



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102319430 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 18

(21) 申请号	201110042452. 2	<i>A61K 47/16</i> (2006. 01)
(22) 申请日	2005. 10. 19	<i>A61K 47/26</i> (2006. 01)
(30) 优先权数据		<i>A61K 47/34</i> (2006. 01)
	60/620, 413 2004. 10. 20 US	<i>A61J 1/00</i> (2006. 01)
		<i>A61M 5/24</i> (2006. 01)
(62) 分案原申请数据		<i>A61P 35/00</i> (2006. 01)
	200580043463. 5 2005. 10. 19	

(83) 生物保藏信息

HB-12215 1996. 10. 17
HB-12697 1999. 04. 08
HB-12216 1996. 10. 17
CRL 10463 1990. 05. 24

(71) 申请人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 詹姆斯 . D. 安迪亚 魏俊湘 刘骏
沈晔

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 张红春

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 67 页

序列表 46 页 附图 33 页

(54) 发明名称

组氨酸 - 醋酸盐缓冲液中的抗体制剂

(57) 摘要

本发明涉及组氨酸 - 醋酸盐缓冲液中的抗体制剂, 更具体地, 本发明描述了抗体制剂, 其包含在组氨酸 - 醋酸盐缓冲液中配制的单克隆抗体, 以及包含结合 HER2 的结构域 II 的抗体 (例如, Pertuzumab) 的制剂, 和包含结合 DR5 的抗体 (例如, Apomab) 的制剂。

1. 一种稳定的药物制剂,其包括在组氨酸-醋酸盐缓冲液、pH 5.5-6.5 中的单克隆抗体。
2. 权利要求 1 的制剂,其中所述 pH 为从 5.8 到 6.2。
3. 权利要求 1 的制剂,其中所述组氨酸-醋酸盐缓冲液浓度为从大约 1mM 到大约 200mM。
4. 权利要求 3 的制剂,其中所述组氨酸-醋酸盐缓冲液浓度为从大约 10mM 到大约 40mM。
5. 权利要求 1 的制剂,其中所述抗体浓度为从大约 10mg/mL 到大约 250mg/mL。
6. 权利要求 5 的制剂,其中所述单克隆抗体浓度为从大约 20mg/mL 到大约 40mg/mL。
7. 权利要求 5 的制剂,其中所述单克隆抗体浓度为从大约 80mg/mL 到大约 250mg/mL。
8. 权利要求 1 的制剂,其还包括糖。
9. 权利要求 8 的制剂,其中所述糖是二糖。
10. 权利要求 8 的制剂,其中所述糖是海藻糖。
11. 权利要求 8 的制剂,其中所述糖是蔗糖。
12. 权利要求 8 的制剂,其中所述糖浓度是从大约 10mM 到大约 1M。
13. 权利要求 12 的制剂,其中所述糖浓度是从大约 60mM 到大约 250mM。
14. 权利要求 1 的制剂,其还包括表面活性剂。
15. 权利要求 14 的制剂,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯。
16. 权利要求 15 的制剂,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯 20。
17. 权利要求 14 的制剂,其中所述表面活性剂的浓度是从大约 0.0001%到大约 1.0%。
18. 权利要求 17 的制剂,其中所述表面活性剂的浓度是从大约 0.01%到大约 0.1%。
19. 权利要求 1 的制剂,其中所述单克隆抗体是全长抗体。
20. 权利要求 19 的制剂,其中所述单克隆抗体是 IgG1 抗体。
21. 权利要求 1 的制剂,其中所述单克隆抗体是人源化抗体。
22. 权利要求 1 的制剂,其中所述单克隆抗体是包括抗原-结合区的抗体片段。
23. 权利要求 22 的制剂,其中所述抗体片段是 Fab 或 F(ab')₂ 片段。
24. 权利要求 1 的制剂,其是无菌的。
25. 权利要求 1 的制剂,其中所述单克隆抗体结合选自 HER2, CD20, DR5, BR3, IgE 和 VEGF 的抗原。
26. 权利要求 25 的制剂,其中所述抗原是 CD20 而单克隆抗体是人源化的 2H7。
27. 权利要求 25 的制剂,其中所述抗原是 VEGF 而所述单克隆抗体是 Bevacizumab。
28. 权利要求 1 的制剂,其中所述单克隆抗体易于发生脱酰胺或聚集。
29. 权利要求 1 的制剂,其在大约 40℃保存至少 4 周的情况下是稳定的。
30. 权利要求 1 的制剂,其在于大约 5℃或大约 15℃保存至少 3 个月的情况下是稳定的。
31. 权利要求 1 的制剂,其在于大约 -20℃保存至少 3 个月的情况下是稳定的。
32. 权利要求 1 的制剂,其在冻融的情况下是稳定的。
33. 权利要求 1 的制剂,其是水性的。
34. 权利要求 1 的制剂,其是冷冻的。

35. 权利要求 1 的制剂,其不是冻干的并且先前未对其进行过冻干。
36. 权利要求 35 的制剂,其是水性的并可施用于受试者。
37. 权利要求 36 的制剂,其中所述制剂用于经静脉内 (IV),皮下 (SQ) 或肌肉内 (IM) 给药。
38. 权利要求 37 的制剂,其用于经 IV 给药,所述抗体浓度为从大约 20mg/mL 到大约 40mg/mL。
39. 权利要求 37 的制剂,其用于 SQ 给药,所述抗体浓度为从大约 80mg/mL 到大约 250mg/mL。
40. 一种带可被注射器穿透的塞子的小瓶,该小瓶中包含权利要求 1 的制剂。
41. 权利要求 40 的小瓶,其保存于大约 2-8℃。
42. 权利要求 40 的小瓶,其是 20cc 或 50cc 的小瓶。
43. 一种不锈钢罐,在罐中包含权利要求 1 的制剂。
44. 权利要求 43 的罐,其中的制剂是冷冻的。
45. 一种治疗受试者中的疾病或病症的方法,包括向受试者施用可有效治疗所述疾病或病症的量的权利要求 1 所述的制剂。
46. 一种药物制剂,其包括:
 - (a) 易于发生脱酰胺或聚集的全长 IgG1 抗体,其量为大约 10mg/mL 到大约 250mg/mL;
 - (b) 组氨酸-醋酸盐缓冲液, pH 5.5-6.5;
 - (c) 选自海藻糖和蔗糖组成的组的糖,其量为大约 60mM 到大约 250mM;知
 - (d) 聚山梨醇酯 20,其量为大约 0.01%到大约 0.1%。
47. 一种减少治疗性单克隆抗体的脱酰胺或聚集的方法,包括在组氨酸-醋酸盐缓冲液, pH 5.5-6.5 中配制抗体。
48. 权利要求 47 的方法,包括在抗体的配制之前或之后评估任何抗体脱酰胺或聚集。
49. 一种药物制剂,其包含在 pH 大约 5.5 到大约 6.5 的组氨酸缓冲液中的结合 HER2 的结构域 II 的抗体,糖和表面活性剂。
50. 权利要求 49 的制剂,其中缓冲液是组氨酸-醋酸盐。
51. 权利要求 49 的制剂,其中 HER2 抗体包含分别在 SEQ ID Nos. 3 和 4 中的可变轻链氨基酸序列和可变重链氨基酸序列。
52. 权利要求 51 的制剂,其中 HER2 抗体包含选自 SEQ ID No. 15 和 23 的轻链氨基酸序列,和选自 SEQ ID No. 16 和 24 的重链氨基酸序列。
53. 权利要求 49 的制剂,其中制剂的 pH 为大约 5.8 到大约 6.2。
54. 权利要求 49 的制剂,其中抗体结合 HER2 的结构域 I、II 和 III 之间的接合部。
55. 权利要求 49 的制剂,其中抗体是全长抗体。
56. 权利要求 49 的制剂,其中抗体浓度为大约 20mg/mL 到大约 40mg/mL。
57. 一种药物制剂,其包含大约 20mg/mL 到大约 40mg/mL 的量的 Pertuzumab,组氨酸-醋酸盐缓冲液,蔗糖和聚山梨醇酯 20,其中所述制剂的 pH 从大约 5.5 到大约 6.5。
58. 权利要求 57 的制剂,其包含大约 30mg/mL 的 Pertuzumab,大约 20mM 的组氨酸-醋酸盐,大约 120mM 的蔗糖,和大约 0.02%的聚山梨醇酯 20,其中所述制剂的 pH 为大约 6.0。
59. 一种带可被注射器穿透的塞子的小瓶,其中包含权利要求 49 的制剂。

60. 一种不锈钢罐,在该罐中包含权利要求 49 的制剂。
61. 一种治疗受试者中的 HER2 表达型癌症的方法,包括向受试者施用有效治疗所述癌症的量的权利要求 49 的药物制剂。
62. 权利要求 61 的方法,其中将所述制剂经静脉内、皮下,或肌肉内施用给受试者。
63. 制备药物制剂的方法,包括:
 - (a) 制备权利要求 1 的制剂;和
 - (b) 评估该制剂中单克隆抗体的物理稳定性,化学稳定性或生物学活性。
64. 一种药物制剂,其包括在 pH 大约 5.5 到大约 6.5 的组氨酸缓冲液中的 DR5 抗体,糖和表面活性剂。
65. 权利要求 64 的制剂,其中所述缓冲液是组氨酸 - 醋酸盐。
66. 权利要求 64 的制剂,其中 DR5 抗体是激动剂抗体。
67. 权利要求 64 的制剂,其中 DR5 抗体是 Apomab。
68. 权利要求 67 的制剂,其中 DR5 抗体包含 SEQ ID No. 51 的重链氨基酸序列和 SEQ ID No. 52 的轻链氨基酸序列。
69. 权利要求 64 的制剂,其中所述制剂的 pH 为大约 5.8 到大约 6.2。
70. 权利要求 64 的制剂,其中所述抗体是全长抗体。
71. 权利要求 64 的制剂,其中所述抗体浓度为大约 10mg/mL 到大约 30mg/mL。
72. 一种药物制剂,其包含从大约 10mg/mL 到大约 30mg/mL 的量的 Apomab,组氨酸 - 醋酸盐缓冲液,海藻糖和聚山梨醇酯 20,其中所述制剂的 pH 为大约 5.5 到大约 6.5。
73. 权利要求 72 的制剂,其包括大约 20mg/mL 的 Apomab,大约 20mM 的组氨酸醋酸盐,大约 240mM 的海藻糖,和大约 0.02% 的聚山梨醇酯 20,其中所述制剂的 pH 为大约 6.0。
74. 一种带可被注射器穿透的塞子的小瓶,其中包含权利要求 64 的制剂。
75. 一种不锈钢罐,在该罐中包含权利要求 64 的制剂。
76. 一种治疗受试者中癌症的方法,包括向受试者施用有效治疗所述癌症的量的权利要求 64 的药物制剂。
77. 权利要求 76 的方法,其中所述癌症是实体肿瘤。
78. 权利要求 76 的方法,其中所述癌症是非何杰金氏淋巴瘤。
79. 权利要求 76 的方法,其中将所述制剂经静脉内、皮下,或肌肉内施用给受试者。

组氨酸 - 醋酸盐缓冲液中的抗体制剂

[0001] 本申请是申请日为 2005 年 10 月 19 日、申请号为 200580043463.5 (国际申请号为 PCT/US2005/037471)、发明名称为“组氨酸 - 醋酸盐缓冲液中的抗体制剂”的发明申请的分案申请。

[0002] 这是按照 37CFR 1.53(b) 提交的非临时性申请,要求 2004 年 10 月 20 日提交的临时申请 60/620,413 的优先权,将其内容并入本文作为参考。

技术领域

[0003] 本发明涉及抗体制剂,包括在组氨酸 - 醋酸盐缓冲液中配制的单克隆抗体,以及包含结合 HER2 的结构域 II 的抗体的制剂(例如, Pertuzumab),和包含结合 DR5 的抗体的制剂(例如, Apomab)。

背景技术

[0004] 在过去十年中,生物技术的进步已经使得有可能利用重组 DNA 技术生产多种蛋白质进行药物应用。因为蛋白质比传统有机和无机药物更大和更复杂(即除了复杂的三维结构之外还具有多个官能团),这些蛋白质的制剂形成了特殊的问题。为了使蛋白质保留生物学活性,制剂必须保持蛋白质氨基酸至少核心序列的构象完整性完好无损,同时保护蛋白质的多个官能团不受降解。蛋白质的降解途径可以包括化学不稳定性(即涉及通过键的形成或剪切修饰蛋白质的任何过程,其致成新的化学实体)或物理不稳定性(即蛋白质较高次序结构的改变)。化学不稳定性可以由脱酰胺作用,外消旋作用,水解,氧化作用,β 消除或二硫化物交换产生。物理不稳定性可以例如由变性,聚集,沉淀或吸附作用产生。三种最常见的蛋白质降解途径为蛋白质聚集,脱酰胺作用和氧化作用。Cleland 等人 Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 10(4):307-377(1993)。

[0005] 抗体制剂

[0006] 用于药物应用的蛋白质包括抗体。可用于治疗的抗体的例子为结合 HER2 抗原的抗体,如 Pertuzumab。

[0007] 美国专利号 6,339,142 描述了 HER2 抗体组合物,包括抗 HER2 抗体及其一种或多种酸性变体的混合物,其中酸性变体的量少于大约 25%。Trastuzumab 是例示性的 HER2 抗体。

[0008] 美国专利号 6,267,958 和 6,685,940 (Andya 等人)描述了冻干的抗体制剂,包括 HER2 和 IgE 抗体制剂。W097/04807 和 US 2004/0197326A1 (Fick 等人)描述了用 IgE 抗体治疗过敏性哮喘的方法。W099/01556 (Lowman 等人)涉及具有趋于异构化作用的天冬酰胺(aspartyl)残基的 IgE 抗体,及其改进的变体。US 2002/0045571 (Liu 等人)提供了粘性降低的浓缩型蛋白质制剂,例示为人源化 IgE 抗体制剂, rhuMAb E25 和 E26。WO 02/096457 和 US2004/0170623 (Arvinde 等人)描述了包含抗 IgE 抗体 E25 的稳定的液体制剂。还参见涉及高浓度抗 IgE 制剂的 US 2004/0197324A1 (Liu 和 Shire)。

[0009] 美国专利号 6,171,586 (Lam 等人)描述了稳定的水性抗体制剂。F(ab')₂rhuMAb

CD18 抗体配制在醋酸钠和组氨酸-HCl 缓冲液中。rhuMAb CD18 的优选制剂为 10mM 醋酸钠, 8%海藻糖, 0.01% TWEEN 20™, pH 5.0。于 40℃保存一个月的 rhuMAb CD20 的醋酸盐 (pH 5.0) 制剂比在组氨酸中配制的那些样品 (pH 5.0 或 6.0) 显示更大的稳定性。

[0010] US 2003/0190316 (Kakuta 等人) 涉及配制的抗体 hPM-1, 其为人源化 IL-6 受体抗体。单体损失在柠檬酸钠 (pH 6.7) 中最大, 接下来为磷酸钠 (pH 6.8), Tris-HCl (pH 7.2), 组氨酸-HCl (pH 7.2) 和甘氨酸 (pH 7.6), 依次递减。评估了磷酸钠 (pH 6.5), 磷酸盐-His (pH 6.0 或 6.5), His-HCl (pH 6.5), 和磷酸钠 (pH 6.0) 对 hPM-1 稳定性的影响。

[0011] WO2004/071439 (Burke 等人) 指出在 natalizumab (抗 α 4 整联蛋白人源化单克隆抗体) 制剂中由聚山梨醇酯 80 的降解导致杂质增多, 这显然是通过涉及金属离子和组氨酸的氧化反应造成的。因而, 选择磷酸盐缓冲液。

[0012] WO 2000/066160 (英文对应文本 EP 1174148A1) (Okada 等人) 涉及在磷酸钠或柠檬酸钠缓冲液中结合人血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 的纤维蛋白原受体的人源化 C4G1 抗体的制剂。

[0013] WO2004/019861 (Johnson 等人) 涉及 CDP870, 一种聚乙二醇化的抗 TNF α Fab 片段, 其在 50mM 醋酸钠 (pH 5.5) 和 125mM 氯化钠中以 200mg/ml 配制。

[0014] WO2004/004639 (Nesta, P.) 涉及 huC242-DM1 一种肿瘤-激活的免疫毒素在 50mM 琥珀酸缓冲液 (pH 6.0) 和蔗糖 (5% w/v) 中的制剂。

[0015] W003/039485 (Kaisheva 等人) 发现 Dacilizumab (人源化 IL-2 受体抗体) 在琥珀酸钠缓冲液 pH 6.0 中具有最高的稳定性, 并且在组氨酸中随着缓冲液被氧化而迅速丧失效力。

[0016] WO 2004/001007 涉及在组氨酸 HCl, 醋酸钠或柠檬酸钠缓冲液中的 CD80 单克隆抗体。

[0017] 美国专利号 6, 252, 055 (Relton, J.) 涉及在马来酸盐, 琥珀酸盐, 醋酸钠或磷酸盐缓冲液中配制的抗 CD4 和抗 CD23 抗体, 而磷酸盐被鉴定为优选的缓冲液。

[0018] 美国专利号 5, 608, 038 (Eibl 等人) 涉及高度浓缩的多克隆免疫球蛋白制品, 其中具有免疫球蛋白, 葡萄糖或蔗糖, 以及氯化钠。

[0019] W003/015894 (Oliver 等人) 涉及 100mg/mL SYNAGIS®, 25mM 组氨酸-HCl, 1.6mM 甘氨酸, pH 6.0, 和冻干的 SYNAGIS® 的水性制剂, 所述 SYNAGIS® 在配制时 (冻干之前) 包含 25mM 组氨酸, 1.6mM 甘氨酸和 3% w/v 甘露醇 pH 6.0。

[0020] US 2004/0191243A1 (Chen 等人) 报道了一种人 IgG2 抗体 ABX-IL8 的制剂。

[0021] US 2003/0113316A1 (Kaisheva 等人) 涉及一种冻干的抗 IL2 受体抗体制剂。

[0022] HER2 抗体

[0023] 受体酪氨酸激酶的 HER 家族是细胞生长, 分化和存活重要的调节剂。该受体家族包括四个不同的成员, 包括表皮生长因子受体 (EGFR, ErbB1, 或 HER1), HER2 (ErbB2 或 p185^{neu}), HER3 (ErbB3) 和 HER4 (ErbB4 或 tyro2)。

[0024] 由 erbB1 基因编码的 EGFR 与人恶性肿瘤的病因有关。具体地, 在乳腺、膀胱、肺、头、颈和胃癌以及胶质母细胞瘤中已经观察到 EGFR 表达的提高。EGFR 受体表达提高通常与相同肿瘤细胞产生的 EGFR 配体, 转化生长因子 α (TGF- α), 增多相关联, 其导致通过自分泌刺激途径激活受体。Baselga 和 Mendelsohn Pharmac. Ther. 64:127-154 (1994)。

在这些恶性肿瘤的治疗中已经将抗 EGFR 或其配体 TGF- α 和 EGF 的单克隆抗体评估为治疗剂。参见,例如, Baselga and Mendelsohn., 同上; Masui 等人 Cancer Research 44: 1002-1007(1984); 和 Wu 等人 J. Clin. Invest. 95: 1897-1905(1995)。

[0025] HER 家族的第二个成员, p185^{neu}, 最初被鉴定为来自化学处理大鼠的神经母细胞瘤的转化型基因的产物。neu 原癌基因的激活形式通过所编码蛋白质的跨膜区中的点突变(缬氨酸到谷氨酸)产生。在乳房和卵巢癌中观察到 neu 人同系物的扩增并且与预后不良相关联(Slamon 等人, Science, 235: 177-182(1987); Slamon 等人, Science, 244: 707-712(1989); 和美国专利号 4,968,603)。到目前为止,对于人肿瘤未曾报道过与 Neu 原癌基因中的点突变类似的点突变。HER2 的过表达(经常但并非一律由于基因扩增)在其它癌中也曾观察到,包括胃,子宫内膜,唾液腺,肺,肾,结肠,甲状腺,胰腺和膀胱的癌。参见, King 等人, Science, 229: 974(1985); Yokota 等人, Lancet: 1: 765-767(1986); Fukushima 等人, Mol Cell Biol., 6: 955-958(1986); Guerin 等人, Oncogene Res., 3: 21-31(1988); Cohen 等人, Oncogene, 4: 81-88(1989); Yonemura 等人, Cancer Res., 51: 1034(1991); Borst 等人, Gynecol. Oncol., 38: 364(1990); Weiner 等人, Cancer Res., 50: 421-425(1990); Kern 等人, Cancer Res., 50: 5184(1990); Park 等人, Cancer Res., 49: 6605(1989); Zhau 等人, Mol. Carcinog., 3: 254-257(1990); Aasland 等人 Br. J. Cancer 57: 358-363(1988); Williams 等 Pathobiology 59: 46-52(1991); 和 McCann 等人, Cancer, 65: 88-92(1990)。HER2 可以在前列腺癌中过表达(Gu 等人 Cancer Lett. 99: 185-9(1996); Ross 等人 Hum. Pathol. 28: 827-33(1997); Ross 等人 Cancer 79: 2162-70(1997); 和 Sadasivan 等人 J. Urol. 150: 126-31(1993))。

[0026] 已经描述过抗大鼠 p185^{neu} 和人 HER2 蛋白质产物的抗体。Drebin 和同事培育出抗大鼠 neu 基因产物, p185^{neu} 的抗体。参见,例如, Drebin 等人, 细胞 41: 695-706(1985); Myers 等人, Meth. Enzym. 198: 277-290(1991); 和 W094/22478。Drebin 等人 Oncogene 2: 273-277(1988) 报道与 p185^{neu} 两个不同区域反应的抗体的混合物带来对于移植入裸小鼠中的 neu- 转化 NIH-3T3 细胞的协同抗肿瘤效应。还参见 1998 年 10 月 20 日公布的美国专利 5,824,311。

[0027] Hudziak 等人, Mol. Cell. Biol. 9(3): 1165-1172(1989) 描述了一组 HER2 抗体的生成,其利用人乳腺肿瘤细胞系 SK-BR-3 表征。在暴露于所述抗体 72 小时之后通过单层结晶紫染色来测定 SK-BR-3 细胞的相对细胞增殖。利用这种测定法,用抑制细胞增殖 56% 的称作 4D5 的抗体获得最大抑制。该组中的其它抗体在此测定法中减少细胞增殖的程度较小。进一步发现抗体 4D5 使得过表达 HER2 的乳腺肿瘤细胞系对于 TNF- α 的细胞毒性效应变得敏感。还参见 1997 年 10 月 14 日公开的美国专利号 5,677,171。在 Hudziak 等人中讨论的 HER2 抗体在以下文献中做进一步表征。Fendly 等人 Cancer Research 50: 1550-1558(1990); Kotts 等人 体外 26(3): 59A(1990); Sarup 等人 Growth Regulation 1: 72-82(1991); Shepard 等人 J. Clin. Immunol. 11(3): 117-127(1991); Kumar 等人 Mol. Cell. Biol. 11(2): 979-986(1991); Lewis 等人 Cancer Immunol. Immunother. 37: 255-263(1993); Pietras 等人 Oncogene 9: 1829-1838(1994); Vitetta 等人 Cancer Research 54: 5301-5309(1994); Sliwkowski 等人 J. Biol. Chem. 269(20): 14661-14665(1994); Scott 等人 J. Biol. Chem. 266: 14300-5(1991); D'Souza 等人 Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 7202-7206(1994);

Lewis 等 人 Cancer Research 56 :1457-1465(1996) ; 和 Schaefer 等 人 Oncogene 15 :1385-1394(1997)。

[0028] 鼠 HER2 抗体 4D5 的重组人源化形式 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Trastuzumab 或 HERCEPTIN[®]; 美国专利号 5,821,337) 在临床上对于患有过表达 HER2 的乳癌的患者有效, 所述患者先前已经接受过广泛的抗癌治疗 (Baselga 等人, J. Clin. Oncol. 14 :737-744(1996))。1998 年 9 月 25 日 Trastuzumab 收到食品与药物管理局的销售许可, 用于治疗其肿瘤过表达 HER2 蛋白的患有转移性乳癌的患者。

[0029] 在 Tagliabue 等人 Int. J. Cancer 47 :933-937(1991) ; McKenzie 等人 Oncogene 4 :543-548(1989) ; Maier 等人 Cancer Res. 51 :5361-5369(1991) ; Bacus 等人 Molecular Carcinogenesis 3 :350-362(1990) ; Stancovski 等 人 PNAS(USA) 88 :8691-8695(1991) ; Bacus 等 人 Cancer Research 52 :2580-2589(1992) ; Xu 等 人 Int. J. Cancer 53 :401-408(1993) ; W094/00136 ; Kasprzyk 等 人 Cancer Research 52 :2771-2776(1992) ; Hancock 等 人 Cancer Res. 51 :4575-4580(1991) ; Shawver 等 人 Cancer Res. 54 :1367-1373(1994) ; Arteaga 等人 Cancer Res. 54 :3758-3765(1994) ; Harwerth 等人 J. Biol. Chem. 267 :15160-15167(1992) ; 美国专利号 5,783,186 ; 和 Klapper 等人 Oncogene 14 :2099-2109(1997) 中描述了具有各种特性的其它 HER2 抗体。

[0030] 同源性筛选已经鉴定了两种其它 HER 受体家族成员 ; HER3 (美国专利号 5,183,884 和 5,480,968 以及 Kraus 等人 PNAS(USA) 86 :9193-9197(1989)) 和 HER4 (EP Pat Appln No 599,274 ; Plowman 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :1746-1750(1993) ; 和 Plowman 等人, Nature, 366 :473-475(1993))。这些受体都对于至少某些乳癌细胞系都呈现增强的表达。

[0031] 一般在细胞中发现 HER 受体的各种组合, 并且异源二聚体化作用被认为增强对于多种 HER 配体的细胞反应的多样性 (Earp 等人 Breast Cancer Research and Treatment 35 :115-132(1995))。EGFR 与六种不同的配体结合 ; 表皮生长因子 (EGF), 转化生长因子 α (TGF- α), 双调蛋白 (amphiregulin), 肝素结合型表皮生长因子 (HB-EGF), beta 细胞蛋白 (betacellulin) 和上皮调节蛋白 (epiregulin) (Groenen 等人 Growth Factors 11 :235-257(1994))。源自单基因选择性剪切的调蛋白蛋白质家族是 HER3 和 HER4 的配体。调蛋白家族包括 α , β 和 γ 调蛋白 (Holmes 等人, Science, 256 :1205-1210(1992) ; 美国专利号 5,641,869 ; 和 Schaefer 等人 Oncogene 15 :1385-1394(1997)) ; neu 分化因子 (NDFs), 神经胶质生长因子 (GGFs) ; 乙酰胆碱受体诱导活性 (ARIA) ; 和感觉与运动神经元衍生的因子 (SMDF)。综述参见 Groenen 等人 Growth Factors 11 :235-257(1994) ; Lemke, G. Molec. & Cell. Neurosci. 7 :247-262(1996) 和 Lee 等人 Pharm. Rev. 47 :51-85(1995)。最近鉴定了三种另外的 HER 配体 ; 据报道结合 HER3 或 HER4 的神经调节蛋白 -2 (NRG-2) (Chang 等人 Nature 387 :509-512(1997) ; and Carraway 等人 Nature 387 :512-516(1997)) ; 结合 HER4 的神经调节蛋白 -3 (Zhang 等人 PNAS(USA) 94(18) :9562-7(1997)) ; 和结合 HER4 的神经调节蛋白 -4 (Harari 等人 Oncogene 18 :2681-89(1999))。HB-EGF, beta 细胞蛋白和上皮调节蛋白也结合 HER4。

[0032] 尽管 EGF 和 TGF α 并不结合 HER2, EGF 刺激 EGFR 和 HER2 形成异源二聚体, 其激活 EGFR 并导致 HER2 在异源二聚体中的转磷酸作用。二聚体化作用和 / 或转磷酸作用似乎激活

HER2 酪氨酸激酶。参见 Earp 等人,同上。同样地,当 HER3 与 HER2 共表达时,形成活性信号复合物并且抗 HER2 抗体能够破坏这种复合物 (Sliwowski 等人, J. Biol. Chem., 269(20): 14661-14665(1994))。此外,当与 HER2 共表达时,HER3 对调蛋白 (HRG) 的亲合性提高到较高的亲合性状态。关于 HER2-HER3 蛋白复合物还参见,Levi 等人, Journal of Neuroscience 15:1329-1340(1995); Morrissey 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1431-1435(1995); 和 Lewis 等人, Cancer Res., 56:1457-1465(1996)。HER4, 像 HER3 一样, 与 HER2 形成活性信号复合物 (Carraway 和 Cantley, Cell 78:5-8(1994))。

[0033] 为了靶向 HER 信号途径,将 rhuMAb 2C4 (Pertuzumab, OMNITARG™) 开发为人源化抗体,其抑制 HER2 与其它 HER 受体的二聚体化作用,由此抑制配体驱动的磷酸化作用和激活作用,以及 RAS 和 AKT 途径的下游激活作用。在 Pertuzumab 作为治疗实体肿瘤的单一药剂的 I 期试验中,用 Pertuzumab 治疗三名患有晚期卵巢癌的受试者。一名患者有持续的部分反应,而其它受试者病情稳定持续 15 周, Agus 等人 Proc Am Soc Clin Oncol 22:192, Abstract 771(2003)。

[0034] DR5 抗体

[0035] 本领域已经鉴定了属于肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族的各种配体和受体。这些配体包括肿瘤坏死因子- α (“TNF- α ”), 肿瘤坏死因子- β (“TNF- β ”或“淋巴毒素- α ”), 淋巴毒素- β (“LT- β ”), CD30 配体, CD27 配体, CD40 配体, OX-40 配体, 4-1BB 配体, LIGHT, Apo-1 配体 (也称作 Fas 配体或 CD95 配体), Apo-2 配体 (也称作 Apo2L 或 TRAIL), Apo-3 配体 (也称作 TWEAK), APRIL, OPG 配体 (也称作 RANK 配体, ODF, 或 TRANCE), 和 TALL-1 (也称作 BlyS, BAFF 或 THANK) (参见, 例如, Ashkenazi, Nature Review, 2:420-430(2002); Ashkenazi and Dixit, Science, 281:1305-1308(1998); Ashkenazi and Dixit, Curr. Opin. Cell Biol., 11:255-260(2000); Golstein, Curr. Biol., 7:750-753(1997) Wallach, Cytokine Reference, Academic Press, 2000, pages 377-411; Locksley 等人, Cell, 104:487-501(2001); Gruss and Dower, Blood, 85:3378-3404(1995); Schmid 等人, Proc. Natl. Acad. Sci., 83:1881(1986); Dealtry 等人, Eur. J. Immunol., 17:689(1987); Pitti. 等人, J. Biol. Chem., 271:12687-12690(1996); Wiley 等人, Immunity, 3:673-682(1995); Browning. 等人, Cell, 72:847-856(1993); Armitage 等人 Nature, 357:80-82(1992), 1997 年 1 月 16 日公开的 WO 97/01633; 1997 年 7 月 17 日公开的 WO 97/25428; Marsters 等人, Curr. Biol., 8:525-528(1998); Chicheportiche 等人, Biol. Chem., 272:32401-32410(1997); Hahne 等人, J. Exp. Med., 188:1185-1190(1998); 1998 年 7 月 2 日公开的 W098/28426; 1998 年 10 月 22 日公开的 W098/46751; 1998 年 5 月 7 日公开的 W0/98/18921; Moore 等人, Science, 285:260-263(1999); Shu. 等人, J. Leukocyte Biol., 65:680(1999); Schneider 等人, J. Exp. Med., 189:1747-1756(1999); Mukhopadhyay 等人, J. Biol. Chem., 274:15978-15981(1999))。

[0036] 由这些 TNF 家族配体介导的各种细胞反应的诱导一般通过它们结合到特异性细胞受体上而起始。某些,但并非全部 TNF 家族配体通过细胞表面“死亡受体”结合,并诱导各种生物学活性以激活胱天蛋白酶,或执行细胞死亡或凋亡途径的酶 (Salvesen 等人, 细胞, 91:443-446(1997))。到目前为止鉴定的 TNF 受体超家族的成员包括 TNFR1, TNFR2, TACI, GITR, CD27, OX-40, CD30, CD40, HVEM, Fas (也称作 Apo-1 或 CD95), DR4 (也称作 TRAIL-R1),

DR5(也称作 Apo-2 或 TRAIL-R2), DcR1, DcR2, osteoprotegerin(OPG), RANK 和 Apo-3(也称作 DR3 或 TRAMP)等。

[0037] 这些 TNF 受体家族成员的大多数共有细胞表面受体的典型结构,包括细胞外,跨膜和细胞内区域,而其它成员则被发现天然为缺少跨膜和细胞内结构域的可溶性蛋白质。典型 TNFRs 的细胞外部分包含起始自 NH₂ 端的多重半胱氨酸富集结构域(CRDs)的重复氨基酸序列模式。

[0038] 几年前称作 Apo-2L 或 TRAIL 的配体被鉴定为细胞因子 TNF 家族的成员(参见,例如, Wiley 等人, *Immunity*, 3:673-682(1995); Pitti 等人, *J. Biol. Chem.*, 271:12697-12690(1996); WO 97/01633; WO 97/25428; 公开于 1998 年 6 月 9 日的美国专利 5,763,223; 公开于 2001 年 9 月 4 日的美国专利 6,284,236)。全长天然序列人 Apo2L/TRAIL 多肽为 281 个氨基酸长的 II 型跨膜蛋白质。通过酶学剪切多肽的细胞外区域,一些细胞能够产生天然可溶形式的多肽(Mariani 等人, *J. Cell. Biol.*, 137:221-229(1997))。可溶形式的 Apo2L/TRAIL 结晶研究显示一种类似于 TNF 和其它相关蛋白质结构的同源三聚体结构(Hymowitz 等人, *Molec. Cell*, 4:563-571(1999); Cha 等人, *Immunity*, 11:253-261(1999); Mongkolsapaya 等人, *Nature Structural Biology*, 6:1048(1999); Hymowitz 等人, *Biochemistry*, 39:633-644(2000))。不过, Apo2L/TRAIL, 不像其它 TNF 家族成员, 被发现具有独特的结构特征, 其中三个半胱氨酸残基(同源三聚体每个亚基的位置 230 上)一起与锌原子配位, 并且锌结合对于三聚体稳定性和生物学活性是重要的(Hymowitz 等人, 同上; Bodmer 等人, *J. Biol. Chem.*, 275:20632-20637(2000))。

