的抗體群獲得的抗體，即構成群體的各個抗體相同，除了可能的天然存在的突變外，它們通常以極少量存在。單株抗體是高度專一性的，即針對單一抗原位點。另外，與包含針對不同決定簇（表位）的不同抗體的多株抗體製品不同，每種單株抗體針對抗原上的單一決定簇。除了它們的專一性以外，單株抗體的優越性體現在可以合成它們而不受其他抗體的污染。修飾語「單株」表示抗體由基本上同質的抗體群獲得的特徵，並不解釋為需要藉由任何特定方法來生產抗體。

除非另有說明，本發明的「單株抗體18A4」指具有下文實施例中鼠18A4抗體的抗原結合殘基或衍生自下文實施例中鼠18A4抗體的抗體。例如，單株抗體18A4可以是鼠單株抗體18A4或其變體，諸如具有鼠單株抗體18A4的抗原結合胺基酸殘基的人源化抗體18A4。下文實施例2中提供了人源化18A4抗體的實例。

「表位18A4」為AGR2胞外域中單株抗體18A4所結合的區域。為了篩選結合18A4表位的抗體，可進行一般交叉阻斷試驗，諸如 *Antibodies, A Laboratory Manual*，Cold Spring Harbor Laboratory，Ed Harlow和David Lane（1988）中所述。

本文中的單株抗體明確包括「嵌合」抗體，其中重鏈和/或輕鏈的一部分與衍生自特定物種或屬於特定抗體類別或亞類的抗體中的相應序列相同或同源，而鏈的剩餘部分與衍生自另一物種或屬於另一抗體類別或亞類的抗體中的相應序列相同或同源，以及這類抗體的片段，只要它們顯示所需生物學活性。

「完整」抗體為包含抗原結合可變區以及輕鏈恆定區（CL）和重鏈恆定區CH1、CH2和CH3的抗體。恆定區可以為天然序列恆定區（例如人天然序列恆定區）或其胺基酸序列變體。較佳地，完整抗體具有一種或多種效應器（effector）功能。

「抗體片段」包含完整抗體的一部分，較佳包含其抗原結合或可變區。抗體片段的例子包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、線性抗體、單鏈抗體。

「Fv」片段是包含完整的抗原識別和結合位點的抗體片段。此區域由一個重鏈的和一個輕鏈的可變區緊密連接的二聚體組成，該連接（如在scFv中）可以是共價的。在此構型中，每個可變區的三個CDR相互作用來限定VH-VL二聚體表面上的抗原結合位點。

「Fab」片段包括輕鏈的可變區和恆定區以及重鏈的可變區和第一恆定區（CH1）。F(ab')₂抗體片段包含一對Fab片段，其通常在它們的羧基末端附近藉由它們之間的鉸鏈（hinge）半胱胺酸來共價連接。抗體片段的其他化學偶聯法也是本領域已知的。

「單鏈Fv」或「scFv」抗體片段包含抗體的VH和VL結構域，其中這些結構域存在於單條多肽鏈中。通常，Fv多肽還包含VH和VL

結構域之間的多肽接頭，該接頭使scFv形成結合抗原的理想結構。

術語「線性抗體」包含成對的串聯Fd節段（VH-CH1-VH-CH1），它與互補輕鏈多肽一起形成成對的抗原結合區。線性抗體可以是雙專一性的或單專一性的。

本文所用的術語「抗體可變區」指抗體分子的輕鏈和重鏈的部分，其包括互補決定區（CDRs：即CDR1, CDR2和CDR3）和框架區（FRs）的胺基酸序列。VH指重鏈的可變區。VL指輕鏈的可變區。根據本發明所用方法，CDRs和FRs指定的胺基酸位點可以透過Kabat等人（*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD（1991）中描述的編號系統）來限定。

本文所用的術語「互補決定區」(CDRs：即CDR1、CDR2和CDR3)指抗體可變區的胺基酸殘基，其存在對於抗原結合是必需的。每個可變區通常具有鑒定為CDR1、CDR2和CDR3的三個CDR區。每個互補決定區可包含來自Kabat所限定的「互補決定區」的胺基酸殘基（即大約為輕鏈可變區中的殘基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)以及重鏈可變區中的31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)）。

「框架區」(後文稱FR)是CDR殘基之外的那些可變區殘基。每個可變區通常具有鑒定為FR1, FR2, FR3和FR4的四個FR。如果所述CDR根據Kabat來限定，輕鏈FR殘基大致位於殘基1-23（LCFR1），35-49（LCFR2），57-88（LCFR3），和98-107（LCFR4），並且重鏈FR殘基大致位於重鏈殘基的殘基1-30（HCFR1），36-49

(HCFR2), 66-94 (HCFR3), 和 103-113 (HCFR4)。如果所述 CDR 包含來自高變環的胺基酸殘基, 輕鏈 FR 殘基大致位於輕鏈中的殘基 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3), 和 97-107 (LCFR4), 且重鏈 FR 殘基大致位於重鏈殘基的殘基 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3), 和 102-113 (HCFR4)。有些情況下, 當 CDR 包含來自根據 Kabat 限定的 CDR 和高變環的那些胺基酸時, FR 殘基會相應調節。例如, 當 CDRH1 包括胺基酸 H26-H35 時, 重鏈 FR1 殘基在位點 1-25 且 FR2 殘基在位點 36-49。

「T 細胞抗原表位」(T cell epitope) 用於本文是指單株抗體本身作為蛋白質抗原時可被 MHC 分子結合和提呈, 並被 T 細胞抗原受體所識別的可能肽段。單株治療抗體所含的這些肽段會增加患者對治療抗體的免疫反應。這些肽段數量越多, 引起免疫反應的幾率越高。

非人 (如齧齒類) 抗體的「人源化」形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗體。在極大程度上, 人源化抗體指人免疫球蛋白 (受體抗體) 中的高變區殘基用具有所需專一性、親和力和能力的非人物種 (供體抗體) 諸如小鼠、大鼠、兔或非人靈長類的高變區殘基替換的免疫球蛋白。在有些情況中, 將人免疫球蛋白的構架區 (FR) 殘基用相應的非人殘基替換。而且, 人源化抗體可包含在受體抗體或供體抗體中沒有發現的殘基。進行這些修飾是為了進一步改進抗體的性能。通常, 人源化抗體將包含基本上不少於至少一個、通常兩個下述可變區, 其中所有或基本上所有的高變環對應於非人免疫球蛋白的高變環, 且

所有或基本上所有的FR是人免疫球蛋白序列的FR。視需要，人源化抗體還將包含至少部分的免疫球蛋白恆定區（Fc），通常是人免疫球蛋白的恆定區。

「抗-血管生成劑」或「血管生成抑制物」指直接或間接抑制血管生成、脈管生成、或不理想的血管滲透性的小分子量物質、多核苷酸、多肽、分離的蛋白質、重組蛋白質、抗體、或其偶聯物或融合蛋白質。應理解抗-血管生成劑包括那些結合和阻斷血管生成因子或其受體的血管生成活性的製劑。文獻 *Oncogene* , 22:6549-6556 (2003) 中表2列出了已知的抗血管生成因子。文獻 *Sato Int. J. Clin. Oncol.* , 8:200-206 (2003) 中的表1列出了臨床試驗中使用的抗-血管生成劑。

術語「異常血管生成」造成疾病狀態惡化或導致患病狀態的、過度的、不當的或失控血管生成，所述疾病狀態例如癌症，尤其是有血管生成的實體瘤（solid tumor）和轉移瘤（metastatic tumor）。

本文所用術語「細胞毒劑」是指抑制或阻止細胞功能和/或引起細胞破壞的物質。該術語係包括放射性同位素，化療劑和毒素。

「化療劑」是在癌症治療中使用的化學化合物，也稱為抗腫瘤藥物。抗腫瘤藥物一般根據藥物化學結構和來源不同，分為：烷化劑、抗代謝藥、抗腫瘤抗生素、蒽環類抗生素（anthracycline）、抗腫瘤植物藥、激素。根據藥物作用的週期或時相（phase）專一性不同，可將腫瘤化療藥分為：（1）細胞週期非專一性藥物（cell cycle nonspecific agents, CCNSA）烷化劑、抗腫瘤抗生素及鉑類

配合物等；(2) 細胞週期專一性藥物 (cell cycle specificagents, CCSA) 抗代謝藥物、長春類藥物等。

II. 人源化抗AGR2抗體的生產

本領域已經描述了用於將非人抗體人源化的方法。較佳地，人源化抗體具有從非人來源引入的一個或多個胺基酸殘基。這些非人胺基酸殘基常常稱為「輸入」殘基，它們通常取自「輸入」可變區。人源化可本質上遵循Winter及其同事的方法進行 (Jones等人, *Nature*, 321: 522-525(1986); Riechmann等人, *Nature*, 332: 323-327(1988); Verhoeyen等人, *Science*, 239: 1534-1536 (1988))，藉由用高變區序列替換人抗體的相應序列。因此，這類「人源化」抗體是嵌合抗體 (美國專利4,816,567)，其中基本上少於整個人可變區用來自非人物種的相應序列替換。在實踐中，人源化抗體通常是其中一些高變區殘基和可能的一些FR殘基用來自齧齒類抗體中類似位點的殘基替換的人抗體。

用於製備人源化抗體的人可變區的選擇，包括輕鏈和重鏈，對於降低抗原性非常重要。根據所謂的「最適 (best-fit)」方法，用齧齒類抗體可變區序列對已知的人可變區序列的整個文庫進行篩選。然後選擇與齧齒類最接近的人序列作為人源化抗體的人框架區 (FR) (Sims等人, *J. Immunol.*, 151: 2296(1993); Chothia等人, *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987))。另一種方法使用由特定輕鏈或重鏈亞群的所有人抗體的共有序列衍生的特定框架區。同一框架可用於幾種不同的人源化抗體 (Carter等人, *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta等人, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993))。

製備人源化抗體重要的是，抗體在人源化後能保持對抗原的高親和力以及其他有利的生物學特性。下文的實施例描述了結合AGR2的例示性人源化抗AGR2抗體的生產。

本文的人源化抗體包含摻入人重鏈可變區的非人高變區殘基，且在選自第57、58、60、65、67、68和/或70位點上包含框架區(FR)取代，其中使用了Kabat等人(*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))描述的可變區編碼系統描述的可變區編碼。在一個實施態樣中，該人源化抗體包含在選自第57、58、60、65、67、68和70位點上的兩個或多個位點上的FR取代；而在其他實施態樣中，該人源化抗體包含在選自第57、58、60、65、67、68和70位點上的三個或四個位點上的FR取代。在較佳的實施態樣中，該人源化抗體包含第65、67、68和70位點上的、或第67、68和70位點上的、或第68和70位點上的FR取代。在另外的較佳的實施態樣中，該人源化抗體包含第57、58和60位點上的、或第57和60位點上的FR取代。本發明的人源化抗體較佳存在較少而非較多框架取代以便將免疫原性降至最低，但功效也是一個很重要的考慮因素。實際取代的胺基酸較佳為那些保留以便不改變免疫原性或功效的胺基酸。57位點上的天冬醯胺(N)較佳改變為絲胺酸(S)，58位點上的亮胺酸(L)較佳改變為精胺酸(R)，60位點上的絲胺酸(S)較佳改變成蘇胺酸(T)，65位點上的賴胺酸

(K) 較佳改變成麩醯胺酸 (Q)，67位點上的賴胺酸 (K) 較佳改變成精胺酸 (R)，68位點上的丙胺酸 (A) 較佳改變成纈胺酸 (V)，而70位點上的亮胺酸較佳改變成蛋胺酸 (M)。

本文關注的例示性人源化抗體包含重鏈可變區互補決定殘基 DYNMD (SEQ ID NO: 8); DINPNYDTTS YNQKFKG 或 DINPNYDTTS YNQKFQG (SEQ ID NO: 9); 和/或 SMMGYGSPMD Y (SEQ ID NO: 10)，並視需要包含這些CDR殘基的胺基酸修飾，例如其中這些修飾基本上維持或改善抗體的親和力。例如，所關注的抗體變體可以在上述重鏈可變區CDR序列中帶有約1至5個胺基酸、約1至4個胺基酸、約1至3個胺基酸、約1至2個胺基酸取代。可以藉由例如親和力成熟 (affinity maturation) 來製備這類抗體變體。較佳的是，該人源化抗體重鏈可變區包含互補決定殘基 DYNMD (SEQ ID NO: 8); DINPNYDTTS YNQKFKG 或 DINPNYDTTS YNQKFQG (SEQ ID NO: 9) 和 SMMGYGSPMD Y (SEQ ID NO: 10) 中的兩種、最佳所有三種CDR序列。最佳的人源化抗體包含SEQ ID NO:4的重鏈可變區胺基酸序列。

本發明的人源化抗體可包含輕鏈可變區互補決定殘基 RASKSVSTSG YSYMH (SEQ ID NO: 11); LASNLES (SEQ ID NO: 12); 和/或 QHIRELPRT (SEQ ID NO: 13)。在較佳的實施態樣中，在上述段落中的那些重鏈可變區CDR殘基以外還包括該處描述的輕鏈可變區互補決定殘基。這類人源化抗體視需要包含上述輕鏈CDR殘基的胺基酸修飾，例如其中這些修飾基本上維持或改善抗體的親和力。例如，所關注的抗體變體可以在上述輕鏈可變區CDR

序列中帶有約1至5個胺基酸、約1至4個胺基酸、約1至3個胺基酸、約1至2個胺基酸取代。可以藉由親和力成熟來製備這類抗體變體。較佳的是，本發明的人源化抗體的輕鏈可變區包含互補決定殘基RASKSVSTSG YSYMH (SEQ ID NO: 11); LASNLES (SEQ ID NO: 12) 和QHIRELPRT (SEQ ID NO: 13) 中的兩種、最佳所有三種CDR序列。最佳的人源化抗體包含SEQ ID NO: 3所示的輕鏈可變區胺基酸序列。

本發明還關注結合AGR2的親和力成熟抗體。親本抗體可以是人抗體或人源化抗體，例如分別包含輕鏈和/或重鏈可變區序列SEQ ID NO: 3和4的抗體（即型式（version）5）。親和力成熟抗體較佳以優於鼠抗AGR2單株抗體18A4或其變體5的親和力結合AGR2（例如根據使用AGR2胞外域（ECD）的ELISA的評估，親和力提高了例如約2倍或約4倍至約100倍或約1000倍）。

本發明涵蓋結合AGR2的人源化抗體或其親和力成熟抗體的多種形式。例如，人源化抗體或親和力成熟抗體可以為抗體片段，如Fab，視需要偶聯一種或多種細胞毒劑以便生成免疫偶聯物。或者，人源化抗體或親和力成熟抗體可以為完整抗體，諸如完整IgG1抗體。

III. 載體、宿主細胞和重組方法

本發明還提供了編碼人源化抗AGR2抗體的分離的核酸、包含所述核酸的載體和宿主細胞以及用於生產所述抗體的重組技術。

為了重組生產抗體，分離編碼它的核酸，並將其插入可複製載體，用於進一步選殖（DNA擴增）或表現。可以使用一般流程容

易的分離編碼單株抗體的DNA並測序（如使用能夠與編碼抗體重鏈和輕鏈的基因專一性結合的寡核苷酸探針）。可以獲得許多載體。載體構件通常包括但不限於下列一種或多種：信號序列、複製起點、一種或多種標記基因、增強子元件（enhancer element）、啟動子和轉錄終止序列。

(i) 信號序列構件

不僅可以直接重組生產本發明的抗AGR2抗體，而且可以作為與異源多肽的融合多肽，該異源多肽較佳在成熟蛋白質或多肽的N-末端處帶有專一性切割位點的信號序列或其他多肽。較佳受到宿主細胞識別並加工（即受到信號肽酶切割）的異源信號序列。例如，為了酵母分泌，可以用例如酵母轉化酶前導序列、 α -因子前導序列。在哺乳動物細胞表現中，可以利用哺乳動物信號序列以及病毒分泌前導序列，例如單純皰疹gD信號。

將這類前驅物區的DNA連接到編碼抗AGR2抗體的DNA的讀碼框中。

(ii) 複製起點構件

表現和選殖兩種載體都含有能夠使載體在一種或多種選擇的宿主細胞中複製的核酸序列。一般來說，在選殖載體中，這種序列為能夠使載體不依賴於宿主染色體DNA複製的序列，包括複製起點或自主複製序列。眾所周知多種細菌、酵母和病毒的這類序列。

(iii) 選擇基因構件

表現和選殖載體可以含有選擇基因，也稱為選擇標記。典型的

選擇基因編碼如下蛋白質：(a)賦予抗生素或其他毒素抗性，如胺苄青黴素、新黴素、甲胺蝶呤或四環素；(b)補足營養缺陷；或(c)提供不能由複合培養基獲得的關鍵營養物，例如編碼芽孢桿菌D-丙胺酸消旋酶的基因。

(iv) 啟動子構件

表現和選殖載體通常含有受到宿主生物體識別的啟動子，且與編碼抗AGR2抗體的核酸可操作連接。

(v) 增強子元件構件

常常通過在載體中插入增強子序列來提高高等真核細胞對編碼本發明抗AGR2抗體的DNA的轉錄。已知來自哺乳動物基因的許多增強子序列。然而，通常使用來自真核細胞病毒的增強子。

(vi) 轉錄終止構件

用於真核宿主細胞的表現載體還將含有終止轉錄和穩定mRNA所必需的序列。這類序列通常可以由真核或病毒DNA或cDNA非轉譯區的5'端和偶爾的3'端獲得。這些區域含有在編碼抗AGR2抗體的mRNA的非轉譯部分中轉錄成聚腺苷酸化片段的核苷酸區段。

(vii) 宿主細胞的選擇和轉化

適於選殖或表現本文載體中的DNA的宿主細胞是上文描述的原核生物、酵母或高等真核細胞。適於此目的的原核生物包括真細菌，諸如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物體。除了原核生物以外，真核微生物，諸如絲狀真菌或酵母也是編碼抗AGR2抗體的載體的合適選殖或表現宿主。

適用於表現糖基化抗AGR2抗體的宿主細胞衍生自多細胞生物體。無脊椎動物細胞的實例包括植物和昆蟲細胞。諸如草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 等宿主。

然而，脊椎動物細胞是人們最感興趣的，而且培養（組織培養）中脊椎動物細胞的繁殖已經成為慣用流程。有用哺乳動物宿主細胞系的實例是用SV40轉化的猴腎CV1系、人胚腎系、幼倉鼠腎細胞、CHO細胞、DG44細胞、DP12細胞系等。

為了生產抗AGR2抗體，用上文所述表現或選殖載體轉化宿主細胞，並在為了誘導啟動子、選擇轉化子或擴增編碼期望序列的基因而適當改動的慣用營養培養基中進行培養。

(viii) 宿主細胞的培養和抗AGR2抗體的純化

可以在多種可商購的培養基，例如RPMI-1640(Sigma)、Dulbecco氏改良的Eagle氏培養基（DMEM，Sigma）中培養用於生產本發明抗AGR2抗體的宿主細胞。而且還可以根據需要向這些培養基中添加激素和/或其他生長激素、鹽、緩衝劑、抗生素、痕量元素和葡萄糖等本領域技術人員知道的必需補充物。培養條件諸如溫度、pH等可根據所選擇的宿主細胞做適當調整，這對本領域普通技術人員而言是容易做到的。

在使用重組技術時，可以在細胞內或在周質空間（periplasmic space）中生成抗體，或者直接分泌到培養基中。如果在細胞內生成抗體，那麼作為第一步，藉由例如離心或超濾清除宿主細胞或裂解片段的微粒碎片。如果將抗體分泌到培養基中，那麼通常首先使用商品化蛋白質濃縮濾器濃縮來自這類表現

系統的上清液。在任何上述步驟中，可以包括蛋白酶抑制劑來抑制蛋白水解，而且可以包括抗生素來防止外來污染物的生長。

可以使用例如羥磷灰石層析、凝膠電泳、透析和親和層析（較佳的純化技術是親和層析）來純化由細胞製備的抗體組合物。蛋白A作為親和配體的適宜性取決於抗體中存在的任何免疫球蛋白Fc結構域的種類和同種型。根據待回收的抗體，也可使用其他蛋白質純化技術諸如反相HPLC、陰離子或陽離子交換層析、SDS-PAGE和硫酸銨沉澱等等。

IV. 藥用製劑

製備依照本發明使用的抗體的治療用製劑，即將具有所需純化程度的抗體與視需要的製藥學可接受的載體、賦形劑或穩定劑混合，以冷凍乾燥製劑或水溶液的形式儲存。可接受的載體、賦形劑或穩定劑在所採用的劑量和濃度對接受者是無毒的，這對本領域技術人員而言是顯而易見的。

本文中的製劑還可包含所治療具體適應症所需的超過一種活性化合物，較佳為該等活性互補且彼此沒有不利影響的化合物。該活性化合物例如，可以是化療劑、細胞毒劑和/或抗血管發生劑等。

V. 製品和試劑盒

在本發明的另一個實施態樣中，提供了裝有可用於治療本發明所述病症的抗體或其藥物組合物的製品和試劑盒。該產品包含一種容器及貼在容器上或單獨放在該產品包裝中的標籤或包裝插頁。合適的容器包括例如瓶子、小管、注射器等。所述容器可以用各種材料諸如玻璃或塑膠製成。該容器裝有有效治療本發明所

述病症的藥物組合物。該標籤或包裝插頁表明該組合物用於治療該疾病，例如癌症，例如乳腺癌（例如轉移性乳腺癌）、前列腺癌、肺癌（例如非小細胞肺癌）、結腸直腸癌等。

此外，該產品可以包括：(a)其中裝有組合物的第一容器，其中該組合物包含本文的單株抗體，較佳人源化的單株抗體；和(b)其中裝有組合物的第二容器，其中該組合物包含人源化抗體以外的治療劑。本發明該實施態樣的產品還可包括表明該第一和第二組合物可聯合用於治療諸如癌症的包裝插頁。或者/另外，所述產品還可包括第二（或第三）容器，其中裝有製藥學可接受的緩衝劑，諸如注射用抑菌水（BWFI）、磷酸鹽緩衝鹽水。它還可包括商業和使用者觀點來看所需的其他物質。

VI. 使用抗AGR2單株抗體的治療

本發明關注的是抗AGR2抗體可用於治療腫瘤，例如乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、結腸直腸癌，非小細胞肺癌，腎癌，肝癌，頭頸癌，黑素瘤，卵巢癌和多發性骨髓瘤等等。

可以將其他治療方案與抗AGR2抗體的施用聯合。聯合施藥包括使用分開的製劑或單一藥物製劑的共同施藥，和按照任一次序依次施藥，其中較佳存在一段時間所有兩種（或多種）活性劑同時發揮其生物學活性。

在一個較佳的實施態樣中，用兩種不同的抗AGR2抗體治療患者。在另一實施態樣中，將一種或多種抗AGR2抗體的施用與針對另一種腫瘤相關抗原的抗體的施用聯合。在另一實施態樣中，AGR2抗體可以與起抑制血管發生作用的抗血管發生劑聯合。

在一個實施態樣中，本發明的治療包括聯合施用抗AGR2抗體（一種或多種）與一種或多種哺乳動物免疫功能調節劑，諸如細胞激素，以及化療劑或生長抑制劑，包括共同施用不同化療劑的混合物。較佳的化療劑包括紫杉烷類（如紫杉醇和多西他賽）和/或蔥環類抗生素。可以按照製造商的說明或如本領域技術人員根據經驗的決定使用這類化療劑的製劑和給藥態樣。

任何上述與本發明抗體聯合施用的藥物的合適劑量可以是其一般治療情況下所使用的劑量，也可以因與本發明抗AGR2抗體的聯合適用而使其使用的劑量降低。

本發明抗體的合適劑量可根據疾病的類型和嚴重程度從約1微克/公斤至15毫克/公斤適當調整，可以透過例如一次或多次分開的方式施藥，還可以連續輸注。典型的日劑量可以在約1微克/公斤至100毫克/公斤，這取決於治療的目的、先前的療法、患者的臨床病史和對抗體的反應以及主治醫師的判斷。

VII. 抗AGR2單株抗體的檢測用途

本發明的抗體（例如人源化抗AGR2抗體）還具有非治療性應用。例如抗AGR2單株抗體還可以用於檢測AGR2蛋白質在特定細胞、組織或血清中的表現。

就診斷應用而言，一般可用檢測部分，例如放射性同位素、螢光標記物、或酶-基質標記物對抗體進行標記。本領域技術人員瞭解實現這一目的的各種技術。例如，可以將抗體與生物素偶聯，或者，將抗體與小分子半抗原（例如地高辛（digoxin））偶聯。

本發明的抗體可以用於任何已知測定方法，諸如競爭性結合測

定、直接和間接夾心式測定(sandwich assay)、和免疫沉澱測定法。

為便利起見，可以在試劑盒中提供本發明的抗體，即預定量的試劑與用於進行診斷試驗的說明書的包裝組合。如果用酶標記抗體，那麼試劑盒將包括酶所需的基質和輔因子（例如提供可檢測發色團或螢光團的基質前驅物）。此外，可以包括其他添加劑，諸如穩定劑、緩衝劑（例如封閉緩衝劑或裂解緩衝劑）等。各種試劑的相對量可以廣泛改變以便提供實質性優化試驗靈敏度的試劑在溶液中的濃度。具體而言，可以將這些試劑作為乾粉提供，通常為冷凍乾燥的，它們包括在溶解時提供具有合適濃度的試劑溶液的賦形劑。

實施例

實施例1：單株抗體18A4的生產和鑒定

A. 融合瘤細胞培養液的收集

用RPMI-1640培養液（含10%牛血清，1%抗生素）連續培養細胞3天，使細胞量保持80%並確保細胞在對數生長期，用PBS洗滌，換為不含血清的RPMI-1640培養液培養48小時後收集上清液。

B. 單株抗體的純化

採用Protein-G免疫親和層析法按照Pierce Protein G Agarose（20399）說明書純化抗體。簡要步驟如下：從4°C冰箱取出柱材料及所有的試劑，在室溫放置，使其溫度達到室溫；溫和混勻管柱材料，取2毫升50%柱材料混懸液裝入柱子，注意不要有氣泡；加入5毫升結合緩衝液平衡柱子；樣品先通過0.45微米濾膜過濾的

方法去除雜質，然後用結合緩衝液：樣品的比例為1：9稀釋樣品，使樣品的鹽濃度及pH值符合結合要求；將稀釋的樣品上柱，上樣總量在最大結合能力（5毫克小鼠IgG/毫升管柱材料）的80%以下可做到最大結合，否則流出液中會含有抗體，使用5毫升洗脫緩衝液洗脫所需的抗體，1毫升/管收集，收集前在管中加入100微升1M磷酸或Tris中和液，考馬斯亮藍G-250（Coomassie Brilliant Blue G-250）法測定各管蛋白濃度。混合蛋白濃度高的樣品，使用PBS（磷酸鹽緩衝液）進行透析改變溶液體系，使用12毫升洗脫緩衝液再生柱子。

實施例2：單株抗體效價檢測

ELISA 檢測抗體效價步驟如下：包被酶表板100微升/孔（抗原濃度3微克/毫升，若免疫原為融合蛋白，標籤蛋白也需包被），4°C過夜或37°C孵育2小時，倒去液體、倒扣平板、拍乾。封閉：加200微升/孔封閉液，4°C過夜或37°C 2小時，倒去液體、倒扣平板、拍乾。加待測樣品100微升/孔（稀釋倍數： 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 。陽性、陰性對照稀釋1000倍，100微升/孔），37°C孵育半小時或4°C過夜，倒去液體、倒扣平板、拍乾。洗滌緩衝液洗滌3×3分鐘，拍乾。加二抗：二抗用封閉緩衝液稀釋1：10000，100微升/孔，37°C 20分鐘，洗滌緩衝液洗滌3×3分鐘，拍乾。顯色：加底物100微升/孔，顯色至充分變暗。終止：加終止液100微升，然後讀取該板在450奈米處的吸光度。該板拍照記錄，見第1圖，表明該抗體的效價達到 10^6 以上。

實施例3：單株抗體的專一性

免疫印跡檢測：

細胞裂解前用 $1 \times \text{PBS}$ 洗滌2次，加10毫升PBS，將細胞刮下。1000rpm，離心5分鐘，棄上清液。加入細胞5倍體積的NP40裂解液（加蛋白酶抑制劑），混勻，裂解20分鐘；腫瘤組織用5倍體積的NP40裂解液（加蛋白酶抑制劑），混勻，裂解20分鐘。15000rpm， 4°C ，離心1分鐘，收取上清液，蛋白定量（以上裂解操作都是在冰上完成）。5xPAGE 蛋白載入緩衝液（protein loading buffer）（加 β -巰基乙醇）懸浮沉澱， 95°C 加熱5分鐘。用15 % SDS-PAGE 瓊脂糖凝膠分離蛋白，恆壓80伏特，電泳2小時，使蛋白分開。將蛋白電轉移至硝酸纖維素膜上，400毫安培，45分鐘，用5 % 牛血清白蛋白室溫封閉1小時。一抗室溫雜交2小時， $1 \times \text{PBST}$ 洗 3×10 分鐘。一抗稀釋倍數：兔源AGR2抗體1：10000， β -actin 1：2000。二抗室溫雜交1小時， $1 \times \text{PBST}$ 洗 3×10 分鐘。曝光顯影掃描結果。

結果表明：單株抗體可檢測到T47D、轉染AGR2-pcDNA3的293T細胞中的AGR2的表現，而轉染pcDNA3的293T細胞檢測不到AGR2的表現。見第2圖。

B．免疫沉澱

樣品準備：將0.2毫升蛋白G（50% slurry Protein G Agarose from Pierce）加入盛有10毫升PBS的離心管中，混勻，RT，30分鐘。1500 rpm，離心2分鐘，去上清液10毫升。加入含抗體（第3圖所示抗體，同型IgG作為對照抗體）培養基10毫升，混勻。搖床，RT >2小時或 4°C 過夜。離心去上清液。用10毫升PBS洗兩次。將與抗體結合