[0039] 在文献中已经报道 Apo2L/TRAIL 可以在免疫系统调节中发挥作用, 包括在自身免疫疾病如风湿性关节炎中(参见, 例如, Thomas 等人, *J. Immunol.*, 161:2195-2200(1998); Johnsen 等人, *细胞因子*, 11:664-672(1999); Griffith 等人, *J. Exp. Med.*, 189:1343-1353(1999); Song 等人, *J. Exp. Med.*, 191:1095-1103(2000))。

[0040] 已经报道 Apo2L/TRAIL 的可溶形式在许多癌细胞中诱导凋亡, 包括结肠, 肺, 乳房, 前列腺, 膀胱, 肾, 卵巢和脑的肿瘤, 以及黑素瘤, 白血病, 和多发性骨髓瘤(参见, 例如, Wiley 等人, 同上; Pitti 等人, 同上; 公开于 2000 年 2 月 29 日的美国专利 6,030,945; 公开于 2004 年 6 月 8 日的美国专利 6,746,668; Rieger 等人, *FEBS Letters*, 427:124-128(1998); Ashkenazi 等人, *J. Clin. Invest.*, 104:155-162(1999); Walczak 等人, *Nature Med.*, 5:157-163(1999); Keane 等人, *Cancer Research*, 59:734-741(1999); Mizutani 等人, *Clin. Cancer Res.*, 5:2605-2612(1999); Gazitt, *Leukemid*, 13:1817-1824(1999); Yu 等人, *Cancer Res.*, 60:2384-2389(2000); Chinnaiyan 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:1754-1759(2000))。鼠肿瘤模型的体内研究进一步提示 Apo2L/TRAIL, 单独或结合化疗或放疗, 能够发挥基本的抗肿瘤作用(参见, 例如, Ashkenazi 等人, 同上; Walczak 等人, 同上; Gliniak 等人, *Cancer Res.*, 59:6153-6158(1999); Chinnaiyan 等人, 同上; Roth 等人, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 265:1999(1999); PCT 申请 US/00/15512; PCT 申请 US/01/23691)。与许多类型的癌细胞相反, 大多数正常的人细胞类型似乎通过某种重组形式的 Apo2L/TRAIL 耐受凋亡诱导(Ashkenazi 等人, 同上; Walczak 等人, 同上)。Jo 等人报道多组氨酸标记的可溶形式的 Apo2L/TRAIL 在诱导正常分离的人肝细胞的体外凋亡, 但不能诱导非人肝细胞的凋亡(Jo 等人, *Nature Med.*, 6:564-567(2000); 还参见, Nagata,

Nature Med., 6 :502-503(2000))。据信某些重组 Apo2L/TRAIL 制品对于患病和正常细胞的生化特性和生物学活性可以有所不同,这取决于,例如,标记分子的存在或缺失,锌含量,和三聚体百分比含量(参见, Lawrence 等人, Nature Med., Letter to the Editor, 7 :383-385(2001); Qin 等人, Nature Med., Letter to the Editor, 7 :385-386(2001))。

[0041] 已经发现 Apo2L/TRAIL 结合至少五种不同的受体。结合 Apo2L/TRAIL 的受体中至少两种包含功能性细胞质死亡结构域。一种这类受体称作“DR4”(和/或称作 TR4 或 TRAIL-R1)(Pan 等人, Science, 276 :111-113(1997);还参见公开于 1998 年 7 月 30 日的 W098/32856;公开于 1999 年 7 月 29 日的 W099/37684;公开于 2000 年 12 月 7 日的 W000/73349;公开于 2002 年 8 月 13 日的 US 6,433,147;公开于 2002 年 10 月 8 日的 US 6,461,823,和公开于 2002 年 1 月 29 日的 US 6,342,383)。

[0042] Apo2L/TRAIL 的另一种这类受体称作 DR5(或者它还称作 Apo-2;TRAIL-R 或 TRAIL-R2, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 或 KILLER)(参见,例如, Sheridan 等人, Science, 277 :818-821(1997), Pan 等人, Science, 277 :815-818(1997), 公开于 1998 年 11 月 19 日的 W098/51793;公开于 1998 年 9 月 24 日的 W098/41629;Screaton 等人, Curr. Biol., 7 :693-696(1997);Walczak 等人, EMBO J., 16 :5386-5387(1997);Wu 等人, Nature Genetics, 17 :141-143(1997);公开于 1998 年 8 月 20 日的 W098/35986;公开于 1998 年 10 月 14 日的 EP870,827;公开于 1998 年 10 月 22 日的 W098/46643;公开于 1999 年 1 月 21 日的 W099/02653;公开于 1999 年 1 月 25 日的 W099/09165;公开于 1999 年 3 月 11 日的 W099/11791;公开于 2002 年 8 月 13 日的 US 2002/0072091;公开于 2001 年 12 月 7 日的 US 2002/0098550;公开于 2001 年 12 月 6 日的 US 6,313,269;公开于 2001 年 8 月 2 日的 US2001/0010924;公开于 2003 年 7 月 3 日的 US 2003/01255540;公开于 2002 年 10 月 31 日的 US 2002/0160446, 公开于 2002 年 4 月 25 日的 US2002/004878;公开于 2002 年 2 月的 US 6,342,369;公开于 2003 年 5 月 27 日的 US 6,569,642, 公开于 2000 年 6 月 6 日的 US 6,072,047, 公开于 2003 年 11 月 4 日的 US 6,642,358;公开于 2004 年 6 月 1 日的 IS 6,743,625)。像 DR4 一样,据报道 DR5 包含细胞质死亡结构域并且能够在配体结合后发出凋亡信号(或经与分子相结合,所述分子如激动剂抗体,其模仿配体的活性)。在 Apo-2L/TRAIL 和 DR5 之间形成的复合物的晶体结构描述于 Hymowitz 等人, Molecular Cell, 4 :563-571(1999)中。

[0043] 在配体结合后, DR4 和 DR5 都能够通过称作 FADD/Mort1 的包含死亡结构域的接头分子,独立地通过募集和激活凋亡起始因子胱天蛋白酶 -8 而促进凋亡(Kischkel 等人, Immunity, 12 :611-620(2000);Sprick 等人, Immunity, 12 :599-609(2000);Bodmer 等人, Nature Cell Biol., 2 :241-243(2000))。

[0044] 据报道 Apo2L/TRAIL 也结合称作 DcR1, DcR2 和 OPG 的那些受体,据信它们充当抑制剂,而非信号传导剂(参见,例如, DcR1(也称作 TRID, LIT 或 TRAIL-R3)(Pan 等人, Science, 276 :111-113(1997);Sheridan 等人, Science, 277 :818-821(1997);McFarlane 等人, J. Biol. Chem., 272 :25417-25420(1997);Schneider 等人, FEBS Letters, 416 :329-334(1997);Degli-Esposti 等人, J. Exp. Med., 186 :1165-1170(1997);和 Mongkolsapaya 等人, J. Immunol., 160 :3-6(1998));DcR2(也称作 TRUNDD 或 TRAIL-R4)(Marsters 等人, Curr. Biol., 7 :1003-1006(1997);Pan 等人, FEBS Letters, 424 :

41-45(1998);Degli-Esposti 等人,Immunity,7:813-820(1997)),和 OPG。与 DR4 和 DR5 相反,DcR1 和 DcR2 受体并不发出凋亡信号。

[0045] 在文献中已经报道了某些结合 DR4 和 / 或 DR5 受体的抗体。例如,在某些哺乳动物细胞中针对 DR4 受体并且具有激动性或凋亡性活性的抗 DR4 抗体在,例如,公开于 1999 年 7 月 29 日的 WO 99/37684;公开于 2000 年 7 月 12 日的 WO 00/73349;公开于 2003 年 8 月 14 日的 WO 03/066661 中进行了描述。还参见,例如,Griffith 等人,J. Immunol., 162:2597-2605(1999);Chuntharapai 等人,J. Immunol.,166:4891-4898(2001);公开于 2002 年 12 月 2 日的 WO 02/097033;公开于 2003 年 5 月 22 日的 WO 03/042367;公开于 2003 年 5 月 8 日的 WO 03/038043;公开于 2003 年 5 月 8 日的 W003/037913。同样地描述了某些抗 DR5 抗体,参见,例如,公开于 1998 年 11 月 8 日的 WO 98/51793;Griffith 等人,J. Immunol.,162:2597-2605(1999);Ichikawa 等人,Nature Med.,7:954-960(2001);Hylander 等人,“An Antibody to DR5(Trail-receptor 2) Suppresses the Growth of Patient Derived Gastrointestinal Tumors Grown in SCID Mouse”,Abstract,2d International Congress on Monoclonal Antibody in Cancers, Aug. 29-Sept. 1, 2002, Banff, Alberta, Canada;公开于 2003 年 5 月 8 日的 WO 03/038043;公开于 2003 年 5 月 8 日的 WO 03/037913。此外,已经描述了具有对 DR4 和 DR5 受体都有交叉反应性的某些抗体(参见,例如,公开于 2001 年 6 月 26 日的美国专利 6,252,050)。

[0046] 发明概述

[0047] 本发明这里部分涉及,将组氨酸-醋酸盐(histidine-acetate), pH 5.5-6.5, 鉴定为特别有用的缓冲液,其用于配制单克隆抗体,特别是易于脱酰胺作用(deamidation)和/或聚集(aggregation)的全长 IgG1 抗体。该制剂阻止其中抗体产品的降解。

[0048] 因而,在第一方面,本发明涉及一种稳定的药物制剂,其包括在组氨酸-醋酸盐缓冲液 pH 5.5-6.5 中的单克隆抗体。所述单克隆抗体优选地结合选自 HER2, CD20, DR5, BR3, IgE 和 VEGF 的抗原。

[0049] 此外,本发明涉及治疗受试者疾病或病症的方法,包括向受试者施用有效量的所述制剂以治疗所述疾病或病症。

[0050] 在另一方面,本发明涉及一种药物制剂,其包括:(a) 易于发生脱酰胺作用或聚集的全长 IgG1 抗体,其量为从大约 10mg/mL 到大约 250mg/mL;(b) 组氨酸-醋酸盐缓冲液(histidine-acetate buffer), pH 5.5-6.5;(c) 选自海藻糖和蔗糖的糖,其量从大约 60mM 到大约 250mM;和(d) 聚山梨醇酯 20,其量为从大约 0.01% 到大约 0.1%。

[0051] 本发明还提供降低治疗性单克隆抗体的脱酰胺作用或聚集作用的方法,包括在组氨酸-醋酸盐缓冲液, pH 5.5-6.5 中配制所述抗体。

[0052] 在又一方面,本发明涉及包含抗体,糖和表面活性剂的药物制剂,所述抗体在 pH 从大约 5.5 到大约 6.5 的组氨酸缓冲液中结合 HER2 的结构域 II。

[0053] 本发明还涉及一种药物制剂,其包含从大约 20mg/mL 到大约 40mg/mL 的量的 Pertuzumab,组氨酸-醋酸盐缓冲液,蔗糖,和聚山梨醇酯 20,其中所述制剂的 pH 为大约 5.5 到大约 6.5。

[0054] 本发明还涉及一种药物制剂,其包含在 pH 从大约 5.5 到大约 6.5 的组氨酸缓冲液中的 DR5 抗体,糖,和表面活性剂。

[0055] 在另一方面,本发明涉及一种药物制剂,其包含从大约 10mg/mL 到大约 30mg/mL 的量的 Apomab,组氨酸-醋酸盐缓冲液,海藻糖,和聚山梨醇酯 20,其中所述制剂的 pH 为大约 5.5 到大约 6.5。

[0056] 在又一方面,本发明提供一种治疗受试者中癌症的方法,包括向受试者施用有效量的药物制剂以治疗癌症。

[0057] 本发明还涉及带有可以通过注射器刺穿的塞子的小瓶或不锈钢罐,所述小瓶或罐中包含可选为冻干形式的所述制剂。

[0058] 另外,本发明提供制备药物制剂的方法,包括:(a) 制备单克隆抗体制剂;和(b) 评估制剂中单克隆抗体的物理稳定性,化学稳定性,或生物学活性。

[0059] 附图简述

[0060] 图 1 描绘了 HER2 的细胞外结构域的结构域 I-IV(分别为 SEQ ID Nos. 19-22)。

[0061] 图 2A 和 2B 描绘了以下氨基酸序列的比对:鼠单克隆抗体 2C4 可变轻(V_L)(图 2A)和可变重(V_H)(图 2B)链结构域(分别为 SEQ ID Nos. 1 和 2);人源化 2C4 版本 574 的 V_L 和 V_H 结构域(分别为 SEQ ID Nos. 3 和 4),以及人 V_L 和 V_H 共有框架(hum κ 1,轻 kappa 亚基 I;humIII,重亚基 III)(分别为 SEQ ID Nos. 5 和 6)。星号标识在人源化 2C4 版本 574 和鼠单克隆抗体 2C4 之间或在人源化 2C4 版本 574 和人框架之间的区别。互补决定区(CDRs)在括号中。

[0062] 图 3A 和 3B 显示 Pertuzumab 轻链和重链的氨基酸序列(分别为 SEQ ID Nos. 15 和 16)。CDR 以粗体显示。计算的轻链和重链的分子量为 23,526.22Da 和 49,216.56Da(还原形式的半胱氨酸)。糖部分附着于重链的 Asn 299 上。

[0063] 图 4A 和 4B 显示 Pertuzumab 轻和重链的氨基酸序列,每个都包括完整的氨基末端信号肽序列(分别为 SEQ ID Nos. 17 和 18)。

[0064] 图 5 图示了 2C4 在 HER2 的异源二聚体结合位点上的结合,由此阻止与活化的 EGFR 或 HER3 的异源二聚体化作用。

[0065] 图 6 描绘了 HER2/HER3 与 MAPK 和 Akt 途径的偶联。

[0066] 图 7 比较了 Trastuzumab 和 Pertuzumab 的活性。

[0067] 图 8 通过离子交换(IEX)分析显示了 Pertuzumab 制剂的稳定性。

[0068] 图 9 通过大小排阻层析(SEC)分析显示了 Pertuzumab 制剂的稳定性。

[0069] 图 10 反映了 Pertuzumab 在不同的制剂中的物理稳定性。

[0070] 图 11 来自 Pertuzumab 液体制剂的搅动研究(agitation study)。

[0071] 图 12 来自 Pertuzumab 液体制剂的其它搅动研究。

[0072] 图 13 来自 Pertuzumab 制剂的冻-融研究。

[0073] 图 14A 和 14B 显示 Trastuzumab 轻链(SEQ ID No. 13)和重链(SEQ ID No. 14)的氨基酸序列。

[0074] 图 15A 和 15B 描绘了变体 Pertuzumab 轻链序列(SEQ ID No. 23)和变体 Pertuzumab 重链序列(SEQ ID No. 24)。

[0075] 图 16A 和 16B 显示了在 IgG 抗体中普遍观察到的寡糖结构。

[0076] 图 17A 和 17B 显示了特异性抗 IgE 抗体 E25, E26, HAE1 和 Hu-901 折轻和重链的序列(SEQ ID Nos. 37-44)。在图 17A 中,可变轻链结构域在残基 111 的残基 VEIK 结束。在图

17B 中,可变重链结构域在残基 120 附近的残基 VTVSS 结束。

[0077] 图 18A 是比较鼠 2H7 (SEQ ID No. 25), 人源化 2H7v16 变体 (SEQ ID No. 26), 和人 kappa 轻链亚基 I (SEQ ID No. 27) 中每一种的可变轻结构域 (V_L) 的氨基酸序列的序列比对。2H7 和 hu2H7v16 的 V_L 的 CDR 如下: CDR1 (SEQ ID No. 57), CDR2 (SEQ ID No. 58), 和 CDR3 (SEQ ID No. 59)。

[0078] 图 18B 是比较鼠 2H7 (SEQ ID No. 28), 人源化 2H7v16 变体 (SEQ ID No. 29), 和重链亚基 III 的人共同序列 (SEQ ID No. 30) 的可变重结构域 (V_H) 的氨基酸序列的序列比对。2H7 和 hu2H7v16 的 V_H 的 CDR 如下: CDR1 (SEQ ID No. 60), CDR2 (SEQ ID No. 61), 和 CDR3 (SEQ ID No. 62)。

[0079] 在图 18A 和图 18B 中, 每条链中的 CDR1, CDR2 和 CDR3 都包括在括号中, 侧翼为框架区, 表示为 FR1-FR4。2H7 指鼠 2H7 抗体。在序列两行之间的星号表示在两条序列之间不同的位置。残基根据 Kabat 等人 Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) 编号, 插入显示为 a, b, c, d, 和 e。

[0080] 图 19 描绘了三种不同的 VEGF 抗体的可变结构域序列, 其分别为 SEQ ID Nos. 31-36。

[0081] 图 20 显示下列 Apomab 样品的大小排阻层析 (SEC) 洗脱曲线: (a) 对照和制剂, 其在 (b) pH 4.0, (c) pH 5.0, (d) pH 6.0 和 (e) pH 7.0 的条件制备。在分析前将制备的样品保存于 40°C 2 个月。

[0082] 图 21 描绘了保存过程中 Apomab 抗体单体损失的 pH 速率曲线。在保存过程中于 30°C 和 40°C 监测 SEC 的单体动力学, 并计算一级速率常数。

[0083] 图 22 提供 Apomab 样品的离子交换层析 (IEC) 洗脱曲线如下: (a) 对照和制剂, 其在 (b) pH 4.0, (c) pH 5.0, (d) pH 6.0 和 (e) pH 7.0 的条件制备。在分析之前将配制的样品保存于 40°C 2 个月。

[0084] 图 23 显示在保存期间 IEC 主峰损失的 pH 速率曲线。在保存过程中于 30°C 和 40°C 监测 IEC 的主峰动力学, 并计算一级速率常数。

[0085] 图 24 显示人 Apo-2 配体 cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID No. 45) 及其衍生的氨基酸序列 (SEQ ID No. 46)。核苷酸位置 447 上的“N” (在 SEQ ID No. 45 中) 用来表示核苷酸碱基可以是“T”或“G”。

[0086] 图 25A 和 25B 显示于 1998 年 11 月 19 日在 WO 98/51793 中公开的人 DR5 受体 (SEQ ID No. 47) 的 411 个氨基酸序列, 以及编码核苷酸序列 (SEQ ID No. 48)。

[0087] 图 26A 和 26B 显示人 DR5 受体的 440 个氨基酸序列以及编码核苷酸序列 (SEQ ID No. 50), 其也于 1998 年 8 月 20 日在 WO 98/35986 中公开。

[0088] 图 27 显示 Apomab 7.3 重链氨基酸序列 (SEQ ID No. 51)。

[0089] 图 28 显示 Apomab 7.3 轻链氨基酸序列 (SEQ ID No. 52)。

[0090] 图 29 显示 16E2 重链 (SEQ ID No. 53) 和 Apomab 7.3 重链 (SEQ ID No. 51) 氨基酸序列的比对。

[0091] 图 30 显示 16E2 轻链 (SEQ ID No. 54) 和 Apomab 7.3 轻链 (SEQ ID No. 52) 氨基酸序列的比对。

[0092] 图 31A 和 31B 描绘了 Apomab 7.3 的可变重链氨基酸序列 (图 31A ;SEQID No. 55) 和可变轻链氨基酸序列 (图 31B ;SEQ ID No. 56)。CDR 残基以粗体标识。

[0093] 图 32 显示成熟 2H7v16 和 2H7v511 轻链 (分别为 SEQ ID Nos. 63 和 64) 的比对。用 Kabat 可变结构域残基编号方法和 Eu 恒定结构域残基编号方法显示序列。

[0094] 图 33 显示成熟 2H7v16 和 2H7v511 重链 (分别为 SEQ ID Nos. 65 和 66) 的比对。用 Kabat 可变结构域残基编号方法和 Eu 恒定结构域残基编号方法显示序列。

[0095] 优选实施方案详述

[0096] I. 定义

[0097] 术语“药物制剂”指一种制备物,其形式允许活性成分的生物学活性有效,并且其不包含其它组分,所述其它组分对于将对其施用该制剂的受试者来说具有不可接受的毒性。这些制剂是无菌的。

[0098] “无菌 (sterile)”制剂是经灭菌的 (aseptic) 或不含有所有活体微生物及其孢子。

[0099] 在这里,“冷冻”制剂是在 0℃ 以下温度的制剂。一般来说,冷冻制剂不是冻干的,它在之前或之后也未进行冻干。优选地,冷冻制剂包含进行保存的冷冻药物物质 (在不锈钢罐中) 或冷冻药物产品 (在最终的药瓶配置中)。

[0100] “稳定的”制剂是这样的制剂,其中的蛋白质在保存后基本上保持其物理稳定性和 / 或化学稳定性和 / 或生物学活性。优选地,该制剂在保存后基本上保持其物理和化学稳定性,以及其生物学活性。一般基于希望的制剂保质期来选择贮存期。用来测量蛋白质稳定性的各种分析技术是本领域已有的并且在例如 Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pubs. (1991) 和 Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10 :29-90 (1993) 中进行了综述。可以在选定的温度下测量稳定性持续选定的时间。优选地,所述制剂在大约 40℃ 稳定至少大约 2-4 周,和 / 或在大约 5℃ 和 / 或 15℃ 稳定至少 3 个月,和 / 或在大约 -20℃ 稳定至少 3 个月或至少 1 年。另外,所述制剂优选在制剂的冷冻 (至,例如, -70℃) 和融解后是稳定的,例如在 1, 2 或 3 个循环的冻融之后。稳定性能够以许多不同的方式进行定性和 / 或定量地评估,包括评估聚集物形成 (例如利用大小排阻层析,通过测量浊度,和 / 或通过肉眼观察); 通过利用阳离子交换层析或毛细管分区电泳评估电荷异质性; 氨基末端或羧基末端序列分析; 质谱分析; SDS-PAGE 分析以比较减小的和完整的抗体; 肽图谱 (例如胰蛋白酶或 LYS-C) 分析; 评估生物学活性或抗体的抗原结合功能; 等等。不稳定性可以包括下列的任一种或多种: 聚集, 脱酰胺作用 (例如 Asn 脱酰胺作用), 氧化作用 (例如 Met 氧化作用), 异构化作用 (例如 Asp 异构化作用), 剪切 / 水解 / 片段化 (例如铰链区片段化), 琥珀酰亚胺形成, 未配对的半胱氨酸, N- 末端延伸, C- 末端加工, 糖基化作用差异, 等等。

[0101] 本文的“脱酰胺”单克隆抗体是这样一种抗体,其中它的一个或多个天门冬酰胺残基已经被衍生成,例如,天冬氨酸或异 - 天冬氨酸。

[0102] “易于脱酰胺作用”的抗体是这样一种抗体,其包括一个或多个被发现易于发生脱酰胺基的残基。

[0103] “易于聚集”的抗体是这样一种抗体,其已经被发现与其它抗体分子一起聚集,特别是在冷冻和 / 或搅动之后。

[0104] “易于片段化”的抗体是这样一种抗体,其已经被发现剪切成两个或多个片段,例

如其铰链区。

[0105] “减弱脱酰胺作用,聚集,或片段化”意欲相对于在不同的 pH 或在不同的缓冲液中配制的单克隆抗体来防止或减少脱酰胺作用,聚集,或片段化的量。

[0106] 在这里,单克隆抗体的“生物学活性”指该抗体结合抗原并导致可测量生物学反应的能力,所述生物学反应可以在体外或体内进行测量。这种活性可以是拮抗性的(例如当所述抗体为 HER2 抗体时)或激动性的(例如当所述抗体结合 DR5 时)。对于 Pertuzumab 而言,在一个实施方案中,生物学活性指配制的抗体抑制人乳癌细胞系 MDA-MB-175-VII 增殖的能力。当所述抗体为 Apomab 时,生物学活性可以指,例如,配制的抗体杀伤结肠癌,Colo205 细胞的能力。

[0107] “等渗的”意指目标制剂具有与人血液基本上相同的渗透压。等渗制剂一般将具有从大约 250 到 350mOsm 的渗透压。等渗性可以利用例如蒸气压或冰冻型渗压计进行测量。

[0108] 如本文所用的,“缓冲液”指通过其酸-碱共轭组分的作用而耐受 pH 变化的缓冲溶液。本发明的缓冲液优选具有的 pH 从大约 5.0 到大约 7.0,优选从大约 5.5 到大约 6.5,例如从大约 5.8 到大约 6.2,最优选具有大约 6.0 的 pH。将控制 pH 在此范围中的缓冲液的例子包括醋酸盐,琥珀酸盐,琥珀酸盐,葡萄糖酸盐,组氨酸,柠檬酸盐,甘氨酸甘氨酸和其它有机酸缓冲液。本文的优选缓冲液是组氨酸缓冲液。

[0109] “组氨酸缓冲液”是包括组氨酸离子的缓冲液。组氨酸缓冲液的实例包括组氨酸氯化物,组氨酸醋酸盐,组氨酸磷酸盐,组氨酸硫酸盐。发现在本文实施例中鉴定的优选组氨酸缓冲液是组氨酸醋酸盐。在优选的实施方案中,通过用醋酸(液体)滴定 L-组氨酸(游离碱,固体)来制备组氨酸醋酸盐缓冲液。优选地,组氨酸缓冲液或组氨酸-醋酸盐缓冲液为 pH 5.5-6.5,优选地 pH 5.8-6.2。

[0110] 本文的“糖”包含常规组合物 $(CH_2O)_n$ 及其衍生物,包括单糖,二糖,三糖,多糖,糖醇,还原性糖,非还原性糖等等。本文的糖的实例包括葡萄糖,蔗糖,海藻糖(trehalose),乳糖,果糖,麦芽糖,右旋糖苷,甘油,右旋糖苷,赤藻糖醇,丙三醇,阿拉伯糖醇,sylitol,山梨糖醇,甘露醇,密里二糖(melibiose),松三糖(melezitose),蜜三糖(raffinose),甘露三糖(mannotriose),水苏糖(stachyose),麦芽糖,乳果糖(lactulose),麦芽酮糖(maltulose),山梨醇(glucitol),麦芽糖醇,乳糖醇,异-麦芽酮糖(maltulose),等等。本文优选的糖是非还原性二糖,如海藻糖或蔗糖。

[0111] 在本文中,“表面活性剂”指表面活性制剂,优选非离子性表面活性剂。本文的表面活性剂的实例包括聚山梨醇酯(例如,聚山梨醇酯 20 和,聚山梨醇酯 80);聚羟亚烃(poloxamer)(例如聚羟亚烃 188);Triton;十二烷基磺酸钠(SDS);月桂基磺酸钠;辛基糖甙钠;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-、或硬脂基-磺基甜菜碱;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-、或硬脂基-肌氨酸;亚油基-、肉豆蔻基-、或鲸蜡基-甜菜碱;月桂酰胺基丙基-、柯卡酰胺基丙基-、亚油酰胺基丙基-、肉豆蔻酰胺基丙基-、棕榈酰胺基丙基-、或异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱(如月桂酰胺基丙基);肉豆蔻酰胺基丙基-、棕榈酰胺基丙基-、或异硬脂酰胺基丙基-二甲基胺;甲基可可酰基钠或甲基油基牛磺酸钠;以及 MONAQUAT™ 系列(Mona Industries, Inc., Paterson, New Jersey);聚乙二醇,聚丙二醇,和乙烯与丙烯二醇的共聚物(例如 Pluronics, PF68 等);等等。本文优选的表面活性剂是聚山梨醇酯 20。

[0112] “HER 受体”是受体蛋白质酪氨酸激酶,它属于 HER 受体家族,包括 EGFR, HER2, HER3

和 HER4 受体以及将来鉴定的此家族的其它成员。HER 受体一般将包含细胞外结构域,它可以结合 HER 配体;亲脂性跨膜结构域;保守性细胞内酪氨酸激酶结构域;和具有几个酪氨酸残基的羧基末端信号结构域,它可以进行磷酸化。优选地 HER 受体是天然序列人 HER 受体。

[0113] HER2 的细胞外结构域包含四个域,结构域 I(氨基酸残基从大约 1-195),结构域 II(氨基酸残基从大约 196-320),结构域 III(氨基酸残基从大约 321-488),和结构域 IV(氨基酸残基从大约 489-632)(没有信号肽的残基编号)。参见 Garrett 等人 *Mol. Cell.* 11:495-505(2003),Cho 等人 *Nature* 421:756-760(2003),Franklin 等人 *癌细胞* 5:317-328(2004),或 Plowman 等人 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:1746-1750(1993)。还参见本文的图 1。

[0114] 术语“ErbB1”,“HER1”,“表皮生长因子受体”和“EGFR”在本文中可以相互交换使用,并且如例如在 Carpenter 等人 *Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914(1987)中公开的,称作 EGFR,包括其自然发生的突变形式(例如 Humphrey 等人 *PNAS(USA)* 87:4207-4211(1990)中的删除突变体 EGFR)。erbB1 指编码 EGFR 蛋白质产物的基因。

[0115] 表述方式“ErbB2”和“HER2”在本文中可以相互交换使用,并且称作人 HER2 蛋白质,例如,在 Semba 等人, *PNAS(USA)* 82:6497-6501(1985)和 Yamamoto 等人 *Nature* 319:230-234(1986)(Genebank 编号 X03363)中所述。术语“erbB2”指编码人 ErbB2 的基因而“neu”指编码大鼠 p185^{neu} 的基因。优选的 HER2 是天然序列人 HER2。

[0116] “ErbB3”和“HER3”指例如,在美国专利号 5,183,884 和 5,480,968 以及 Kraus 等人 *PNAS(USA)* 86:9193-9197(1989)中所公开的受体多肽。

[0117] 本文的术语“ErbB4”和“HER4”指例如在欧洲专利申请号 599,274;Plowman 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750(1993);和 Plowman 等人, *Nature*, 366:473-475(1993)中公开的受体多肽,包括其异构体,例如,在公开于 1999-04-22 的 W099/19488 中所披露的。

[0118] “HER 配体”意指结合和/或激活 HER 受体的多肽。本文中具体的目标 HER 配体是天然序列人 HER 配体如表皮生长因子(EGF)(Savage 等人, *J. Biol. Chem.* 247:7612-7621(1972));转化生长因子 α (TGF- α)(Marquardt 等人, *Science* 223:1079-1082(1984));双调蛋白也称作雪旺细胞瘤(schwannoma)或角化细胞自分泌生长因子(Shoyab 等人 *Science* 243:1074-1076(1989);Kimura 等人 *Nature* 348:257-260(1990);和 Cook 等人 *Mol. Cell. Biol.* 11:2547-2557(1991)); β 纤维素(Shing 等人, *Science* 259:1604-1607(1993);和 Sasada 等人 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190:1173(1993));肝素结合型表皮生长因子(HB-EGF)(Higashiyama 等人, *Science* 251:936-939(1991));上皮调节蛋白(epiregulin)(Toyoda 等人, *J. Biol. Chem.* 270:7495-7500(1995);和 Komurasaki 等人 *Oncogene* 15:2841-2848(1997));调蛋白(参见下文);神经调节蛋白-2(NRG-2)(Carraway 等人, *Nature* 387:512-516(1997));神经调节蛋白-3(NRG-3)(Zhang 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:9562-9567(1997));神经调节蛋白-4(NRG-4)(Harari 等人 *Oncogene* 18:2681-89(1999))或 cripto(CR-1)(Kannan 等人 *J. Biol. Chem.* 272(6):3330-3335(1997))。结合 EGFR 的 HER 配体包括 EGF, TGF- α , 双调蛋白, β 纤维素, HB-EGF 和上皮调节蛋白。结合 HER3 的 HER 配体包括调蛋白。能够结合 HER4 的 HER 配体包括 β 纤维素, 上皮调节蛋白, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 和调蛋白。

[0119] 当用在本文中时“调蛋白”(HRG)指由在美国专利号 5,641,869 或 Marchionni 等人, Nature, 362 :312-318(1993) 中公开的调蛋白基因产物所编码的多肽。调蛋白的实例包括调蛋白- α , 调蛋白- β 1, 调蛋白- β 2 和调蛋白- β 3(Holmes 等人, Science, 256 :1205-1210(1992); 和美国专利号 5,641,869); neu 分化因子 (NDF) (Peles 等人细胞 69 :205-216(1992)); 乙酰胆碱受体诱导活性 (ARIA) (Falls 等人, Cell 72 :801-815(1993)); 神经胶质生长因子 (GGFs) (Marchionni 等人, Nature, 362 :312-318(1993)); 感觉和运动神经元衍生因子 (SMDF) (Ho 等人 J. Biol. Chem. 270 :14523-14532(1995)); γ -调蛋白 (Schaefer 等人 Oncogene 15 :1385-1394(1997))。该术语包括天然序列 HRG 多肽的生物学活性片段和 / 或氨基酸序列变体, 如其 EGF 样结构域片段 (例如 HRG β 1₁₇₇₋₂₄₄)。