的蛋白G珠（Protein G beads）轉入1.5毫升離心管。加PBS至0.2毫升。4°C備用。收集T47D、MCF7細胞上清液（24小時）20毫升，分為兩管，每管10毫升。一管用結合有本發明抗體抗體的蛋白G做免疫沉澱，去除AGR2，一管用結合有對照抗體的蛋白G作為對照。RT >2小時或4°C過夜，離心，收集上清液再重複一次免疫沉澱。用PBS 1毫升洗4次。5xPAGE蛋白載入緩衝液（加 β -巰基乙醇）懸浮沉澱，95°C，5分鐘。免疫印跡檢測效果。

結果表明：單株抗體可藉由免疫沉澱檢測到T47D、MCF7上清液中的AGR2，見圖3。

免疫螢光檢測：

將圓形蓋玻片放入24孔板中，PBS潤洗一次。再用相應的培養基浸潤，吸乾培養基。將T47D、MCF7細胞胰酶消化轉入到24孔板。細胞貼壁後，吸掉培養液，PBS洗滌1次。4%甲醛室溫固定10-20分鐘，PBS洗滌1次。0.5% TritonX-100，0.3%羊血清室溫40分鐘。加一抗，4 °C，過夜，PBS洗滌3×5分鐘。加螢光二抗，室溫，30分鐘，PBS洗滌3×5分鐘。DAPI染色2至5分鐘，PBS洗滌2×5分鐘。封片觀察用螢光顯微鏡觀察。

結果表明：單株抗體可檢測到乳腺癌細胞T47D、MCF7細胞內的原位AGR2的表現，見第4圖。

實施例4：人源化18A4抗體的製備

首先將鼠單株抗體18A4的可變區選殖到能夠產生小鼠/人嵌合抗體的載體中。使用STRAGENETM RNA提取試劑盒，按照製造商的方案從融合瘤細胞中分離總RNA。通過RT-PCR擴增可變區，凝

膠純化，並如先前所述插入基於pUC119，含有人 κ 恆定區和人CH1結構域的質體的衍生物。將所得質體轉形到大腸桿菌菌株DH5 α 中以獲得質體。抽提質體並對其進行測序，獲得鼠18A4單株抗體重鏈和輕鏈的可變區序列（SEQ ID NO：1和SEQ ID NO：2）。

對獲得的18A4抗體序列進行比對分析，以同源性最高的人抗體胚系基因IGHV1-46*03和IGKV3-20*02為模板（template），基於對18A4三維結構的類比分析和以IGHV1-46*03和IGKV3-20*02為模板的上市抗體藥物序列的分析，獲得理論抗體序列18A4Hu1的重鏈胺基酸序列和輕鏈胺基酸序列，序列比對結果如第5圖和第6圖。根據理論序列應用重疊PCR方式合成抗體V區，並通過重疊PCR的方法將合成的人源化抗體重鏈可變區和人源化抗體輕鏈可變區連接入基於pGmax的含有人IgG1重鏈恆定區和人輕鏈Kappa恆定區的抗體表現質體中，完整抗體表現質體構建見第7圖（序列為SEQ ID NO：7）。

構建成功的18A4Hu1抗體表現質體轉染293T細胞進行真核表現，具體來說，將2毫克/毫升的PEI與表現質體以3：1（w：w）比例混合後作為轉染液轉染293T細胞，6小時後換成含10%血清的DMEM培養基培養12小時，再更換為無血清培養基，培養4天，收取上清液，從而獲得抗體。

對獲得的抗體上清進行分離純化，具體來說，通過蛋白A對上清液進行親和層析，對分離的含抗體的洗脫液進行透析，從而獲得純抗體18A4Hu1，用A280吸光法或考馬斯亮藍法測定純化抗體濃度。對純化的抗體進行SDS-PAGE電泳分析，進一步確定其純度（見

第8圖)。

對產生的人源化抗體18A4Hu1進行親和力分析，並與鼠18A4抗體進行比較，具體來說，用3奈克/微升濃度的抗原AGR2進行包板（96孔酶標板），每孔100微升，用封閉液封閉。將濃度為0.1奈克/微升濃度的抗體與不同濃度的抗原等體積混合並37度孵育過夜，抗原濃度從1000nM起倍比稀釋。將100微升孵育後的混合液分別加入不同的酶標孔中，37度孵育1小時，洗滌酶標板後加入抗人或抗鼠的HRP標記的二抗，37度孵育1小時，加入顯色液A和B各80微升，37度顯色30分鐘，加50微升終止液終止，OD450處測吸光值，繪製親和力曲線圖並計算抗體親和力。鼠抗體18A4和人源化抗體18A4Hu1的親和力曲線如第9圖。

通過對人源化抗體18A4Hu進行T細胞抗原表位分析，對個別氨基酸進行人源化替代，產生多種人源化變體（變體資訊如第10圖），並對人源化變體的抗原結合能進行比較，從而選出抗原表位更少而親和力更高的人源化抗體，例如稱為Agtuzumab的抗體，見第11圖所示。

對產生的人源化抗體Agtuzumab進行特性鑒定。藉由用抗人二抗對Agtuzumab的種屬特性進行分析，確認Agtuzumab為人源化抗體（如第12圖）。透過western-blot分析Agtuzumab的抗原專一性，確認其可以和表現純化的AGR2-MBP蛋白專一性結合（如第13圖），確認其可以與表現AGR2的細胞MCF7裂解液中的AGR2結合（如第14圖），確認其可以和天然狀態下的AGR2結合並能夠藉由免疫沉澱（IP）的方法檢測到MCF7上清液中的天然分泌型AGR2（如第

15圖)。

對AGR2進行抗原表位分析並對潛在的多個抗原表位胺基酸位點分別進行突變(突變資訊如第16圖)，用AGR2突變體作為抗原，18A4和Agtuzumab作為一抗，通過western-blot進行抗原表位元分析，圖17顯示18A4和人源化抗體Agtuzumab具有一致的抗原表位。

通過競爭性ELISA法測定和比較Agtuzumab的親和力狀況，第9圖顯示Agtuzumab的親和力與鼠18A4親和力相近，且略高於18A4Hu1，具有更高的親和力和更低的潛在抗原性。

藉由腫瘤轉移實驗，證明人源化抗體Agtuzumab同18A4一樣，具有抑制HepG2轉移的生物學功能，見第18圖。實施例5：體外抑制腫瘤細胞生長的實驗

MTT法檢測方法如下：MCF-7、T47D細胞株用相應的細胞培養液傳代培養至對數生長期(至少傳兩代，每代生長至80%匯合)，經胰酶-EDTA液消化，調整細胞終濃度為 5×10^3 至 5×10^4 /毫升，接種於96孔板中，每孔200微升。查看每孔細胞是否均勻分佈。待細胞貼壁後，每種細胞分別加入不含抗體、含有20微克/毫升本發明抗體和20微克/毫升對照抗體IgG的培養基。48小時後，每孔加入濃度為5毫克/毫升的MTT溶液20微升。繼續溫孵4小時後，棄去96孔板上各孔中原有液體，每孔再加入DMSO 150微升以溶解formazan沉澱。室溫下放置0.5小時後，在脫色搖床上振盪10分鐘，用酶標儀在490奈米波長下測定各孔的吸光值。

結果表明：單株抗體在體外抑制了T47D細胞和MCF-7細胞的生長。見第19圖：本發明抗體及對照抗體IgG濃度均為20微克/毫升。

實施例6：體外抑制腫瘤細胞遷移的實驗

劃痕實驗步驟如下：將乳腺癌細胞T47D、卵巢癌細胞SKOV3，骨肉瘤細胞U2OS，小鼠成纖維細胞3T3鋪入6孔板（細胞70%匯合），待其長滿後用窄的細胞刮板劃掉中間的細胞，用1×PBS洗兩次，洗掉刮下的細胞。照相，並做好記號。加入含有20微克/毫升本發明抗體或20微克/毫升對照抗體IgG的培養基。開始計時，分別在24、48小時拍照（注意要找到相應記號，拍攝同一區域）。

結果表明：單株抗體可體外抑制T47D、SKOV3，3T3細胞的遷移。見第20圖：本發明抗體及對照抗體IgG濃度均為20微克/毫升。

實施例7：體外抑制腫瘤細胞轉移的實驗

腫瘤轉移小室實驗分為6組，1：對照，2：MBP（25微克/毫升），3：AGR2-MBP融合蛋白（25微克/毫升）4：AGR2-MBP（25微克/毫升）+IgG（25微克/毫升），5：AGR2-MBP（25微克/毫升）+18A4（25微克/毫升），6：18A4（25微克/毫升）。

腫瘤轉移小室內培養基都是RPMI-1640培養基+1%FBS。

實驗中先加好外孔培養基，胰酶消化HepG2、SKOV3細胞，計數，離心去除上清液。將細胞濃度用含1%FBS的RPMI-1640培養基調整為 5×10^5 個/毫升。每個小室內加入200微升，放於細胞培養箱中培養（5%CO₂，37°C），開始計時。分別在24小時和48小時將小室取出，刮去內室的細胞，將小室置甲醇溶液室溫固定15分鐘。結晶紫染色液染色5分鐘。乙醇脫色15分鐘，放入PBS中，拍照，統計穿膜細胞數。

結果表明：本發明抗體可體外抑制肝癌細胞HepG2，SKOV3的轉移。見第21圖。

實施例8：體外抑制腫瘤細胞週期的實驗

流式細胞儀檢測細胞週期步驟如下：T47D細胞株用相應的細胞培養液傳代培養至對數生長期（至少傳兩代，每代生長至80%匯合），經胰酶-EDTA液消化，鋪入6孔板中。待細胞貼壁後換成含有20微克/毫升本發明抗體或20微克/毫升對照抗體IgG的培養基。分別在加入抗體後的0、6、12、24、48小時，用1× Trypsin消化細胞，加10毫升培養基將細胞吹散至單個細胞，並收集至15毫升離心管，200×g離心5分鐘收集細胞。棄上清液，用5毫升 1×PBS洗兩次。棄上清液後，用1毫升預冷的1×PBS徹底懸浮細胞，將其滴加入含有9毫升70%預冷的乙醇中，混勻，冰上孵育1小時。200×g離心5分鐘收集細胞，棄上清液，加15毫升1×PBS在冰上洗細胞3-4小時。200×g離心5分鐘收集細胞，棄上清液，加500微升PI染色緩衝溶液，轉移至1.5毫升離心管中。將離心管子用鋁箔紙包裹，37℃孵育30分鐘。上機檢測細胞週期。

結果表明：單株抗體可以通過增加細胞週期的G1/G0期、減少S和G2/M期體外抑制乳腺癌細胞T47D、MCF7的生長（第22圖）。

實施例9：單株抗體的可變區序列確定

確定了阻斷性單株抗體的抗原結合位點的基因序列。方法如下：從融合瘤細胞中提取RNA，按照Marks等人的方法通過PCR擴增VL和VH，確定基因序列（Marks, J. D.等人，*J. Mol. Biol*，222：589-597，1991）。實驗所用引子（primer）為：輕鏈

5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGGA-3'，重鏈
5'-CCACAATCCCTGGGCACAA-3'，兩者都是反向測序。

實施例10：單株抗體對應抗原表位的序列確定

確定了單株抗體對應抗原AGR2的抗原表位的胺基酸序列（見第23圖）。方法如下：從MCF7細胞中提取RNA，用PCR方法得到AGR2的mRNA，反轉錄得到cDNA，構建pcDNA3-AGR2-His真核表現質體，然後對AGR2進行缺失突變，突變使用的上游引子：5'-GTTGCTTGTCTTGGATTTATATAGA-3'，下游引子：5'-GCTGAAAATAAAGAAATCCAGAAAT-3'。該突變使抗原表位PLMIIHHLDECPHSQALKKVFA缺失。western blot檢測阻斷性單株抗體不再與突變後的AGR2蛋白結合，從而確定了該抗體結合的AGR2抗原表位胺基酸序列。接著對AGR2進行點突變，突變使用的上游引子5'-ATGAATAATCATCAAGGGTTTGTTC-3'，下游引子5'-CACTTGGATGAGTGCCACACA-3'，將其中PDI活性位點「CXXS」的「C」突變成「S」，單株和抗體對這個突變蛋白的結合明顯減弱。確定該單株抗體可專一性結合抗原表位「PLMIIHHLDECPHSQALKKVFA」，且可能對PDI活性進行抑制。見第24、25圖。

實施例11：抗體動物體內實驗

用6周齡的雌性BALB/c裸鼠（180 - 220公克），將處於對數生長期的SKOV3細胞懸浮於PBS中，注射至小鼠皮下（ 2×10^6 /隻）。將注射細胞後的小鼠隨機分為兩組（每組8隻）：PBS組，18A4組。在注射細胞後4天開始腹腔用藥，用藥量：18A4為8毫克/公斤[1,

2]，等體積的PBS為對照。每週2次，注射藥物的同時量腫瘤的大小。藥物處理14周後，結束實驗。參考Herceptin和Avastin的文獻[3-5]公式： $(L \times W^2) / 2$ 計算腫瘤的體積。

結果表明，單株抗體可在體內抑制腫瘤的生長。見第26圖。

【圖式簡單說明】

第1圖為ELISA檢測AGR2專一性。

第2圖為免疫印跡檢測AGR2專一性。

A：1.MCF7 細胞裂解液；2.轉染AGR2-pcDNA3的MB-231裂解液；3.轉染pcDNA3的MB-231裂解液；4.轉染AGR2-pcDNA3的293T裂解液；5.轉染pcDNA3的293T。

B：單株抗體可與鼠AGR2交叉反應。

第3圖為免疫沉澱檢測AGR2專一性

第4圖為免疫螢光檢測AGR2專一性。

第5A圖和第5B圖描繪了鼠單株抗體18A4的輕鏈可變區(VL)(圖5A)和重鏈可變區(VH)(圖5B)(分別為SEQ ID NO：1和2)；人源化18A4Hu1型式的VL和VH結構域(分別為SEQ ID NO：3和4)；及人VL和VH共有框架(hum κ III，輕鏈 κ 亞型III；humI，重鏈亞型I)(分別為SEQ ID NO：5和6)的胺基酸序列對比。星號鑒定了人源化18A4Hu1與鼠單株抗體18A4之間或人源化18A4Hu1與人共有框架區之間的差異。為了比較，給互補決定區(CDR)加下劃線。

第6A圖和第6B圖描繪了鼠單株抗體18A4的輕鏈可變區(VL)(圖

2A) 和重鏈可變區 (VH) (圖2B) (分別為SEQ ID NO: 1和2); 人源化18A4Hu1型式的VL和VH結構域 (分別為SEQ ID NO: 3和4); 及人胚系VL和VH共有框架 (hum κ III, 輕鏈 κ 亞型III; humI, 重鏈亞型I) (分別為SEQ ID NO: 5和6) 以及以相關胚系VL和VH為樣板產生的上市藥物的共有序列的胺基酸序列對比。「-」代表與18A4具有相同的胺基酸,「*」代表上市藥物變化較大的胺基酸位點,暗示該位點的變化對抗體的親和力和專一性有較大影響。

第7圖為完整抗體表現質體的構建示意圖,圖中片段2包含有IRES組件,片段1包含啟動子,終止子,PolyA尾,抗性基因等常規真核表現質體所具有的相關元件。

第8圖為純化抗體的SDS-PAGE電泳圖,M代表標籤,標識蛋白大小。1、2、5、6泳道為鼠源樣品,3、4、7、8為人源樣品,左圖為非變性膠,右圖為變性膠。染膠試劑為考馬斯亮藍染料。

第9圖為競爭性ELISA法測定抗體親和力實驗結果。

第10圖為人源化抗體變體的突變位點比對及潛在T細胞抗原表位元數目的變化情況。紅色標識為改變的胺基酸序列。

第11圖為人源化抗體變體的抗原結合曲線。

第12圖為western-blot法鑒定人源化抗體Agtuzumab種屬特性。左圖為SDS-PAGE染色結果,右圖為以偶聯HRP的抗人抗體為二抗的western-blot結果,泳道1、2、3分別為鼠18A4抗體,人IgG對照抗體和人源化抗體Agtuzumab。

第13圖為western-blot法檢測人源化抗體Agtuzumab抗原結合專

一性。左圖為SDS-PAGE染色結果，右圖所用的一抗從做往右分別為轉染對照空質體的上清液，表現Agtuzumab的上清液，抗GST的陰性對照抗體上清液，鼠18A4抗體上清液，抗MBP抗體上清液，抗MBP抗體上清液，轉染對照空質體的上清液，表現Agtuzumab的上清液和抗GST的陰性對照抗體上清液。

第14圖為western-blot法檢測人源化抗體Agtuzumab與細胞裂解液中抗原的結合專一性。左圖為SDS-PAGE染色結果，右圖泳道1、2、3、4樣品分別為轉染AGR2質體的293T細胞，未轉染AGR2質體的293T細胞，MCF-7（有天然AGR2表現）細胞裂解液和純化的AGR2-MBP。一抗為人源化抗體Agtuzumab。26KDa的條帶為 β -actin的條帶，用於標識裂解液中蛋白的相對量。

第15圖為免疫沉澱（IP）法檢測人源化抗體Agtuzumab與MCF7細胞中天然AGR2的結合能力。泳道1、2、3分別為MCF7細胞裂解液，經偶聯人IgG的protein G IP下來的蛋白和經偶聯人源化抗體Agtuzumab的protein G IP下來的蛋白，一抗為抗AGR2的兔單抗，二抗為偶聯HRP的兔多株抗體。

第16圖為根據AGR2潛在的抗原表位分析進行突變產生的AGR2-MBP突變體，紅色GGG代表該位點被突變為三個甘氨酸。

第17圖為western-blot法分析鼠18A4和人源化抗體Agtuzumab與AGR2-MBP突變體的結合狀況。泳道1至12分別為AGR2-MBP，AGR2-MBP突變體1至10，MBP。

第18圖為腫瘤侵襲小室實驗檢測抗體可體外抑制肝癌細胞HepG2侵襲性轉移。

第19圖為MTT法檢測抗體可體外乳腺癌細胞T47D、MCF7的生長與遷移。

第20圖為劃痕實驗檢測抗體可體外乳腺癌細胞T47D的遷移。

第21圖為腫瘤侵襲小室實驗檢測抗體可體外抑制肝癌細胞HepG2侵襲性轉移。

第22圖為流式細胞儀檢測抗體可體外抑制乳腺癌細胞MCF-7和T47D的細胞週期。第22 A圖在本發明抗體處理48小時後，檢測到乳腺癌細胞T47D細胞週期受到抑制，T47D細胞G1/G0期較對照上升了8.56%，同時S期和G2/M期分別下降了8.56%。圖22 B. 在本發明抗體處理48小時後，檢測到乳腺癌細胞MCF-7細胞週期受到抑制，MCF-7細胞G1/G0期較對照上升了5.37%，同時S期和G2/M期分別下降了5.37%。

第23圖、第24圖、第25圖為Western blot檢測確認抗體結合於AGR2活性位點結構域。

第26圖A、B：動物腫瘤生長。C、D：實驗組和對照組腫瘤大小比較。E 血管比較。

【主要元件符號說明】

(無)

10

序列表

<110> 賽諾菲（中國）投資有限公司上海分公司
上海交通大學

<120> AGR2 阻斷抗體及其用途

<130> F12W2705

<150> CN 201110186469.5

<151> 2011-07-05

<160> 15

<170> PatentIn version 3.3

 $\langle 210 \rangle$ 1 $\langle 211 \rangle$ 111

<212> PRT

<213> 人工的

 $\langle 220 \rangle$

<223> 18A4 的輕鏈可變區(VL)序列

 $\langle 400 \rangle$ 1

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Gly Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg
85 90 95

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

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 18A4 的重鏈可變區(VH)序列

<400> 2

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

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

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

201319085

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人源化 18A4HU1 型式的 VL 序列

<400> 3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg
85 90 95

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

<210> 4
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人源化 18A4HU1 型式的 VH 序列

<400> 4

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

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

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

201319085

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5
<211> 102
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> VL 共有框架(hum κ III, 輕鏈 κ 亞型 III)的胺基酸序列

<400> 5

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

•

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Trp Thr Phe Gly Gly Gly
85 90 95

Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工的

 $\langle 220 \rangle$

<223> VH 共有框架(humI, 重鏈亞型 I)的胺基酸序列

<400> 6

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

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

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

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

. Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

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

Ser

<210> 7
<211> 8775
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 18A4Hu1 完整抗體表現質體構建體序列

<400> 7
catatgagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca 60
gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtga 120
gttagctcac tcattaggca ccccaggctt tacactttat gcttccggct cgtatgttgt 180
gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag ctatgaccat gattacgcca 240
agcttccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcattctcaat tagtcagcaa 300
ccatagtccc gcccctaact ccgcccattc cgcccctaac tccgcccagt tccgcccatt 360
ctccgcccc a tggctgacta attttttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctcggcct 420
ctgagctatt ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt tgcaaaaagc 480

ttgcaaaga tggataaagt tttaaacaga gaggaatctt tgcagctaatt ggaccttcta 540
 ggtctttgaaa ggagtgggaa ttggctccgg tgcccgtcag tgggcagagc gcacatcgcc 600
 cacagtcccc gagaagttgg ggggaggggt cggcaattga accggtgcct agagaagggtg 660
 gcgcggggta aactgggaaa gtgatgtcgt gtactggctc cgcctttttc ccgagggtgg 720
 gggagaaccg tatataagt cagtagtcgc cgtgaacgtt ctttttcgca acgggtttgc 780
 cgccagaaca caggtaagt ccgtgtgtgg ttcccgcggg cctggcctct ttacgggtta 840
 tggcccttgc gtgccttgaa ttacttccac gcccctggct gcagtacgtg attcttgatc 900
 ccgagcttcg ggttggaaagt ggggtgggaga gttcgaggcc ttgcgcttaa ggagccccctt 960
 cgccctcgtgc ttgagttgag gcctggcctg ggcgctgggg ccgccgcgtg cgaatctggt 1020
 ggcaccttcg cgccgtctc gctgctttcg ataagtctct agccatttaa aatttttgat 1080
 gacctgctgc gacgcttttt ttctggcaag atagtcttgt aaatgcgggc caagatctgc 1140
 acactgggtat ttcggttttt ggggccgcgg gcggcgacgg ggcccgtgcg tcccagcgca 1200
 catgttcggc gaggcggggc ctgcgagcgc ggccaccgag aatcggaagg gggtagtctc 1260
 aagctggccg gcctgctctg gtgcctggcc tcgcgccgcc gtgtatcgcc ccgccctggg 1320
 cggcaaggct ggcccggtcg gcaccagttg cgtgagcgga aagatggccg cttcccggcc 1380
 ctgctgcagg gagctcaaaa tggaggacgc ggcgctcggg agagcgggcg ggtgagtcac 1440
 ccacacaaag gaaaagggcc ttccgtcct cagccgtcgc ttcatgtgac tccacggagt 1500
 accgggcgcc gtccaggcac ctcgattagt tctcgagctt ttggagtacg tcgtctttag 1560
 gttgggggga ggggttttat gcgatggagt ttccccacac tgagtgggtg gagactgaag 1620
 ttaggccagc ttggcacttg atgtaattct ccttgggaatt tgcccttttt gagtttggat 1680

cttggttcat tctcaagcct cagacagtgg ttcaaagttt ttttcttcca tttcaggtgt 1740
 cgtgaggaat tctctagaga tccctcccga tatcgtttaa acatggacat gagggttcct 1800
 gctcagctcc tgggactcct gctgctctgg ctcccagggtg ccagatgtga gattgtgctg 1860
 acacagtctc ctgccacctt atctctctct ccaggggaga gggccaccct gagctgcagg 1920
 gccagcaaga gtgtcagtac atctggctat agttatatgc actggtacca acagaaacca 1980
 ggccaggccc ccagactcct catctatctt gcattctaacc tagaatctgg gatccctgct 2040
 agattcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcacactca ccatcagcag gctggaacct 2100
 gaggacttcg ctgtgtatta ctgtcagcac attagagagc ttccctcggac gttcggtgga 2160
 ggcaccaagc tggaaatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat ctccccgcca 2220
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgtttgtg gcctgctgaa taacttctat 2280
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 2340
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 2400
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa ctctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 2460
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttagggatc cgccccctctc 2520
 cctccccccc ccctaacgtt actggccgaa gccgcttgga ataaggccgg tgtgcgtttg 2580
 tctatatgtt attttccacc atattgccgt cttttggcaa tgtgagggcc cggaaacctg 2640
 gccctgtctt ctgacgagc attcctaggg gtctttcccc tctcgccaaa ggaatgcaag 2700
 gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc ttcttgaaga caaacaacgt 2760
 ctgtagcgac cttttgcagg cagcgggaacc cccacctgg cgacaggtgc ctctgcggcc 2820
 aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa aggcggcaca accccagtgc cacgttgtga 2880

gttggatagt tgtggaaaga gtcaaatggc tctcctcaag cgtattcaac aaggggctga 2940
 aggatgccca gaaggtaccc cattgtatgg gatctgatct ggggcctcgg tacacatgct 3000
 ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaaac gtctaggccc cccgaaccac ggggacgtgg 3060
 ttttcctttg aaaaacacga tgataatatg gccacaacca tggactggac ctggagcatc 3120
 cttttcttgg tggcagcagc aacagggtgcc cactcccagg tccagctggt gcagtctgga 3180
 gctgaggtga agaagcctgg agcttcagtg aaggtttcct gcaaggcttc tggatacaca 3240
 ttcactgact acaacatgga ctgggttcga caggcccctg gacagggcct tgagtggatt 3300
 ggagatatta atcctaacta tgacactact agctacaacc agaagttcca gggcagagtg 3360
 acaatgactg tggacaagtc cacgagcaca gcctacatgg agctcagcag cctgagatct 3420
 gaggacactg cagtctatta ctgtgcaaga tcgatgatgg gatatggttc ccctatggac 3480
 tactggggtc aaggcacact ggtcaccgtc tctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc 3540
 ttccccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcagccct gggctgcctg 3600
 gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 3660
 ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tctcaggac tctactcct cagcagcgtg 3720
 gtgaccgtgc cctccagcag ctgggacacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag 3780
 cccagcaaca ccaagggtga caagaaagt gagcccaat ctgtgacaa aactcacaca 3840
 tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttctt ctcccccca 3900
 aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 3960
 gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 4020
 aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 4080

.
 ctccaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 4140
 aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 4200
 ccacagggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 4260
 acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 4320
 cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc 4380
 ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt ctctcatgc 4440
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctccg 4500
 ggtaaataagg tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccac cctggctgag 4560
 ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc 4620
 acctacggca agctgaccct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg 4680
 cccacccctg tgaccaccct gacctacggc gtgcagtgct tcagccgcta ccccgaccac 4740
 atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc 4800
 atctttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac 4860
 accctgggtga accgcatcga gctgaagggc attgacttca aggaggacgg caacatcctg 4920
 gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag 4980
 aagaacggca tcaaggtgaa ctccaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag 5040
 ctgcccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgct gctgcccgac 5100
 aaccactacc tgagcatcca gtccgccctg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac 5160
 atggctctgc tggagttcgt gaccgccgcc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac 5220
 aagtaaagcg gccgcgactc tagagtgagg gtccccacct gggacccttg agagtatcag 5280

gtctccacg tgggagacaa gaaatccctg ttttaatttt aaacagcagt gtccccatc 5340

tgggtccttg caccctcac tctggcctca gccgactgca cagcggcccc tgcattccct 5400

tggctgtgag gcccctggac aagcagaggt ggccagagct gggaggcatg gccctggggt 5460

cccacgaatt tgctggggaa tctcgttttt cttcttaaga cttttgggac atggtttgac 5520

tcccgaacat caccgacgcg tctcctgttt ttctgggtgg cctcgggaca cctgccctgc 5580

ccccacgagg gtcaggactg tgactctttt tagggccagg caggtgcctg gacatttgcc 5640

ttgctggacg gggactgggg atgtgggagg gagcagacag gaggaatcat gtcaggcctg 5700

tgtgtgaaag gaagctccac tgtcacctc cacctcttca cccccactc accagtgtcc 5760

cctccactgt cacattgtaa ctgaacttca ggataataaa gtgtttgcct ccaaaaaaaaa 5820

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5880

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagaattcac tggccgtcgt ttacaacgt cgtgactggg 5940

aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc 6000

gtaatagcga agaggcccgcc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg 6060

aatggcgccct gatgcggtat ttctcttta cgcattctgt cggtatttca caccgcatac 6120

gtcaaagcaa ccatagtagc cgccctgtag cggcgcattha agcgcggcgg gtgtggtggt 6180

tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt tcgctttctt 6240

cccttccttt ctcgccacgt tcgccggctt tccccgtcaa gctctaaatc gggggctccc 6300

tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg atttgggtga 6360

tggttcacgt agtgggcat cgccctgata gacggttttt cgccctttga cgttggagtc 6420

cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca acactcaacc ctatctcggg 6480

ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct 6540
 gatttaacaa aaatttaacg cgaattttta caaaatatta acgtttacaa ttttatgggtg 6600
 cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac 6660
 acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt 6720
 gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag 6780
 acgaaagggc ctctgatac gcctattttt ataggttaat gtcattgataa taatggtttc 6840
 ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt 6900
 ctaaatacat tcaaataatgt atccgctcat gagacaataa ccttgataaa tgcttcaata 6960
 atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ticccttttt 7020
 tgcggcattt tgccttcctg tttttgctca ccagaaaacg ctggtgaaag taaaagatgc 7080
 tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtlaagat 7140
 ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagtctctgt 7200
 atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca 7260
 ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg 7320
 catgacagta agagaattat gcagtgtctc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa 7380
 ctacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg 7440
 ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga 7500
 cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg 7560
 cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt 7620
 tgcaggacca ctctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg 7680

agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc 7740
 ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca 7800
 gatcgctgag atagggtcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc 7860
 atatatactt tagatlgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat 7920
 cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc 7980
 agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg 8040
 ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct 8100
 accaactctt ttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct 8160
 tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct 8220
 cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg 8280
 gtiggactca agacgatagt taccggataa ggcgagcgg tcgggctgaa cgggggggtc 8340
 gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 8400
 gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaaagcg 8460
 cagggtcgga acaggagagc gcacgagga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta 8520
 tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gtcgtcagg 8580
 ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg 8640
 ctggcctttt gtcacatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat 8700
 taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc 8760
 agtgagcgag gaagc 8775