[0120] 本文的“HER 二聚体”是非共价结合的二聚体, 包括至少两种不同的 HER 受体。当表达两种或多种 HER 受体的细胞暴露于 HER 配体时可以形成这种复合物, 并且可以通过免疫沉淀进行分离并通过 SDS-PAGE 进行分析, 如例如 Sliwkowski 等人, J. Biol. Chem., 269(20) :14661-14665(1994) 所述。这些 HER 二聚体的实例包括 EGFR-HER2, HER2-HER3 和 HER3-HER4 异二聚体。另外, HER 二聚体可以包含两个或多个结合不同 HER 受体, 如 HER3, HER4 或 EGFR 的 HER2 受体。其它蛋白质, 如细胞因子受体亚基 (例如 gp130) 可以与二聚体相结合。

[0121] HER2 上的“异二聚体结合位点”, 指 HER2 的细胞外结构域中的区域, 在形成二聚体后, 它与 EGFR, HER3 或 HER4 细胞外结构域中的区域相接触, 或相接触。在 HER2 的结构域 II 中发现该区。Franklin 等人 Cancer Cell 15 :317-328(2004)。

[0122] “HER 激活”或“HER2 激活”指任何一个或多个 HER 受体, 或 HER2 受体的激活, 或磷酸化作用。一般来说, HER 激活导致信号转导 (例如由 HER 受体的细胞内激酶结构域引发的信号转导, 所述结构域磷酸化 HER 受体或底物多肽中的酪氨酸残基)。HER 激活可以通过 HER 配体与包括目标 HER 受体的 HER 二聚体的结合来介导。HER 配体结合 HER 二聚体可以激活二聚体中一个或多个 HER 受体的激酶结构域并由此导致一个或多个 HER 受体中酪氨酸残基的磷酸化作用, 和 / 或其它底物多肽中酪氨酸残基的磷酸化作用, 如 Akt 或 MAPK 细胞内激酶。

[0123] 以最宽泛的意义使用本文的术语“抗体”, 具体包括全长单克隆抗体, 多克隆抗体, 由至少两个全长抗体形成的多特异性抗体 (例如双特异性抗体), 和抗体片段, 只要它们展示所需的生物学活性。

[0124] 本文中所用的术语“单克隆抗体”指从实质上均一的抗体群获得的抗体, 即包含该群体的单个抗体除了可能在单克隆抗体生产过程中发生的变体以外都相同和 / 或结合相同的表位, 这些变体一般以小量存在。与一般包括针对不同决定簇 (表位) 的不同抗体的多克隆抗体制品相反, 每种单克隆抗体都针对抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性之外, 其优势还在于它们未被其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆的”指抗体获自实质上均一的抗体群的特征, 不应理解为限定由任何特定方法产生抗体。例如根据本发明使用的单克隆抗体可以通过由 Kohler 等, 自然, 256 :495(1975) 首次描述的杂交瘤方法来制备, 或可以通过重组 DNA 法 (如美国专利 4,816,567) 来制备。“单克隆抗体”还可以用 Clackson 等, 自然, 352 :624-628(1991) 和 Marks 等, 分子生物学杂志, 222 :581-597(1991) 所述技术从噬菌体抗体库中分离。

[0125] 本文中单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体（免疫球蛋白），其中重链和 / 或轻链的一部分等同于或同源于源自特定物种的抗体或属于特定抗体类或亚类的抗体的相应序列，而链的其余部分等同于或同源于来自另一种物种的抗体或属于另一抗体类或亚类的抗体的相应序列条件是它们展示所需生物学活性（见美国专利 4,816,567 ;Morrison 等,美国国家科学院学报,81 :6851-6855(1984)）。本文的目标嵌合抗体包括“灵长类化 (primatized)”抗体,其包含源于非人灵长类可变结构域抗原结合序列（例如 Old World Monkey, 猿等）和人恒定区序列。

[0126] 抗体片段”包括全长抗体的一部分,优选包括其抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括 Fab, Fab', F(ab')₂, 和 Fv 片段 ;二价抗体 ;线性化抗体 ;单链抗体分子 ;和由抗体片段构成的多特异性抗体。

[0127] “全长抗体”是这样一种抗体,其包含抗原 - 结合可变区以及轻链恒定结构域 (C_L) 和重链恒定结构域 s, C_H1, C_H2 和 C_H3。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域（例如人天然序列恒定结构域）或其氨基酸序列变体。优选地,全长抗体具有一种或多种效应功能。

[0128] 本文中术语“主要种类抗体”指组合物中的一种抗体结构,其在该组合物中是在量上占优势的抗体分子。在一个实施方案中,主要种类抗体是 HER2 抗体,如结合 HER2 结构域 II 的抗体,比 Trastuzumab 更有效抑制 HER 二聚体化作用的抗体,和 / 或结合 HER2 的异二聚体结合位点的抗体。本文的主要组分 HER2 抗体的优选实施方案是这样一种实施方案,其包括 SEQ IDNos. 3 和 4 中的可变轻和可变重氨基酸序列,最优选包括 SEQ ID Nos. 15 和 16 中的轻链和重链氨基酸序列 (Pertuzumab)。

[0129] 本文中“氨基酸序列变体”抗体是具有不同于主要种类抗体的氨基酸序列的抗体。一般,氨基酸序列变体将与主要种类抗体具有至少大约 70% 同源性,优选地,它们至少将与主要种类抗体具有大约 80%,更加优选至少大约 90% 同源性。氨基酸序列变体在主要种类抗体的氨基酸序列之内或邻近的某些位置上具有取代,删除,和 / 或添加。本文的氨基酸序列变体的实例包括酸性变体（例如脱酰胺抗体变体）,碱性变体,在其一个或两个轻链上具有氨基末端引导延伸（例如 VHS-）的抗体,在其一个或两个重链上具有 C- 末端赖氨酸残基的抗体,等等,并且包括重和 / 或轻链氨基酸序列变异的组合。本文的特定目标抗体变体是在其一个或两个轻链上包含氨基末端引导延伸的抗体,任选地进一步包括相对于主要种类抗体的其它氨基酸序列和 / 或糖基化作用差异。

[0130] “治疗性单克隆抗体”是用于治疗人受试者的抗体。本文公开的治疗性单克隆抗体包括 :用于癌症和各种非恶性疾病或病症的 HER2 抗体 ;用于治疗 B 细胞恶性肿瘤,自身免疫疾病,移植物排斥,或阻抑针对外源抗原的免疫反应的 CD20 或 BR3 抗体 ;用于治疗 IgE 介导的病症的 IgE 抗体 ;用于治疗癌症的 DR5 或 VEGF 抗体。

[0131] 本文的“糖基化作用变体”抗体是具有一个或多个糖部分附于其上的抗体,其不同于附于主要种类抗体上的一个或多个糖部分。本文的糖基化作用变体的实例包括具有 G1 或 G2 寡糖结构,而非 G0 寡糖结构附于其 Fc 区上的抗体,有一个或两个糖部分附于其一个或两个轻链上的抗体,没有糖附于抗体的一个或两个重链上的抗体,等等,以及糖基化作用变化的组合。

[0132] 当抗体具有 Fc 区时,可以将寡糖结构如图 16 所示的结构附于抗体的一个或两个重链上,例如在残基 299 上 (298, 残基的 Eu 编号)。对于 Pertuzumab 来说,G0 是占优势的

寡糖结构,在 Pertuzumab 组合物中发现有较少量的其它寡糖结构如 G0-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) 和 G2。

[0133] 除非另外指定,本文的“G1 寡糖结构”包括 G-1, G1-1, G1(1-6) 和 G1(1-3) 结构。

[0134] 本文中“氨基末端引导延伸 (amino-terminal leader extension)”指氨基末端引导序列的一个或多个氨基酸残基,其存在于抗体的任何一个或多个重或轻链的氨基末端。例示性的氨基末端引导延伸包含或由存在于抗体变体一条或两条轻链上的三个氨基酸残基, VHS 组成。

[0135] “同源性”被定义为在比对序列和引入缺口之后氨基酸序列变体残基相同的百分比,如果有必要的话,去实现最大百分比同源性。进行比对的方法和计算机程序是本领域公知的。一种这类计算机程序为“Align 2”,其于 1991 年 12 月 10 日在美国版权局,华盛顿区, DC20559 以用户文件存档。

[0136] 抗体“效应功能”指那些可归结于抗体 Fc 区的生物学活性(天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体 Fc 区)。“效应功能”的例子包括 C1q 结合;补体依赖性细胞毒性;Fc 受体结合;抗体-依赖型细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体的下调(例如 B 细胞受体;BCR)等。

[0137] 根据其重链恒定结构域的氨基酸序列,可以将全长抗体指定到不同的“类别”。有五种主要的全长抗体类别:IgA, IgD, IgE, IgG, 和 IgM, 其中几种可以进一步分入“亚类”(同种型),例如, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 和 IgA2。对应于不同类别抗体的链恒定结构域分别叫作 α , δ , ϵ , γ , 和 μ 。不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是公知的。

[0138] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”指一种细胞介导的反应,其中表达 Fc 受体(FcR)的非特异性细胞毒细胞(如自然杀伤(NK)细胞,中性粒细胞,和巨噬细胞)识别靶细胞上结合的抗体,并随后引起靶细胞的裂解。介导 ADCC 的主要细胞即 NK 细胞仅表达 Fc γ R III,而单核细胞表达 Fc γ R I, Fc γ R II 和 Fc γ R III。Ravetch 和 Kinet 在免疫学年鉴 9:457-92(1991), 464 页的表 3 中总结了造血细胞上的 FcR 表达。为评估目的分子的 ADCC 活性,可进行体外 ADCC 试验,如美国专利 5,500,362 号或 5,821,337 号中所述。这类试验中有用的效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。任选地或另外,目的分子的 ADCC 活性可在体内评估,例如在 Clynes 等 PNAS(USA) 95:652-656(1998)公开的动物模型中。

[0139] “人效应细胞”是表达一种或多种 FcR 并执行效应剂功能的白细胞。优选所述细胞至少表达 Fc γ R III 并执行 ADCC 效应剂的功能。例如可介导 ADCC 的人白细胞包括人外周血单个核细胞(PBMC),自然杀伤(NK)细胞,单核细胞,细胞毒 T 细胞和中性粒细胞;其中优选 PBMC 和 NK 细胞。效应细胞可分离自其天然来源,例如如本文所述分离自血液和 PBMC。

[0140] 术语“Fc 受体”或“FcR”用于描述与抗体 Fc 区结合的受体。优选的 FcR 是天然序列的人 FcR。而且,优选的 FcR 是与 IgG 抗体结合的受体(γ 受体),包括 Fc γ R I, Fc γ R II 和 Fc γ R III 亚型,以及这些受体的等位基因变体和可替换的剪接形式。Fc γ R II 受体包括 Fc γ R IIA(“活化型受体”)和 Fc γ R IIB(“抑制型受体”),二者的氨基酸序列相似,主要区别在其胞浆结构域。活化型受体 Fc γ R IIA 在其胞浆结构域包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制型受体 Fc γ R IIB 在其胞浆结构域包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)(见综述 Daeron, 免疫学年鉴 15:203-234(1997))。在 Ravetch

和 Kinet, 免疫学年鉴 9 :457-92(1991) ;Capel 等, 免疫方法 (免疫学方法) 4 :25-34(1994) ;和 de Haas 等, 实验室及临床医学杂志 (J. Lab. Clin. Med.) 126 :330-41(1995) 中对 FcR 进行了综述。其它 FcR, 包括将来被确定的, 均被包含在术语“FcR”中。该术语也包括新生期的受体, FcRn, 其负责将母体的 IgG 转运至胎儿 (Guyer 等, 免疫学杂志 117 :587(1976) 和 Kim 等, 免疫学杂志 24 :249(1994))。

[0141] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指在补体存在时分子裂解标靶的能力。补体活化途径由补体系统第一个成分 (C1q) 结合至一个与同源抗原形成复合物的分子 (如抗体) 来启动。为评价补体活化, 可如 Gazzano-Santoro 等, 免疫学方法杂志 202 :163(1996) 所述进行 CDC 试验。

[0142] “天然抗体”通常是约 150,000 道尔顿的异源四聚体糖蛋白, 由两个相同的轻链 (L) 和两个相同的重链 (H) 构成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接, 而免疫球蛋白不同种型的重链中二硫键数目不同。每条重链和轻链还具有规则间隔的链内二硫键。每个重链在其一个端有可变结构域 (V_H), 紧接着多个恒定结构域。每个轻链端有可变结构域 (V_L), 而另一端有恒定结构域; 轻链恒定结构域与重链第一恒定结构域并列, 轻链的可变结构域与重链的可变结构域并列。据信在轻链和重链的可变结构域之间特定氨基酸形成一个界面。

[0143] 术语“可变的”是指不同抗体的可变区某些部分序列差异很大, 且这些部分在每种特定抗体与其特定抗原的结合和特异性中都有用。然而在抗体整个可变区中可变性的分布并不均等。它集中在轻链和重链可变区的三个被称为高变区的节段中。可变区的更高度保守部分被称为框架区 (FR)。天然轻链和重链的可变区分别包含四个 FR, 它们大多采用 β 片层构型, 通过三个高变区相连, 这些高变区与 β 片层结构形成环状, 有时形成部分环状。每条链的高变区通过 FR 连接至十分接近, 并与其他链的高变区共同形成抗体的抗原结合位点 (见 Kabat 等, 具有免疫学意义的蛋白的序列, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。恒定区不直接参与抗体对抗原的结合, 但显示多种效应功能, 如使抗体参与抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC)。

[0144] 当用在本文中时术语“高变区”指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区通常含有来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基 (例如轻链可变区的残基 24-34 (L1), 50-56 (L2) 和 89-97 (L3), 重链可变区的残基 31-35 (H1), 50-65 (H2) 和 95-102 (H3); Kabat 等, 具有免疫学意义的蛋白的序列, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)), 和 / 或“高变环”的残基 (例如轻链可变区的残基 26-32 (L1), 50-52 (L2) 和 91-96 (L3), 重链可变区的残基 26-32 (H1), 53-55 (H2) 和 96-101 (H3); Chothia 和 Lesk, 分子生物学杂志 196 :901-917(1987))。“框架区”或“FR”残基是除本文所定义的高变区残基以外的可变区残基。

[0145] 抗体经木瓜蛋白酶消化产生两个相同的称为“Fab”的抗原结合片段和一个残余“Fc”片段, 每个 Fab 片段具有单个抗原结合位点, Fc 的名称反映了其容易形成结晶的能力。胃蛋白酶处理产生一个 $F(ab)_2$ 片段, 它有两个抗原结合位点并仍能与抗原交联。

[0146] “Fv”是最小抗体片段, 包含完整的抗原识别和抗原结合位点。这个区域是由一条重链和一个轻链可变区紧密、非共价结合成的二聚体。在 V_H - V_L 二聚体表面, 每个可变区的三个高变区在构型上相互作用, 从而限定抗原结合位点。六个高变区共同赋予抗体以抗原

结合特性。但即使单个可变区（或 Fv 中仅包含三个抗原特异性高变区的那一半）也能识别并结合抗原，只是比完整结合位点的亲和力低。

[0147] Fab 片段还包含轻链恒定区和重链的第一恒定区 (CH1)。Fab' 不同于 Fab 片段之处在于，其重链 CH1 结构域的羧基端添加了数个残基，其中包括来自抗体铰链区的一或多个半胱氨酸。本文中 Fab'-SH 指一种 Fab'，其中恒定区的半胱氨酸残基有至少一个游离巯基。F(ab')₂ 抗体片段最初是作为 Fab' 片段对且它们之间有铰链区半胱氨酸的形式产生的。抗体片段的其它化学连接也是已知的。

[0148] 可以将脊椎动物任何物种的抗体的“轻链”指定为两种完全不同的型之一，称作 κ 和 λ ，型别区分的依据是其恒定区氨基酸序列。

[0149] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包括抗体的 V_H 和 V_L 结构域，这些结构域存在于单个多肽链上。优选地，Fv 多肽在 V_H 和 V_L 结构域之间还包含一个多肽接头，它能使 scFv 形成抗原结合所需的结构。关于 scFv 的综述见 Pluckthun 在《单克隆抗体的药理学》，第 113 卷，Rosenburg 和 Moore 编，Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页 (1994)。HER2 抗体 scFv 片段在 W093/16185；美国专利号 5,571,894；和美国专利号 5,587,458 中进行了描述。

[0150] 术语“二价抗体 (diabodies)”是指具有两个抗原结合位点的小分子抗体片段，这些片段在一条多肽链 (V_H-V_L) 上含有相连的一个重链可变区 (V_H) 和一个轻链可变区 (V_L)。利用一种非常短的接头，其使得同一条链上的两个结构域无法配对，被迫与另一条链上的互补结构域配对，从而形成两个抗原结合位点。在 EP 404,097；W093/11161；和 Hollinger 等，美国国家科学院学报，90：6444-6448 (1993) 中对二价抗体作更充分地描述。

[0151] “人源化”形式的非人（例如啮齿动物）抗体是包含源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。对于大多数的部分而言，人源化抗体人免疫球蛋白（受体 (recipient) 抗体），其中受体的高变区残基被具有所需特异性、亲和力和能力 (capacity) 的非人物种如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类（供体 (donor) 抗体）的高变区的残基所替代。在一些情况下，人免疫球蛋白框架区 (FR) 残基被相应的非人残基取代。而且人源化抗体可包含未在受体抗体或供体抗体中发现的残基。这些修饰旨在进一步细化抗体的功能。一般情况下，人源化抗体基本上包含至少一个、通常两个可变区的全部，其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的那些，所有或基本上所有 FR 是人的免疫球蛋白序列中的那些。人源化抗体任选地还包含免疫球蛋白恒定区 (Fc)、通常为人免疫球蛋白的至少一部分。详见 Jones 等，自然 321：522-525 (1986)；Riechmann 等，自然 332：323-329 (1988)；和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2：593-596 (1992)。

[0152] 人源化 HER2 抗体包括 huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 和 huMAb4D5-8 或 Trastuzumab (HERCEPTIN®)，如美国专利 5,821,337 的表 3 中所述，本文特别将其并入作为参考；本文所述的人源化 520C9 (W093/21319) 和人源化 2C4 抗体。

[0153] 对于本文的目的而言，“Trastuzumab,”“HERCEPTIN®,”和“huMAb4D5-8”分别指包括 SEQ ID NOS. 13 和 14 中的轻和重链氨基酸序列的抗体。

[0154] 在这里，“Pertuzumab,”“rhuMAb 2C4,”和“OMNITARG™”分别指包括 SEQ ID NOS. 3 和 4 中的可变轻和可变重氨基酸序列的抗体。其中 Pertuzumab 是全长抗体，优选地它分别包含 SEQ ID NOS. 15 和 16 中的轻链和重链氨基酸序列。

[0155] “裸抗”是未偶联到异种分子,如细胞毒性部分或放射性标准上的抗体(如本文所定义的)。

[0156] “亲和性-成熟的”抗体是在其一个或多个高变区中具有一或多种变化的抗体,所述变化导致所述抗体与不具有那些变化的亲代抗体相比,前者对于抗原的亲和性提高。优选的亲和性成熟的抗体将具有纳摩尔的或甚至皮摩尔的靶抗原亲和性。通过本技术领域已知的方法产生亲和性-成熟的抗体。Marks 等, *Bio/Technology*, 10:779-783(1992) 描述了通过 VH 和 VL 域重排的亲和性成熟 (affinity maturation)。CDR 和 / 或框架残基的随机突变由 Barbas 等, *Proc. Nat. Acad. Sci, USA*, 91:3809-3813(1994); Schier 等, *Gene*, 169:147-155(1995); Yelton 等, *J. Immunol.*, 155:1994-2004(1995); Jackson 等, *J. Immunol.*, 154(7):3310-3319(1995); 和 Hawkins 等, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896(1992) 描述。

[0157] “激动剂抗体”是结合并激活受体的抗体。一般地,激动剂抗体的受体激活能力将至少在定性上与受体的天然激动剂配体相似(并且可以是基本上在定性上相似)。激动剂抗体的实例是结合 TNF 受体超家族中的受体,如 DR5 的抗体,并且其诱导表达 TNF 受体(例如 DR5)的细胞的凋亡。确定凋亡诱导的测定法在 W098/51793 和 W099/37684 中进行了描述,特此将二者并入本文作为参考。

[0158] “分离的”抗体是指从其天然环境成份中鉴定和分离和 / 或回收的抗体。其天然环境的污染成份是会干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质,且可能包括酶,激素,和其它蛋白型或非蛋白型溶质。在优选的实施方案中,该抗体将纯化成 (1) 按劳里 (Lowry) 方法测定的抗体重量百分比超过 95%, 且最优选重量百分比超过 99%, (2) 其纯化程度足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N- 末端或内部氨基酸序列,或 (3) 在还原性或非还原性条件下进行 SDS-PAGE 并使用考马斯蓝或者,优选银染测定具有同质性。分离的抗体包括在重组细胞内的原位抗体,因为该抗体天然环境中的至少一种成份不存在。然而,一般来说,分离的抗体由至少一个纯化步骤制备。

[0159] “比 Trastuzumab 更有效地抑制 HER 二聚体化作用”的 HER2 抗体是比 Trastuzumab 更有效地(例如至少大约 2- 倍更加有效地)减弱或消除 HER 二聚体的抗体。优选地,这种抗体至少大约与鼠单克隆抗体 2C4, 鼠单克隆抗体 2C4 的 Fab 片段, Pertuzumab, 和 Pertuzumab 的 Fab 片段同样有效地抑制 HER2 二聚体化作用。可以通过直接研究 HER 二聚体,或通过评估 HER 激活,或缘自 HER 二聚化作用的下游信号,和 / 或通过评估抗体-HER2 结合位点等等来评估 HER 二聚化作用抑制。筛选具有比 Trastuzumab 更有效地抑制 HER 二聚体化作用的抗体的测定法在 Agus 等人 *Cancer Cell* 12:127-137(2002) 和 W001/00245 (Adams 等人) 中进行了描述。例如,可以通过评估,例如,HER 二聚体形成的抑制(参见,例如,Agus 等人 *Cancer Cell* 12:127-137(2002) 的图 1A-B; 和 W001/00245); 表达 HER 二聚体的细胞的 HER 配体激活的减弱(例如, W001/00245 和 Agus 等人 *Cancer Cell* 12:127-137(2002) 的图 2A-B); HER 配体与表达 HER 二聚体的细胞的结合的阻抑(例如, W001/00245, 和 Agus 等人 *Cancer Cell* 12:127-137(2002) 的图 2E); 在 HER 配体存在(或缺失)时表达 HER 二聚体的癌细胞(例如 MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D 细胞)的细胞生长抑制(例如, W001/00245 和 Agus 等人 *Cancer Cell* 12:127-137(2002) 的图 3A-D); 下游信号的抑制(例如, HRG- 依赖型 AKT 磷酸化作用的抑制或 HRG- 或 TGF α - 依赖型 MAPK 磷酸化作用的抑制)(参见,例如, W001/00245, 和 Agus 等人 *Cancer Cell* 12:127-137(2002) 的图 2C-D) 来

测定 HER 二聚体化作用的抑制。还可以通过研究抗体 HER2 结合位点,例如,通过评估结合 HER2 的抗体的结构或模型,如晶体结构,来评估抗体是否抑制 HER 二聚体化作用(参见,例如, Franklin 等人 Cancer Cell 5 :317-328(2004))。

[0160] HER2 抗体可以比 Trastuzumab 更加有效地“抑制 HRG- 依赖型 AKT 磷酸化作用”和/或抑制“HRG- 或 TGF α - 依赖型 MAPK 磷酸化作用”(例如至少 2- 倍更加有效地)(例如参见 Agus 等人 Cancer Cell 2 :127-137(2002) 和 W001/00245)。

[0161] HER2 抗体可以“不抑制 HER2 外部结构域 (ectodomain) 切割”(Molina 等人 Cancer Res. 61 :4744-4749(2001))。

[0162] “结合 HER2 的异二聚体结合位点”的 HER2 抗体,结合结构域 II 中的残基(任选地还结合其它 HER2 细胞外结构域,如结构域 I 和 III 中的残基),并且至少在某种程度上可以空间阻碍 HER2-EGFR, HER2-HER3, 或 HER2-HER4 异二聚体的形成。Franklin 等人 Cancer Cell 5 :317-328(2004) 表征了 HER2-Pertuzumab 晶体结构,保存在 RCSB 蛋白质数据库 (ID Code 1S78),例证了结合 HER2 的异二聚体结合位点的例示性抗体。

[0163] “结合 HER2 的结构域 II”的抗体结合结构域 II 中的残基并且任选地结合 HER2 其它结构域,如结构域 I 和 III 中的残基。优选地结合结构域 II 的抗体结合到 HER2 的结构域 I, II 和 III 之间的连接上。

[0164] 当在本文中使用“生长抑制剂”指在体外或体内抑制细胞,特别是表达 HER 的癌细胞的生长的化合物或组合物。因而,生长抑制剂可以是显著减少处于 S 期的表达 HER 的细胞的百分比的抑制剂。生长抑制剂的实例包括阻抑细胞周期进程(在 S 期以外处)的试剂,如诱导 G1 阻滞和 M- 期阻滞的试剂。典型的 M- 期阻抑剂包括长春花碱类 (vincas) (长春新碱和长春碱),紫杉烷,和拓扑 II 抑制剂如阿霉素,表柔比星 (epirubicin), 柔红霉素 (daunorubicin), 依托泊苷 (etoposide), 和博来霉素。那些阻滞 G1 的试剂也延伸到 S 期阻滞,例如, DNA 烷化剂如它莫西芬,强的松,达卡巴嗪 (dacarbazine), 氮芥 (mechlorethamine), 顺铂, 氨甲蝶呤, 5- 氟尿嘧啶, 和阿糖胞苷 (ara-C)。其它信息可以见于 The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” by Murakami 等人 (WB Saunders :Philadelphia, 1995), 特别是第 13 页。

[0165] “生长抑制性”抗体的实例是那些结合 HER2 和抑制过表达 HER2 癌细胞的生长的抗体。优选的生长抑制性 HER2 抗体以大约 0.5-30 μ g/ml 的抗体浓度抑制细胞培养物中 SK-BR-3 乳房肿瘤细胞的生长超过 20%, 优选超过 50% (例如从大约 50% 到大约 100%), 其中所述生长抑制是在 SK-BR-3 细胞暴露于抗体六天之后(参见发布于 1997 年 10 月 14 日的美国专利号 5,677,171)测定的。SK-BR-3 细胞生长抑制测定在该专利和下文中作更加详细的描述。优选的生长抑制性抗体是鼠单克隆抗体 4D5 的人源化变体,例如, Trastuzumab。

[0166] “诱导凋亡”的抗体是指诱导程序性细胞死亡的抗体,所述死亡可通过膜联蛋白 (annexin) V 的结合, DNA 片段化, 细胞皱缩, 内质网膨胀, 细胞碎裂, 和/或膜泡(称为凋亡小体)形成确定。所述细胞通常是表达该抗体所结合抗原的细胞。优选地所述细胞是肿瘤细胞。例如磷脂酰丝氨酸 (PS) 转位可以通过膜联蛋白结合测量; DNA 片段化可以通过 DNA 梯度评估; 而伴随着 DNA 片段化的核/染色质浓缩可以通过亚二倍体细胞的任何增长进行评估。优选地,在膜联蛋白结合测定中,诱导凋亡的抗体是导致相对于未处理细胞对膜联蛋

白结合的诱导为大约 2-50 倍,优选地大约 5-50 倍,最优选大约 10-50 倍的抗体,所述测定利用表达该抗体所结合抗原的细胞进行。诱导凋亡的抗体的实例为 HER2 抗体 7C2 和 7F3,和某些 DR5 抗体。

[0167] “表位 2C4”是抗体 2C4 结合的 HER2 细胞外结构域中的区域。为了筛选结合 2C4 表位的抗体,可以进行常规交叉阻抑测定,如在 *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane(1988)中所述的测定。或者,可以进行表位图谱绘制以评估抗体是否结合到 HER2 的 2C4 表位上。表位 2C4 包含来自 HER2 细胞外结构域中结构域 II 的残基。2C4 和 Pertuzumab 在结构域 I, II 和 III 的连接处结合 HER2 的细胞外结构域。Franklin 等人癌细胞 5 :317-328(2004)。

[0168] “表位 4D5”是抗体 4D5(ATCC CRL 10463) 和 Trastuzumab 进行结合的 HER2 细胞外结构域中的区域。这一表位靠近 HER2 的跨膜结构域,并且在 HER2 的结构域 IV 内。为了筛选结合 4D5 表位的抗体,可以进行常规交叉阻抑测定,如在 *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane(1988)中所述的测定。或者,可以进行表位图谱绘制以评估抗体是否结合到 HER2 的 4D5 表位上(例如从 HER2 的大约残基 529 到大约残基 625 的区域中任何一个或多个残基,包括残基 529 和残基 625)。

[0169] “表位 7C2/7F3”是 7C2 和 / 或 7F3 抗体(都保存在 ATCC,参见下文)结合的 HER2 细胞外结构域的结构域 I 之内的,氨基末端上的区域。为了筛选结合 7C2/7F3 表位的抗体,可以进行常规交叉阻抑测定,如在 *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane(1988)中所述的测定。或者,可以进行表位图谱绘制以证实抗体是否结合到 HER2 上的 7C2/7F3 表位上(例如从 HER2 的大约残基 22 到大约残基 53 的区域中任何一个或多个残基)。

[0170] “治疗”指治疗性治疗和预防性措施。需要处理的人包括已经患有疾病的人以及要预防疾病的人。因此,可以将本文待处理的患者诊断为患有疾病或可能倾向或易于患有该疾病。

[0171] 术语“癌症”和“癌的”指或描述哺乳动物的生理状态,其一般表征为无节制的细胞生长。癌症的实例包括,但不限于,癌,淋巴瘤,胚细胞瘤(包括髓母管细胞瘤和视网膜母细胞瘤),肉瘤(包括脂肪肉瘤和滑液细胞肉瘤),神经内分泌肿瘤(包括类癌样肿瘤,促泌素瘤,和胰岛细胞癌),间皮瘤,神经鞘瘤(包括听神经瘤),脊膜瘤、腺癌、黑素瘤,和白血病或淋巴恶性肿瘤。这些癌症的更加具体的实例包括鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌),肺癌包括小细胞肺癌,非小细胞肺癌,肺的腺癌和肺的鳞状细胞癌,腹膜癌,肝细胞癌,肠胃癌包括胃肠癌,胰腺癌,胶质母细胞瘤,颈癌,卵巢癌,肝癌,膀胱癌,肝癌,乳癌,结肠癌,直肠癌,结肠直肠癌,子宫内膜或子宫癌,唾液腺癌,肾癌,前列腺癌,外阴癌,甲状腺癌,肝癌,肛门癌,阴茎癌,阴囊癌,食道癌,胆道肿瘤,以及头和颈部的癌。

[0172] 术语“有效量”指对患者疾病有效的药物量。当所述疾病是癌症时,药物的有效量可以减少癌细胞的数目;减少肿瘤大小;抑制(即,在某种程度上延缓并且优选终止)癌细胞浸润入外周器官;抑制(即,在某种程度上延缓并且优选终止)肿瘤转移;在某种程度上抑制肿瘤生长;和 / 或在某种程度上减轻一种或多种与癌症相关联的症状。在药物可以阻止癌细胞生长和 / 或杀死现存癌细胞的程度上,它可以是抑制细胞生长的和 / 或细胞毒性的。所述有效量可以延长进程自由存活,导致产生目标反应(包括部分反应, PR, 或完全反

应, CR), 提高整体存活时间, 和 / 或改善癌症的一种或多种症状。

[0173] “表达 HER2 的癌症”是包含具有 HER2 蛋白存在于其细胞表面上的细胞的癌症。

[0174] “过表达”HER 受体的癌症是这样一种癌症, 其与相同组织类型的非癌细胞相比, 在其细胞表面具有显著更高水平的 HER 受体, 如 HER2。这种过表达可能是由基因扩增或由增强的转录或翻译而引起的。HER 受体过表达可以在诊断性或预后性测定中通过评估存在于细胞表面上的 HER 蛋白质的水平提高而进行测定 (例如通过免疫组化测定; IHC)。或者, 或此外, 可以通过例如荧光原位杂交 (FISH; 参见 1998 年 10 月公开的 W098/45479), DNA 印迹, 或聚合酶链式反应 (PCR) 技术, 如定时定量 PCR (RT-PCR) 测量编码 HER 的核酸在细胞中的水平。还可以通过测量在生物液如血清中渗出的抗原来研究 HER 受体过表达 (参见, 例如, 1990-06-12 发布的美国专利号 4, 933, 294; 1991-04-18 公开的 W091/05264; 1995-03-28 发布的美国专利 5, 401, 638; 和 Sias 等人 J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990))。除了以上测定之外, 熟练专业人员还可利用各种体内测定法。例如, 可以将患者体内的细胞暴露于抗体, 所述抗体任选地标记了可检测标记, 例如放射性同位素, 并且可以通过例如外部扫描放射性或通过分析取自先前暴露于抗体的患者的活检组织来评估抗体与患者体内细胞的结合。

[0175] 相反, “不过表达 HER2 受体”的癌症是这样一种癌症, 其与相同组织类型的非癌细胞相比, 并不会表达高于正常水平的 HER2 受体。

[0176] “过表达”HER 配体的癌症是这样一种癌症, 其与相同组织类型的非癌细胞相比, 产生显著更高水平的该配体。这种过表达可能是由基因扩增或由增强的转录或翻译引起的。可以通过评估患者体内配体 (或编码它的核酸) 的水平来诊断性确定 HER 配体的过表达, 例如在肿瘤活检组织中或通过各种诊断性测定法如 IHC, FISH, DNA 印迹, PCR 或上述的体内测定法来进行。

[0177] 本文中所用的术语“细胞毒制剂”指抑制或阻止细胞功能和 / 或引起细胞破坏的物质。该术语旨在包括放射性核素 (例如 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} 和镭的放射性同位素), 化疗剂, 和毒素如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素, 包括其片段和 / 或变体。