201319085

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重鏈 CDR1 區

<400> 8

Asp Tyr Asn Met Asp
1 5

<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重鏈 CDR2 區

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> Xaa 是 K 或 Q

<400> 9

Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Thr Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Xaa
1 5 10 15

Gly

<210> 10
<211> 11

201319085

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重鏈 CDR3 區

<400> 10

Ser Met Met Gly Tyr Gly Ser Pro Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 輕鏈 CDR1 區

<400> 11

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His

1 5 10 15

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 輕鏈 CDR2 區

<400> 12

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

201319085

. <210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 輕鏈 CDR3 區

<400> 13

Gln His Ile Arg Glu Leu Pro Arg Thr
1 5

<210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> AGR2 活性結構域

<400> 14

Cys Pro His Ser
1

<210> 15
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> AGR2 與阻斷抗體的必要結合區

<400> 15

Pro Leu Met Ile Ile His His Leu Asp Glu Cys Pro His Ser Gln Ala
1 5 10 15

201319085

Leu Lys Lys Val Phe Ala
20

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：101124372

※ 申請日：101 年 7 月 5 日

※IPC 分類：C07K16/18 (2006.01)
C07K16/46 (2006.01)
C12N15/13 (2006.01)
A61K39/395 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

AGR2阻斷抗體及其用途

二、中文發明摘要：

本發明涉及一種AGR2阻斷性單株抗體，尤其是阻斷AGR2的人源化單株抗體。本發明還涉及包含該抗體的藥物組合物，製備方法及用途。該抗體可用於阻斷腫瘤生長和轉移。

三、英文發明摘要：

七、申請專利範圍：

1. 一種專一性結合 AGR2 蛋白的抗體，該抗體能與鼠抗人 AGR2 蛋白單株抗體 (monoclonal antibody) 18A4 結合基本上相同的 AGR2 蛋白表位 (epitope)。
2. 如請求項 1 所述的抗體，其中該抗體是鼠抗人 AGR2 單株抗體 18A4 或其人源化形式或嵌合形式。
3. 如請求項 1 或 2 所述的抗體，其中該表位是位於 AGR2 蛋白二硫鍵異構酶活性結構域 (domain)。
4. 如請求項 1 至 4 中任一項所述的抗體，其中該抗體結合的抗原表位如 Seq ID No. 12 所示。
5. 如上述請求項任一項所述的抗體，其包含選自如下的至少一種序列：包含 Seq ID No. 8 所示的重鏈 CDR1 胺基酸序列，包含 Seq ID No. 9 所示的重鏈 CDR2 胺基酸序列，包含 Seq ID No.10 所示的重鏈 CDR3 胺基酸序列，包含 Seq ID No. 11 所示的輕鏈 CDR1 胺基酸序列，包含 Seq ID No. 12 所示的輕鏈 CDR2 胺基酸序列和包含 Seq ID No. 13 所示的輕鏈 CDR3 胺基酸序列。
6. 如請求項 5 所述的抗體，其包含：如 DYNMD (Seq ID No.8) 所示的重鏈 CDR1 胺基酸序列，如 DINPNYDTTSYNQKFQG (Seq ID No.9) 所示的重鏈 CDR2 胺基酸序列，如 SMMGYGSPMDY (Seq ID No. 10) 所示的重鏈 CDR3 胺基酸序列，如 RASKSVSTSGYSYMH (Seq ID No. 11) 所示的輕鏈 CDR1 胺基酸序列，如 LASNLES (Seq ID No. 12) 所示的輕

鏈 CDR2 胺基酸序列和如 QHIRELPRT (Seq ID No. 13) 所示的輕鏈 CDR3 胺基酸序列。

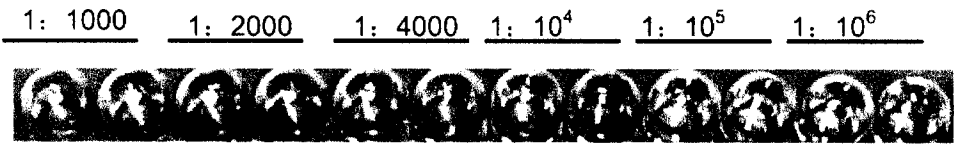
7. 如請求項 6 所述的抗體，其中該抗體的重鏈可變區胺基酸序列如 Seq ID No. 2 所示，該抗體的輕鏈可變區胺基酸序列如 Seq ID No. 1 所示。
8. 如請求項 6 所述的抗體，其中該抗體的重鏈可變區胺基酸序列如 Seq ID No. 4 所示，該抗體的輕鏈可變區胺基酸序列如 Seq ID No. 3 所示，
9. 如請求項 1 至 8 中任一項所述的抗體，其為人源化抗體，較佳為人源化的完整 IgG1 抗體。
10. 如請求項 1 至 9 中任一項所述的抗體，其為抗體片段，較佳為 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 片段、線性抗體、單鏈抗體，更佳為 Fab 片段。
11. 一種藥物組合物，包含如請求項 1 至 10 中任一項所述的抗體和可藥用載體。
12. 一種分離的核酸，其係編碼如請求項 1 至 10 中任一項所述的抗體。
13. 一種載體，包含如請求項 12 所述的核酸。
14. 一種宿主細胞，包含如請求項 13 所述的載體。
15. 一種生產人源化抗體的方法，包括培養如請求項 14 所述的宿主細胞，以便表現 (express) 該核酸並產生該抗體。
16. 如請求項 15 所述的方法，還包括從該宿主細胞培養物中回收

該抗體。

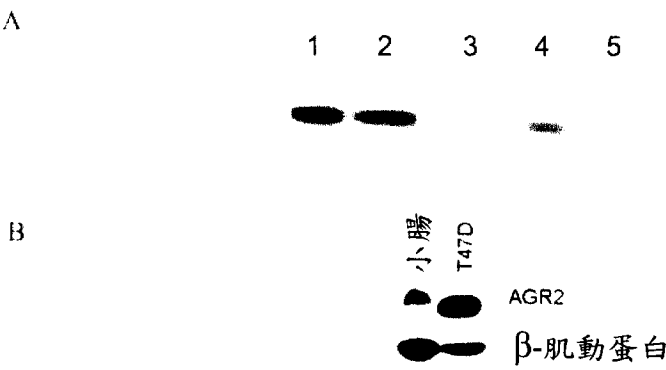
17. 一種使用如請求項 1 至 10 中任一項的抗體用於治療與哺乳動物中的病理性血管生成相關的病症的方法，該方法包括給藥該哺乳動物該抗體的步驟。
18. 如請求項 17 所述的方法，其中該病症是癌症。
19. 如請求項 18 所述的方法，其中該癌症是選自乳腺癌、卵巢癌、骨肉瘤、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、腎癌、頭頸癌、黑素瘤和多發性骨髓瘤。
20. 如請求項 19 所述的方法，其中該治療包含將第二治療劑與該抗體同時或順序給藥的步驟。
21. 如請求項 20 所述的方法，其中該第二治療劑是選自：抗-血管生成劑、化療劑和細胞毒劑。

八、圖式：

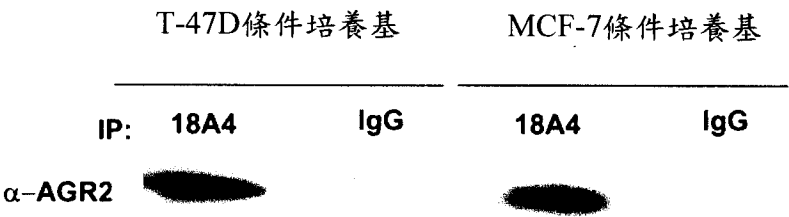
第1圖 ELISA檢測AGR2專一性



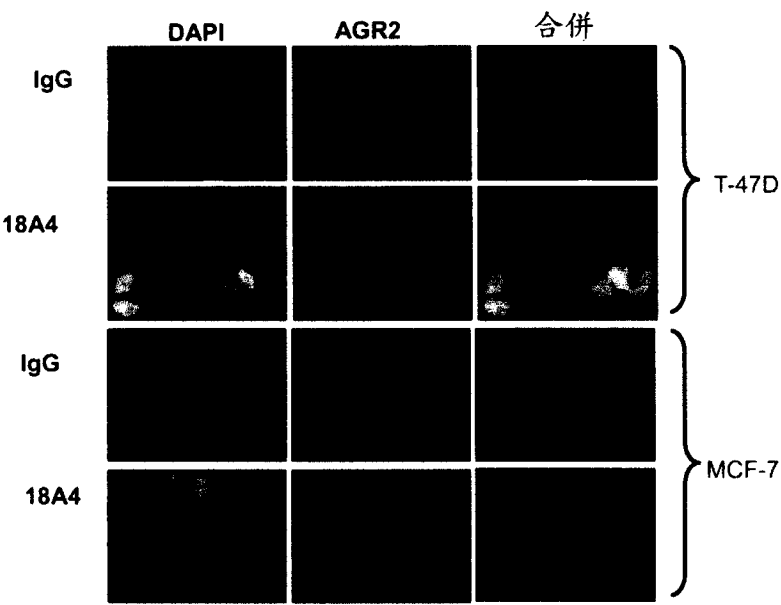
第2圖 免疫印跡檢測AGR2專一性



第3圖 免疫沉澱法檢測AGR2專一性



第4圖 免疫螢光檢測AGR2專一性



第5A圖 鼠單株抗體18A4和18A4HUI的輕鏈可變區序列比較

```
18A4HUI-VL      EIVETQSPATLSLSPGERATLSCRASKSVSTSGYSYMDWYQQKPGQAPRIELIYLASNLESGIPARESGSGSGTDEFTLTISRIEPLDEAVYYCQIERRLPRTEGGGKLEETK
18A4-VL         EIVETQSPATLSLSPGERATLSCRASKSVSSSYLAWYQQKPGQAPRIELIYGASSRAIGIPARESGSGSGTDEFTLTISRIEPLDEAVYYCQWTEGGGKLEETK
18A4HUI-VL      DIVETQSPATLSLSPGERATLSCRASKSVSTSGYSYMDWYQQKPGQAPRIELIYLASNLESGIPARESGSGSGTDEFTLTISRIEPLDEAVYYCQIERRLPRTEGGGKLEETK
*      * * * * *      *      * *      * *      *      *      *      * * * * *      * * * * *      *
```

第5B圖 鼠單株抗體18A4和18A4HUI的重鏈可變區序列比較

```
18A4HUI-VH      QQQLVQSGAVYKKPGASVKVSCKASGYTFDYMDWVRQAPGQGLFWIGDINPNYDTLSYNQKEKGKATLVDPKSSSLAYMELSRSEDIAVYYCARSMMGYGSFMDYWGQGGLVYVSS
18A4-VH         QQQLVQSGAVYKKPGASVKVSCKASGYTFISYYMDWVRQAPGQGLFWIGDINPNYDTLSYNQKEKGKATLVDPKSSSLAYMELSRSEDIAVYYCARSMMGYGSFMDYWGQGGLVYVSS
18A4HUI-VH      EQQLVQSGAVYKKPGASVKVSCKASGYTFDYMDWVRQAPGQGLFWIGDINPNYDTLSYNQKEKGKATLVDPKSSSLAYMELSRSEDIAVYYCARSMMGYGSFMDYWGQGGLVYVSS
*      * *      *      *      * * * * *      *      * * * * *      *      * * * * *      *      *      *
```

第6A圖 鼠單株抗體18A4輕鏈可變區（V_L）與人源化18A4HUI型式的V_L的結構比較

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
	1020	30	4050	60
18A4/L	DIVLTQSPASLTIVSLGQRATISC	RASKSVSTSGYSYMH	WYQRKPGQPPKLLIY	LASNLES
IGKV3-20*02	E-----T-SL-P-E---L--	---Q---S-***-LA	---Q---A-R---	GASSRAT
IGKV3 (共有序列)	E-----*T-SL-P-E---L--	*****	---Q---A-R---*	*****
18A4Hu1/L	E-----T-SL-P-E---L--	-----	---Q---A-R---	-----

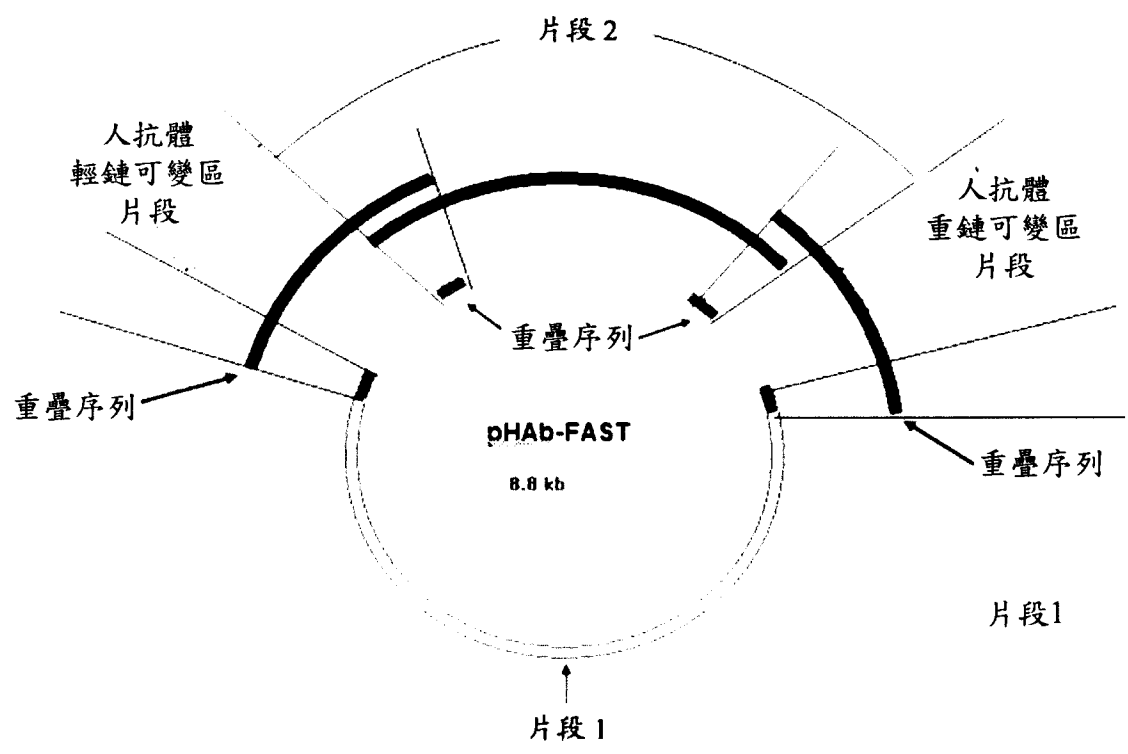
	FR3	CDR3	FR4
	708090	100	110
18A4/L	GVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEGEDAATYYC	QHIRELPRT	FGGGTKLEIK
IGKV3-20*02	-I-----T-SRL-P-F-----	-*****W-	---Q---V---
IGKV3 (共有序列)	-I-*-----T-SRL-P-F-----	*****	---*---*---
18A4Hu1/L	-I-----T-SRL-P-F-----	-----	-----

第6B圖 鼠單株抗體18A4重鏈可變區（V_H）與人源化18A4HUI型式的V_H的結構比較

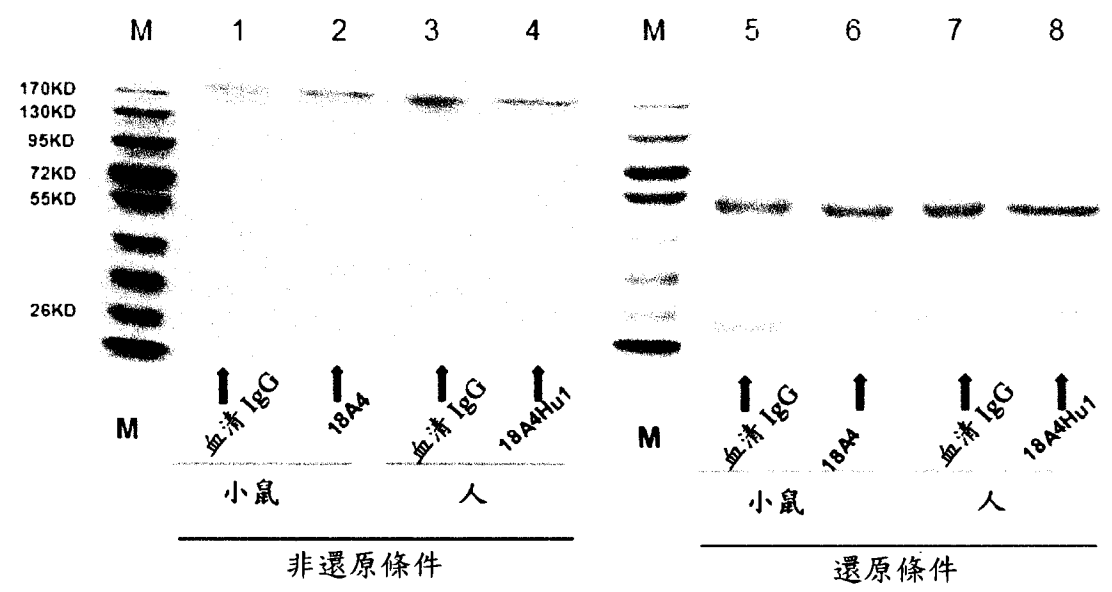
	FR1	CDR1	FR2	CDR2
	102030	40	5060	
18A4/H	EVQLQQFGAELVKPGASVKISCKASAYTFT	DYNMD	WVKQSHGKSLEWIG	DINPNYDTTSYNQKFKG
IGHV1-46*03	Q---V-S---VK-----V-----G----	S-Y-H	--R-AP-QG---M-	I---SGGS---A---Q-
IGHV1 (共有序列)	Q---V-S---VK---*---V-----G----	*****	--R-AP-QG-----	*****
18A4Hu1/H	Q---V-S---VK-----V-----G----	-----	--R-AP-QG-----	-----

	FR3	CDR3	FR4
	708090	100	110120
18A4/H	KATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDVAVYYCAR	SMMGYGSPMDY	WGQGTSTVTVSS
IGHV1-46*03	RV-M-R-T-T-V---S-R-----	***Y***FDY	-----L-----
IGHV1 (共有序列)	**-*-*-T*---S-R-----	*****	-----L-----
18A4Hu1/H	-----T-----S-R-----	-----	-----L-----

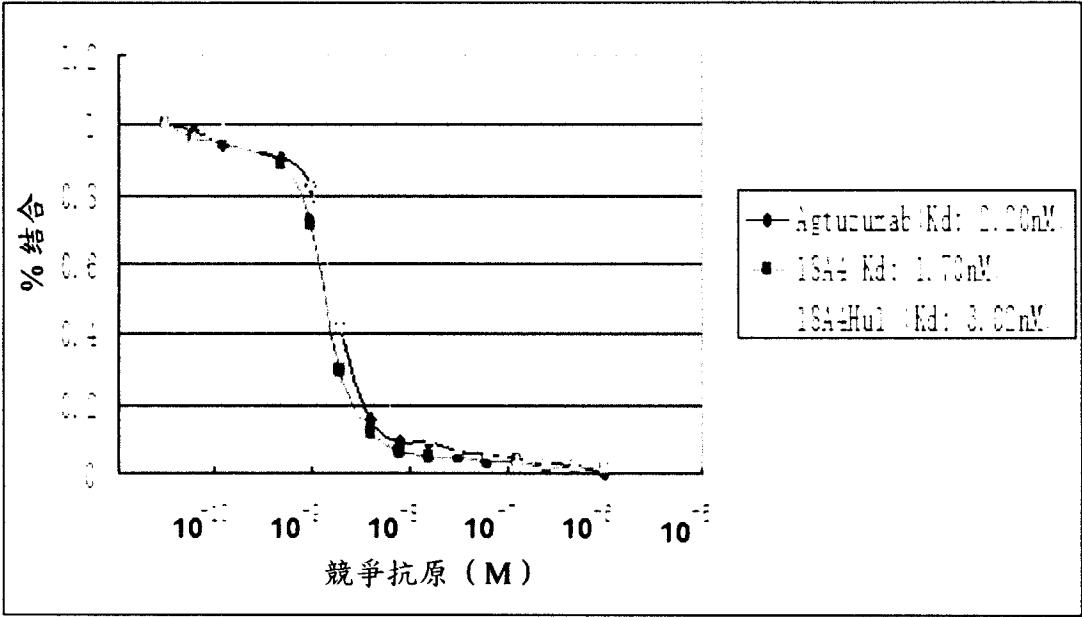
第7圖 完整抗體表現質體的構建示意圖



第8圖 純化抗體的SDS-PAGE電泳圖



第9圖 競爭性ELISA法測定抗體親和力實驗結果



第10圖 人源化抗體變體的突變位點比對及潛在T細胞抗原表位數目的變化情況

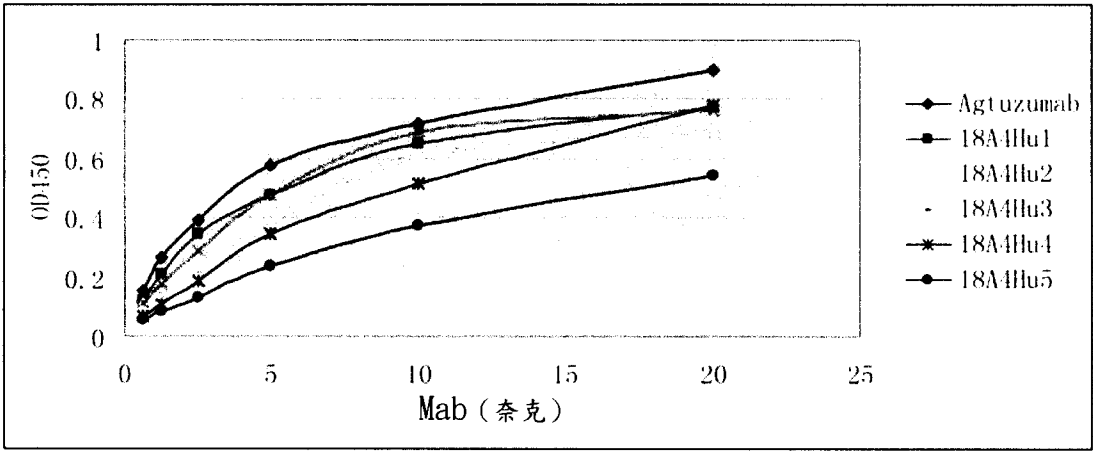
重鏈突變

名稱	突變	HCDR2 和 HFR2 T 細胞表位	總T細胞表位
18A4	YNQKFKGKATLTV	5+11	60
18A4Hu1	YNQKFKGKATLTV	5+11	44
18A4Hu2	YNQKFKGKVMTTV	2+6	36
18A4Hu3	YNQKFKGRVTMTV	2+5	35
Agtuzumab	YNQKFQGRVTMTV	0+5	33

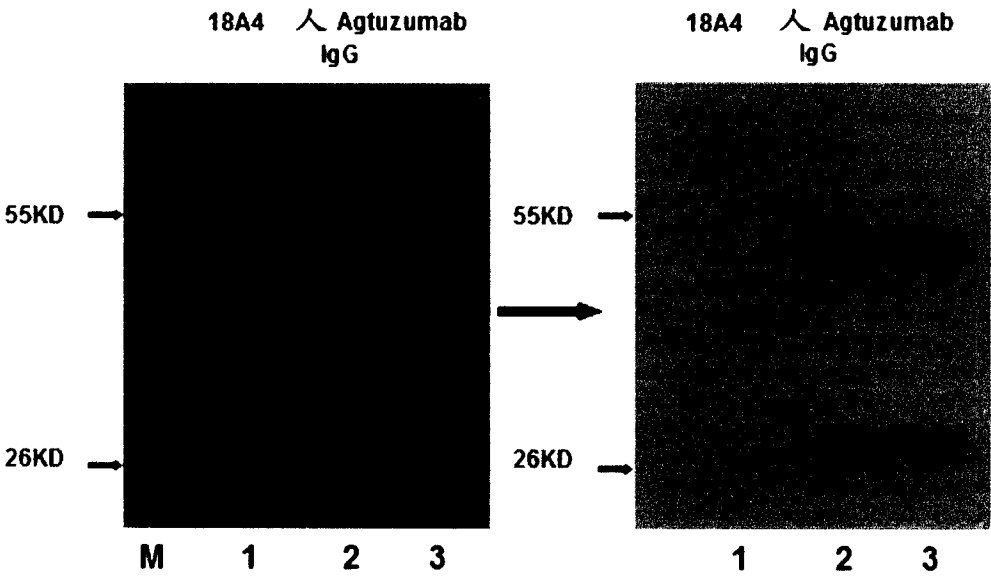
輕鏈突變

名稱	突變	LFR2 和 LCDR2 T 細胞表位	總T細胞表位
18A4	LLIYLASNLES	5+3+14	41
18A4Hu1	LLIYLASNLES	5+3+14	26
18A4Hu4	LLIYLASSLET	5+2+1	12
18A4Hu5	LLIYLASSRET	2+2+1	9

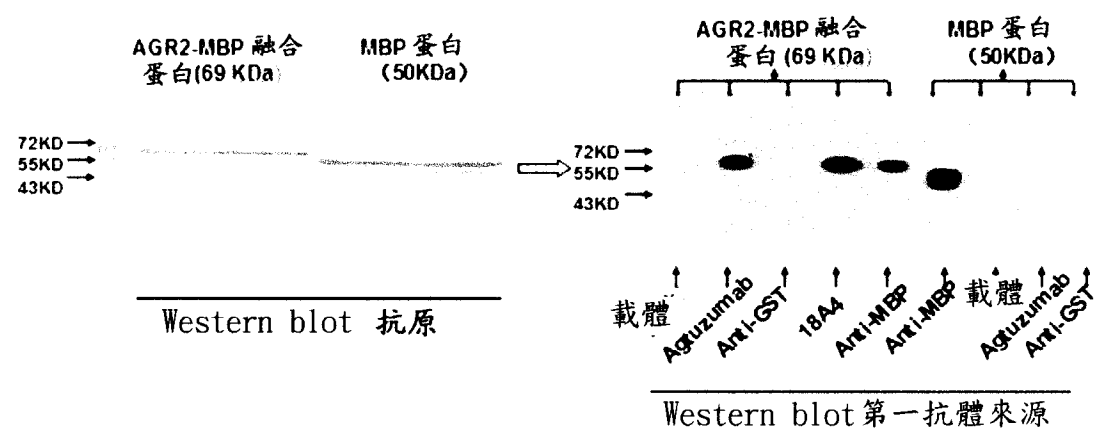
第11圖 人源化抗體變體的抗原結合曲線



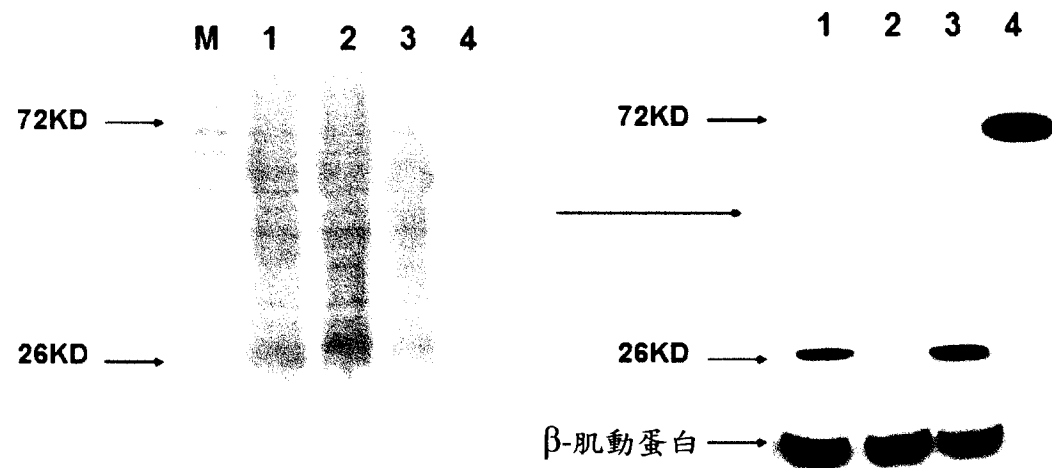
第12圖 Western-blot法鑒定人源化抗體Agtuzumab種屬特性



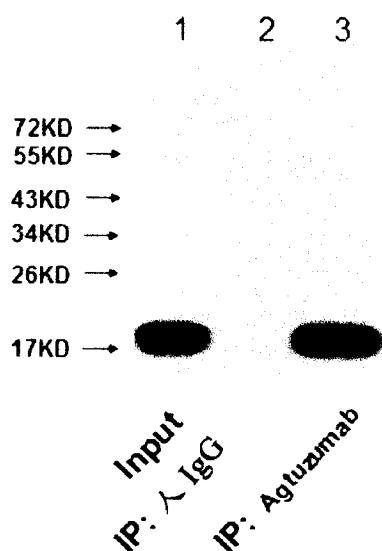
第13圖 Western-blot法檢測人源化抗體Agtuzumab抗原結合專一性