[0178] “化疗剂”是可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的实例包括烷化剂, 如噻替哌 (thiotepa) 和环磷酰胺 (cyclophosphamide) (CYTOXAN[®]); 烷基磺酸酯如白消安 (busulfan), 英丙舒凡 (improsulfan) 和哌泊舒凡 (piposulfan); 氮丙啶如 benadopa, 卡波醌 (carboquone), 美妥替哌 (meturedopa) 和尿烷亚胺 (uredopa); 乙撑亚胺和 methylamelamine 包括六甲蜜胺 (altretamine), 三亚乙基蜜胺 (triethylenemelamine), 三亚乙基磷酰胺, 三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺 (trimethylolomelamine); acetogenins (特别是 bullatacin 和 bullatacinone); delta-9-四氢大麻酚 (dronabinol, MARINOL[®]); beta-拉帕酮; 拉帕醇; colchicines; 白桦脂酸; 喜树碱 (包括合成的类似物拓扑替康 (topotecan)); CPT-11 (依立替康, CAMPTOSAR[®]); 乙酰基喜树碱, 东莨菪甙元, 和 9-氨基喜树碱); 苔藓抑素 (bryostatin); callistatin; CC-1065 (包括其阿多来新 (adozelesin)、卡折来新 (carzelesin) 和比折来新 (bizelesin) 合成类似物); 鬼臼毒素; 鬼臼树酸; 替尼泊甙; cryptophycins (特别是 cryptophycin 1 和 cryptophycin8); 海兔毒素 (dolastatin); duocarmycin (包括合成类似物, KW-2189

和 CBI-TMI);eleutherobin;pancratistatin;sarcodictyin;spongistatin; 氮芥 (nitrogenmustards) 如苯丁酸氮芥, 萘氮芥, 胆磷酰胺 (cholophosphamide), 雌氮芥 (estramustine), 异环磷酰胺 (ifosfamide), 氮芥 (mechlorethamine), 盐酸氧氮芥;左旋苯丙氨酸氮芥 (melphalan), 新氮芥 (novembichin), 胆甾醇苯乙酸氮芥, 松龙苯芥 (prednimustine), 曲磷胺 (trofosfamide), 尿嘧啶氮芥;亚硝基脲 (nitrosureas) 如亚硝基脲氮芥 (carmustine), 氯脲菌素 (chlorozotocin), 福莫司汀 (fotemustine), 洛莫司汀 (lomustine), 尼莫司汀 (nimustine) 和雷莫司汀 (ranimustine); 抗生素如烯二醇抗生素 (如加利车霉素, 尤其是加利车霉素 γ 1 和加利车霉素 ω 1, 参见例如 Agnew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186(1994); dynemicin, 包括 dynemicinA; esperamicin; 以及新制癌菌素生色团 (chromophore) 和相关的色蛋白 enediyne 抗生素生色团), 阿克拉霉素, 放线菌素, authramycin, 重氮丝氨酸, 博来霉素, 放线菌素 C (cactinomycin), carabycin, 洋红霉素 (carminomycin), 嗜癌素 (carzinophilin), 色霉素, 放线菌素 D, 柔红菌素 (daunorubicin), 地托比星 (detorubicin), 6-重氮-5-氧-L-正亮氨酸, 阿霉素 (doxorubicin) (包括 ADRIAMYCIN®, 吗啉代-阿霉素, 氰基吗啉代-阿霉素, 2-吡咯啉基-阿霉素, 阿霉素 HCl 脂质体注射液 (DOXIL®), 脂质体阿霉素 TLC D-99 (MYOCET®), 聚乙二醇化的脂质体阿霉素 (CAELYX®), 和脱氧阿霉素), 表阿霉素 (epirubicin), 依索比星 (esorubicin), 伊达比星 (idarubicin), 发波霉素 (marcellomycin), 丝裂霉素如丝裂霉素 C, 霉酚酸, 诺加霉素 (nogalamycin), 橄榄霉素 (olivomycin), 培洛霉素 (peplomycin), potfiromycin, 嘌呤霉素, 三铁阿霉素 (quelamycin), 罗多比星 (rodorubicin), 链黑菌素; 链脲霉素 (streptozocin), 杀结核菌素, 乌苯美司 (ubenimex), 净司他丁 (zinostatin), 佐柔比星 (zorubicin); 抗代谢药如氨甲蝶呤, 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物, 如二甲叶酸 (denopterin), 氨甲蝶呤, 蝶罗呤, 三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物如氟达拉滨 (fludarabine), 6-巯基嘌呤, 硫咪嘌呤, 硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物, 如安西他滨 (ancitabine), 阿扎胞苷 (azacitidine), 6-氮尿苷, 卡莫氟 (carmofur), 阿糖胞苷, 双脱氧尿苷, 去氟氧尿苷 (doxifluridine), 依诺他滨 (enocitabine), 氟尿苷; 抗肾上腺类, 如氨鲁米特 (aminoglutethimide), 米托坦 (mitotane), 曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充剂如 frolinic acid; 醋葡内酯; 醛磷酸胺糖苷 (aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸 (aminolevulinic acid); 安吡啶 (amsacrine); bestrabucil; 比生群 (biasntrene); 依达曲沙 (edatraxate); 地磷酰胺 (defofamine); 秋水仙胺; 地吡醌 (diaziquone); elfornithine; 依利醋铵 (elliptinium acetate); epothilone; 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓; 羟基脲; 香菇多糖 (lentinan); 氯尼达明 (lonidamine); 美登木素生物碱 (maytansinoids) (包括美登素和柄型菌素) 米托胍脲 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 莫哌达醇 (mopidamol); 硝呋旦 (nitracrine); 喷司他丁 (pentostatin); 蛋氨酸氮芥 (phenamet); 吡柔比星 (pirarubicin); 鬼臼树酸 (podophyllinic acid); 2-乙基酰肼; 丙卡巴肼 (procarbazine); PSK® 多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 雷佐生 (razoxane); rhizoxin; 西索菲兰 (sizofiran); 锗螺胺 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸; 三亚胺脲; 2,2',2''-三氯三乙胺 (trichlorotriethylamine); 单端孢霉烯族毒素类 (尤其是 T-2 毒素, verracurinA, 杆孢菌素 A, 蛇形菌素 (anguidine)); 乌拉坦 (urethan); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露醇

氮芥;二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇;哌泊溴烷(pipobroman);gacytosine;阿拉伯糖苷("Ara-C");三胺硫磷(thiotepa);紫杉烷(taxoid),如紫杉醇(TAXOL®),紫杉醇的白蛋白改造纳米颗粒制剂(ABRAXANETM),和紫杉萜(TAXOTERE®);chloranbucil;6-硫代鸟嘌呤;巯基嘌呤;氨甲蝶呤;铂类药剂如顺铂,奥沙利铂和卡铂;长春花碱,其阻止微管蛋白聚合作用形成微管,包括长春碱(VELBAN®),长春新碱(ONCOVIN®),长春地辛(ELDISINE®, FILDESIN®),和长春瑞宾(NAVELBINE®);依托泊甙(etoposide)(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;leucovovin;诺安托(novantrone);依达曲沙;柔红霉素;氨基蝶呤;伊拜膦酸盐;拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);视黄醛如维甲酸,包括bexarotene(TARGRETIN®);二膦酸盐如氯甲双膦酸盐(例如,BONEFOS®或OSTAC®),依替膦酸钠(DIDROCAL®),NE-58095,唑来膦酸(zoledronic acid)/zoledronate(ZOMETA®),阿仑膦酸钠(FOSAMAX®),帕米膦酸钠(AREDIA®),替鲁膦酸盐(SKELID®),或利塞膦酸盐(ACTONEL®);曲沙他滨(troxacitabine)(1,3-二氧戊烷核苷胞核嘧啶类似物);反义寡核苷酸,特别是那些抑制在涉及失控细胞增殖的信号途径中的基因表达的反义寡核苷酸,如,例如,PKC- α , Raf, H-Ras, 和表皮生长因子受体(EGF-R);疫苗如THERATOPE®疫苗和基因治疗疫苗,例如,ALLOVECTIN®疫苗,LEUVECTIN®疫苗,和VAXID®疫苗;拓扑异构酶1抑制剂(例如,LURTOTECAN®);rmRH(例如,ABARELIX®);BAY439006(sorafenib;Bayer);SU-11248(Pfizer);哌立福辛(perifosine),COX-2抑制剂(例如塞来考昔(celecoxib)或艾托考昔(etoricoxib)),蛋白体抑制剂(例如PS341);bortezomib(VELCADE®);CCI-779;tipifarnib(R11577);orafenib,ABT510;Bcl-2抑制剂如oblimersensodium(GENASENSE®);pixantrone;EGFR抑制剂(参见下面的定义);酪氨酸激酶抑制剂(参见下面的定义);和可药用的盐,酸或任何上述药剂的衍生物;以及以上药剂中的两种或多种的组合,如CHOP,环磷酰胺,阿霉素,长春新碱和脱氢皮质醇的组合疗法的缩写,以及FOLFOX,用奥沙利铂(ELOXATIN™)结合5-FU和leucovovin的治疗方案的缩写。

[0179] 这一定义还包括作用来调节或抑制激素对肿瘤作用的抗激素剂,如具有混合激动剂/拮抗剂模式的抗雌激素剂,包括,他莫昔芬(NOLVADEX®),4-羟基他莫昔芬,托瑞米芬(FARESTON®),碘昔芬,屈洛昔芬,雷洛昔芬(EVISTA®),曲沃昔芬,keoxifene,和选择性雌激素受体调节剂(SERMs)如SERM3;无激动剂特性的纯抗雌激素剂如fulvestrant(FASLODEX®),和EM800(这种药剂可以阻抑雌激素受体(ER)二聚作用,抑制DNA结合,增强ER更新,和/或抑制ER水平);芳香酶抑制剂,包括甾族芳香酶抑制剂如福美司坦和依西美坦(exemestane)(AROMASIN®),和非甾族芳香酶抑制剂如阿纳托唑(ARIMIDEX®),来曲唑(FEMARA®)和氨鲁米特,和其它芳香酶抑制剂包括伏氯唑(vorozole)(RIVISOR®),甲地孕酮醋酸盐(MEGASE®),fadrozole,咪唑;促黄体激素释放激素激动剂,包括亮丙瑞林(LUPRON®和ELIGARD®),戈舍瑞林,布舍瑞林,和tripterelin;性类固醇,包括孕激素如甲地孕酮醋酸盐和甲羟孕酮醋酸盐,雌激素如己烯雌酚和普雷马林(premarin),和雄性激素/视黄醛如氟甲睾酮,所有的transretionic

acid 和芬维 A 胺 ; 奥那司酮 (onapristone) ; 抗黄体酮剂 ; 雌激素受体下调剂 (ERDs) ; 抗雄性激素如氟他胺, 尼鲁米特和比卡鲁胺 (bicalutamide) ; 睾丸酮 ; 和可药用的盐, 酸或任何上述药剂的衍生物 ; 以及以上药剂中的两种或多种的组合。

[0180] 如本文所用的, 术语“EGFR 靶向药物”指结合 EGFR 并且, 任选地, 抑制 EGFR 激活的治疗剂。这种制剂的实例包括结合 EGFR 的抗体和小分子。结合 EGFR 的抗体的实例包括 MAb 579(ATCC CRL HB 8506), MAb 455(ATCC CRL HB8507), MAb 225(ATCC CRL 8508), MAb 528(ATCC CRL8509) (参见, 美国专利号 4, 943, 533, Mendelsohn 等人) 及其变体, 如嵌合的 225(C225 或 Cetuximab ; ERBUTIX®) 和重构的人 225(H225) (参见, W096/40210, Imclone Systems Inc.) ; 结合 II 型突变体 EGFR 的抗体 (美国专利号 5, 212, 290) ; 结合 EGFR 的人源化和嵌合抗体, 如美国专利号 5, 891, 996 中所述 ; 和结合 EGFR 的人抗体, 如 ABX-EGF (参见 W098/50433, Abgenix)。抗 EGFR 抗体可以缀合以细胞毒性剂, 由此生成免疫缀合物 (参见, 例如, EP659, 439A2, Merck Patent GmbH)。结合 EGFR 的小分子实例包括 ZD1839 或 Gefitinib(IRESSA™; Astra Zeneca), CP-358774 或 Erlotinib HCL (TARCEVA™; Genentech/OSI) 和 AG1478, AG1571(SU 5271; Sugen)。

[0181] “酪氨酸激酶抑制剂”是在某种程度上抑制酪氨酸激酶如 HER 受体的酪氨酸激酶活性的分子。这类抑制剂的实例包括在前段落中提到的 EGFR 靶向药物以及小分子 HER2 酪氨酸激酶抑制剂如可获自 Takeda 的 TAK165, 双 -HER 抑制剂如优选结合 EGFR 但抑制 HER2 和 EGFR- 过表达细胞的 EKB-569 (可获自 Wyeth), 口服 HER2GW572016 (可获自 Glaxo) 和 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂, 和 PKI-166 (可获自 Novartis) ; pan-HER 抑制剂如 canertinib(CI-1033; Pharmacia) ; Raf-1 抑制剂如可获自 ISIS Pharmaceuticals 的反义试剂 ISIS-5132, 其抑制 Raf-1 信号过程 ; 非 -HER 靶向 TK 抑制剂如 Imatinib 甲磺酸盐 (Gleevac™), 可获自 Glaxo ; MAPK 细胞外调节的激酶 I 抑制剂 CI-1040 (可获自 Pharmacia) ; 喹唑啉, 如 PD 153035, 4-(3- 氯苯胺) 喹唑啉 ; pyridopyrimidines ; pyrimidopyrimidines ; pyrrolopyrimidines, 如 CGP 59326, CGP 60261 和 CGP 62706 ; pyrazolopyrimidines, 4-(苯氨基)-7H- 吡咯基 [2,3-d] 嘧啶 ; 姜黄素 (diferuloyl 甲烷, 4,5- 二 (4- 对氟苯胺) 邻苯二甲酰亚胺) ; 包含硝基噻吩部分的 tyrphostines ; PD-0183805 (Warner-Lambers) ; 反义分子 (例如结合 HER- 编码核酸的那些) ; 喹噁啉 (美国专利号 5, 804, 396) ; tryphostins (美国专利号 5, 804, 396) ; ZD6474 (Astra Zeneca) ; PTK-787 (Novartis/Schering AG) ; pan-HER 抑制剂如 CI-1033 (Pfizer) ; Affinitac (ISIS 3521 ; Isis/Lilly) ; Imatinib 甲磺酸 (Gleevac ; Novartis) ; PKI 166 (Novartis) ; GW2016 (Glaxo SmithKline) ; CI-1033 (Pfizer) ; EKB-569 (Wyeth) ; Semaxinib (Sugen) ; ZD6474 (AstraZeneca) ; PTK-787 (Novartis/Schering AG) ; INC-1C11 (Imclone) ; 或下面任一个专利公开文本中所述的 : 美国专利号 5, 804, 396 ; W099/09016 (American Cyanamid) ; W098/43960 (American Cyanamid) ; W097/38983 (Warner Lambert) ; W099/06378 (Warner Lambert) ; W099/06396 (Warner Lambert) ; W096/30347 (Pfizer, Inc) ; W096/33978 (Zeneca) ; W096/3397 (Zeneca) ; 和 W096/33980 (Zeneca)。

[0182] “抗血管生成剂”指在某种程度中阻抑或干扰血管形成的化合物。抗血管生成因子可以, 例如, 是结合参与促进血管生成的生长因子或生长因子受体的小分子或抗体。本文优选的抗血管生成因子是结合血管内皮生长因子 (VEGF) 的抗体, 如

Bevacizumab (AVASTIN®)。

[0183] 术语“细胞因子”是由一个细胞群释放的、作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白的总称。这类细胞因子有淋巴因子,单核因子,和传统的多肽激素。细胞因子包括生长激素,如人生长激素, N- 甲二磺酰人生长激素,和牛生长激素;甲状旁腺素;甲状腺素;胰岛素;前胰岛素;松弛素;前松弛素;糖蛋白激素如卵泡刺激素 (FSH), 甲状腺刺激素 (TSH), 促黄体 (生成) 激素 (LH); 肝细胞生长因子;成纤维细胞生长因子;催乳素;胎盘催乳素;肿瘤坏死因子- α 和 β ;苗勒管 (mullerian)- 抑制物;小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;苯丙酸诺龙;血管内皮细胞生长因子;整合素;血小板生成素 (TPO);神经生长因子如 NGF- β ;血小板生长因子;转化生长因子 (TGF) 如 TGF- α 和 TGF- β ;胰岛素样生长因子-I 和 -II;促红细胞生成素 (EPO);骨诱导因子 (osteoinductive factors);干扰素如干扰素- α , - β , - γ ;集落刺激因子 (CSF) 如巨噬细胞-CSF (M-CSF);粒细胞-巨噬细胞-CSF (GM-CSF);粒细胞-CSF (G-CSF);白细胞介素 (IL) 如 IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15;肿瘤坏死因子如 TNF- α 或 TNF- β ;和其它多肽因子包括 LIF 和 kit 配体 (KL)。本文所用的术语细胞因子包括天然蛋白或来自重组细胞培养物的蛋白以及天然序列细胞因子的生物活性等效物。

[0184] 配制的抗体优选是基本上纯的并且是基本上均一的 (即不含污染性蛋白质等)。“基本上纯的”抗体意指基于组合物的总重量,包括至少大约 90% 重量比的抗体的组合物,优选至少大约 95% 重量比。“基本上均一的”抗体意指基于组合物的总重量,包括至少大约 99% 重量比的抗体的组合物。

[0185] 本文的“B 细胞表面标记”或“B 细胞表面抗原”是在 B 细胞表面上表达的抗原,其可以用与其结合的抗体靶向。例示性的 B 细胞表面标记包括 CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 和 CD86 白细胞表面标记 (有关描述参见 The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition. 1997, ed. Barclay 等人 Academic Press, Harcourt Brace&Co., New York)。其它 B 细胞表面标记包括 RP105, FcRH2, B 细胞 CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, Btig, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA, 和 239287。与哺乳动物的其它非 B 细胞组织相比本文的特定目标 B 细胞表面标记优选在 B 细胞上表达,并且可以在前体 B 细胞和成熟 B 细胞上表达。本文的优选 B 细胞表面标准是 CD20 或 BR3。

[0186] “CD20”抗原,或“CD20”是大约 35-kDa,非糖基化的磷蛋白,见于来自外周血或淋巴器官的超过 90% 的 B 细胞表面。CD20 存在于正常的 B 细胞以及恶变的 B 细胞,但是并不在干细胞上表达。在文献中 CD20 的其它名称包括“B-淋巴细胞限制型抗原”和“Bp35”。CD20 抗原在例如 Clark 等人 Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:1766 (1985) 中进行了描述。

[0187] 仅仅对于本文的目的而言,“人源化 2H7”指 2H7 抗体的人源化变体,所述 2H7 抗体的 CDR 序列公开于美国专利号 5,500,362 (图 5 和 6) 中,特此将其并入本文作为参考。本文的人源化 2H7 抗体的实例包括 W02004/056312 中所述的变体,以及其它变体,包括,但不限于:2H7v16, 2H7v31, 2H7v73, 2H7v75, 2H7v96, 2H7v114, 2H7v115, 2H7v116, 2H7v138, 2H7v477, 2H7v375, 等等,在此将 W02004/056312 也并入本文作为参考。

[0188] 在一个实施方案中,人源化 2H7 抗体包含下列 CDR 序列中的一种,两种,三种,四

种,五种或六种:

[0189] CDR L1 序列 RASSSVSYXH 其中 X 是 M 或 L (SEQ ID No. 67), 例如 SEQ ID No. 57 (图 18A),

[0190] SEQ ID No. 58 的 CDR L2 序列 (图 18A),

[0191] CDR L3 序列 QQW XFNPPT 其中 X 是 S 或 A (SEQ ID No. 68), 例如 SEQ ID No. 59 (图 18A),

[0192] SEQ ID No. 60 的 CDR H1 序列 (图 18B),

[0193] AIYPGNGXTSYNQKFKG 的 CDR H2 序列, 其中 X 是 D 或 A (SEQ ID No. 69), 例如 SEQ ID No. 61 (图 18B), 和

[0194] VVYYSXXYWYFDV 的 CDR H3 序列, 其中位置 6 上的 X 是 N, A, Y, W 或 D, 而位置 7 上的 X 是 S 或 R (SEQ ID No. 70), 例如 SEQ ID No. 62 (图 18B)。

[0195] 上面的 CDR 序列一般存在于人可变轻和可变重框架序列之内, 如基本上人轻链 κ 亚基 I (V_L-I) 的人共有 FR 残基, 和基本上人重链亚基 III (V_H-III) 的人共有 FR 残基。还参见 WO 2004/056312 (Lowman 等人)。

[0196] 可变重区可以连接到人 IgG 链恒定区上, 其中该区可以是, 例如, IgG1 或 IgG3, 包括天然序列和变体恒定区。

[0197] 在优选的实施方案中, 这类抗体包含 SEQ ID No. 29 的可变重结构域序列 (v16, 如图 18B 中所示), 任选地还包括 SEQ ID No. 26 的可变轻结构域序列 (v16, 如图 18A 中所示), 其在位置 56, 100, 和 / 或 100a 上任选地包含一个或多个氨基酸取代, 例如 D56A, N100A 或 N100Y, 和 / 或可变重结构域中的 S100aR, 在可变轻结构域位置 32 和 / 或 92 上的一个或多个氨基酸取代, 例如 M32L 和 / 或 S92A。优选地, 抗体是完整抗体, 包括 SEQ ID Nos. 63 或 64 的轻链氨基酸序列, 和 SEQ ID No. 65, 66, 71 或 72 的重链氨基酸序列。

[0198] 优选的人源化 2H7 抗体是 ocrelizumab (Genentech)。

[0199] 本文的抗体可以进一步包含 Fc 区中的提高 ADCC 活性的至少一个氨基酸取代, 如这样一种氨基酸取代, 其中氨基酸取代在位置 298, 333, 和 334 上, 优选 S298A, E333A, 和 K334A, 其利用重链残基的 Eu 编号。还参见美国专利号 6, 737, 056B1, Presta。

[0200] 这些抗体的任一种可以包含 Fc 区中的至少一个取代, 其增强 FcRn 结合或血清半寿期, 例如在重链位置 434 上的取代, 如 N434W。还参见美国专利号 6, 737, 056B 1, Presta。

[0201] 这些抗体的任一种可以包含 Fc 区中的至少一个氨基酸取代, 其增强 CDC 活性, 例如, 至少包含位置 326 上的取代, 优选 K326A 或 K326W。还参见美国专利号 6, 528, 624B1 (Idusogie 等人)。

[0202] 一些优选的人源化 2H7 变体是那些包括 SEQ ID No. 26 的可变轻结构域和 SEQ ID No. 29 的可变重结构域的变体, 包括在 Fc 区 (如果存在的话) 中有或无取代的变体, 以及那些包括在 SEQ ID No. 29 中具有取代 N100A; 或 D56A 和 N100A; 或 D56A, N100Y, 和 S100aR 的可变重结构域以及在 SEQ ID No. 26 中具有取代 M32L; 或 S92A; 或 M32L 和 S92A 的可变轻结构域的变体。

[0203] 已经将 2H7v16 的可变重链中的 M34 鉴定为抗体稳定性的潜在来源并且是另一种取代的潜在候选物。

[0204] 在本发明的一些优选实施方案的总结中, 基于 2H7v16 的变体的可变区包含 v16 的

氨基酸序列,但除了在下表中所指出的氨基酸取代位置之外。除非另外指定,2H7 变体将与 v16 具有相同的轻链。

[0205] 例示性的人源化 2H7 抗体变体

2H7 版本	重链 (VH)改变	轻链 (VL)改变	Fc 改变
16 用于参 照			-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
[0206] 114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	-	-	K334L
588	-	-	S298A, E333A, K334A, K326A
511	D56A, N100Y, S100aR	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A

[0207] 一种优选的人源化 2H7 包含 2H7v16 可变轻结构域序列:DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQGTKVEIKR(SEQ ID No. 26);

[0208] 和 2H7v16 可变重结构域序列:EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYSNYSYWFYFDVWGQGTLLTVSS(SEQ ID No. 29).

[0209] 当所述人源化 2H7v16 抗体是完整抗体时,它可以包含轻链氨基酸序列:DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID No. 63);

[0210] 和 SEQ ID No. 65 的重链氨基酸序列或:EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYSNYSYWFYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID No. 71).

[0211] 另一种优选的人源化 2H7 抗体包含 2H7v511 可变轻结构域序列:DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR(SEQ ID No. 73)

[0212] 和 2H7v511 可变重结构域序列:EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYSYRYWFYFDVWGQGTLLTVSS(SEQ ID No. 74).

[0213] 当所述人源化 2H7v511 抗体是完整抗体时,它可以包含轻链氨基酸序列:DIQMTQS PSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID No. 64)

[0214] 和 SEQ ID No. 66 的重链氨基酸序列或:EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMH WVRQAPGKGLEWVGAIYPNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSRYWYFDVW GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAAALPAPIAATISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID No. 72)。

[0215] 本文的“B 细胞恶性肿瘤”包括非何杰金 (Hodgkin's) 淋巴瘤 (NHL),包括低级 / 滤泡 NHL,小淋巴细胞 (SL) NHL,中级 / 滤泡 NHL,中级弥散性 NHL,高级免疫母细胞 NHL,高级淋巴瘤母细胞 NHL,高级小非凹陷性细胞 NHL,bulky 病 NHL,套细胞淋巴瘤,AIDS- 相关性淋巴瘤,和 Waldenstrom's 巨球蛋白血症;白血病,包括急性淋巴瘤母细胞白血病 (ALL),慢性淋巴瘤母细胞白血病 (CLL),毛细胞白血病和慢性髓母细胞白血病 (chronic myeloblastic leukemia);和其它血液学恶性肿瘤。这些恶性肿瘤可以用抗 B 细胞表面标记,如 CD20 的抗体进行治疗。

[0216] 如本文所用的术语“非何杰金氏淋巴瘤”或“NHL”,指除了何杰金氏淋巴瘤之外的淋巴细胞的癌症。一般通过何杰金氏淋巴瘤中存在 Reed-Sternberg 细胞而非何杰金氏淋巴瘤中缺失所述细胞可以将何杰金氏淋巴瘤与非何杰金氏淋巴瘤区分开来。如本文所用的术语所包括的非何杰金氏淋巴瘤的实例包括任何可以由本领域技术人员 (例如肿瘤学家或病理学者) 按照本领域已知的分类方案来鉴定的疾病,所述分类方案如修订的欧美淋巴瘤 (European-American Lymphoma) (REAL) 方案,描述于 Color Atlas of Clinical Hematology, Third Edition; A. Victor Hoffbrand and John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Limited 2000) (具体参见图 11.57, 11.58 和 / 或 11.59)。更具体的实例包括但不限于,复发性或难治性 NHL,前线 (front line) 低级 NHL, III/IV 期 NHL,化疗耐受型 NHL,前体 B 成淋巴细胞白血病和 / 或淋巴瘤,小淋巴细胞淋巴瘤,B 细胞慢性淋巴细胞白血病和 / 或前淋巴细胞 (prolymphocytic) 白血病和 / 或小淋巴细胞淋巴瘤,B 细胞前淋巴细胞淋巴瘤,免疫细胞瘤和 / 或淋巴浆细胞淋巴瘤,边缘区 B 细胞淋巴瘤,脾边缘区淋巴瘤,结节外边缘区 -MALT 淋巴瘤,结节边缘区淋巴瘤,毛状细胞白血病,浆细胞瘤和 / 或浆细胞骨髓瘤,低级 / 滤泡淋巴瘤,中级 / 滤泡 NHL,套细胞淋巴瘤,滤泡中心淋巴瘤 (滤泡样 (follicular)), 中级弥散型 NHL,弥散型大 B 细胞淋巴瘤,浸润性 NHL (包括浸润性前线 NHL 和浸润性复发 NHL),自体同源干细胞移植后复发性或难治性 NHL,原发性纵隔大 B 细胞淋巴瘤,原发性渗出淋巴瘤,高级成免疫细胞 NHL,高级成淋巴细胞 NHL,高级小非凹陷性细胞 NHL, bulky 病 NHL, Burkitt's 淋巴瘤,前体 (外源) T 细胞淋巴瘤母细胞白血病和 / 或淋巴瘤,成人 T 细胞淋巴瘤和 / 或白血病,T 细胞慢性淋巴细胞白血病和 / 或前淋巴细胞白血病,大颗粒淋巴细胞白血病,蕈样肉芽肿病和 / 或 Sezary 综合征,结节外天然杀伤 / T 细胞 (鼻型) 淋巴瘤,肠型 T 细胞淋巴瘤,肝脾型 T 细胞淋巴瘤,皮下脂膜炎样 T 细胞淋巴瘤,皮肤淋巴瘤,间变性 (anaplastic) 大细胞淋巴瘤,血管中心性淋巴瘤,肠 T 细胞淋巴瘤,外周

T 细胞（未另外指定）淋巴瘤和血管免疫母细胞型 T 细胞淋巴瘤。

[0217] 在本文中“自身免疫疾病”是源自或针对个体自身组织或其共分离物或临床表现，或缘自其病症的疾病或紊乱。自身免疫疾病或紊乱的实例包括，但不限于关节炎（类风湿性关节炎，幼年型类风湿性关节炎，骨关节炎，银屑病关节炎，和关节强直性脊椎炎），银屑病，皮炎包括特应性皮炎、慢性特发性荨麻疹，包括慢性自身免疫荨麻疹，多肌炎 / 皮肌炎，毒性表皮坏死溶离，硬皮病（包括系统性硬皮病），硬化症如进行性系统硬化症，炎性肠病（IBD）（例如，克罗恩氏病，溃疡性结肠炎，自身免疫炎性肠病），坏疽性脓皮病，结节性红斑，原发性硬化性胆管炎，巩膜表层炎），呼吸窘迫综合征，包括成人呼吸窘迫综合征（ARDS），脑膜炎，IgE- 介导的疾病如过敏性和变应性和特应性鼻炎，脑炎如 Rasmussen 氏脑炎、葡萄膜炎或自身免疫性葡萄膜炎，大肠炎如显微镜结肠炎和胶原样结肠炎，血管球性肾炎（GN）如膜性 GN（膜性肾病），先天性膜性肾病，膜性增生性 GN（MPGN），包括 I 型和 II 型，和快速进展性 GN，过敏疾病，过敏反应，湿疹，哮喘，涉及 T 细胞和慢性炎症反应的疾病，动脉粥样硬化，自身免疫心肌炎，白血球粘着不足，系统性红斑狼疮（SLE）如皮肤 SLE，亚急性皮肤红斑狼疮，狼疮（包括肾炎型、大脑炎型、幼儿型、非肾型、平圆形、脱发型），幼儿型（I 型）糖尿病，包括幼儿胰岛素依赖型糖尿病（IDDM），成人糖尿病（II 型糖尿病），多发性硬化症（MS）如脊-眼（spino-optical）MS，由细胞因子和 T- 淋巴细胞介导的与急性和延迟性过敏症相关联的免疫反应，肺结核，结节病，肉芽肿病包括淋巴瘤样肉芽肿病，韦格纳肉芽肿病，粒细胞缺乏症，脉管炎（包括大血管脉管炎（包括风湿性多肌痛和巨细胞（Takayasu's）脉管炎），中血管脉管炎（包括川崎病和多发性结节性动脉炎），CNS 脉管炎，全身坏死性脉管炎，和 ANCA- 相关性脉管炎，如 Churg-Strauss 脉管炎或综合征（CSS），颞动脉炎，再生障碍性贫血，Coombs 阳性贫血，Diamond Blackfan 贫血，溶血性贫血或免疫性溶血性贫血包括自身免疫性溶血性贫血（AIHA），恶性贫血，纯红细胞发育不全（PRCA），因子 VIII 缺乏症，血友病 A，自身免疫中性粒细胞减少症，全血细胞减少，白血球减少症，与白细胞渗出有关的疾病，CNS 炎性疾病，多器官损伤综合征，抗原抗体复合物介导的疾病，抗肾小球基膜病，抗磷脂抗体综合征，过敏性神经炎，白塞病，Castleman 综合征、Goodpasture 综合征、雷诺氏综合征、干燥综合征、渗出性多形性红斑（Steven-Johnson syndrome）、类天疱疮比如大疱性类天疱疮、天疱疮（包括寻常型天疱疮（vulgaris），落叶型天疱疮（foliaceus），和天疱疮粘膜类天疱疮（pemphigus mucosum-membranepemphigoid）），自身免疫性多发性内分泌病，Reiter' 氏病，免疫复合物性肾炎，慢性神经病如 IgM 多发性神经炎或 IgM 介导的神经病，血小板减少症（例如由心肌梗塞患者发展的），包括血栓性血小板减少性紫癜（TTP）和自身免疫性或免疫介导的血小板减少症如特发性血小板减少性紫癜（ITP）包括慢性或急性 ITP，睾丸或卵巢的自身免疫疾病包括自身免疫睾丸炎和卵巢炎，原发性甲状腺功能减退，甲状旁腺机能减退，自身免疫内分泌疾病包括甲状腺炎如自身免疫甲状腺炎，慢性甲状腺炎（Hashimoto's 甲状腺炎），或亚急性甲状腺炎，自身免疫性甲状腺病，特发性甲状旁腺机能减退，阿狄森氏病，Grave 氏病，多腺综合征如自身免疫性多腺综合征（或多腺内分泌综合征），副肿瘤（paraneoplastic）综合征，包括神经学肿瘤伴随综合征如 Lambert-Eaton 肌无力综合征或 Lambert-Eaton 综合征，僵人综合征，脑脊髓炎如变态反应性脑脊髓炎，重症肌无力，小脑变性，边缘系统和 / 或脑干脑炎，神经性肌强直，斜视眼阵挛或斜视肌阵挛综合征（OMS），和感觉性神经病，Sheehan 综合征，自身免