第14圖 Western-blot法檢測人源化抗體Agtuzumab與細胞裂解液中抗原的結合專一性



第15圖 免疫沉澱(IP)法檢測人源化抗體Agtuzumab與MCF7細胞中天然AGR2的結合能力



第16圖 根據AGR2潛在的抗原表位分析進行突變產生的AGR2-MBP突變體

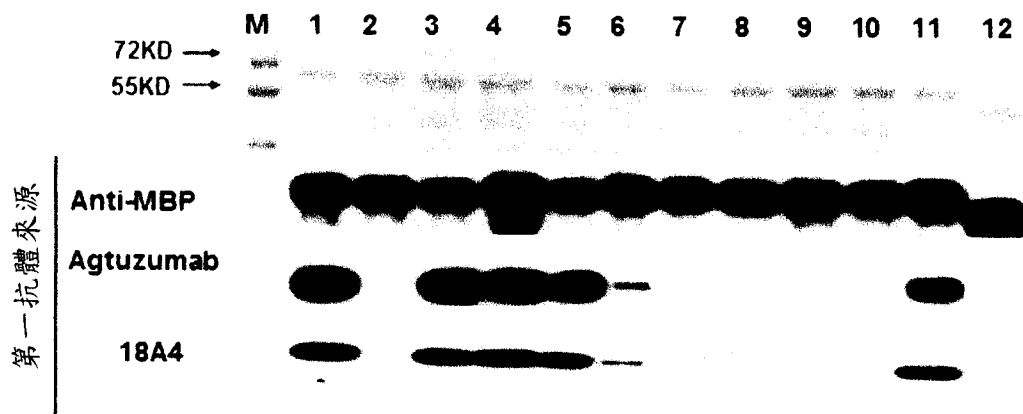
AGR2, 從 P71 至 L175

FL	FLYI	DHDLDE	DFHSQ	RRVF	AEWZ	QWLAQ	FWLLN	WVETTE	KELESP	QWV	PRID ⁰	DPS	TUFACIT	SYVENL	YAYE	PACTAL	LMNGZ	FAKIL	INTL	
1	FLYI	GOCHLDE	DFHSQ	RRVF	AEWZ	QWLAQ	FWLLN	WVETTE	KELESP	QWV	PRID ⁰	DPS	TUFACIT	SYVENL	YAYE	PACTAL	LMNGZ	FAKIL	INTL	
2	FLYI	DHGGC	DFHSQ	RRVF	AEWZ	QWLAQ	FWLLN	WVETTE	KELESP	QWV	PRID ⁰	DPS	TUFACIT	SYVENL	YAYE	PACTAL	LMNGZ	FAKIL	INTL	
3	FLYI	GGGL	DFHSQ	RRVF	AEWZ	QWLAQ	FWLLN	WVETTE	KELESP	QWV	PRID ⁰	DPS	TUFACIT	SYVENL	YAYE	PACTAL	LMNGZ	FAKIL	INTL	
4	FLYI	DHDLDE	DFGGAL	RRVF	AEWZ	QWLAQ	FWLLN	WVETTE	KELESP	QWV	PRID ⁰	DPS	TUFACIT	SYVENL	YAYE	PACTAL	LMNGZ	FAKIL	INTL	
5	FLYI	DHDLDE	DFHSQ	GGCPA	AEWZ	QWLAQ	FWLLN	WVETTE	KELESP	QWV	PRID ⁰	DPS	TUFACIT	SYVENL	YAYE	PACTAL	LMNGZ	FAKIL	INTL	
6	FLYI	DHDLDE	DFHSQ	RRVF	AEWZ	QWLAQ	FWLLN	GGGV	WVETTE	KELESP	QWV	PRID ⁰	DPS	TUFACIT	SYVENL	YAYE	PACTAL	LMNGZ	FAKIL	INTL
7	FLYI	DHDLDE	DFHSQ	RRVF	AEWZ	QWLAQ	FWLLN	WVETTE	KELESP	QWV	GGGG ⁰	DPS	TUFACIT	SYVENL	YAYE	PACTAL	LMNGZ	FAKIL	INTL	
8	FLYI	DHDLDE	DFHSQ	RRVF	AEWZ	QWLAQ	FWLLN	WVETTE	KELESP	QWV	PRID ⁰	GGGCT	TUFACIT	SYVENL	YAYE	PACTAL	LMNGZ	FAKIL	INTL	
9	FLYI	DHDLDE	DFHSQ	RRVF	AEWZ	QWLAQ	FWLLN	WVETTE	KELESP	QWV	PRID ⁰	DPS	TUFACIT	SYVENL	GGGGP	PACTAL	LMNGZ	FAKIL	INTL	
10	FLYI	DHDLDE	DFHSQ	RRVF	AEWZ	QWLAQ	FWLLN	WVETTE	KELESP	QWV	PRID ⁰	DPS	TUFACIT	SYVENL	YAYE	PACGGG	LMNGZ	FAKIL	INTL	

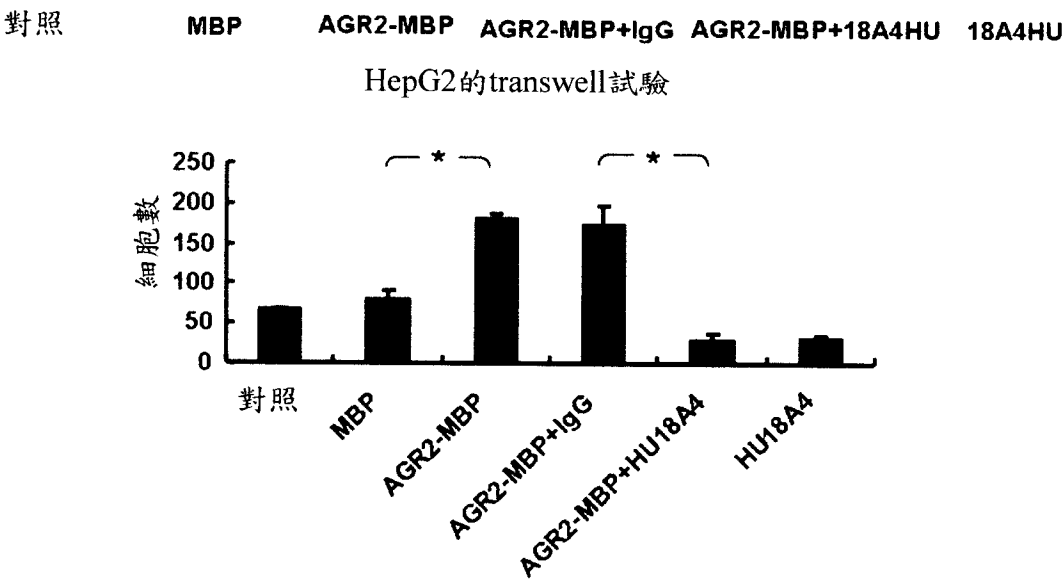
CCX5
(PDI 活性位點)

(PDI 活性位點)

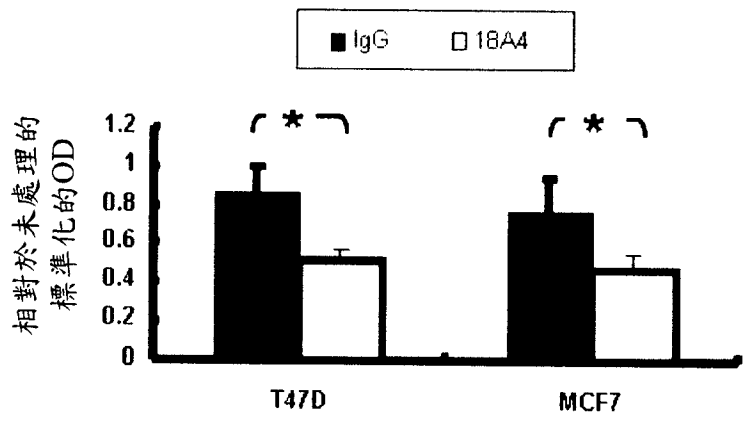
第17圖 Western-blot法分析鼠18A4和人源化抗體Agtuzumab與AGR2-MBP突變體的結合



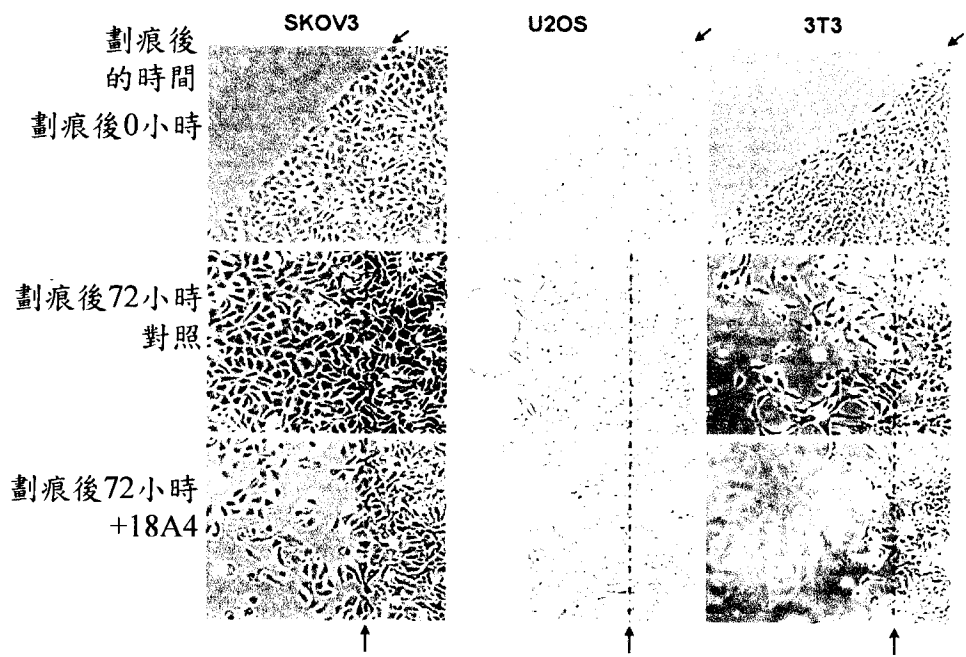
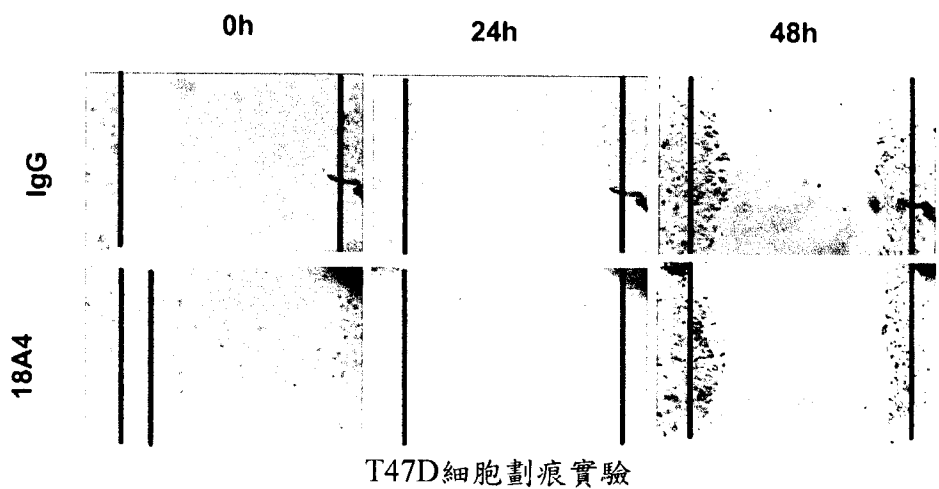
第18圖 腫瘤侵襲小室實驗檢測抗體可體外抑制肝癌細胞HepG2侵襲性轉移



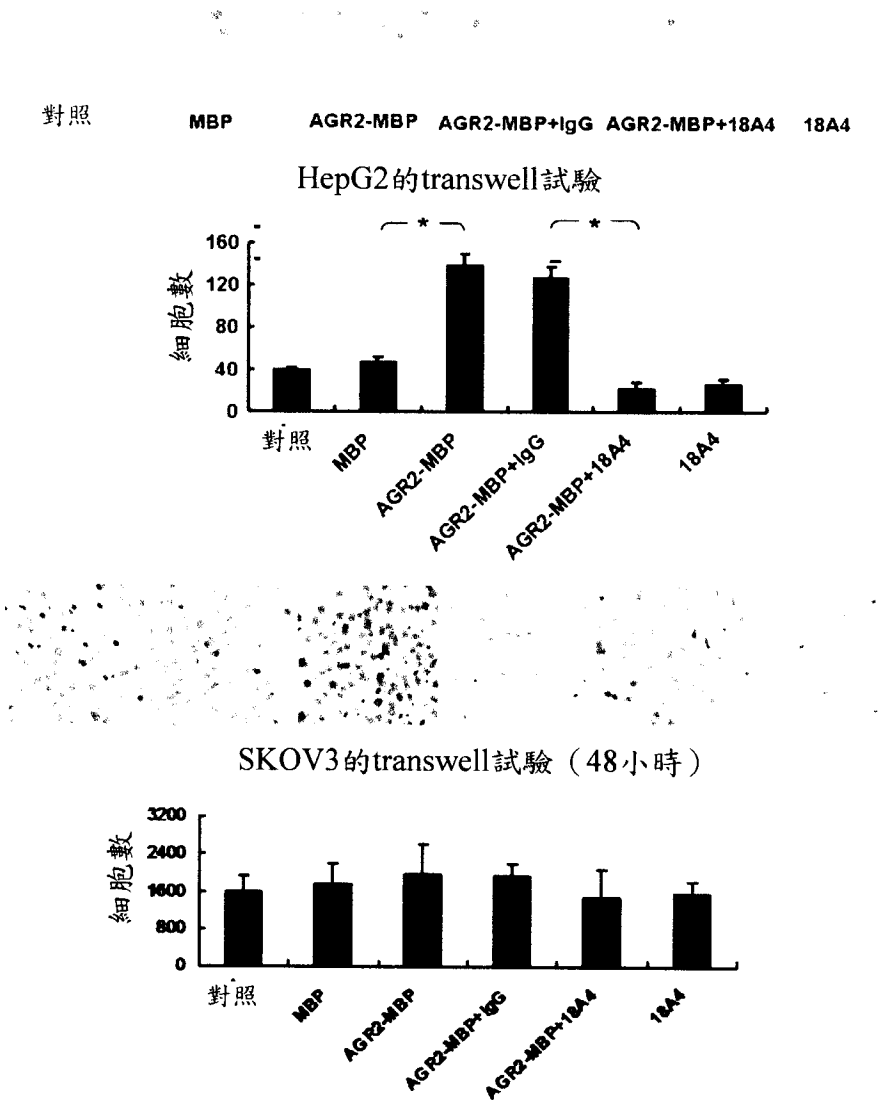
第19圖 MTT法檢測抗體可體外乳腺癌細胞T47D、MCF7的生長與遷移



第20圖 劃痕實驗檢測抗體可體外乳腺癌細胞T47D的遷移

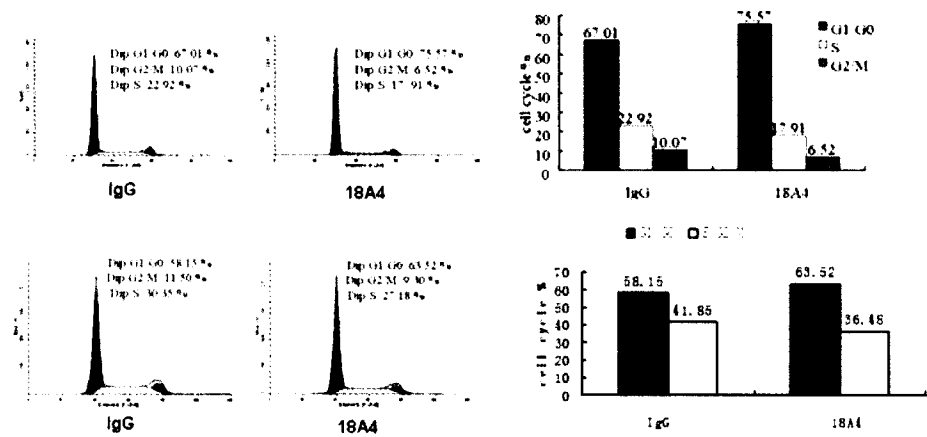


第21圖 腫瘤侵襲小室實驗檢測抗體可體外抑制肝癌細胞HepG2侵襲性轉移

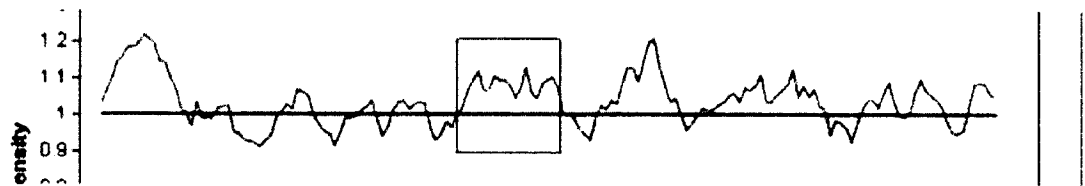


AGR2 (25微克/毫升) , IgG (25微克/毫升) , 18A4 (25微克/毫升)