疫肝炎,慢性肝炎,狼疮样肝炎,慢性活动型肝炎或自身免疫性慢性活动型肝炎,淋巴样间质性肺炎 (lymphoid interstitial pneumonitis)、闭塞性细支气管炎 (非移植物) 相对于 NSIP, Guillain-Barré 综合症, Berger 氏病 (IgA 肾病), 原发性胆汁性肝硬变、口炎性腹泻 (麸质肠病), 顽固性口炎性腹泻、疱疹样皮炎、冷球蛋白血症、肌萎缩性侧索硬化 (ALS; Lou Gehrig 氏病), 冠状动脉病, 自身免疫性内耳疾病 (AIED), 或自身免疫性听力损失、眼肌阵挛综合症 (opsoclonus myoclonus syndrome) (OMS), 多发性软骨炎如顽固性多软骨炎, 肺泡蛋白沉积症, 淀粉样变性, 巨细胞性肝炎, 巩膜炎, 非癌性淋巴细胞增多, 原发性淋巴细胞增多, 其包括单克隆 B 细胞性淋巴细胞增多 (例如, 良性单克隆丙种球蛋白病和意义未确定的单克隆丙种球蛋白病, MGUS), 外周神经病, 副肿瘤综合征, 神经通路疾病 (channelopathies) 如癫痫症, 偏头痛, 心律不齐, 肌肉紊乱, 聋, 盲, 周期性麻痹, 和中枢神经系统神经通路疾病, 孤独症, 炎性肌病, 局灶节段性肾小球硬化症 (FSGS), 内分泌性眼病, 葡萄膜视网膜炎 (uveoretinitis), 自身免疫性肝病, 纤维肌痛, 多发性内分泌失调, Schmidt 氏综合症, 肾上腺炎, 胃萎缩, 老年性痴呆, 脱髓鞘病, 心肌梗塞后综合征 (Dressler's syndrome), 脱发 (alopecia) arcata, CREST 综合症 (钙质沉着, 雷诺现象, 食管动力障碍 (dysmotility), 指端硬化, 和毛细血管扩张), 男性和女性自身免疫性不育, 强直性脊柱炎, 混合结缔组织病, 南美洲锥虫病, 风湿热, 反复流产, 农民肺, 多形性红斑, 心脏切开后综合征, Cushing 综合症, 鸟类爱好者 (bird-fancier's) 肺, 阿尔波特氏综合征、肺泡炎如过敏性肺泡炎和纤维性肺泡炎, 间质性肺病, 输血反应, 麻风病, 疟疾, 利什曼病, kypanosomiasis, 血吸虫病, 蛔虫病, 曲菌病, Sampter 氏综合症, Caplan 综合症, 登革热, 心内膜炎, 心内膜心肌纤维化, 内眼炎, erythema elevatum et diutinum, 胎儿成红细胞增多症 (erythroblastosis fetalis), 嗜酸性粒细胞筋膜炎 (eosinophilic fasciitis), Shulman 综合症, Felty 综合症, flariasis, 睫状体炎比如慢性睫状体炎, 异时性睫状体炎, 或 Fuch 睫状体炎, Henoch-Schonlein 紫癜, 人免疫缺陷病毒 (HIV) 感染, 埃可病毒感染, 心肌病, 阿尔茨海默氏病, 细小病毒感染, 风疹病毒感染, 免疫接种后综合症, 先天性风疹感染, Epstein-Barr 病毒感染, 腮腺炎, Evan 氏综合症, 自身免疫性腺功能不良, Sydenham 舞蹈病, 链球菌感染后肾炎, 闭塞性血栓性脉管炎, 甲状腺毒症 (thyrotoxicosis), 脊髓痨 (tabes dorsalis), 和巨细胞多肌痛。

[0218] 本文的“肿瘤坏死因子受体超家族”或“TNF 受体超家族”指被 TNF 家族的细胞因子结合的受体多肽。一般, 这些受体是在其细胞外结构域中具有一个或多个半胱氨酸富集重复序列的 I 型跨膜受体。TNF 受体超家族可以进一步细分成 (1) 死亡受体; (2) 诱饵 (decoy) 受体; 和 (3) 缺失死亡结构域的信号受体。“死亡受体”在其细胞质或细胞内区中包含“死亡结构域”, 即作用来在细胞中转导能够导致凋亡或某些基因的诱导的信号的区域或序列。“诱饵受体”缺失功能性死亡结构域并且不能转导导致凋亡的信号。TNF 基因家族中的细胞因子的实例包括肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 肿瘤坏死因子- β (TNF-beta 或淋巴毒素), CD30 配体, CD27 配体, CD40 配体, OX-40 配体, 4-1BB 配体, Apo-1 配体 (也称作 Fas 配体或 CD95 配体), Apo-2 配体 (也称作 TRAIL), Apo-3 配体 (也称作 TWEAK), 护骨蛋白 (osteoprotegerin) (OPG), APRIL, RANK 配体 (也称作 TRANCE), 和 TALL-1 (也称作 BlyS, BAFF 或 THANK)。TNF 受体超家族中的受体的实例包括: 1 型肿瘤坏死因子受体 (TNFR1), 2 型肿瘤坏死因子受体 (TNFR2), p75 神经生长因子受体 (NGFR), B 细胞表面抗原 CD40, T 细胞

抗原 OX-40, Apo-1 受体 (也称作 Fas 或 CD95), Apo-3 受体 (也称作 DR3, sw1-1, TRAMP 和 LARD), 称作“跨膜激活剂和 CAML- 互作剂”或“TACI”的受体, BCMA 蛋白质, DR4, DR5 (或者称作 Apo-2 ; TRAIL-R2, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 或 KILLER), DR6, DcR1 (也称作 TRID, LIT 或 TRAIL-R3), DcR2 (也称作 TRAIL-R4 或 TRUND), OPG, DcR3 (也称作 TR6 或 M68), CAR1, HVEM (也称作 ATAR 或 TR2), GITR, ZTNFR-5, NTR-1, TNFL1, CD30, 淋巴毒素 β 受体 (LTBr), 4-1BB 受体和 TR9 (EP988, 371A1)。

[0219] 术语“Apo-2 配体”, “Apo-2L”, “Apo2L”, Apo-2 配体 /TRAIL”和“TRAIL”在本文中可以互换使用, 指包括图 24 (SEQ ID No. 46) 中所示氨基酸序列的氨基酸残基 114-281 的多肽序列, 包括 95-281, 包括残基 92-281, 包括残基 91-281, 包括残基 41-281, 包括残基 39-281, 包括残基 15-281, 或包括残基 1-281, 以及以上序列的生物学活性片段, 删除, 插入, 和 / 或取代变体。在一个实施方案中, 所述多肽序列包含图 24 (SEQ ID No. 46) 的残基 114-281。任选地, 所述多肽序列包含图 24 (SEQ ID No. 46) 的残基 92-281 或残基 91-281。Apo-2L 多肽可以由图 24 (SEQ ID No. 45) 中所示的天然核苷酸序列编码。任选地, 编码残基 Pro119 (图 24 ; SEQ ID No. 45) 的密码子可以是“CCT”或“CCG”。任选地, 所述片段或变体是具有生物学活性的并且具有与任一种以上序列至少大约 80% 氨基酸序列同一性, 或至少大约 90% 序列同一性, 或至少 95%, 96%, 97%, 98%, 或 99% 序列同一性。该定义包括 Apo-2 配体的取代变体, 其中它的天然氨基酸中的至少一个被其它氨基酸如丙氨酸残基所取代。该定义还包括分离自 Apo-2 配体来源或通过重组和 / 或合成方法制备的天然序列 Apo-2 配体。本发明的 Apo-2 配体包括在 1997-01-16 公布的 W097/01633, 1997-07-17 公布的 W097/25428, 公布的 July 22, 1999-07-22 公布的 W0 99/36535, 2001-01-04 公布的 W0 01/00832, 2002-02-07 公布的 W0 02/09755, 2000-12-14 公布的 W0 00/75191, 和 2000-02-29 发布的美国专利号 6, 030, 945 中公开的称作 Apo-2 配体或 TRAIL 的多肽。该术语一般用来指包括多肽的单体, 二聚体, 三聚体, 六聚体或高度寡聚体形式。除非另外特别声明, 所用提及 Apo-2L 序列的氨基酸残基的编号都使用根据图 24 (SEQ ID No. 46) 的编号。

[0220] “Apo-2 配体受体”包括本领域称作“DR4”和“DR5”的受体。Pan 等人描述了称作“DR4”的 TNF 受体家族成员 (Pan 等人, Science, 276 :111-113 (1997) ; 还参见 1998-07-30 公开的 W098/32856 ; 1999-07-29 公开的 W0 99/37684 ; 2000-12-07 公开的 W0 00/73349 ; 2002-08-13 发布的 US 6, 433, 147 ; 2002-10-08 发布的 US 6, 461, 823, 和 2002-01-29 发布的 US 6, 342, 383)。Sheridan 等人, Science, 277 :818-821 (1997) 和 Pan 等人, Science, 277 :815-818 (1997) 描述了 Apo2L/TRAIL 的另一种受体 (还参见, 1998-11-19 公开的 W098/51793 ; 1998-09-24 公开的 W098/41629)。这种受体称作 DR5 (或者该受体还被称作 Apo-2 ; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 或 KILLER ; Screation 等人, Curr. Biol., 7 :693-696 (1997) ; Walczak 等人, EMBO J., 16 :5386-5387 (1997) ; Wu 等人, Nature Genetics, 17 :141-143 (1997) ; 1998-08-20 公开的 W098/35986 ; 1998-10-14 公开的 EP870, 827 ; 1998-10-22 公开的 W098/46643 ; 1999-01-21 公开的 W099/02653 ; 1999-02-25 公开的 W099/09165 ; 1999-03-11 公开的 W099/11791 ; 2002-08-13 公开的 US 2002/0072091 ; 2001-12-07 公开的 US 2002/0098550 ; 2001-12-06 发布的 US 6, 313, 269 ; 2001-08-02 公开的 US 2001/0010924 ; 2003-07-03 公开的 US 2003/01255540 ; 2002-10-31 公开的 US 2002/0160446, 2002-04-25 公开的 US 2002/0048785 ; 2003-05-27 发布的 US

6, 569, 642, 2000-06-06 发布的 US 6, 072, 047, 2003-11-04 发布的 US6, 642, 358)。如上所述, Apo-2L 的其它受体包括 DcR1, DcR2, 和 OPG。当在本文中使用术语“Apo-2L 受体”包括天然序列受体和受体变体。这些术语包括在许多哺乳动物, 包括人中表达的 Apo-2L 受体。Apo-2L 受体可以如在许多人组织种系中天然发生的那样进行内源表达, 或者可以通过重组或合成方法进行表达。“天然序列 Apo-2L 受体”包含具有与衍生自天然的 Apo-2L 受体相同的氨基酸序列的多肽。因而, 天然序列 Apo-2L 受体可以具有来自任何哺乳动物, 包括人的天然发生的 Apo-2L 受体的氨基酸序列。这种天然序列 Apo-2L 受体可以分离自天然或者能够通过重组或合成方法产生。术语“天然序列 Apo-2L 受体”具体包括天然发生的截短或分泌形式的受体(例如, 包含, 例如, 细胞外结构域序列可溶形式), 天然发生的变体形式(例如, 其它剪切形式)和天然发生的等位基因变体。受体变体可以包括天然序列 Apo-2L 受体的片段或删除突变体。图 25A-C 显示 1998-11-19 在 W098/51793 中公开的人 DR5 受体的 411 氨基酸序列, 及其核苷酸序列 (SEQ IDNos. 47 和 48)。人 DR5 受体的转录剪切变体是本领域已知的。这种剪切变体编码图 26A-C 中所示的人 DR5 受体的 440 氨基酸序列, 及其核苷酸序列 (SEQ ID Nos. 49 and 50), 如 1998-08-20 在 W0 98/35986 中所公开的。

[0221] 本文中所用的“死亡受体抗体”一般指针对肿瘤坏死因子受体超家族中的受体, 并且包含能够产生凋亡信号的死亡结构域的抗体, 这类抗体包括 DR5 抗体和 DR4 抗体。

[0222] 以宽泛的意义使用“DR5 受体抗体”, “DR5 抗体”, 或“抗 DR5 抗体”来意指结合至少一种形式的 DR5 受体或其细胞外结构域的抗体。任选地 DR5 抗体融合或连接到异源序列或分子上。优选地所述异源序列允许或有助于抗体形成较高级或寡聚复合物。任选地, DR5 抗体结合 DR5 受体但不结合或与任何其它 Apo-2L 受体(例如 DR4, DcR1, 或 DcR2) 交叉反应。任选地抗体是 DR5 信号活性的激动剂。

[0223] 任选地, 如在 BIAcore 结合测定中所测量的, 本发明的 DR5 抗体在大约 0.1nM 到大约 20mM 的浓度范围上结合 DR5 受体。任选地, 如在 BIAcore 结合测定中所测量的, 本发明的 DR5 抗体显示大约 0.6nM 到大约 18mM 的 IC₅₀ 值。

[0224] 仅仅对于本文的目的而言, 术语“Apomab”指结合 DR5 并且包含 SEQ IDNos. 55 和 56 的可变重和可变轻氨基酸序列的激动剂抗体。优选地 Apomab 分别包含 SEQ ID Nos. 51 和 52 的重和轻链。

[0225] II. 抗体的生产

[0226] 可以根据本发明配制的抗体的生产技术如下。

[0227] (i) 抗原筛选和制备

[0228] 优选地, 抗体结合的抗原是生物学上重要的糖蛋白并且将抗体施用给患疾病或病症的哺乳动物可以带来哺乳动物的治疗益处。不过, 也考虑了针对非多肽抗原(如肿瘤相关糖脂抗原, 见美国专利 5, 091, 178) 的抗体。

[0229] 在抗原是多肽时, 其可以是跨膜分子(例如受体)或配体例如生长因子等。抗原的实例包括如肾素等分子; 生长激素, 包括人生长激素和牛生长激素; 生长激素释放因子; 甲状旁腺激素; 甲状腺刺激激素; 脂蛋白; α -1-抗胰蛋白酶; 胰岛素 A-链; 胰岛素-B链; 前胰岛素; 卵泡刺激激素; 降钙素; 黄体激素; 胰高血糖素; 因子 VIIIc、因子 IX、组织因子 (TF) 和 vonWillebrands 因子等凝血因子; 蛋白 C 等抗凝血因子; 心房利钠因子; 肺表面活性物质; 纤溶酶原激活剂, 例如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA); 蛙皮素; 凝

血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子 α 和 β ;脑啡肽酶;RANTES(调节对 T 细胞表达和分泌的正常激活);人巨噬细胞炎症蛋白(MIP-1- α);血清白蛋白,例如人血清白蛋白;苗勒管(Muellerian)抑制物质;松弛素 A 链;松弛素 B 链;前松弛素;小鼠绒毛膜促性腺激素相关肽;微生物蛋白,例如 β 内酰胺酶;DNase;IgE;细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原(CTLA),例如 CTLA-4;抑制素(inhibin);激活素(activin);血管内皮生长因子(VEGF);激素或生长因子的受体;蛋白 A 或 D;类风湿因子;神经营养因子,例如骨衍生神经营养因子(BDNF),神经营养素-3、-4、-5 或 6(NT-3、NT-4、NT-5 或 NT-6)或神经生长因子,例如 NGF- β ;血小板衍生的生长因子(PDGF);纤维母细胞生长因子,例如 aFGF 和 bFGF;表皮生长因子(EGF);转化型生长因子(TGF),例如 TGF- α 和 TGF- β ,包括 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4 或 TGF- β 5;胰岛素样生长因子 I 和 II(IGF-I 和 IGF-II);des(1-3)-IGF-I(脑 IGF-I),胰岛素样生长因子结合蛋白;CD 蛋白,例如 CD3、CD4、CD8、CD19 和 CD20;促红细胞生成素;骨诱导因子(osteoinductivefactor);免疫毒素;骨形态发生(morphogenetic)蛋白(BMP);干扰素,例如干扰素- α 、- β 和 γ ;集落刺激因子(CSF),例如 M-CSF、GM-CSF 和 G-CSF;白细胞介素(IL),例如 IL-1 到 IL-10;超氧化物歧化酶;T 细胞受体;表面膜蛋白;衰变(decay)加速因子;病毒抗原,例如 AIDS 包膜的一部分;转运蛋白;归巢受体;粘着素;调节蛋白;整合素,例如 CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4 和 VCAM;肿瘤相关抗原,例如 HER2、HER3 或 HER4 受体;以及上述任何多肽的片段。

[0230] 本发明所包含的抗体的例示性分子靶标包括 CD 蛋白质如 CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34 和 CD40;ErbB 受体家族的成员如 EGF 受体, HER2, HER3 或 HER4 受体;B 细胞表面抗原,如 CD20 或 BR3;肿瘤坏死受体超家族的成员,包括 DR5;前列腺干细胞抗原(PSCA);细胞粘附分子如 LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, α 4/ β 7 整合素,和 α v/ β 3 整合素包括其 α 或 β 亚基(例如抗 CD11a, 抗 CD18 或抗 CD11b 抗体);生长因子如 VEGF 及其受体;组织因子(TF);肿瘤坏死因子(TNF)如 TNF- α 或 TNF- β , α 干扰素(α -IFN);白介素,如 IL-8;IgE;血液组抗原;flk2/flt3 受体;肥胖症(OB)受体;mp1 受体;CTLA-4;蛋白质 C 等等。

[0231] 可以将可溶性抗原或其片段,任选地偶联到其它分子上,用作产生抗体的免疫原。对于跨膜分子,如受体,可以将这些的片段(例如受体的细胞外结构域)用作免疫原。或者,可以将表达跨膜分子的细胞用作免疫原。这类细胞可以来自天然来源(例如癌细胞系)或者可以通过重组技术进行转化来表达跨膜分子的细胞。可以用于制备抗体的其它抗原及其各种形式对于本领域技术人员来说将是显而易见的。

[0232] 为产生 HER2 抗体,用于其生产的 HER2 抗原可以是,例如,HER2 或其部分的细胞外结构域的可溶形式,其包含所需的表位。或者,可以使用在其细胞表面表达 HER2 的细胞(例如过表达 HER2 的经转化的 NIH-3T3 细胞;或癌细胞系如 SK-BR-3 细胞,参见 Stancovski 等人 PNAS(USA) 88:8691-8695(1991)) 来生成抗体。

[0233] (ii) 单克隆抗体

[0234] 单克隆抗体获自一群基本上同质的抗体,即,包含该群的单个抗体是相同的和/或结合相同的表位,除了可以在单克隆抗体生产期间生成的可能的变体。因而,修饰语“单克隆”表明抗体并非不同抗体组合物的特性。

[0235] 例如,可以利用 Kohler,自然 256:495(1975)首次描述的杂交瘤方法或者可以通

过重组 DNA 方法（美国专利号 4816567）制备单克隆抗体。

[0236] 在杂交瘤方法中，按上述方法免疫小鼠或其它适当的宿主动物，例如仓鼠，来诱导出产生或能够产生抗体的淋巴细胞，所述抗体可与免疫中应用的蛋白特异性结合。或者，可以将淋巴细胞在体外进行免疫，然后，用聚乙二醇等适当的融合剂将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合，形成杂交瘤细胞（Goding, 单克隆抗体：原理与应用，pp. 59-103 (Academic Press, 1986)）。

[0237] 在适当的培养基中接种并培养如此制备的杂交瘤细胞，所述培养基优选包括一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如，如果亲本骨髓瘤细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶（HGPRT 或 HPRT），那么用于杂交瘤的所述培养基通常包括次黄嘌呤、氨基喋呤和胸腺嘧啶核苷（HAT 培养基），这些物质可防止 HGPRT 缺陷型细胞的生长。

[0238] 优选的骨髓瘤细胞是那些可有效融合、支持所选抗体产生细胞稳定产生高水平抗体、并且对 HAT 等培养基敏感的骨髓瘤细胞。其中，优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤细胞系，例如来源于 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的细胞系（得自 Salk Institute Cell Distribution Center, 圣迭戈, 加利福尼亚, 美国）和 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞（美国典型培养物保藏中心, Rockville, 马里兰, 美国）。还有报道将人杂交瘤细胞和小鼠-人异质性杂交瘤细胞系用于制备人单克隆抗体（Kozbor, 免疫学杂志, 133 :3001 (1984) ; Brodeur 等, 单克隆抗体制备技术和应用, 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1987)）。

[0239] 测定杂交瘤细胞生长培养基中针对所述抗原的单克隆抗体的产生。优选地，通过免疫沉淀或体外结合试验，例如放射免疫分析（RIA）或酶联免疫吸附试验（ELISA），测定由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。

[0240] 单克隆抗体的结合亲和性可以，例如，通过 Munson 等人, Anal. Biochem., 107 : 220 (1980) 的 Scatchard 分析进行测定。

[0241] 在产生具有所需的特异性、亲和力和 / 或活性之抗体的杂交瘤细胞被鉴定之后，可以通过有限稀释方法将所述克隆进行亚克隆，并通过标准方法进行培养（Goding, 单克隆抗体：原理和应用，pp. 59-103, Academic Press, 1986)）。用于此目的的适当培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。另外，杂交瘤细胞可以在动物体内生长形成腹水瘤。

[0242] 通过常规免疫球蛋白纯化方法，例如蛋白 A-Sepharose, 羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析，将亚克隆分泌的单克隆抗体从培养基、腹水或血清中适当分离。

[0243] 用传统的方法可容易地分离编码单克隆抗体的 DNA 并测定其序列（例如，利用能够与编码单克隆抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针）。所述杂交瘤细胞可作为此类 DNA 的优选来源。所述 DNA 一经分离，将其连接入表达载体，然后将载体转化入宿主细胞，例如大肠杆菌细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢（CHO）细胞或不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞，在重组宿主细胞中合成单克隆抗体。有关在细菌中重组表达编码抗体的 DNA 的综述性论文包括 Skerra 等人, Curr. Opinion in Immunol., 5 :256-262 (1993) 和 Plückthun, Immunol. Revs., 130 :151-188 (1992)。

[0244] 在另一个实施方案中，单克隆抗体或抗体片段可以从抗体噬菌体文库中分离，所述抗体噬菌体文库用在 McCafferty 等, 自然 348 :552-554 中所述技术制备。Clackson 等, 自然 352 :624-628 (1991) 和 Marks 等, 生物化学杂志 222 :581-597 (1991) 分别叙述了利

用噬菌体文库对鼠和人的抗体的分离。随后的文献叙述了高亲和力 (nM 范围) 人抗体的产生, 其通过链改组 (chainshuffling) (Marks 等, 生物 / 技术, 10 : 779-783 (1992)) 以及组合感染和体内重组作为构建很大的噬菌体文库的策略 (Waterhouse 等, 核酸研究, 21 : 2265-2266 (1993))。因此, 对于单克隆抗体的分离, 这些技术是传统的单克隆抗体杂交瘤技术的可替代方法。

[0245] 也可以对 DNA 进行修饰, 例如, 用编码人重链和轻链恒定区的序列取代其鼠同源序列 (美国专利号 4816567 ;Morrison 等, 美国国家科学院院刊 81 : 6851 (1984)), 或通过将非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列共价连接至免疫球蛋白的编码序列。

[0246] 通常这类免疫球蛋白多肽取代抗体恒定区, 或取代抗体的一个抗原结合位点的可变区已产生嵌合型二价抗体, 其包括一个特异性针对一种抗原的抗原结合位点, 和具有针对不同抗原的特异性的另一个抗原结合位点。

[0247] (iii) 人源化抗体

[0248] 本领域已经描述了人源化非人抗体的方法。优选地, 人源化抗体具有一个或多个被引入的非人类来源的氨基酸残基。这些非人类氨基酸残基通常是“引入”的残基, 其典型地来源于“引入”可变区。根据 Winter 和其同事的方法 (Jones 等, 自然, 321 : 522-525 (1986) ;Riechmann 等, 自然 332 : 323-327 (1988) ;Verhoeyen 等, 科学 239 : 1534-1536 (1988)), 通过用人抗体的相应序列取代鼠类 CDR 或 CDR 序列, 可以基本上进行人源化。因此, 这类“人源化”抗体是嵌合抗体 (美国专利号 4816567), 其中基本上少于完整的人可变区的序列被来源于非人类物种的相应序列代替。实际上, 人源化抗体一般是人抗体, 其中一些 CDR 残基和一些 FR 残基被噬齿类抗体中类似位点的残基代替。

[0249] 在制备人源化抗体中应用的人重链和轻链可变区的选择对于降低抗原性非常重要。根据所谓的“最适”方法, 可在已知人可变区序列的完整文库中筛选噬齿类抗体的可变区序列。然后, 将与噬齿类序列最相近的人的序列作为人源化抗体的框架 (FR) (Sims 等, 免疫学杂志 . 151 : 2296 (1993) ;Chothia 等, 分子生物学杂志 . 196 : 901 (1987))。另一种方法应用来源于特定亚组轻链或重链之所有人类抗体共同序列的特定框架。相同的框架可以用于若干不同的人源化抗体 (Carter 等, 美国国家科学院院刊 89 : 4285 (1992) ;Presta 等, 免疫学杂志 . , 151 : 2623 (1993))。

[0250] 更为重要的是抗体被人源化且保留对抗原的高亲和力和其它良好的生物学活性。为了达到此目的, 根据优选的方法, 利用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念上的人源化产物, 通过此方法制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型为公众可获得且为本领域技术人员所熟知。已有能说明并显示所选候选免疫球蛋白序列可能的三维构象结构的计算机程序。观察这些显示结果可以分析所述残基在候选免疫球蛋白序列的功能中可能的作用, 即分析能影响候选免疫球蛋白与抗原结合能力的残基。这样, 可以从受体筛选 FR 残基, 并将其与重要的序列组合, 以得到所需抗体特性, 例如对靶抗原的亲和力增强。通常, CDR 残基直接并且主要涉及对抗原结合的影响。

[0251] WO 01/00245 描述了结合 HER2 并且阻抑 HER 受体的配体激活的例示性人源化 HER2 抗体的生产。本文的特定目标人源化抗体基本上与鼠单克隆抗体 2C4 (或其 Fab 片段) 同样有效地阻抑 EGF, TGF- α 和 / 或 HRG 介导的 MAPK 的激活, 和 / 或与鼠单克隆抗体 2C4 (或其 Fab 片段) 同样有效地结合 HER2。本文的人源化抗体可以, 例如, 包含并入人可变重结构

域的非人高度可变区残基,并且可以进一步包含选自 69H,71H 和 73H 位置上的框架区 (FR) 取代,上述操作利用在 Kabat 等人,Sequence of Protein of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991) 中给出的可变结构域编号系统。在一个实施方案中,人源化抗体包含在位置 69H,71H 和 73H 位置中的两个或全部位置上的 FR 取代。

[0252] 本文的例示性的目标人源化抗体包含可变重结构域互补决定残基 GFTFTDYTMX,其中 X 优选为 D 或 S (SEQ ID No. 7); DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEQ ID No. 8); 和 / 或 NLGPSFYFDY (SEQ ID No. 9),任选地包含那些 CDR 残基的氨基酸修饰,例如其中所述修饰基本上保留或提高抗体的亲和性。例如,目标抗体变体可以在以上可变重 CDR 序列中具有从大约一个到大约七个或大约五个氨基酸取代。这类抗体变体可以通过,例如,如下所述的亲和性成熟来制备。最优选的人源化抗体包含 SEQ ID No. 4 中的可变重结构域氨基酸序列。

[0253] 除了前段中的那些可变重结构域 CDR 残基之外,人源化抗体可以包含例如可变轻结构域互补决定残基 KASQDVSIGVA (SEQ ID No. 10); SASYXXX,其中位置 5 上的 X 优选是 R 或 L,其中位置 6 上的 X 优选是 Y 或 E,而位置 7 上的 X 优选是 T 或 S (SEQ ID No. 11); 和 / 或 QQYYIYPYT (SEQ ID No. 12)。这类人源化抗体任选地包含以上 CDR 残基的氨基酸修饰,例如其中所述修饰基本上保持或增强抗体的亲和性。例如,目标抗体变体可以在以上可变轻 CDR 序列中具有从大约一个到大约七个或大约五个氨基酸取代。这类抗体变体可以通过,例如,如下所述的亲和性成熟来制备。最优选的人源化抗体包含 SEQ ID No. 3 中的可变轻结构域氨基酸序列。

[0254] 本申请还涉及结合 HER2 并阻抑 HER 受体的配体激活的亲和性成熟抗体。亲本抗体可以是人抗体或人源化抗体,例如,分别包含 SEQ ID Nos. 3 和 4 的可变轻和 / 或重序列的抗体 (即变体 574)。亲和性成熟抗体优选地以优于鼠 2C4 或变体 574 (例如从大约两倍或大约四个倍,到大约 100 倍或大约 1000 倍增强亲和性,例如,如利用 HER2-细胞外结构域 (ECD) ELISA 所评估的) 的亲和性结合 HER2 受体。例示性的进行取代的可变重 CDR 残基包括 H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99, 或两个或多个的组合 (例如这些残基的两个,三个,四个,五个,六个,或七个)。进行改变的可变轻 CDR 残基的实例包括 L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 或两个或多个 (例如这些残基的两个,三个,四个,五个,高达大约十个) 的组合。

[0255] 要求保护各种形式的人源化抗体或亲和性成熟抗体。例如,人源化抗体或亲和性成熟抗体可以是抗体片段,如 Fab,其任选地与一种或多种细胞毒性剂偶联,以便生成免疫偶联物。或者,人源化抗体或亲和性成熟抗体可以是全长抗体,如全长 IgG1 抗体。

[0256] (iv) 人抗体

[0257] 除了进行人源化以外还可制备人类抗体。例如现在已能产生如下转基因动物 (如小鼠),它们通过免疫能产生人类抗体的所有成分而不产生内源免疫球蛋白。例如,有报道称,嵌合及种系 (germ-line) 突变小鼠中抗体重链连接区 (J_H) 基因的纯合缺失导致内源抗体的产生被完全抑制。将人类种系免疫球蛋白基因阵列转移到这类种系突变小鼠中将导致因抗原攻击而产生人类抗体。见,例如, Jakobovits 等,美国国家科学院学报,90:2551(1993); Jakobovits 等,自然,362:255-258(1993); Bruggermann 等,Year in Immuno. 7:33(1993); 和美国专利号 5591669,5589369 和 5545807。

[0258] 或者,可用噬菌体展示技术 (McCafferty 等,自然 348 :552-553(1990)) 从未免疫供者的免疫球蛋白可变 (V) 区基因的所有组成而体外产生人类抗体和抗体片段。依据此技术,将抗体 V 区基因克隆在与丝状噬菌体 (如 M13 或 fd) 主要或次要衣壳蛋白基因相同的框架内,并在噬菌体颗粒的表面展示为功能性抗体片段。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝,根据抗体的功能特点进行的选择也导致对显示这些性质的抗体的编码基因进行选择。因此,噬菌体模仿了 B 细胞的部分特点。噬菌体展示可以以多种形式进行;其综述见,例如,Johnson, Kevin S. 和 Chiswell, David J., 结构生物学的最新观点 (Current Opinion in Structural Biology) 3 :564-571(1993)。可使用若干来源的 V 基因片段进行噬菌体展示。Clackson 等,自然,352 :624-628(1991) 从免疫小鼠脾脏来源的 V 基因的随机组合小文库中分离了抗 - 恶唑酮抗体的一个多样性阵列。可基本如 Marks 等,分子生物学杂志 222 :581-597(1991),或 Griffith 等,EMBO J. 12 :725-734(1993) 所述构建未经免疫的人类供者 V 基因的所有组成,并分离针对抗原多样性阵列 (包括自身抗原) 的抗体。亦参见美国专利号 5565332 和 5573905。

[0259] 如上所述,人类抗体也可通过体外活化的 B 细胞而产生 (见美国专利 5,567,610 和 5,229,275)。

[0260] 人类抗 HER2 抗体在 1998 年 6 月 30 日公布的美国专利 5772997 和 1997 年 1 月 3 日公开的 W097/00271 中叙述。

[0261] (v) 抗体片段

[0262] 已开发了生成抗体片段的多种技术。传统上,这些片段通过对完整抗体的蛋白水解性消化获得 (见 Morimoto 等,生物化学和生物物理学方法杂志 (Journal of Biochemical and Biophysical Methods) 24 :107-117(1992)) 和 Brennan 等,科学,229 :81(1985))。但现在可直接通过重组宿主细胞产生这些片段。例如,可从上述抗体噬菌体库分离抗体片段。或者,可从大肠杆菌直接回收 Fab'-SH 片段,并经化学连接形成 F(ab')₂ 片段 (Carter 等,生物/技术 10 :163-167(1992))。依据另一种方法,可直接从重组宿主细胞培养中分离 F(ab')₂ 片段。其它产生抗体片段的技术对本领域技术人员是显而易见的。在其它实施方案中,所选抗体是单链 Fv 片段 (scFv)。见 W093/16185;美国专利 5,571,894;和美国专利 5,587,458。抗体片段也可以是“线性化抗体”,如美国专利 5,641,870 所述。这类线性化抗体片段可以是单特异性或双特异性的。

[0263] (vi) 双特异性抗体

[0264] 双特异性抗体是具有针对至少两种不同表位的结合特异性的抗体。例示性的双特异性抗体可以与 HER2 蛋白的两种不同表位结合。其它这种抗体可将 HER2 结合位点与针对 EGFR、HER3 和 / 或 HER4 的结合位点组合。或者,可将抗 HER2 臂与结合白细胞上引发分子的臂结合,从而集中针对 HER2 表达细胞的细胞防御机制,所述引发分子如 T 细胞受体分子 (例如 CD2 或 CD3),或 IgG Fc 受体 (Fc γ R) 如 Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32) 和 Fc γ RIII (CD16)。双特异性抗体还可用于将细胞毒制剂定位至表达 HER2 的细胞。这些抗体具有 HER2 结合臂和结合细胞毒制剂 (例如皂草素,抗 INF-α, 长春花生物碱,蓖麻毒蛋白 A 链,氨甲蝶呤或放射性同位素半抗原) 的臂。双特异性抗体可制备成全长抗体或抗体片段 (如 F(ab')₂ 双特异性抗体)。

[0265] WO 96/16673 描述了双特异性 HER2/Fc γ RIII 抗体,而在美国专利 5837234 中公

开了双特异性 ErbB2/Fc γ RI 抗体 IDM1 (Osidem)。双特异性 HER2/Fc α 抗体见 W098/02463。美国专利 5821337 中教导了双特异性 HER2/CD3 抗体。MDX-210 是双特异性 HER2-Fc γ RIII Ab。

[0266] 制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。完整双特异性抗体的传统制备方法是基于两种免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中这两条链具有不同特异性 (Millstein 等,自然,305:537-539 (1983))。由于免疫球蛋白重链轻链随机分配,这些杂交瘤 (细胞杂交瘤 (quadroma)) 可能产生 10 种不同抗体分子的混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。对所述正确分子的纯化 (通常通过亲和层析步骤来进行) 非常复杂,且产量很低。类似的方法见 W093/08829 和 Traunecker 等,EMBO J,10:3655-3659 (1991)。

[0267] 依据不同的方法,将具有所需结合特异性 (抗体-抗原结合位点) 的抗体可变区与免疫球蛋白恒定区序列融合。该融合优选与包含铰链区的至少一部分、CH2 及 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定区融合。优选使含有轻链结合所需位点的第一重链恒定区 (CH1) 出现在至少在一种融合中。可将编码免疫球蛋白重链融合体,以及必要时,编码免疫球蛋白轻链的 DNA 插入不同表达载体,共转染至适当宿主生物。这使得在使用非等比的三种多肽链进行构建的实施方案中,能较灵活地调整三种多肽片段的相互比例,以获得最佳产量。但也可在至少两种多肽链以等比例表达而获得高产时或所述比例无特别意义时,将两种或所有三种多肽链的编码序列插入一个表达载体中。

[0268] 在该方法的优选实施方案中,所述双特异性抗体由一条臂上的带有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和另一条臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对 (提供第二结合特异性) 构成。已发现这种不对称结构有利于从非必要免疫球蛋白链的混合中分离出所需双特异性化合物,因为只有该双特异性分子的一半上存在免疫球蛋白轻链,这使得分离更加容易。此方法公开于 W094/04690 中。制备双特异性抗体的进一步细节,见 Suresh 等,酶学方法,121:210 (1986)。

[0269] 根据美国专利 5,731,168 所述的另一种方法,可改造一对抗体分子之间的界面,使得从重组细胞培养中获得的异源二聚体的百分比最大。优选的界面包括抗体恒定区 CH3 结构域的至少一部分。在该方法中,源于第一抗体分子界面上的一条或多条氨基酸小侧链被较大侧链 (如酪氨酸或色氨酸) 取代。与所述大侧链大小相同或相近的互补“沟”可通过将氨基酸大侧链用小侧链 (如丙氨酸或苏氨酸) 取代而在第二抗体分子的界面上形成。这使得异二聚体的产量比不想要的终产物如同型二聚体的高。

[0270] 双特异性抗体包括交联抗体或“异源偶联的”抗体。例如,可使异源偶联物中的抗体之一与抗生物素蛋白偶联,使另一抗体与生物素偶联。有观点认为,这类抗体可用于将免疫细胞导向不想要的细胞 (美国专利号 4676980),也可用于治疗 HIV 感染 (W091/00360, W092/200373, EP03089)。异源偶联抗体可通过任何适当的交联方法制备。适当的交联制剂和多种交联技术为本领域已知,公开于美国专利号 4676980 中。

[0271] 从抗体片段制备双特异性抗体的技术也已有文献描述。例如,双特异性抗体可利用化学连接制备。Brennan 等,科学 229:81 (1985) 中描述了将完整抗体经蛋白水解制备 F(ab')₂ 片段的方法。这些片段在二巯基复合剂亚砷酸钠存在时被还原,从而稳定相邻的巯基,并阻止分子间二硫键的形成。生成的 Fab' 片段被转化为硫硝基苯甲酸盐 (TNB) 衍生物。其中一种 Fab'-TNB 衍生物经巯基乙胺还原成 Fab'-硫醇,再与等分子量的其它

Fab'-TNB 衍生物混合形成双特异性抗体。如此产生的双特异性抗体可作为酶的选择性固相化中所用的试剂。

[0272] 近期的进展促进了 Fab'-SH 片段从大肠杆菌的直接回收,该片段可经化学偶联形成双特异性抗体。Shalaby 等,实验医学杂志,175:217-225(1992) 描述了完全人源化双特异性抗体 F(ab')₂ 分子的产生。每一 Fab' 片段分别从大肠杆菌中分泌出来,体外直接化学偶联形成双特异性抗体。如此制备的双特异性抗体能与过度表达 HER2 受体的细胞和正常人 T 细胞结合,还能引发人类细胞毒淋巴细胞对人乳腺肿瘤细胞的裂解活性。直接从重组细胞培养中制备并分离双特异性抗体片段的多种技术也已有描述。例如,可用亮氨酸拉链制备双特异性抗体。Kostelny 等,免疫学杂志,148(5):1547-1553(1992)。将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽与两种不同抗体的 Fab' 部分通过基因融合而连接。使抗体的同型二聚体在铰链区被还原成单体,然后被再氧化形成抗体的异二聚体。该方法也可用于制备抗体同型二聚体。由 Hollinger 等,美国国家科学院学报,90:6444-6448(1993) 描述的“二价抗体”技术提供了另一种制备双特异性抗体片段的方法。所述片段中含有重链可变区 (V_H),其通过接头与轻链可变区 (V_L) 相连,该接头非常短,使得同一链的两个结构域之间无法配对。因此,同一片段上的 V_H 和 V_L 结构域被迫与另一片段上的互补 V_L 和 V_H 结构域配对,从而形成两个抗原结合位点。还报道了另一种用单链 Fv (sFv) 二聚体来制备双特异性抗体的策略。见 Gruber 等,免疫学杂志,152:5368(1994)。

[0273] 考虑二价以上的抗体。如可制备三特异性抗体。Tutt 等,免疫学杂志,147:60(1991)。

[0274] (vii) 其它氨基酸序列修饰

[0275] 考虑本文所述抗体的氨基酸序列修饰。例如,可能需要改进抗体的结合亲和力和/或其它生物学特点。抗体的氨基酸序列变体可通过在抗体核酸中引入适当的核苷酸变化或通过肽合成制备。这类修饰包括例如抗体的氨基酸序列内残基的缺失、和/或插入和/或取代。可进行缺失、插入和取代的任何组合以获得最终的构建体,只要最终的构建体具有所需的特性。所述氨基酸变化还可改变抗体的翻译后加工过程,例如改变糖基化位点的数目或位置。

[0276] 一种鉴别抗体中处于诱变优选位置的某些残基或区域的有用方法是 Cunningham 和 Wells,科学 244:1081-1085(1989) 所述的“丙氨酸扫描诱变”。这里,鉴定一个残基或一组靶残基(例如,带电的残基如精氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸和谷氨酸)并用中性或带负电的氨基酸取代(最优选丙氨酸或多聚丙氨酸)取代,以便影响氨基酸与抗原的相互作用。那些证实对取代具有功能敏感性的氨基酸位置通过在取代点引入进一步的或其他的变体而改进。因而,尽管引入氨基酸序列变异的位点是预先决定的,但突变本身的性质不必是预定的。例如,为分析在指定位点处突变的作用,在所述靶密码子或区域实行丙氨酸扫描或随机诱变,并筛选所表达的具有预期活性的抗体变体。

[0277] 氨基酸序列插入包括氨基-和/或羧基-端的融合(其长度从一个残基至包括100个或更多残基的多肽),以及序列内单个或多个氨基酸残基的插入。末端插入的例子包括带有 N-末端甲硫氨酰残基的抗体或与细胞毒性多肽融合的该抗体。抗体分子的其它插入变体包括使该抗体的 N-或 C-末端与能增加该抗体的血清半衰期的酶或多肽融合。

[0278] 另一类变体是氨基酸取代变体。这些变体使抗体分子中至少一个氨基酸残基被不

同残基取代。最有兴趣进行取代诱变的位点包括高变区,也可以考虑 FR 的改变。保守取代见表 1 的“优选取代”栏。如果这些取代引起生物学活性的改变,则可引入表 1 中“取代举例”栏的更实质性改变,或进一步在下文的氨基酸分类中所述的更实质性改变,并筛选产物。

[0279] 表 1

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

[0281] 通过选择取代来实现抗体生物学特性的基本修饰,所述取代在其维持 (a) 取代区多肽骨架结构,例如,如片层或螺旋状构象, (b) 在靶位点上分子的电荷或疏水性,或 (c) 侧

链大小的效应上明显不同。氨基酸可根据它们侧链性质的相似性分组（在 A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975) 中）：

[0282] (1) 非极性 :Ala(A), Val(V), Leu(L), Ile(I), Pro(P), Phe(F), Trp(W), Met(M)

[0283] (2) 不带电的极性 :Gly(G), Ser(S), Thr(T), Cys(C), Tyr(Y), Asn(N), Gln(Q)

[0284] (3) 酸性 :Asp(D), Glu(E)

[0285] (4) 碱性 :Lys(K), Arg(R), His(H)

[0286] 或者,天然存在的残基可根据共有的侧链特性分成几组：

[0287] (1) 疏水型 :正亮氨酸,met,ala,val,leu,ile；

[0288] (2) 中性亲水型 :cys,ser,thr；

[0289] (3) 酸性 :asp,glu；

[0290] (4) 碱性 :asn,gln,his,lys,arg；

[0291] (5) 影响链方向的残基 :gly,pro；和

[0292] (6) 芳香基 :trp,tyr,phe。

[0293] 非保守取代将限定上述某一类的成员被另一类取代。

[0294] 不参与维持抗体的正确构象的任何半胱氨酸残基也可被取代,通常被丝氨酸取代,以提高该分子的氧化稳定性,并阻止异常交联。相反,可在该抗体中添加半胱氨酸连接以提高其稳定性（特别当该抗体为抗体片段如 FV 片段时）。

[0295] 取代变体的特别优选类型包括取代亲本抗体高变区的一或多个残基。通常,所选用用于进一步开发的变体相对于其亲本抗体应具有改进的生物学活性。产生这种取代变体的一个方便方法是利用了噬菌体展示的亲和力成熟。简单地说,使高变区的几个位点（如 6-7 个位点）突变以便在每一位点产生所有可能的氨基酸取代。这样产生的抗体变体以单价形式展示在丝状噬菌体颗粒上,其为与每个颗粒内包装的 M13 基因 III 产物的融合体。然后筛选噬菌体展示的变体是否具有本文所述生物学活性（如结合亲和力）。为了鉴定备选的高变区修饰位点,可通过丙氨酸扫描诱变来鉴定对抗原结合作出主要贡献的高变区残基。此外,分析抗原-抗体复合物的晶体结构以确定抗原与抗体之间的接触点也较有利。这些接触残基及其邻近残基是根据本文所述技术进行取代的候选位点。一旦产生这样的变体,如本文所述对它们全部进行筛选,选出在一或多个相关实验中具有优势特性的抗体以便进一步开发。

[0296] 所述抗体的另一种类型的氨基酸变体改变了该抗体原来的糖基化模式。所谓改变就是去掉该抗体中的一或多个碳水化合物部分,和 / 或添加一或多个原本不存在于该抗体中的糖基化位点。

[0297] 抗体的糖基化通常为 N- 连接或 O- 连接。N- 连接指将碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链相连。三肽序列天冬酰胺-X- 丝氨酸和天冬酰胺-X- 苏氨酸（其中 X 是除脯氨酸以外的任何氨基酸）是使碳水化合物部分与天冬酰胺侧链酶促相连的识别序列。因此,多肽中存在上述任一种三肽序列都可产生潜在的糖基化位点。O- 连接糖基化指将 N- 乙酰半乳糖胺、半乳糖、或木糖附着于羟基氨基酸,主要是丝氨酸、苏氨酸,但也可用 5- 羟脯氨酸和 5- 羟赖氨酸。

[0298] 在抗体中添加糖基化位点可通过改变氨基酸序列,使其包含一或多个上述三肽序列而实现（在添加 N- 连接糖基化位点的情况下）。这种改变也可通过在原始抗体的序列中

添加或取代一或多个丝氨酸或苏氨酸残基来实现（在添加 O- 连接的情况下）。

[0299] 当所述抗体包含 Fc 区时，可以改变附于其上的糖。例如，具有成熟糖结构的抗体在美国专利申请号 US 2003/0157108A1, Presta, L. 中进行了描述，所述成熟糖结构缺少海藻糖附于抗体的 Fc 区上。还参见 US 2004/0093621A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。在附于抗体 Fc 区上的糖中具有对分 N- 乙酰基葡萄糖胺 (GlcNAc) 的抗体在 W003/011878, Jean-Mairet 等人和美国专利号 6,602,684, Umana 等人中提及。在附于抗体 Fc 区上的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体在 W097/30087, Patel 等人中报道。还参见, W098/58964 (Raju, S.) 和 W099/22764 (Raju, S.), 其涉及具有变化的糖附于其 Fc 区上的抗体。

[0300] 编码抗体的氨基酸序列变体的核酸分子由本领域已知的各种方法制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离（在天然氨基酸序列变体的情况下），或通过对抗 ErbB2 抗体之早期制备的变体或非变体形式进行寡核苷酸介导的（或定点）诱变，PCR 诱变和盒式诱变来制备。

[0301] (viii) 筛选具有所需特性的抗体

[0302] 以上已经描述了生成抗体的技术。可以根据需要进一步选择具有某种生物学特性的抗体。

[0303] 为了鉴定抑制 HER 受体的配体激活的抗体，可以测定该抗体阻抑 HER 配体结合表达 HER 受体的细胞的能力（例如结合另一种 HER 受体，该受体与目标 HER 受体一起形成 HER 异寡聚体）。例如，可以将天然表达，或经转染后表达 HER 异寡聚体的 HER 受体的细胞与抗体一起温并且随后暴露于经标记的 HER 配体。随后可以评估 HER2 抗体阻抑配体结合 HER 异寡聚体中的 HER 受体的能力。

[0304] 例如，基本上如 W001/00245 中所述可以利用 24 孔板中的冰上单层 MCF7 培养物进行 HER2 抗体对 HRG 结合 MCF7 乳腺癌细胞系的抑制。可以将 HER2 单克隆抗体加到每个孔中并温育 30 分钟。随后可以添加 ^{125}I - 标记的 rHRG β 1₁₇₇₋₂₂₄ (25pm)，可以将温育持续 4 到 16 个小时。可以制备剂量反应曲线并对目标抗体计算 IC₅₀ 值。在一个实施方案中，阻抑 HER 受体的配体激活的抗体在这种测定中将具有大约 50nM 或更少，更加优选 10nM 或更少的 IC₅₀，以抑制 HRG 结合 MCF7 细胞。其中所述抗体是抗体片段如 Fab 片段，在这种测定中抑制 HRG 结合 MCF7 细胞的 IC₅₀ 可以是，例如，大约 100nM 或更少，更加优选 50nM 或更少。

[0305] 或者，或此外，可以评估 HER2 抗体阻抑存在于 HER 异寡聚体中的 HER 受体的 HER 配体 - 刺激的酪氨酸磷酸化作用的能力。例如，可以将内源表达 HER 受体或经转染后表达它们的细胞与抗体一起温育并且随后利用抗磷酸酪氨酸单克隆（其任选地缀合以可检测的标记）测定 HER 配体 - 依赖型酪氨酸磷酸化作用活性。还可利用美国专利号 5,766,863 中所述的激酶受体激活测定法来确定 HER 受体激活以及抗体对该活性的阻抑。

[0306] 在一个实施方案中，可以基本上如 W001/00245 中所述来筛选抗体，所述抗体抑制 MCF7 细胞中的 p180 酪氨酸磷酸化作用的 HRG 刺激。例如，可以将 MCF7 细胞接种在 24- 孔板中并且可以将针对 HER2 的单克隆抗体添加到每孔中并于室温温育 30 分钟；随后可以将 rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ 加入到每管中至终浓度 0.2nM，可以将温育持续 8 分钟。从每孔中吸出培养基，可以通过添加 100 μ l 的 SDS 样品缓冲液（5% SDS, 25mM DTT, 和 25mM Tris-HCl, pH6.8）来终止反应。可以将每个样品（25 μ l）在 4-12% 梯度凝胶 (Novex) 上进行电泳并且随后电泳

转移到聚偏二氟乙烯膜上。可以将抗磷酸酪氨酸（以 $1 \mu\text{g/ml}$ ）免疫印迹显影，并可以通过反射密度计量来量化 $M_r \sim 180,000$ 上的优势反应条带的强度。选择的抗体在这种测定中将优选显著抑制 p180 酪氨酸磷酸化作用的 HRG 刺激至对照的大约 0-35%。可以准备通过反射密度计量测定的 p180 酪氨酸磷酸化作用的 HRG 刺激的抑制剂量反应曲线，并且可以计算目标抗体的 IC_{50} 。在一个实施方案中，阻抑 HER 受体的配体激活的抗体将具有大约 50nM 或更少，更加优选 10nM 或更少的 IC_{50} ，以便在这种测定中抑制 p180 酪氨酸磷酸化作用的 HRG 刺激。当所述抗体是抗体片段如 Fab 片段时， IC_{50} 为大约 100nM 或更少，更加优选 100nM 或更少，以便在这种测定中抑制 p180 酪氨酸磷酸化作用的 HRG 刺激。

[0307] 还可以评估抗体对 MDA-MB-175 细胞的生长抑制作用，例如，基本上如 Schaefer 等人 *Oncogene* 15:1385-1394 (1997) 中所述的那样。根据这种测定，可以用 HER2 单克隆抗体 ($10 \mu\text{g/ml}$) 处理 MDA-MB-175 细胞 4 天并且结晶紫染色。与 HER2 抗体一起温育可以显示对这种细胞系的生长抑制作用，类似于单克隆抗体 2C4 所展示的那样。在另一个实施方案中，外源性 HRG 将不会显著逆转这种抑制。优选地，在外源性 HRG 存在和缺失的情况下，该抗体将能够在比单克隆抗体 4D5 更大的程度上抑制 MDA-MB-175 细胞的细胞增殖（任选地，在比单克隆抗体 7F3 更大的程度上）。

[0308] 在一个实施方案中，目标 HER2 抗体可以阻抑 MCF7 和 SK-BR-3 细胞中 HER2 与 HER3 的调蛋白依赖型关联，如在共免疫沉淀实验中所测定的，所述实验如在 W001/00245 中所述，这种阻抑基本上比单克隆抗体 4D5 更加有效，并且优选基本上比单克隆抗体 7F3 更加有效。

[0309] 为了鉴定生长抑制性 HER2 抗体，可以筛选抑制过表达 HER2 的癌细胞生长的抗体。在一个实施方案中，选择的生长抑制性抗体能够抑制细胞培养物中的 SK-BR-3 细胞的生长大约 20-100% 并且优选大约 50-100%，抗体浓度为大约 $0.5-30 \mu\text{g/ml}$ 。为了鉴定这种抗体，可以进行美国专利号 5,677,171 中所述的 SK-BR-3 测定。根据这种测定，将 SK-BR-3 细胞生长在 F12 和 DMEM 培养基的 1:1 混合物中，所述培养基添加了 10% 胎牛血清，谷氨酰胺和青霉素链霉素。将 SK-BR-3 细胞以 20,000 细胞接种在 35mm 细胞培养皿 ($2\text{mls}/35\text{mm}$ 皿) 中。每皿添加 $0.5-30 \mu\text{g/ml}$ 的 HER2 抗体。六天后，利用电子 COULTER™ 细胞计数仪与细胞数目，与未处理的细胞相比较。可以将抑制 SK-BR-3 细胞生长大约 20-100% 或大约 50-100% 的那些抗体选作生长抑制抗体。筛选生长抑制抗体，如 4D5 和 3E8 的测定法参见美国专利号 5,677,171。

[0310] 为了选择诱导凋亡的 HER2 抗体，可以利用 BT474 细胞进行膜联蛋白结合测定。如前段所述，培养 BT474 细胞并接种在培养皿中。随后移除培养基并以单独的新鲜培养基或包含 $10 \mu\text{g/ml}$ 单克隆抗体的培养基替代。三天培育期后，用 PBS 洗涤单层并通过胰蛋白酶作用进行分离。随后离心细胞，重悬于 Ca^{2+} 结合缓冲液中并如上面有关细胞死亡测定所讨论的那样等分到试管中。随后试管接受标记过的膜联蛋白（例如膜联蛋白 V-FTIC）($1 \mu\text{g/ml}$)。可以利用 FACSCAN™ 流式细胞仪和 FACSCONVERT™ CellQuest 软件 (Becton Dickinson) 来分析样品。将那些相对于对照来说诱导了统计学上显著水平的膜联蛋白结合的抗体选作凋亡诱导抗体。除了膜联蛋白结合测定之外，还可以利用使用 BT474 细胞的 DNA 染色测定法。为了进行这种测定，把如前两段所述用目标抗体处理过的 BT474 细胞与 $9 \mu\text{g/ml}$ HOECHST33342™ 一起于 37°C 温育 2hr，随后利用 MODFIT LT™ 软件 (Verity

SoftwareHouse) 在 EPICS ELITE™ 流式细胞仪 (Coulter Corporation) 上进行分析。利用这种测定可以将抗体选作促凋亡抗体,所述抗体诱导凋亡细胞百分比的变化比未经处理的细胞的情况(高达 100% 的凋亡细胞)高 2 倍或更多(优选 3 倍或更多)。筛选诱导凋亡的 HER2 抗体,如 7C2 和 7F3 的测定法参见 W098/17797。

[0311] 为了筛选被目标抗体结合的 HER2 上的表位的抗体,可以进行常规交叉阻抑测定,如在 Antibody, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane(1988) 中所述,以便评估抗体是否交叉阻抑抗体,如 2C4 或 Pertuzumab 是否结合 HER2。或者,或此外,可以通过本领域已知的方法进行表位绘图和/或可以研究抗体-HER2 结构(Franklin 等人 Cancer Cell 5:317-328(2004)),看 HER2 的何种结构域被抗体所结合。

[0312] (ix) 免疫偶联物

[0313] 本发明还涉及免疫偶联物,其含有与细胞毒药物偶联的抗体,所述细胞毒药物如化疗药物、毒素(例如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,包括其片段和/或变体)或放射性同位素(即放射偶联物)。

[0314] 可有效用于制备这类免疫偶联物的化疗药物如上述。本文还涉及抗体与一或多种小分子毒素,如加利车霉素,美登素(美国专利 5,208,020),单端孢霉烯(trichothene),CC1065 的偶联物。

[0315] 在本发明的一个优选实施方案中,使抗体与一或多个美登素分子偶联(如每个抗体分子与约 1-约 10 个美登素分子偶联)。美登素可转化成 May-SS-Me,然后还原成 May-SH3,并与修饰过的抗体反应(Chari 等,癌症研究 52:127-131(1992))产生美登木素生物碱-抗体偶联物。

[0316] 另一种目标免疫偶联物包含与一个或多个加利车霉素分子偶联的 HER2 抗体。加利车霉素家族的抗生素能在亚 pM 浓度水平产生双链 DNA 断裂。可使用的加利车霉素结构类似物包括,但不限于 γ_1^1 、 α_2^1 、 α_3^1 、N-乙酰基- γ_1^1 、PSAG 以及 θ_1^1 (Hinmam 等,癌症研究 53:3336-3342(1993) 和 Lode 等,癌症研究 58:2925-2928(1998))。也见美国专利 5,714,586; 5,712,374; 5,264,586 和 5,773,001,其包含在本文作为参考。

[0317] 可以应用的酶活性毒素及其片段包括:白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、莨菪根毒素 A 链、 α -帚曲毒素、油桐(Aleutites fordii) 蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆(Phytolacca Americana) 蛋白(PAPI, PAPII, PAP-S)、苦瓜(momordica charantia) 抑制因子、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(sapaonaria officinalis) 抑制剂、白树毒素,米托菌素(mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢菌毒素(tricothecenes)。例见 1993 年 10 月 28 日公开的 W093/21232。

[0318] 本发明还涉及一种免疫偶联物,其在抗体与具有核裂解活性的化合物(如核糖核酸酶或 DNA 内切核酸酶如脱氧核糖核酸酶;DNase) 之间形成。

[0319] 多种放射性同位素可用于制备放射性偶联的抗体,实例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 以及 Lu 的放射性同位素。

[0320] 抗体与细胞毒制剂的偶联物可通过多种双功能蛋白偶联剂来连接,所述双功能蛋白偶联剂如:N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二巯基)丙酸酯(SPDP),琥珀酰亚氨

基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯, iminothiolane(IT), 亚氨酸酯的双功能衍生物(如亚氨基己二酸二甲酯盐酸盐), 活性酯类(如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯), 醛类(如戊二醛(glutareldehyde)), 双-叠氮化合物(如双(对-叠氮基苯甲酰基)己二胺), 双-重氮衍生物(如双-(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺), 二异氰酸酯(如亚甲代苯基 2,6-二异氰酸酯), 和双-活性氟化合物(如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如, 蓖麻毒蛋白免疫毒素可如 Vitetta 等, 科学 238:1098(1987) 所述制备。C 14 标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三氨五乙酸酯(MX-DTPA) 是将放射性核苷酸偶联至抗体的例示性偶联剂。见 W094/11026。这种接头可能是有利于细胞毒药物在细胞内释放的“可断开的接头”。例如, 可使用酸不稳定型接头, 肽酶敏感型接头, 二甲基接头或含二硫键的接头(Chari 等, 癌症研究 52:127-131(1992))。

[0321] 在另一实施方案中, 抗体可与肿瘤预靶向中应用的“受体”(如链霉抗生物素蛋白)偶联, 将该抗体-受体偶联物给予患者, 之后用清除剂除去循环中未结合的偶联物, 再给予已偶联了细胞毒制剂(如放射性核苷酸)的“配体”(如抗生物素蛋白)。

[0322] (x) 其它抗体修饰

[0323] 本文涉及对抗体的其它修饰。例如, 可以使抗体与一种非蛋白多聚物, 如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧化烯(polyoxyalkylene)、或聚乙二醇与聚丙二醇的共聚物交联。还可将抗体包被于通过凝聚技术或界面聚合作用制备的微囊(例如, 分别为羟甲基纤维素或明胶微囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯(methylmethacrylate)微囊)中, 胶体药物传递系统(如脂质体、白蛋白小球体、微乳胶、纳米颗粒和纳米胶囊)或巨乳胶(macroemulsions)中。这些技术公开于 Remingtons' s Pharmaceutical Sciences, 16 版, Oslo, A., Ed. (1980)。

[0324] 在效应功能方面可能希望改进本发明的抗体, 以增强抗体的抗原依赖型细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖型细胞毒性(CDC)。这可以通过在抗体的 Fc 区中引入一个或多个氨基酸取代来实现。或者或此外, 可以在 Fc 区中引入半胱氨酸残基, 从而在该区域中形成链间二硫键。这样制得的同质二聚抗体可能有改进的内化能力和/或提高的补体介导的细胞杀伤能力和依赖于抗体的细胞毒性(ADCC)。参见 Caron 等, J. Exp Med. 176:1191-1195(1992) 和 Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922(1992)。也可如 Wolff 等 Cancer Research 53:2560-2565(1993) 描述的那样, 用异二聚功能性交联剂来制备抗肿瘤活性增强的同质二聚抗体。或者, 可将抗体工程改造成具有双 Fc 区, 从而可能增强补体裂解和 ADCC 能力。见 Stevenson 等, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230(1989)。

[0325] W000/42072(Presta, L.) 描述了在人效应细胞存在时 ADCC 功能提高的抗体, 其中所述抗体在其 Fc 区包含氨基酸取代。优选地, ADCC 提高的抗体在 Fc 区的位置 298, 333, 和/或 334 上包含取代。优选地经改变的 Fc 区是人 IgG1Fc 区, 其包括这些位置中的一个, 两个或三个上的取代或由其组成。

[0326] 在 W099/51642, 美国专利号 6, 194, 551B1, 美国专利号 6, 242, 195B1, 美国专利号 6, 528, 624B1 和美国专利号 6, 538, 124(Idusogie 等人) 中描述了 C1q 结合和/或补体依赖型细胞毒性(CDC) 改变了的抗体。所述抗体在其 Fc 区的氨基酸位置 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 和/或 334 中的一个或多个位置上包含氨基酸取代。

[0327] 例如, 为了提高抗体的血清半寿期, 可以如美国专利 5, 739, 277 中所述, 将补救受体结合表位并入抗体(特别是抗体片段)中。如本文所用的, 术语“补救受体结合表位”指

负责提高体内血清半寿期的 IgG 分子的 Fc 区的表位（例如，IgG₁，IgG₂，IgG₃，或 IgG₄）。在其 Fc 区具有取代并且血清半寿期提高的抗体还在 W000/42072 (Presta, L.) 中进行了描述。

[0328] 还考虑具有三个或更多（优选四个）功能性抗原结合位点的经改造的抗体（美国申请号 US2002/0004587A1, Miller 等人）。

[0329] 还可以将本文公开的 HER2 抗体配制成免疫脂质体。通过本领域已知的方法，如在 Epstein 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 :3688 (1985) ;Hwang 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 :4030 (1980) ;美国专利号 4,485,045 和 4,544,545 ;和 1997-1-23 日公开的 W097/38731 中所述的方法，来制备包含抗体的脂质体。在美国专利号 5,013,556 中公开了具有提高的周转时间的脂质体。

[0330] 可以通过反相蒸发方法用包含磷脂酰胆碱，胆固醇和 PEG- 衍生的磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的脂质组合物生成特别有用的脂质体。将脂质体通过确定孔径大小的滤器压出以产生具有所需直径的脂质体。如在 Martin 等人 J. Biol. Chem. 257 :286-288 (1982) 中所述，可以将本发明的抗体的 Fab' 片段通过二硫交互反应偶联到脂质体上。任选地将化疗剂包含在所述脂质体中。参见 Gabizon 等人 J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989)。

[0331] (ix) 例示性抗体

[0332] 可以根据本发明配制的例示性抗体包括，但不限于下列：

[0333] 抗 ErbB 抗体，包括抗 HER2 抗体，如本文中更加详细描述的那些；

[0334] 结合 B 细胞表面标记的抗体，所述 B 细胞表面标记如 CD19, CD20 (例如 Rituximab (RITUXAN®) 和人源化 2H7)，CD22, CD40 或 BR3；

[0335] 结合 IgE 的抗体，包括可由 Genentech 商购的 Omalizumab (XOLAIR®)，E26 (本文的图 17A-B)，HAE1 (本文的图 17A-B)，在其 Fc 区的位置 265 上具有氨基酸取代的 IgE 抗体 (US 2004/0191244A1)，Hu-901 (图 17A-B herein)，W02004/070011 中的 IgE 抗体，或包含任何这些 IgE 抗体的可变结构域的抗体（包括抗体片段和全长抗体）。还参见, Presta 等人, J. Immunol. 151 :2623-2632 (1993) ;国际公开号 W0 95/19181 ;美国专利号 5,714,338, 发布于 1998-02-03 ;美国专利号 5,091,313, 发布于 1992-02-25 ;1993-03-04 公开的 W0 93/04173 ;1999-01-14 公开的 W0 99/01556 ;和美国专利号 5,714,338；

[0336] 结合血管内皮生长因子 (VEGF) 或其受体的抗体，包括可由 Genentech 商购的 Bevacizumab (AVASTIN™)，和 Ranibizumab (LUCENTIS™)；

[0337] 抗 IL-8 抗体 (St John 等人, Chest, 103 :932 (1993)，和国际公开号 W095/23865)；

[0338] 抗 PSCA 抗体 (W001/40309)；

[0339] 抗 CD40 抗体，包括 S2C6 及其人源化变体 (W000/75348)；

[0340] 抗 CD11a 抗体，包括 efalizumab (RAPTIVA®) (美国专利号 5,622,700, W0 98/23761, Steppe 等人, Transplant Intl. 4 :3-7 (1991)，和 Hourmant 等人, Transplantation 58 :377-380 (1994))；抗 CD18 抗体 (1997-04-22 发布的美国专利号 5,622,700, 或 1997-07-31 公开的 W0 97/26912)；

[0341] 抗 Apo-2 受体抗体 (1998-11-19 公开的 W0 98/51793)；

[0342] 抗 TNF- α 抗体包括 cA2 (REMICADE®)，CDP571 和 MAK-195 (参见, 1997-09-30 发布的美国专利号 5,672,347, Lorenz 等人 J. Immunol. 156 (4) :1646-1653 (1996)，和 Dhainaut 等人 Crit. Care Med. 23 (9) :1461-1469 (1995))；