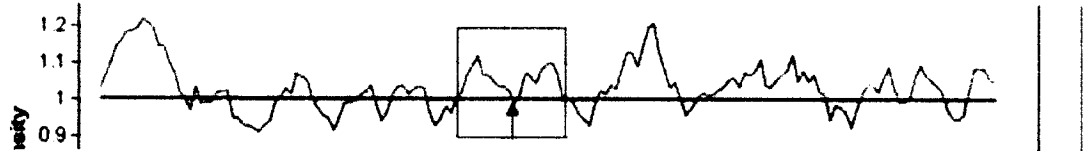
第22圖 流式細胞術檢測抗體可體外抑制乳腺癌細胞MCF-7和T47D的細胞週期



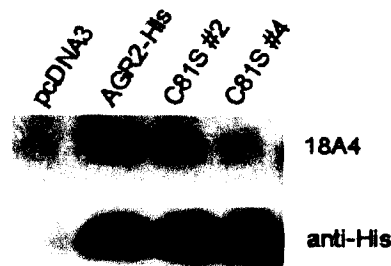
第23圖 Western blot法檢測確認抗體結合於AGR2活性位點結構域



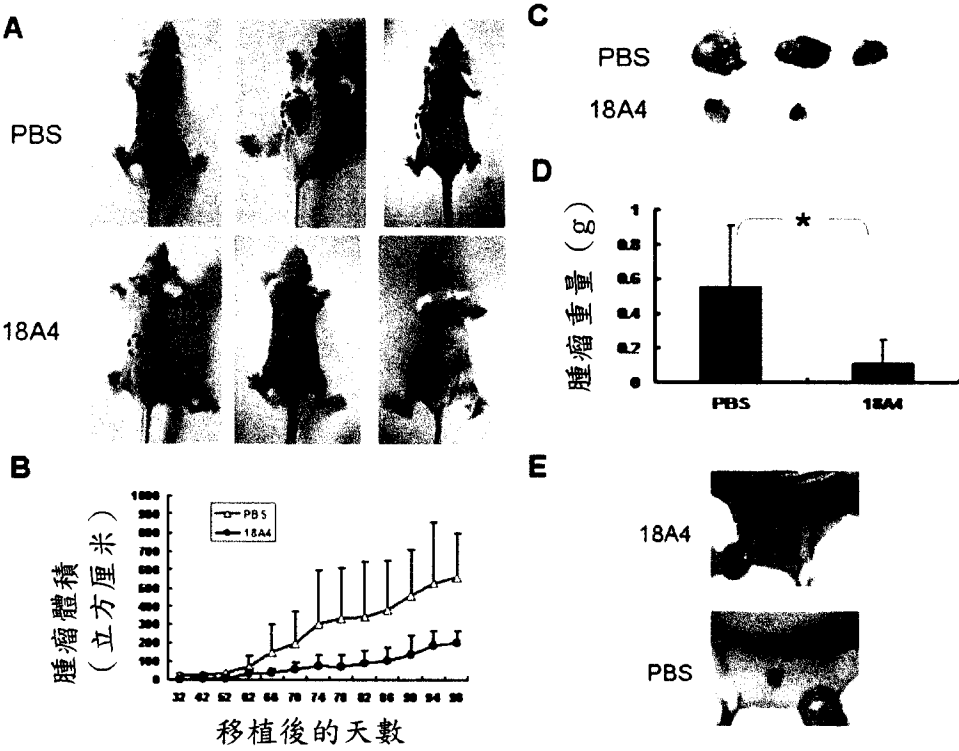
第24圖 Western blot法檢測確認抗體結合於AGR2活性位點結構域



第25圖 Western blot法檢測確認抗體結合於AGR2活性位點結構域



第26圖 動物腫瘤生長比較



四、指定代表圖：

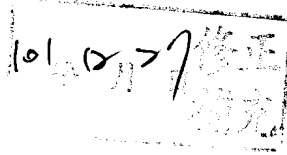
(一)本案指定代表圖為：第（ 1 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

（無）

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

（無）



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明涉及一種遺傳免疫及分子生物技術領域的單株抗體，具體涉及一種AGR2阻斷抗體及其用途。

【先前技術】

Anterior gradient-2 (AGR2) 最早在雌激素受體表現 (express) 的人乳腺癌細胞株中通過分化篩選發現 (Kuang, W.W. 等人, *Nucleic Acids Res.*, 1998. 26(4): p. 1116-23.), 隨後得到全長cDNA株, 比較後發現與蟾蜍XA-2發育相關蛋白同源並命名為hAG-2 (Thompson, D.A.與R.J. Weigel, hAG-2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998. 251(1): p. 111-6)。AGR2與蛋白二硫化物異構酶 (PDI) 有較高的同源性 (Persson, S.等人, *Mol. Phylogenet. Evol.* 2005 36(3): p.734-40.), 並且具有PDI活性 (Park, S.W.等人, *PNAS*, 2009. 106(17): p. 6950-5.)。AGR2有PDI的活性位點「CXXS」, 這與正常PDI的位點「CXXC」有所區別, 通過其他PDI蛋白的研究表明「CXXS」活性位點具有重拍二硫鍵的功能, 但缺失二硫鍵的合成功能。這也就意味著AGR2有擾亂正常細胞生長的功能, 而缺失回復其功能的能力 (Anelli, T.等人, *EMBO J.*, 2002. 21(4): p. 835-44.、Anelli, T.等人, *EMBO J.*, 2003. 22(19): p. 5015-22.)。

AGR2是原發性和繼發性腫瘤的標識蛋白, 並且可在腫瘤患者循環系統中檢出, 並且與腫瘤的發生和轉移密切相關。AGR2具有促進乳腺癌細胞轉化和遷移的作用 (Liu D等人, *Cancer Res*, 2005, 65(9): 3796-3805.)。AGR2可以增加胰腺癌細胞的侵襲能力, 從

而促進腫瘤轉移(Ramachandran V等人, *Cancer Res*, 2008, 68(19): 7811-7818.)。AGR2在前列腺癌的轉移中起到重要作用(Zhang Y, et al. *Cancer Res*, 2010, 70(1): 240-248.)。直到2010年, Kathryn等人提到了用AGR2多株抗體可抑制乳腺癌細胞的生長(Kathryn E Vanderlaag等人, *breast cancer*, 2010, 12.)。

【發明內容】

本發明涉及如下技術方案：

一種專一性結合AGR2蛋白的抗體，該抗體能與鼠抗人AGR2蛋白單株抗體(monoclonal antibody) 18A4結合基本上相同的AGR2蛋白表位(epitope)。

如上所述的抗體，該抗體是鼠抗人AGR2單株抗體18A4或其人源化形式或嵌合形式。

如上所述的抗體，其中該表位係位於AGR2蛋白二硫鍵異構酶活性結構域(domain)。

如上所述的抗體，其中該抗體結合的AGR2活性結構域為CPHS；較佳該抗體與PLMIHHLDE CPHSQALKKV FA(Seq ID No. 12)所示的必要結合區結合。

如上所述的抗體，包含選自如下的至少一種序列：包含Seq ID No. 8所示的重鏈CDR1胺基酸序列，包含Seq ID No. 9所示的重鏈CDR2胺基酸序列，包含Seq ID No. 10所示的重鏈CDR3胺基酸序列，包含Seq ID No. 11所示的輕鏈CDR1胺基酸序列，包含Seq ID No. 12所示的輕鏈CDR2胺基酸序列和包含Seq ID No. 13所示的輕鏈

CDR3胺基酸序列。

如上所述的抗體，其包含：如DYNMD (Seq ID No.8) 所示的重鏈CDR1胺基酸序列，如DINPNYDTTSYNQKFQG (Seq ID No.9) 所示的重鏈CDR2胺基酸序列，如SMMGYGSPMDY (Seq ID No.10) 所示的重鏈CDR3胺基酸序列，如RASKSVSTSGYSYMH (Seq ID No.11) 所示的輕鏈CDR1胺基酸序列，如LASNLES (Seq ID No.12) 所示的輕鏈CDR2胺基酸序列和如QHIRELPRT (Seq ID No.13) 所示的輕鏈CDR3胺基酸序列。

如上所述的抗體，其特徵是，該抗體的重鏈可變區胺基酸序列如Seq ID No.2所示，該抗體的輕鏈可變區胺基酸序列如Seq ID No.1所示。

如上所述的抗體，其特徵是，該抗體的重鏈可變區胺基酸序列如Seq ID No.4所示，該抗體的輕鏈可變區胺基酸序列如Seq ID No.3所示。

如上所述的抗體，其為人源化抗體，較佳為人源化的完整IgG1抗體。

如上所述的抗體，其為抗體片段，較佳為Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、線性抗體、單鏈抗體，更佳為Fab片段。

一種藥物組合物，包含如上所述的抗體和可藥用載體。

一種分離的核酸，其編碼如上所述的抗體。

一種載體，包含如上所述的核酸。

一種宿主細胞，包含如上所述的載體。

生產人源化抗體的方法，包括培養如上所述的宿主細胞，以便表現）該核酸並產生該抗體。

如上所述的方法，還包括從該宿主細胞培養物中回收該抗體。

使用如上所述的抗體用於治療與哺乳動物中的病理性血管生成相關的病症的方法，該方法包括給藥該哺乳動物該抗體的步驟。

如上所述的方法，其中該病症是癌症。

如上所述的方法，其中該癌症選自乳腺癌、卵巢癌、骨肉瘤、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、腎癌、頭頸癌、黑素瘤和多發性骨髓瘤。

如上所述的方法，其中所述治療包含將第二治療劑與該抗體同時或順序給藥的步驟。

如上所述的方法，其中該第二治療劑選自：抗-血管生成劑、化療劑和細胞毒劑。

如上所述的抗體在製備用於治療與哺乳動物中的病理性血管生成相關的病症的藥物中的用途，較佳該病症是癌症，更較佳該癌症選自乳腺癌、卵巢癌、骨肉瘤、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、腎癌、頭頸癌、黑素瘤和多發性骨髓瘤。

本發明還涉及如上所述的抗體在檢測患者組織、細胞樣品中的AGR2表現的用途。

本發明還涉及如上所述的抗體在製備檢測患者組織、細胞

七、申請專利範圍：

1. 一種專一性結合 AGR2 蛋白的抗體，該抗體能與鼠抗人 AGR2 蛋白單株抗體 (monoclonal antibody) 18A4 結合基本上相同的 AGR2 蛋白表位 (epitope)。
2. 如請求項 1 所述的抗體，其中該抗體是鼠抗人 AGR2 單株抗體 18A4 或其人源化形式或嵌合形式。
3. 如請求項 1 或 2 所述的抗體，其中該表位是位於 AGR2 蛋白二硫鍵異構酶活性結構域 (domain)。
4. 如請求項 1 或 2 所述的抗體，其中該抗體結合的抗原表位如 Seq ID No. 12 所示。
5. 如請求項 1 或 2 所述的抗體，其包含選自如下的至少一種序列：包含 Seq ID No. 8 所示的重鏈 CDR1 胺基酸序列，包含 Seq ID No. 9 所示的重鏈 CDR2 胺基酸序列，包含 Seq ID No. 10 所示的重鏈 CDR3 胺基酸序列，包含 Seq ID No. 11 所示的輕鏈 CDR1 胺基酸序列，包含 Seq ID No. 12 所示的輕鏈 CDR2 胺基酸序列和包含 Seq ID No. 13 所示的輕鏈 CDR3 胺基酸序列。
6. 如請求項 5 所述的抗體，其包含：如 DYNMD (Seq ID No. 8) 所示的重鏈 CDR1 胺基酸序列，如 DINPNYDTTSYNQKFQG (Seq ID No. 9) 所示的重鏈 CDR2 胺基酸序列，如 SMMGYGSPMDY (Seq ID No. 10) 所示的重鏈 CDR3 胺基酸序列，如 RASKSVSTSGYSYMH (Seq ID No. 11) 所示的輕鏈 CDR1 胺基酸序列，如 LASNLES (Seq ID No. 12) 所示的輕

鏈 CDR2 胺基酸序列和如 QHIRELPRT (Seq ID No. 13) 所示的輕鏈 CDR3 胺基酸序列。

7. 如請求項 6 所述的抗體，其中該抗體的重鏈可變區胺基酸序列如 Seq ID No. 2 所示，該抗體的輕鏈可變區胺基酸序列如 Seq ID No. 1 所示。
8. 如請求項 6 所述的抗體，其中該抗體的重鏈可變區胺基酸序列如 Seq ID No. 4 所示，該抗體的輕鏈可變區胺基酸序列如 Seq ID No. 3 所示，
9. 如請求項 1 或 2 所述的抗體，其為人源化抗體，較佳為人源化的完整 IgG1 抗體。
10. 如請求項 1 或 2 所述的抗體，其為抗體片段，較佳為 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 片段、線性抗體、單鏈抗體，更佳為 Fab 片段。
11. 一種藥物組合物，包含如請求項 1 至 10 中任一項所述的抗體和可藥用載體。
12. 一種分離的核酸，其係編碼如請求項 1 至 10 中任一項所述的抗體。
13. 一種載體，包含如請求項 12 所述的核酸。
14. 一種宿主細胞，包含如請求項 13 所述的載體。
15. 一種生產人源化抗體的方法，包括培養如請求項 14 所述的宿主細胞，以便表現 (express) 該核酸並產生該抗體。
16. 如請求項 15 所述的方法，還包括從該宿主細胞培養物中回收該抗體。

17. 一種使用如請求項 1 至 10 中任一項的抗體在製備藥劑的用途，該藥劑係用於治療與哺乳動物中的病理性血管生成相關的病症。
18. 如請求項 17 所述的用途，其中該病症是癌症。
19. 如請求項 18 所述的用途，其中該癌症是選自乳腺癌、卵巢癌、骨肉瘤、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、腎癌、頭頸癌、黑素瘤和多發性骨髓瘤。
20. 如請求項 19 所述的用途，其中該治療包含將第二治療劑與該抗體同時或順序給藥。
21. 如請求項 20 所述的用途，其中該第二治療劑是選自：抗-血管生成劑、化療劑和細胞毒劑。