- [0343] 抗组织因子 (TF) (欧洲专利号 0420937B1, 1994-11-09 授权) ;
- [0344] 抗人 $\alpha 4 \beta 7$ 整合素 (1998-02-19 公开的 WO 98/06248) ;
- [0345] 抗 EGFR 抗体, 包括 1996-12-19 公开的 WO 96/40210 中的嵌合的或人源化 225 抗体 ;
- [0346] 抗 CD3 抗体, 如 OKT3 (1985-05-07 发布的美国专利号 4, 515, 893) ;
- [0347] 抗 CD25 或抗 tac 抗体如 CHI-621 (SIMULECT®) 和 (ZENAPAX®) (参见 1997-12-02 发布的美国专利号 5, 693, 762) ;
- [0348] 抗 CD4 抗体如 cM-7412 抗体 (Choy 等人 Arthritis Rheum 39(1) :52-56 (1996)) ;
- [0349] 抗 CD52 抗体如 CAMPATH-1H (Riechmann 等人 Nature 332 :323-337 (1988) ;
- [0350] 抗 Fc 受体抗体如 Graziano 等人 J. Immunol. 155(10) :4996-5002 (1995) 中的抗 Fc γ RI 的 M22 抗体 ;
- [0351] 抗癌胚抗原 (CEA) 抗体如 hMN-14 (Sharkey 等人 Cancer Res. 55(23Suppl) :5935s-5945s (1995) ;
- [0352] 抗乳腺上皮细胞的抗体包括 huBrE-3, hu-Mc 3 和 CHL6 (Ceriani 等人 Cancer Res. 55(23) :5852s-5856s (1995) ; 和 Richman 等人 Cancer Res. 55(23Suppl) :5916s-5920s (1995)) ;
- [0353] 结合结肠癌细胞的抗体如 C242 (Litton 等人 Eur J. Immunol. 26(1) :1-9 (1996)) ;
- [0354] 抗 CD38 抗体, 例如 AT13/5 (Ellis 等人 J. Immunol. 155(2) :925-937 (1995)) ;
- [0355] 抗 CD33 抗体如 Hu M195 (Jurcic 等人 Cancer Res 55(23Suppl) :5908s-5910s (1995) 和 CMA-676 或 CDP771 ;
- [0356] 抗 CD22 抗体如 LL2 或 LymphoCide (Juweid 等人 Cancer Res 55(23Suppl) :5899s-5907s (1995) ;
- [0357] 抗 EpCAM 抗体如 17-1A (PANOREX®);
- [0358] 抗 GpIIb/IIIa 抗体如 abciximab 或 c7E3Fab (REOPRO®);
- [0359] 抗 RSV 抗体如 MEDI-493 (SYNAGIS®);
- [0360] 抗 CMV 抗体如 PROTOVIR®;
- [0361] 抗 HIV 抗体如 PR0542 ;
- [0362] 抗肝炎抗体如抗 Hep B 抗体 OSTAVIR®;
- [0363] 抗 CA 125 抗体 OvaRex ;
- [0364] 抗特异型 GD3 表位抗体 BEC2 ;
- [0365] 抗 $\alpha v \beta 3$ 抗体 VITAXIN®;
- [0366] 抗人肾细胞癌抗体如 ch-G250 ; ING-1 ;
- [0367] 抗人 17-1A 抗体 (3622W94) ;
- [0368] 抗人结肠直肠肿瘤抗体 (A33) ;
- [0369] 抗 GD3 神经节苷脂的抗人黑色素瘤抗体 R24 ;
- [0370] 抗人鳞状细胞癌 (SF-25) ; 和
- [0371] 抗人白细胞抗原 (HLA) 抗体如 Smart ID10 和抗 HLA DR 抗体 Oncolym (Lym-1) 。
- [0372] (xi) 抗体变体组合物
- [0373] 在至少一个方面, 本发明涉及包括组合物的制剂, 所述组合物包含主要种类抗体

及其一种或多种变体的混合物。当所述主要种类抗体结合 HER2 时,优选地 HER2 抗体(主要组分 HER2 抗体及其抗体变体的其中之一或二者)是这样一种抗体,其结合 HER2 的结构域 II,比 Trastuzumab 更加有效地抑制 HER 二聚体化作用,和/或结合 HER2 的异二聚体结合位点。在这里主要种类抗体的优选实施方案是这样的抗体,其包括 SEQ ID Nos. 3 和 4 中的可变轻和可变重氨基酸序列,最优选包括选自 SEQ ID No. 15 和 23 的轻链氨基酸序列,和选自 SEQ ID Nos. 16 和 24 的重链氨基酸序列。

[0374] 在一个实施方案中,配制的 HER2 抗体组合物包含主要组分 HER2 抗体与其包含氨基末端引导延伸的氨基酸序列变体的混合物。优选地,氨基末端引导延伸在抗体变体的轻链上(例如在抗体变体的一个或两个轻链上)。主要组分 HER2 抗体或抗体变体可以是全长抗体或抗体片段(例如 F(ab')₂ 片段的 Fab),但是优选两者都是全长抗体。本文的抗体变体可以在其任何一个或多个重或轻链上包含氨基末端引导延伸。优选地,氨基末端引导延伸在抗体的一个或两个轻链上。氨基末端引导延伸优选包含或由 VHS- 组成。组合物中氨基末端引导延伸的存在可以通过各种分析技术进行检测,包括,但不限于,N-末端序列分析,电荷异质性测定(例如,阳离子交换层析或毛细管区带电泳),质谱分析,等等。组合物中抗体变体的量一般从构成任何用于检测变体的测定法(优选 N 末端序列分析)的检测极限的量到小于主要种类抗体的量。一般组合物中抗体分子的大约 20% 或更少(例如从大约 1% 到大约 15%,例如从 5% 到大约 15%) 包含氨基末端引导延伸。优选利用定量 N-末端序列分析或阳离子交换分析(优选地利用高分辨率,弱阳离子交换柱,如 PROPACWCX-10™ 阳离子交换柱)来测定这种百分比量。除了氨基末端引导延伸变体之外,还包括其它的主要种类抗体和/或变体的氨基酸序列变化,包括但不限于在其一个或两个重链上包含 C-末端赖氨酸残基的抗体,去酰胺化的抗体变体,等等。

[0375] 另外,主要种类抗体或变体可以进一步包含糖基化作用变异,非限制性的实例包括含有附着在其 Fc 区上的 G1 或 G2 寡糖结构的 HER2 抗体,含有附着在其轻链上的糖部分的 HER2 抗体(例如附着到抗体的一个或两个轻链上的一个或两个糖部),HER2 抗体包括非糖基化重链。

[0376] III. 制剂的制备

[0377] 在第一方面,本发明提供稳定的药物制剂,其包括单克隆抗体,优选地全长人或人源化 IgG1 抗体,所述抗体在 pH 5.5-6.5,优选 pH 5.8-6.2 的组氨酸-醋酸盐缓冲液中。不过,制剂中的抗体可以是包含抗原-结合区的抗体片段,如 Fab 或 F(ab')₂ 片段。

[0378] 在另一实施方案中,本发明涉及一种药物制剂,其包含以下成份或基本上由以下成份组成:大约 10mg/mL 到大约 250mg/mL 的易于发生脱酰胺或聚集的全长 IgG1 抗体;组氨酸-醋酸盐缓冲液, pH 5.5-6.5;大约 60mM 到大约 250mM 的量的选自海藻糖和蔗糖的糖;和大约 0.01% 到大约 0.1% 量的聚山梨醇酯 20。

[0379] 在又一个实施方案中,本发明提供一种药物制剂,其包含在 pH 从大约 5.5 到大约 6.5 的组氨酸缓冲液中的结合 HER2 的结构域 II 的抗体,糖和表面活性剂。例如,该制剂可以包含从大约 20mg/mL 到大约 40mg/mL 的量的 Pertuzumab,组氨酸-醋酸盐缓冲液,蔗糖,和聚山梨醇酯 20,其中该制剂的 pH 为从大约 5.5 到大约 6.5。

[0380] 在另一方面,本发明提供一种药物制剂,其包含在 pH 从大约 5.5 到大约 6.5 的组氨酸缓冲液中的 DR5 抗体,糖和表面活性剂。这种制剂可以,例如,包含从大约 10mg/mL 到

大约 30mg/mL 的量的 Apomab, 组氨酸 - 醋酸盐缓冲液, 海藻糖, 和聚山梨醇酯 20, 其中该制剂的 pH 为从大约 5.5 到大约 6.5。

[0381] 该制剂尤其对易于发生脱酰胺和 / 或聚集和 / 或片段化的抗体有用, 因为该缓冲液阻滞其中配制的抗体的脱酰胺和 / 或聚集和 / 或片段化。此外, 不像其它利用 HCl 制备的组氨酸缓冲液, 组氨酸 - 醋酸盐缓冲液缺少在本文中发现有益的氯离子, 因为当其与糖组合时这种缓冲液与聚山梨醇酯 20 对抗体具有相同的保护作用, 并且是稳定的且可以保存在不锈钢罐中。因而, 除了其本身包含易于发生脱酰胺和 / 或聚集和 / 或片段化的抗体的制剂以外, 本发明还提供减弱治疗性单克隆抗体的脱酰胺, 聚集和 / 或片段化的方法 (例如, 相对于在不同的 pH 或在不同的缓冲液中的组合物), 包括在组氨酸 - 醋酸盐缓冲液, pH 5.5-6.5 中配制抗体。在这一实施方案中, 可以在配制抗体之前或之后测定或测量脱酰胺, 聚集和 / 或片段化, 所述配制的抗体在制剂中及其保存时显示可接受的脱酰胺作用, 聚集和 / 或片段化。

[0382] 制剂中的抗体可以结合抗原, 包括但不限于: HER2, CD20, IgE, DR5, BR3 和 VEGF。

[0383] 当所述配制的抗体结合 HER2 时, 它优选结合 HER2 的结构域 II, 比 Trastuzumab 更加有效地抑制 HER 二聚体化作用, 和 / 或结合 HER2 的异二聚体结合位点。在本文中 HER2 抗体的优选实施方案是这样的抗体, 其包括 SEQ ID Nos. 3 和 4 中的可变轻和可变重氨基酸序列, 最优选包括 SEQ ID Nos. 15 和 16 中的轻链和重链氨基酸序列 (Pertuzumab)。

[0384] 可以在这里配制的 CD20 抗体的实例包括: “C2B8”, 它现在叫做 “Rituximab” (“RITUXAN®”) 可由 Genentech 商购 (还参见美国专利号 5,736,137, 特此并入本文作为参考); 钇-[90]-标记的 2B8 鼠抗体, 命名为 “Y2B 8” 或 “Ibritumomab Tiuxetan” ZEVALIN®, 可由 Biogen-Idec 商购 (还参见美国专利号 5,736,137, 特此并入本文作为参考); 鼠 IgG2a “B1,” 也称作 “Tositumomab,” 任选地标记 ¹³¹I 以生成 “¹³¹I-B 1” 抗体 (碘 I131tositumomab, BEXXAR™) (美国专利号 5,595,721, 特此并入本文作为参考); 鼠单克隆抗体 “1F5” (Press 等人血液 69(2):584-591(1987) 及其包括 “补缀框架 (frameworkpatched)” 或人源化 1F5 的变体 (W003/002607, Leung, S.); ATCC 保藏号 HB-96450); 鼠 2H7 和嵌合 2H7 抗体 (Clark 等人 PNAS 82:1766-1770(1985); 美国专利号 5,500,362, 并入本文作为参考); 人源化 2H7; huMax-CD20 (W004/035607, Genmab, Denmark); AME-133 (Applied Molecular Evolution); A20 抗体或其变体如嵌合或人源化 A20 抗体 (分别为 cA20, hA20) (US2003/0219433, Immunomedics); 和单克隆抗体 L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 或 NU-B2, 其可获自 International Leukocyte Typing Workshop (Valentine 等人, In: Leukocyte Typing III (McMichael, Ed., p.440, Oxford University Press(1987)))。

[0385] 在配制的 CD20 抗体的优选实施方案中, CD20 抗体是人源化 2H7 抗体。在本文中优选的人源化 2H7 抗体是 2H7v16 和 2H7v511。人源化 2H7v16 可以是完整抗体或包含可变轻和可变重序列的抗体片段 (SEQ ID Nos. 26 和 29)。当所述人源化 2H7v16 抗体是全长抗体时, 优选地它包含 SEQ ID Nos. 63 和 65 的轻和重链氨基酸序列。

[0386] 当所述抗体结合 VEGF 时, 优选地它包含图 19 中所示的可变结构域序列。最优选的抗 VEGF 抗体是全长人源化 IgG1 抗体, Bevacizumab (AVASTIN™), 可由 Genentech 商购。

[0387] 当所述配制的抗体结合 IgE 时, 优选地它选自以下抗体组成的组: E25, 可

由 Genentech 商购的 Omalizumab (XOLAIR®) (还参见图 17A-B), E26 (本文的图 17A-B), HAE1 (本文的图 17A-B), 在其 Fc 区的位置 265 上具有氨基酸取代的 IgE 抗体 (US 2004/0191244A1), Hu-901 (本文的图 17A-B), W02004/070011 中的 IgE 抗体, 或包括那些 IgE 抗体任一种的可变结构域的抗体 (包括抗体片段和全长抗体)。

[0388] 当所述抗体结合肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族中的受体或死亡受体时, 优选地它结合 DR5, 并优选是激动剂抗体。在这一领域中的出版物包括 Sheridan 等人, Science, 277 : 818-821 (1997), Pan 等人, Science, 277 : 815-818 (1997), 1998-11-19 公开的 W098/51793 ; 1998-09-24 公开的 W098/41629 ; Screatton 等人, Curr. Biol., 7 : 693-696 (1997) ; Walczak 等人, EMBO J., 16 : 5386-5387 (1997) ; Wu 等人, Nature Genetics, 17 : 141-143 (1997) ; 1998-08-20 公开的 W098/35986 ; 1998-10-14 公开的 EP870, 827 ; 1998-10-22 公开的 W098/46643 ; 1999-01-21 公开的 W099/02653 ; 1999-02-25 公开的 W099/09165 ; 1998-03-11 公开的 W099/11791 ; 2002-08-13 公开的 US 2002/0072091 ; 2001-12-07 公开的 US 2002/0098550 ; 2001-12-06 发布的 US 6, 313, 269 ; 2001-08-02 公开的 US 2001/0010924 ; 2003-07-03 公开的 US 2003/0125540 ; 2002-10-31 公开的 US 2002/0160446, 2002-04-25 公开的 US 2002/0048785 ; 2002-02 发布的 US 6, 342, 369 ; 2003-05-27 公开的 US 6, 569, 642, 2000-06-06 发布的 US 6, 072, 047, 2003-11-04 发布的 US 6, 642, 358 ; 2004-06-01 发布的 US 6, 743, 625。最优选的 DR5 抗体是 Apomab。

[0389] 以上提及的每种制剂都包含缓冲液, 优选组氨酸缓冲液, 最优选组氨酸 - 醋酸盐缓冲液 pH 5.5-6.5, 优选地 5.8-6.2, 例如大约 6.0。缓冲液的浓度至少部分根据所需的 pH 来规定。缓冲液的例示性浓度从大约 1mM 到大约 200mM, 优选地从大约 10mM 到大约 40mM, 最优选大约 20mM。

[0390] 制剂中的抗体浓度优选为从大约 10mg/mL 到大约 250mg/mL。抗体浓度可以根据所希望的用途和制剂施用模式来确定。例如, 当所述制剂用于 IV 给药 (例如 HER2 抗体) 时, 制剂中的抗体浓度优选地从大约 20mg/mL 到大约 40mg/mL。在例示性的希望用于静脉内 (IV) 给药的 Pertuzumab 制剂中, 抗体浓度为从大约 20mg/mL 到大约 40mg/mL, 最优选大约 30mg/mL。

[0391] 当所述抗体用于 SQ 或 IM 给药 (例如对于抗 IgE 抗体来说) 时, 可能需要较高浓度的抗体。这种基本上高的抗体浓度可以从大约 50mg/mL 到大约 250mg/mL, 或从大约 80mg/mL 到大约 250mg/mL, 或从大约 100mg/mL 到大约 200mg/mL。

[0392] 当所述制剂包含 DR5 抗体, 如 Apomab 时, 例示性的抗体浓度从大约 10mg/mL 到大约 30mg/mL, 例如大约 20mg/mL DR5 抗体 ; 这类制剂可以用于静脉内给药。

[0393] 用于给药的制剂优选为含水制剂 (未冻干的) 并且之前亦未进行冻干。尽管所述制剂可以进行冻干, 但优选不做冻干处理。不过, 没有在冻干过程中同时进行干燥的水性制剂的冷冻是特别要求保护的, 这有利于其更长期的保存, 例如在不锈钢罐中。

[0394] 所述制剂优选地进一步包含糖, 最优选二糖, 如海藻糖或蔗糖。一般包含减少可溶性聚集物形成的量的糖, 所述可溶性聚集物如在冻 / 融之后出现的那些。对于 HER2 抗体制剂来说, 例示性的糖浓度为从大约 10mM 到大约 1M, 例如从大约 60mM 到大约 250mM, 最优选大约 120mM, 对于 DR5 抗体制剂来说为大约 240mM。

[0395] 尽管本文发现包含组氨酸 - 醋酸盐缓冲液和糖的制剂是稳定的, 所述制剂任选地

进一步包含表面活性剂,如聚山梨醇酯,最优选聚山梨醇酯 20。一般包含减少可溶性聚集物形成(如在摇晃或运输后发生的)的量的表面活性剂。表面活性剂浓度优选地为从大约 0.0001%到大约 1.0%,最优选从大约 0.01%到大约 0.1%,例如大约 0.02%。

[0396] 任选地,所述制剂并不包含大量的盐如氯化钠。

[0397] 制剂一般是无菌的,而这可以根据本领域技术人员已知的用于制成适于向人受试者给药的药物制剂的方法来实现,包括在制备制剂之前或之后通过无菌滤膜滤过。

[0398] 另外,希望制剂在保存时稳定。熟练技术人员可以采用各种稳定性测定法来确定制剂的稳定性。例如,所述制剂可以是在以下保存条件下稳定的制剂:于大约 40℃至少 4 周;于大约 5℃或大约 15℃至少 3 个月或至少 1 年;和/或大约 -20℃至少 3 个月。稳定性可以在配剂时或在所述温度下保存后,通过评估制剂中抗体的物理稳定性,化学稳定性,和/或生物学活性来进行测试。物理和/或稳定性可以通过多种不同的方式定性和/或定量地评估,包括评估聚集物形成(例如利用大小排阻层析,通过测量浊度,和/或通过肉眼观察);通过利用阳离子交换层析或毛细管区带电泳评估电荷异质性;氨基末端或羧基末端序列分析;质谱分析;SDS-PAGE 分析以比较减小的和完整的抗体;肽图谱(例如胰蛋白酶或 LYS-C)分析;评估抗体的生物学活性或抗原结合功能;等等。不稳定性可能会导致聚集,脱酰胺作用(例如 Asn 脱酰胺作用),氧化作用(例如 Met 氧化作用),异构化作用(例如 Asp 异构化作用),剪切/水解/片段化(例如铰链区片段化),琥珀酰亚胺形成,未配对的半胱氨酸(s),N-末端延伸,C-末端加工,糖基化作用差异,等等。能够利用熟练技术人员可以获得的各种技术来评估生物学活性或抗原结合功能。

[0399] 如上所述,特别考虑了制剂的冷冻。因此,可以在冻融后对制剂测试稳定性。

[0400] 因此,本发明还提供了一种制备药物制剂的方法,包括制备本文所述的制剂,和评估制剂中的单克隆抗体的物理稳定性,化学稳定性,或生物学活性。

[0401] 在优选的实施方案中,提供在小瓶中的优选水性形式的制剂,所述小瓶具有能够被注射器穿刺的盖子。合意地将小瓶保存于大约 2-8℃,直到将它给药于其需要的受试者。小瓶可以是例如 20cc 的小瓶(例如对于 420mg 剂量)或 50cc 小瓶(例如对于 1050mg 剂量)。对于 DR5 抗体,如 Apomab,可以在 5cc 玻璃小瓶(例如 5.5ml 注满)提供该制剂。

[0402] 在另一实施方案中,在不锈钢罐中提供制剂。在不锈钢罐中的制剂任选地是冷冻的和未冻干的。

[0403] 可以在制剂中包括一种或多种其它可药用的载体,赋形剂或稳定剂,如在 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) 中所述的那些,只要它们不会副作用于制剂的所需特性。可接受的载体,赋形剂或稳定剂在采用的剂量和浓度上对接受者无毒,包括:其它缓冲液剂;共溶剂;抗氧化剂包括抗坏血酸和甲硫氨酸;螯合剂如 EDTA;金属复合物(例如 Zn-蛋白质复合物);可生物降解的聚合物如聚酯;防腐剂;和/或形成盐的补偿离子如钠。

[0404] IV. 用抗体制剂进行治疗

[0405] 在一个实施方案中,本发明提供治疗受试者中疾病或病症的方法,包括向受试者施用有效量的本文所述的制剂以治疗疾病或病症。

[0406] 当制剂中的抗体结合 HER2 时,优选将它用于治疗癌症。所述癌症一般将包含 HER2-表达细胞,从而使得本文的 HER2 抗体能够结合癌细胞。因而,在此实施方案中本发明

涉及在受试者中治疗表达 HER2 的癌症的方法,包括向受试者施用有效量的 HER2 抗体药物制剂以治疗癌症。能够用该组合物进行治疗的各种癌症列在上面定义一节中。

[0407] 还考虑 HER2 抗体制剂可以用于治疗和种非恶性疾病或病症,包括自身免疫疾病(例如银屑病);子宫内膜异位;硬皮病;再狭窄;息肉如结肠息肉,鼻息肉或胃肠息肉;纤维腺瘤;呼吸道疾病(参见上面的定义);胆囊炎;神经纤维瘤病;多囊肾病;炎性疾病;皮肤病包括银屑病和皮炎;血管病(参见上面的定义);涉及血管上皮细胞异常增生的病症;胃肠溃疡;Menetrier 氏病,分泌性腺瘤或蛋白质流失综合症;肾病;血管生成疾病;眼睛疾病如老年性黄斑变性,眼假组织胞浆菌病综合征(presumed ocular histoplasmosis syndrome),增生型糖尿病视网膜病变导致的视网膜新血管形成,视网膜血管生成,糖尿病性视网膜病,或老年性黄斑变性;骨相关病理如骨关节炎、软骨病和骨质疏松症;脑局部缺血事件后损伤;纤维变性或水肿(edema)疾病如肝硬化,肺部纤维化,carcoidosis, thyroiditis, 系统性高粘滞性综合征, Osler Weber-Rendu 病,慢性闭塞性肺病,或烧伤、外伤、辐射、中风、缺氧或局部缺血后的水肿;皮肤过敏反应;糖尿病性视网膜病和糖尿病性肾病;Guillain-Barre 综合症;移植物抗宿主疾病或移植排斥;Paget 氏病;骨或关节炎;光老化(例如由对人皮肤的 UV 辐射引起的);良性前列腺肥大;某些微生物感染,所述微生物包括选自腺病毒,汉滩病毒,博氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*),耶尔森菌属(*Yersinia* spp.)和百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)的微生物病原;由血小板聚集引发的血栓;生殖性疾病如子宫内膜异位,卵巢过度刺激综合征,先兆子痫,功能障碍性子宫出血,或月经频多;滑膜炎;动脉粥样瘤(atheroma);急性和慢性肾病(包括增生性血管球性肾炎和糖尿病诱导的肾病);湿疹;肥厚性瘢痕形成;内毒素性休克和真菌感染;家族性腺瘤息肉病;神经变性疾病(例如阿尔茨海默氏病、爱滋病相关的痴呆、震颤性麻痹、肌萎缩性侧索硬化、色素性视网膜炎、脊柱肌肉萎缩(spinal muscular atrophy)和小脑变性);骨髓增生异常综合征;再生障碍性贫血;局部缺血性损伤;肺、肾或肝的纤维化;T 细胞介导的过敏疾病;婴儿肥大性幽门狭窄;泌尿障碍综合症;银屑病关节炎;和桥本氏甲状腺炎。本文疗法的优选非恶性指征包括银屑病、子宫内膜异位、硬皮病、血管病(例如再狭窄、动脉粥样硬化、冠状动脉病,或高血压),结肠息肉,纤维腺瘤或呼吸道疾病(例如哮喘、慢性支气管炎、支气管扩张或囊性纤维化)。

[0408] 在制剂中的抗体结合 B 细胞表面标记如 CD20 或 BR3 时,可以将该制剂用于治疗 B 细胞恶性肿瘤,如 NHL 或 CLL,自身免疫疾病,移植排斥,或阻抑对外来抗原,如抗体,毒素,基因治疗病毒载体,移植物,感染因子,或同种抗原的免疫反应(参见 WO 01/03734, Grillo-Lopez 等人)。

[0409] 当在制剂中的抗体是 IgE 抗体时,可以将它用于治疗 IgE 介导的病症(USSN 2004/019732A1, Liu and Shire),如过敏性哮喘,过敏性鼻炎,特应性(atopic)皮炎,过敏性胃肠病(allergic gastroenteropathy),过敏,湿疹,风疹,过敏性支气管肺曲菌病(bronchopulmonary aspergillosis),寄生虫病,高(hyper)-IgE 综合征,共济失调性毛细血管扩张症(ataxia-telangiectasia),维-奥二氏综合征(Wiskott-Aldrich syndrome),胸腺淋巴发育不全(thymic lymphoplasia),IgE 骨髓瘤,和移植物抗宿主的反应。

[0410] 结合 TNF 超家族中受体(例如结合 DR5)的抗体,或结合 VEGF(或其受体)的抗体,可以用来治疗癌症,所述癌症的各种形式在上面的定义一节进行了描述。优选地,DR5 抗体

制剂治疗的癌症是实体肿瘤或 NHL。

[0411] 当所述适应症是癌症时,可以用抗体制剂与化疗剂的组合来治疗患者。组合给药包括利用分离的制剂或单一药物制剂进行共给药或同时给药,和以任一种顺序连续给药,其中有一个时期两种(或所有)活性药剂同时发挥其生物学活性。因而,化疗剂可以在组合物施用之前或之后施用。在此实施方案中,在化疗剂的至少一次施用和组合物的至少一次施用之间的时间优选为大约 1 个月或更少,最优选大约 2 周或更少。或者,将化疗剂和组合物在单一制剂或分离制剂中同时施用给患者。

[0412] 用所述制剂治疗将带来癌症或疾病的病征或症状的改善。例如,当进行治疗的疾病为癌症时,这种治疗可以带来存活的改善(整体存活和/或无进展存活)和/或可以带来目标临床反应(部分或完全)。另外,用化疗剂和抗体制剂的组合进行治疗可以对患者带来协同性的或大于加成性的治疗益处。

[0413] 优选地,施用的制剂中的抗体是裸抗体。不过,施用的抗体可以与细胞毒性剂偶联。优选地,其结合的免疫偶联物和/或抗原由细胞内化,导致免疫偶联物杀伤其结合的癌细胞的治疗效力提高。在优选的实施方案中,细胞毒性剂靶向或干扰癌细胞中的核酸。这些细胞毒性剂的实例包括美登木生物碱(maytansinoids),刺孢霉素(calicheamicins),核糖核酸酶和 DNA 核酸内切酶。

[0414] 根据已知方法,如静脉内给药,例如,作为丸药,或通过一段时间的持续灌注,通过肌肉内,腹膜内,脑脊髓内(intracerebrospinal),皮下,关节内,滑液内,鞘内,口服,局部,或吸入途径将所述制剂施用给人患者。优选静脉内,肌肉内或皮下给药抗体组合物,最优选静脉内给药。

[0415] 对于皮下递送来说,可以通过注射器;注射装置(例如 INJECT-EASE™ 和 GENJECT™ 装置);注射笔(如 GENPENT™);无针装置(例如 MEDIJECTOR™ 和 BIOJECTOR™);或皮下贴片递送系统施用所述制剂。

[0416] 对于疾病的预防和治疗来说,适当剂量的抗体将取决于如上所定义的待治疗的疾病类型,疾病的严重性和进程,给药抗体是为了预防性还是治疗性目的,先前的治疗,患者的临床病史和对抗体的反应,以及主治医生的判断。将抗体一次性或经过一系列治疗施用给患者。根据疾病的类型和严重性,大约 1 µg/kg 到 50mg/kg(例如 0.1-20mg/kg)的 HER2 或 DR5 抗体是用于施用给患者的起始候选剂量,可以通过一次或多次分离的给药,或通过连续灌注来进行。抗体的剂量一般为从大约 0.05mg/kg 到大约 10mg/kg。如果施用化疗剂,通常以其已知的剂量施用它,或任选地降低用量,因为施用化疗剂会带来药物的组合作用或副作用。这类化疗剂的制备和剂量方案可以根据生产商的说明书或医师经验确定来使用。这类化疗的制备和剂量方案还在 Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams&Wilkins, Baltimore, MD(1992) 中进行了描述。

[0417] 其它治疗性方案可以与抗体组合,包括,但不限于:第二(第三,第四,等等)化疗剂(即不同化疗剂的混合物);另一种单克隆抗体;生长抑制剂;细胞毒性剂;化疗剂;EGFR- 靶向药物;酪氨酸激酶抑制剂;抗血管生成剂;和/或细胞因子;等等。

[0418] 除了上面的治疗方案之外,患者还可以进行手术去除癌细胞和/或放疗。

[0419] V. 制造的商品

[0420] 在本发明的另一实施方案中,提供包含本发明的药物制剂的制造商品,并提供其

使用说明书。所述制造商品包括容器。合适的容器包括,例如,瓶子,小瓶(例如双室小瓶),注射器(如双室注射器)和试管。所述容器要以由许多材料如玻璃或塑料形成。所述容器盛有制剂,而在容器上或与之相关联的标记可以标示用法说明。盛有制剂的容器可以是多用途小瓶,其允许反复施用重构的制剂(例如2-6次施用)。制造商品可以进一步包括从其它商业和用户立场所需要的材料,包括其它缓冲液,稀释剂,过滤器,针,注射器,以及在前部分所述的使用说明书的包装插入物。

[0421] 通过参照下列实施例将会更加充分地理解本发明。不过,它们不应被视为限制本发明的范围。将引用的所有文献和专利并入本文作为参考。

实施例

[0422] 稳定的 Pertuzumab 液体制剂

[0423] 这些实施例描述了稳定的液体制剂的研制和稳定性测试,所述液体制剂包含蛋白质浓度为大约10mg/mL-180mg/mL的Pertuzumab。选定的制剂具有低混浊度,并且在物理和化学上是稳定的。从该制剂中去除氯离子以减少溶蚀的危险。该制剂是等渗的,并且适于皮下或肌肉内递送。利用组氨酸-醋酸盐和蔗糖制剂防止振荡(agitation stress)后形成不可溶的聚集物,无需包括聚山梨醇酯20。

[0424] 分析方法

[0425] 颜色,外观和澄清度(CAC)

[0426] 在室温白色荧光下通过相对于白色和黑色背景肉眼观察小瓶来测定样品的颜色,外观和澄清度。

[0427] UV浓度测量

[0428] 首先将液体产品用制剂缓冲液稀释从而使278nm附近的A_{max}为0.5-1.0吸光度单位。在HP 8453分光光度计上在1cm径长的石英杯中测量经稀释样品的UV吸光度。测量278nm和320nm的吸光度。将来自320nm的吸光度用于校正由于较大聚集物、泡沫和颗粒造成的背景光散射。相对于制剂缓冲液将测量调零。利用1.50(mg/mL)-1cm-1的吸收率来测定蛋白质浓度。

[0429] pH测量

[0430] 利用RADIOMETER COPENHAGEN PHM82™ pH计于室温测量pH。所用的探测器是与放射计连接器相组合的玻璃/参照电极(Sigma, Cat#E-5759)。使用pH 4.01和pH 7.00(EM Science)的标准溶液来校准所述pH计。

[0431] 离子交换层析(IEX)

[0432] 采用阳离子交换层析测量电荷变量的改变。这种测定采用在HP 1100™HPLC系统上的DIONEX PROPAC WCX-10™柱。用包含20mM MES pH 6.0的流动相A将样品稀释到1mg/mL。随后将50mL的经稀释样品加载到保持环境温度的柱上。利用包含20mM MES, 250mM NaCl, pH 6.0的流动相B以浅NaCl梯度洗脱峰。于280nm监测洗脱物。利用HP CHEMSTATION™软件(Rev A08.03)分析数据。

[0433] 毛细管区带电泳(CZE)

[0434] 通过CZE测定Fab和F(ab')₂片段的纯度。将这一测定在BIORAD BIOFOCUS™ 3000™毛细管电泳系统上以BIOCAP XL™毛细管,50 μm I.D., 44.6cm全长,和距离检测仪40cm的

条件跑电泳。

[0435] 大小排阻层析 (SEC)

[0436] 使用大小排阻层析来量化聚集物和片段。这种测定利用 TSK G3000SWXL™, 7.8x300mm 柱并在 HP 1100™ HPLC 系统上运行。用流动相将样品稀释到 10mg/mL 并且注射体积为 20 μL。流动相为 pH 6.8 的 100mMK₂HPO₄ 并且用等度梯度以 0.5mL/min 将蛋白质洗脱 45 分钟。于 280nm 监测洗脱物的吸光度。利用 HP CHEMSTATION™ 软件 (Rev A08.03) 进行整合。

[0437] 生物学活性

[0438] 通过测量其抑制人乳癌细胞系 MDA-MB-175-VII 的增殖的能力来测定 Pertuzumab 的生物学活性。

[0439] 实施例 1

[0440] 在下列缓冲液条件中以 1.0mg/mL 的蛋白质浓度来配制 Pertuzumab Fab 和 F(ab')₂ 抗体片段：

[0441] 10mM 柠檬酸盐, 140mM NaCl, pH 4.0；

[0442] 10mM 琥珀酸盐, 140mM NaCl, pH 5.0；

[0443] 10mM 琥珀酸盐, 140mM NaCl, pH 6.0；

[0444] 10mM 组氨酸, 140mM NaCl, pH 7.0；和

[0445] 10mM 甘氨酸 (glycylglycine), 140mM NaCl, pH 8.0。

[0446] 过滤每种制剂并等分到 3cc WHEATON™ USP I 型玻璃瓶中, 所述玻璃瓶用涂布 TEFLON™ 的灰色丁基合成橡胶塞子封口。将样品保藏于 40±2℃。药物产品的稳定性分析显示 Fab 和 F(ab')₂ 在 pH 5.0 和 6.0 之间最稳定。

[0447] 表 2. pH 对保存于 40C 的 Fab 或 F(ab')₂ 的降解的效应

[0448]

制剂 Ph	Fab		F(ab') ₂	
	CZE	SEC	CZE	SEC
	%主峰	%主峰	%主峰	%主峰
4.0	74.1	96.7	43.6	89.4
5.0	83.2	96.4	65.4	94.0
6.0	82.9	96.2	69.0	92.3
7.0	83.9	96.4	62.3	91.3
8.0	72.7	96.4	49.2	89.8

[0449] 实施例 2

[0450] 用 120mM 蔗糖和 0.02% 聚山梨醇酯 20 将 Pertuzumab 配制到 20mM 组氨酸 - 醋酸盐缓冲液中。用醋酸将制剂的 pH 调节到 5.0 和 7.0 之间的最终 pH。蛋白质浓度为 30mg/mL。将每种制剂填充入 3cc USP I 型玻璃瓶中并保存于 40℃ 进行稳定性分析。结果显示 Pertuzumab 在 pH 6.0 左右最稳定。

[0451] 表 3. pH 对保存于 40C 的 Pertuzumab 的降解的影响

[0452]

制剂 pH	温度 (°C)	保存时间 (wks)	SEC %单体	IEX %主峰
5.0	40	2	99.4	57.4
5.5	40	2	99.4	59.2
6.0	40	2	99.4	60.6
6.5	40	2	99.3	60.5
7.0	40	2	99.1	54.0
5.0	40	4	97.3	48.1
5.5	40	4	99.1	50.5
6.0	40	4	99.1	53.3
6.5	40	4	99.0	52.3
7.0	40	4	98.6	42.3

[0453] 实施例 3

[0454] 在下列赋形剂中制备蛋白质浓度为 100mg/mL 的 Pertuzumab 制剂：

[0455] (1) 10mM 组氨酸-HCl, 240mM 蔗糖, 0.02% 聚山梨醇酯 20, pH 6.0；

[0456] (2) 10mM 组氨酸-醋酸盐 (histine-acetate), 240mM 蔗糖, 0.02% 聚山梨醇酯 20, pH 6.0；

[0457] (3) 10mM 组氨酸-磷酸盐 (histine-phosphate), 240mM 蔗糖, 0.02% 聚山梨醇酯 20, pH 6.0；

[0458] (4) 10mM 组氨酸-硫酸盐 (histine-sulfate), 240mM 蔗糖, 0.02% 聚山梨醇酯 20, pH 6.0。

[0459] 将每种制剂填充入 3cc FORMA VITRUM™ USPI 型玻璃瓶, 所述玻璃瓶用 FLUROTEC™ 面 (faced) 的丁基橡皮塞子封口。将样品保存于 30℃ 和 40℃ 并对稳定性评估质量 (CAC) 和纯度 (SEC, IEC)。稳定性结果显示于 40℃ 保存后组氨酸-磷酸盐缓冲液中的 Pertuzumab 比在其它组氨酸缓冲液中降解得快得多 (图 8 和图 9)。

[0460] 实施例 4

[0461] 在下列缓冲液中通过超滤 / 渗滤将 Pertuzumab 浓缩至各种浓度：

[0462] (1) 20mM 组氨酸-醋酸盐, pH 6.0；

[0463] (2) 10mM 组氨酸-HCl, pH 6.0, 和

[0464] (3) 10mM 组氨酸-硫酸盐, pH 6.0。

[0465] 在过滤前测量每种制剂的浊度。结果, 如图 10 中所示, 表明在组氨酸-醋酸盐和组氨酸-HCl 中配制的 Pertuzumab 样品比在组氨酸-硫酸盐缓冲液中的样品具有更少量的不溶性聚集物。

[0466] 实施例 5

[0467] Pertuzumab 以 30mg/mL 配制在 20mM 组氨酸 - 醋酸盐, 120mM 蔗糖, 0.02% 聚山梨醇酯 20, pH 6.0 中。将 Pertuzumab 填充在 316L 和 HASTELLOY™ 不锈钢微型罐中。将所有样品保存于 -20℃ 和 5℃ 并评估质量 (CAC), 纯度 (SEC, IEC) 和强度 (UV-Vis)。稳定性分析显示 Pertuzumab 在这种制剂中于 -20℃ 和 5℃ 保存至少 3 个月是稳定的。无氯化物的制剂与 316L 和 HASTELLOY™ 不锈钢罐是相容的。

[0468] 表 4. 在不锈钢罐中 Pertuzumab 的稳定性

[0469]

罐	温度 (°C)	时间 (个月)	CAC	UV Spec. (mg/mL)	SEC (%单体)	IEC (%主峰)
		0	通过 ^a	29.0	99.8	67.9
316L	-20	3	通过	28.9	99.7	66.8
	5	3	通过	28.7	99.7	66.8
HASTELLOY ™	-20	3	通过	29.1	99.7	66.8
	5	3	通过	28.8	99.7	67.7

[0470] a. 颜色, 外观和透明度的通过: 澄清到微乳白色, 无色到浅黄色溶液。

[0471] 实施例 6

[0472] 利用切流过滤 (TFF) 来配制 Pertuzumab。最终的制剂包含 20mM 组氨酸 - 醋酸盐, 120mM 蔗糖, 0.02% 聚山梨醇酯 20, pH 6.0, 蛋白质浓度为 30mg/mL。将样品填充入 20M1FORMA VITRUM™ USP I 型玻璃瓶, 所述玻璃瓶盖用 20mm FLUROTEC™ 面的丁基橡皮塞子加帽, 并以铝片盖封口。将所有样品保存于 -70℃, 5℃, 15℃, 并通过质量 (CAC), 纯度 (SEC, IEC), 强度 (UV-Vis), 和势能 (Bio 测定) 评估稳定性。结果显示 Pertuzumab 在这种制剂中于 5℃ 和 15℃ 保存至少 3 个月是稳定的。

[0473] 表 5. 在玻璃瓶中的 Pertuzumab 的稳定性

[0474]

Temp (°C)	时间 (月)	CAC	UV Spec. (mg/mL)	SEC (%单体)	IEC (%主峰)	Bio 测定 (%比活性)
	0	通过	29.2	99.8	64.1	83
-70	1	通过	29.7	99.8	65.2	92
	3	通过	30.7	99.8	67.0	93
5	3	通过	30.4	99.7	67.2	90
15	1	通过	29.7	99.7	64.4	78
	3	通过	30.4	99.7	65.5	93

[0475] 实施例 7

[0476] 在下列缓冲液条件中配制 100mg/mL 的 Pertuzumab :

[0477] (1) 10mM 组氨酸 -HCl, pH 6.0 ;

[0478] (2) 10mM 组氨酸 -HCl, 240mM 蔗糖, pH 6.0 ;

[0479] (3) 20mM 琥珀酸盐 pH 6.0 ;和

[0480] (4) 20mM 琥珀酸盐, 240mM 蔗糖 pH 6.0.

[0481] 将每种制剂添加以不同浓度的聚山梨醇酯 20。将所有样品填充入 3ccUSP I 型玻璃瓶中并于室温以 70rpm 水平搅动达 7 天。在第 7 天时间点上就浊度方面评估每个样品的稳定性。结果表明在最终的制剂中使用聚山梨醇酯 20 有效防止了不溶性聚集物的形成。参见图 11。

[0482] 实施例 8

[0483] 在下列制剂中制备 Pertuzumab :

[0484] (1) 25mg/mL Pertuzumab, 10mM 组氨酸 -HCl, 240mM 蔗糖, pH 6.0 ;

[0485] (2) 50mg/mL Pertuzumab, 10mM 组氨酸 -HCl, 240mM 蔗糖, pH 6.0 ;

[0486] (3) 60mg/mL Pertuzumab, 20mM 组氨酸 - 醋酸盐, 120mM 蔗糖, pH 6.0.

[0487] 将各种量的聚山梨醇酯 20 添加到每种制剂中。将所有样品填充入 3ccUSP I 型玻璃瓶中, 并于室温以 70rpm 水平搅动达 7 天。在第 7 天时间点上就浊度方面评估每个样品的物理稳定性。结果表明使用组氨酸 -HCl 和蔗糖制剂中的聚山梨醇酯 20 有效防止了不溶性颗粒的形成。包含组氨酸 - 醋酸盐和蔗糖的制剂对于蛋白质似乎具有与聚山梨醇酯 20 相同的保护性作用。参见图 12。

[0488] 实施例 9

[0489] 如下配制 Pertuzumab :

[0490] (1) 100mg/mL 蛋白质, 10mM 组氨酸 -HCl, pH 6.0 ;

[0491] (2) 100mg/mL 蛋白质, 20mM 琥珀酸盐, pH 6.0 ;

[0492] (3) 60mg/mL 蛋白质, 20mM 组氨酸 - 醋酸盐, pH 6.0。

[0493] 将每种制剂混合以不同量的蔗糖。将所有样品无菌装入 3cc USP I 型玻璃瓶中。随后将它们冷冻于 -70°C 并于 5°C 融解三次。在三个周期的冻融之后测定每个样品的物理稳定性。结果表明蔗糖防止在冻融过程中形成可溶性聚集物。参见图 13。

[0494] 实施例 10

[0495] 用于治疗性用途的优选的 Pertuzumab 制剂基本上由 20mM 组氨酸醋酸盐、120mM 蔗糖、0.02% 聚山梨醇酯 20、pH 6.0 中的 30mg/mL Pertuzumab 组成。

[0496]

化合物	浓度	量/L
Pertuzumab	30 mg/mL	30 g
L-组氨酸 MW=155.16g/mol	20 mM	3.10 g
冰醋酸 MW=60.05g/mol 密度=1.05g/cm ³	11.6 mM	0.66 mL
蔗糖 MW=342.3g/mol	120 mM	41.1 g
聚山梨醇酯 20 密度=1.012g/cm ³	0.02% (w/v)	0.2 mL

[0497] MW :分子量

[0498] 420mg 剂量瓶配置 :

[0499] 小瓶 :20cc Formal Vitrum Type I glass

[0500] 塞子 :20mm DAIKYO GREY™, 氟 - 树脂压制

[0501] 帽 :20mm 顶部铝片

[0502] 满装体积 :14. 50mL

[0503] 递送物 :生理盐水 IV 袋中的 14. 0mL Pertuzumab.

[0504] 1050mg 剂量瓶配置 :

[0505] 小瓶 :50cc Formal Vitrum Type I glass

[0506] 塞子 :20mm DAIKYO GREY™, 氟 - 树脂压制

[0507] 帽 :20mm 顶部铝片

[0508] 满装体积 :36. 0mL

[0509] 递送物 :生理盐水 IV 袋中的 35. 0mL Pertuzumab.

[0510] 实施例 11

[0511] 本实施例涉及另一种 Pertuzumab 制剂,其已经用于 I 期和 II 期临床试验。该组合物由 25mg/ml Pertuzumab,10mM 组氨酸-HCl 缓冲液,240mM 蔗糖,0. 02%聚山梨醇酯 20, pH 6. 0 组成。

[0512]

成分	浓度
Pertuzumab	25mg/ml
L-His HCl.H ₂ O (MW 209. 6)	1. 12mg/ml (0. 0125M)

L-His (MW 155.2)	0.72mg/ml (0.0099M)
蔗糖 (MW342.3)	82.15mg/ml (0.240M)
聚山梨醇酯 20	0.2mg/ml (0.02%)

[0513] 实施例 12

[0514] 细胞凋亡由内在和外途径介导。化疗可以引发细胞损害并且可能通过响应细胞损害的内在途径而促进凋亡。不过，癌细胞经常通过在 p53 肿瘤抑制剂基因中的突变形成对化疗的抗性 (Ashkenazi A.Targeting Death andDecoy Receptors ofthe Tumour-Necrosis Factor Superfamily.Nature Reviews2 :420-430(2002))。位于细胞表面上的死亡受体,如 DR4 和 DR5,通过不包括 p53 的外途径促进凋亡。激动性分子,如 Apo2L,结合 DR4 和 DR5 受体并通过 Fas- 关联的死亡结构域激活胱天蛋白酶 (caspase) 8 和 10。胱天蛋白酶 8 和 10 随后激活胱天蛋白酶 3,6,和 7 以诱导凋亡。肿瘤细胞上的死亡受体的分子信号对于消除耐受传统疗法和分子像 Apo2L 的癌细胞有治疗性效力,目前正对其进行临床评估。

[0515] “Apomab”是全长 CH0 衍生的人源化 IgG1,构建有 λ 轻链。它是针对 DR5 的激动剂抗体,其已经显示诱导各种癌细胞系的凋亡。利用鼠肿瘤植入模型的临床前研究已经显示 Apomab 与 Apo2L 相比具有类似或增强的肿瘤减小作用。正在将 Apomab 作为抗癌剂进行评估,其用于晚期实体肿瘤和非 Hodgkin 氏淋巴瘤 (NHL) 中。用在这些实验中的 Apomab 的重和轻链氨基酸序列显示在图 27 和 28 中。

[0516] 抗体制剂的制备

[0517] 重组产生的 Apomab 具有非常稀的蛋白质浓度和高 pH。将所述材料浓缩到大约 20mg/mL 并利用 Millipore Labscale 切流过滤 (TFF) 系统以 MILLIPORE PELLICON™ XL, PLGC10,50cm 膜交换入 20mM 醋酸钠,pH 5.0 缓冲液中。利用没有海藻糖和 TWEEN 20®的醋酸钠,组氨酸醋酸盐,和磷酸钠将 Apomab 样品配制入各种缓冲液系统中,pH 从 4.0 到 7.0,利用 10,000Da 分子量隔绝膜 (Pierce, Inc) 进行透析。在最后的透析中添加 240mM 的海藻糖。透析后,向制剂中加入 0.02% TWEEN 20™并用 0.22 μ m 滤器 (Millipore, Inc.) 过滤样品。将 0.5mL 体积的 Apomab 装入无菌 3cc 玻璃瓶 (Forma Vitrum, Inc.) 中并以 13mm 塞子 (Daikyo, Inc) 封闭。在 -70℃,5℃,30℃,和 40℃保存达 3 个月来评估蛋白质稳定性。

[0518] Apomab 制剂的稳定性

[0519] 对于药物产品稳定性测试,将 Apomab 配剂品装入 5cc FORMA VITRUM®玻璃瓶中。使小瓶装填 5.5mL 的配制抗体,用 20mm DAIKYO®塞子封闭,并以头朝上的位置保存于 -70℃,5℃,30℃,和 40℃。

[0520] 对于药物物质稳定性测试,将 Apomab 配剂品通过 0.22 μ m 滤器进行无菌过滤并将 10mL 装入高压蒸汽处理过的 20cc 316L 不锈钢小罐。将小罐头朝上竖直放置于 -20℃和 5℃。于规定的时间间隔从小罐中无菌移取 1mL 等份试样以评估蛋白质质量。对照小瓶为保存于 -20℃中的 3cc 玻璃瓶中的 1mL 等份试样。

[0521] 颜色,外观和澄清度

[0522] 在室温白色荧光下利用白色和黑色背景的观察台来肉眼评估样品的澄清度,外观

和颜色。为了分析药物物质,将小罐样品转移至 3cc 玻璃小瓶中进行检查。

[0523] pH

[0524] 以用来测量缓冲液的 THERMO ORION SURE-FLOW ROSS™ 半微 pH 电极或用来测量蛋白质 pH 筛选样品的 THERMO ORION GLS™ 组合微 pH 电极,用于毒理学稳定性样品的 Beckman 微电极在室温测量 pH。用 pH 7 和 pH 4 的缓冲液标准 (EM Science) 每天校准 METERLAB™ pHM240pH/ 离子仪 (Radiometer Analytical)。

[0525] 浓度

[0526] 利用 AGILENT 8453™ 分光光度计通过紫外线吸收光谱来测定蛋白质浓度。以合适的空白制剂缓冲液来稀释样品以给出从 0.5 到 1.0 的吸光度。用稀释溶液将仪器调零并从 240 到 500nm 扫描光谱。从 279nm 纳米处的吸光度减去 320nm 纳米处的吸光度值以纠正偏移和光散射。通过下列等式来计算蛋白质浓度:

[0527]

$$\text{浓度(mg/mL)} = \frac{(\text{A}_{279} - \text{A}_{320}) \times \text{稀释因子}}{\text{吸收率系数 cm}^{-1}(\text{mg/mL})^{-1}}$$

[0528] 最初将基于序列的吸收率系数测定为 $1.32\text{cm}^{-1}(\text{mg/mL})^{-1}$ 并将这个值用于 pH 筛选研究。通过氨基酸分析和蛋白质水解法测定的后来的值为 $1.7\text{cm}^{-1}(\text{mg/mL})^{-1}$ 并且将这个值用于用在毒理学研究中的 Apomab 的稳定性分析。

[0529] 离子交换层析

[0530] 在装备了二极管阵列检测器的 1100 系列 HPLC (Agilent Technologies, Inc.) 上进行离子交换层析。在 PROPAC WCX-10™ (Dionex) 柱 (4x 250mm) 上以 0.5mL/min 的流速,柱温度 40℃ 进行层析。流动相 A 为 25mM 磷酸钠, pH 6.5。流动相 B 为 100mM 氯化钠, 与流动相 A 在相同的缓冲液中。用 100% 流动相 A 平衡柱。对于 pH 筛选样品将 20mg 量的 Apomab 加到柱上并于 214nm 监测吸光度。以下列梯度将蛋白质从柱上洗脱下来:

[0531] 时间 (min) % A % B

[0532]	0	100	0
[0533]	50	0	100
[0534]	51	100	0
[0535]	70	100	0

[0536] 对于用在毒理学研究中的物质的稳定性分析,将 30mg 量的 Apomab 加到柱上并于 280nm 监测吸光度。以下列梯度将蛋白质从柱上洗脱下来:

[0537] 梯度: 时间 (min) % A % B

[0538]	0	100	0
[0539]	40.0	40	60
[0540]	41.0	0	100
[0541]	45.0	0	100
[0542]	45.1	100	0
[0543]	60.0	100	0

[0544] 大小排阻层析

[0545] 在装备了二极管阵列检测器的 1100 系列 HPLC (Agilent Technologies, Inc.) 上

进行大小排阻层析。将 50 μ g 量的 Apomab 加到 TSK 凝胶 3000SWXL™ (7.8x 300mm) 柱上并对 pH 筛选样品以 0.9mL/min 的流速运行 20 分钟,而对毒理学稳定性样品以 0.5mL/min 的流速运行 30 分钟,以 0.20M 磷酸钾,0.25M 氯化钾,pH 6.2 作为流动相。于 280nm 监测吸光度。

[0546] 效能

[0547] 效能生物测定的目的是利用 ALAMARBLUE™ 测量 Apomab 杀伤 Colo205 细胞的能力。Colo205 是一种结肠癌细胞系,它表达 DR5 和 DR4 死亡受体。这种测定包括基于代谢活性检测的荧光/比色生长指示剂。ALAMARBLUE™ 是一种氧化还原染料,它在氧化状态是蓝色和非荧光性的。细胞内代谢还原作用将它转变成红色,这种红色也是荧光性的。颜色和荧光的改变与活体细胞的代谢活性和数目成比例。当细胞死亡时信号降低。用抗 Fc 将 Apomab 稀释在培养基中,随后将 Colo 205 细胞加入到 Apomab 样品中,于 37℃ 温育 48 小时。最后 2-3 小时加入 ALAMARBLUE™。于 530nm 激发和 590nm 发射读取培养板以得到相对荧光单位 (RFU)。通过 KALEIDAGRAPH™ 分析数据。生成杀伤的稀释曲线。

[0548] 结果

[0549] 制剂 pH 筛选研究

[0550] 利用由未增殖的稳定细胞系产生的 Apomab 研究 pH 对抗体稳定性的作用。对于这种分析,将 Apomab 以 20mg/mL 抗体配制在 20mM 醋酸钠缓冲液中,pH 4.0,4.5,5.0,5.5;20mM 组氨酸醋酸盐缓冲液中,pH 6.0 和 6.5;和 20mM 磷酸钠缓冲液中,pH 7.0。所有制剂都包含 240mM 海藻糖和 0.02% TWEEN 20®。将制剂于 -70℃,5℃,30℃,和 40℃ 的温度保存达 3 个月,并通过各种分析测定法,包括 CAC,pH,浓度,SEC 和 IEC 来测定蛋白质稳定性。在样品保存过程中没有观察到 CAC,pH 或蛋白质浓度的显著变化。

[0551] 通过 SEC 分析样品显示在 5℃ 和 -70℃ 保存期间没有发生显著的变化。不过,在 30℃ 和 40℃ 保存期间观察到了降解,其表现抗体片段和可溶性的聚集物的形成 (图 20)。为了比较制剂,监测保存期间抗体单体的动力学并且计算一级速率常数。对于抗体单体损失所获得的 pH 速率曲线显示在图 21 中。通过在 pH 6.0 的组氨酸醋酸盐缓冲液中配制而获得了对于抗体单体稳定性的最佳条件。

[0552] 通过 IEC 监测 Apomab 电荷异质性。在 5℃ 和 -70℃ 保存期间没有发生 IEC 曲线的显著变化。不过,观察到了降解,其表现根据制剂的不同而形成了酸性或碱性的变体 (图 22)。通常,增强碱性的变体在较低的制剂 pH 下形成而更酸性的变体在较高的制剂 pH 下形成。为了比较制剂,在保存期间监测 IEC 主峰的动力学并计算一级速率常数。对于 IEC 主峰损失所获得的 pH 速率曲线显示在图 23 中。通过 IEC 观察到的速率常数比由 SEC 观察到的常数高大约 10 倍 (图 21)。所以,IEC 主峰的损失是抗体的初步降解,其将最终限制产品的保存期。另外,通过 SEC 观察到,通过在 pH 6.0 的组氨酸醋酸盐缓冲液中配制而获得了稳定 IEC 主峰的最佳抗体稳定性。

[0553] 在上述 pH 筛选数据的分析之后,选择 Apomab 制剂,其包含 20mM 组氨酸醋酸盐,240mM 海藻糖,0.02% 聚山梨醇酯 20,pH 6.0 中的 20mg/mL 抗体。对于药物产品,药瓶配置包括装在 5cc FORMAVITRUM™ 小瓶中的 5.5mL,所述小瓶带有 20mM DAIKYO™ West 塞子。将 Apomab 保存在不锈钢罐中。

[0554] 在上述 5cc 玻璃瓶配置中评估 Apomab 药物产品的稳定性。将小瓶保存

于 -70℃ (对照), 5℃, 30℃, 和 40℃。于特定的时间间隔抽取样品并通过下列测定进行分析: 颜色, 外观, 澄清度 (CAC), pH, 蛋白质浓度, SEC, IEC, 和效能。保存于 -70℃ 和 5℃ 的样品的这些测定结果显示在表 6 中, 而保存于 30℃ 和 40℃ 的样品的结果显示在表 7 中。

[0555] 表 6. 保存于 -70℃ 和 5℃ 的 Apomab 的稳定性数据

[0556]

Temp (°C)	时间点	澄清度	颜色	pH	浓度 (mg/mL)	SEC (%单体)	IEC (%主峰)	效能 (%比活性)
6.0								
接受标准:		报告	报告	± 0.3	20 ± 2	> 95%	报告	60 - 140%
NA	T=0	澄清	无色	5.9	20.2	99.8	63	94
-70	1 月	澄清	无色	6.0	20.5	99.8	63	86
-70	2 月	澄清	无色	6.0	20.4	99.7	64	91
-70	3 月	澄清	无色	6.0	20.5	99.7	63	83
-70	6 月	澄清	无色	6.0	20.4	99.7	64	85
-70	9 月	澄清	无色	6.0	20.4	99.8	65	89
-70	12 月	澄清	无色	6.0	20.8	99.7	63	107
5	1 月	澄清	无色	6.0	20.5	99.7	63	89
5	2 月	澄清	无色	6.0	20.4	99.7	64	99
5	3 月	澄清	无色	6.0	20.6	99.7	63	84
5	6 月	澄清	无色	6.0	20.5	99.7	64	93
5	9 月	澄清	无色	6.0	20.6	99.7	64	88
5	12 月	澄清	无色	6.0	20.7	99.6	64	106

[0557] 表 7. 保存于 30C 和 40C 的 Apomab 的稳定性数据

[0558]

Temp (°C)	时间点	澄清度	颜色	pH	浓度 (mg/mL)	SEC (%单体)	IEC (%主峰)	效能 (%比活性)
接受标准:		报告	报告	6.0 ± 0.3	20 ± 2	> 95%	报告	60 - 140%
30	1 月	澄清	无色	6.0	20.6	98.2	59	91
30	2 月	澄清	无色	6.0	20.3	97.4	54	80
30	3 月	澄清	无色	6.0	20.6	97.2	49	74
30	6 月	澄清	无色	6.0	20.2	94.1	37	51
30	9 月	澄清	浅黄	6.0	20.4	93.2	31	55
30	12 月	澄清	浅黄	6.0	20.6	91.6	25	59
40	1 月	澄清	无色	6.0	20.4	96.6	44	79
40	2 月	澄清	无色	6.0	20.0	93.7	31	64
40	3 月	澄清	浅黄	5.9	20.3	91.5	22	53
40	6 月	澄清	浅黄	6.0	20.2	83.9	NT	26
40	9 月	澄清	黄色	5.9	20.3	78.8	NT	25
40	12 月	澄清	黄色	5.9	20.5	71.4	NT	31

[0559] NT = 未定量

[0560] 在 -70°C 和 5°C 下保存 12 个月后没有观察到蛋白质质量的变化。例如, pH 保持在 6.0 ± 0.3, Apomab 呈现为澄清和无色液体, 蛋白质浓度保持在 20.0 ± 2.0 mg/mL, 并且 % 单体未改变。另外, % IEC 主峰没有显著变化而通过细胞杀伤效能测定确定的 % 比活性在 60% 到 140% 比活性的测定精度内。结果显示保存在 5cc 玻璃瓶中的 Apomab 在 5°C 稳定至少 12 个月。

[0561] 表 7 显示蛋白质质量的改变发生在 30°C 和 40°C。SEC 显示 % 单体降低, 伴随着主要为片段的物质的增多。聚集物与更高温度的情况一样增多, 但速率低得多。不过, 聚集物在 40°C、6 个月后明显增多。IEC % 主峰降低, 伴随着酸性变体的相应增多。在 40°C、2 个月和 30°C、9 个月后碱性峰稍微降低。在 40°C 保存六个月后, 降低发生到 IEC 主峰不再能整合的程度。细胞杀伤生物测量显示在较高温度下较长的保存时间导致 % 比活性的损失。蛋白质浓度和 pH 未改变。溶液在 40°C、3 个月和 30°C、9 个月后变得浅黄并且在 40°C、9 个月后变成黄色。

[0562] 药物物质稳定性

[0563] 药物物质的冻融稳定性数据显示在表 8 中。

[0564] 表 8. 装在小型不锈钢罐中的 Apomab 的冻融稳定性数据

[0565]

Temp(°C)	冻融				浓度	SEC
(冻/融)	循环数	澄清度	颜色	pH	(mg/mL)	(%单体)
接受标准:		报告	报告	6.0 ± 0.3	20.0 ± 2.0	95%
对照(未冷冻)	0	澄清	无色	6.0	20.9	99.6
-20/25	1	澄清	无色	6.0	20.8	99.6
-20/25	2	澄清	无色	6.0	20.8	99.6
-20/25	3	澄清	无色	6.0	20.9	99.6

[0566] 表 9. 装在小型不锈钢罐中的 Apomab 的稳定性数据

[0567]

Temp					浓	度	SEC	IEC	效能
(°C)	时间点	澄清度	颜色	pH	(mg/mL)	(%单体)	(%主峰)	(%比活性)	
接受标准:		报告	报告	6.0 ± 0.3	20 ± 2	> 95%	报告	60 – 140%	
NA	T=0	澄清	无色	5.9	20.0	99.7	63	88	
-20	1 月	澄清	无色	6.0	20.6	99.7	63	107	
-20	3 月	澄清	无色	6.0	20.6	99.7	63	82	
-20	6 月	澄清	无色	6.0	20.3	99.7	64	92	
-20	9 月	澄清	无色	6.0	20.6	99.7	64	92	
-20	12 月	澄清	无色	6.0	21.2	99.7	65	94	
5	1 月	澄清	无色	6.0	20.5	99.7	62	95	
5	3 月	澄清	无色	6.0	20.7	99.6	62	71	
5	6 月	澄清	无色	6.0	20.4	99.5	62	84	
5	9 月	澄清	无色	6.0	20.8	99.4	61	84	
5	12 月	澄清	无色	6.0	21.3	99.2	59	82	

[0568] 在 -20°C 冷冻至少 15 小时并在环境温度下融解三次之后没有观察到蛋白质的化学特性显著改变。例如, Apomab 呈现为澄清和无色液体, pH 保持在 6.0 ± 0.3, 而 SEC 单体峰百分比未改变。

[0569] 在 -20°C 和 5°C 评估不锈钢容器中的 Apomab 稳定性 (表 9)。

[0570] 于特定的间隔、在无菌条件下从小罐中抽取样品并进行分析。

[0571] 就 pH, CAC, 蛋白质浓度和通过 IEC 获得的 % 主峰而言, Apomab 未显示蛋白质质量的改变, 但通过 SEC 可知每 3 个月损失 0.1% 的单体。在 5°C 保存 3 个月期间观察到效力降

低。不过,样品的效力在 6 个月和 9 个月的时间点再次提高。所以,在 3 个月时间点的效力差异被归结为测定偏差。通过 pH, CAC, 蛋白质浓度, SEC 得到的%单体, IEC 得到的%主峰, 可见 Apomab 未显示蛋白质质量的改变, 并且效力没有明显改变。稳定性数据显示 Apomab 在 -20℃ 稳定至少 1 年而在 5℃ 稳定三个月。

[0572] 结论

[0573] 进行制剂筛选研究以选择 Apomab 制剂。利用醋酸钠, 组氨酸醋酸盐, 和磷酸钠, 与 240mM 二水海藻糖和 0.02% 聚山梨醇酯 20 一起作为缓冲液, pH 范围覆盖了 4.0 到 7.0 的 pH 筛选显示, Apomab 在 pH 6.0 的溶液中最稳定。所以, 开发了由 20mM 组氨酸醋酸盐, 240mM 海藻糖, 0.02% 聚山梨醇酯 2, pH 6.0 组成的制剂, 并且通过实验证明是稳定的。利用这种制剂, 显示 Apomab 在 5℃ 稳定至少 12 个月。另外, 当保存在 316L 不锈钢容器中时, 显示 Apomab 在 -20℃ 稳定至少 12 个月而在 5℃ 稳定三个月。当进行多达 3 次冻融循环时还显示 Apomab 是稳定的。

[0001]

序列表

<110> 健泰科生物技术公司 (GENENTECH, INC.)

ANDYA, JAMES
GWEE, SHIANG C.
LIU, JUN
SHEN, YE

<120> 组氨酸 醋酸盐缓冲液中的抗体制剂

<130> P2104R1 PCT

<140> PCT/US2005/037471

<141> 2005-10-19

<150> US 60/620,413

<151> 2004-10-20

<160> 74

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 1

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

Ile Lys

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 2

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

Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser
				110					115				

[0002]

<210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30
 Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys

<210> 4
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 4
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
 95 100 105
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 5
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 20 25 30

[0003]

```

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

```

<210> 6
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

```

<400> 6
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
  1              5              10              15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
      20              25
Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
      35              40              45
Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
      50              55              60
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
      65              70              75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
      80              85              90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu
      95              100             105
Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      110             115

```

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的.

<220>
 <221> Xaa
 <222> 10
 <223> Xaa 优选为 D 或 S

```

<400> 7
Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Xaa
      5              10

```

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

```

<400> 8
Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
  1              5              10              15

```

[0004]

Lys Gly

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 9
Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr
5 10

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 10
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala
5 10

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的.

<220>
<221> Xaa
<222> 5
<223> Xaa 优选为 R 或 L

<220>
<221> Xaa
<222> 6
<223> Xaa 优选为 Y 或 E

<220>
<221> Xaa
<222> 7
<223> Xaa 优选为 T 或 S

<400> 11
Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa
5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 12
Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr
5

<210> 13
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 13
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn

[0005]

	20	25	30
Thr Ala Val Ala Trp	Tyr Gln Gln Lys Pro	Gly Lys Ala Pro	Lys
35	40	45	
Leu Leu Ile Tyr Ser	Ala Ser Phe Leu Tyr	Ser Gly Val Pro	Ser
50	55	60	
Arg Phe Ser Gly Ser	Arg Ser Gly Thr Asp	Phe Thr Leu Thr	Ile
65	70	75	
Ser Ser Leu Gln Pro	Glu Asp Phe Ala Thr	Tyr Tyr Cys Gln	Gln
80	85	90	
His Tyr Thr Thr Pro	Pro Thr Phe Gly Gln	Gly Thr Lys Val	Glu
95	100	105	
Ile Lys Arg Thr Val	Ala Ala Pro Ser Val	Phe Ile Phe Pro	Pro
110	115	120	
Ser Asp Glu Gln Leu	Lys Ser Gly Thr Ala	Ser Val Val Cys	Leu
125	130	135	
Leu Asn Asn Phe Tyr	Pro Arg Glu Ala Lys	Val Gln Trp Lys	Val
140	145	150	
Asp Asn Ala Leu Gln	Ser Gly Asn Ser Gln	Glu Ser Val Thr	Glu
155	160	165	
Gln Asp Ser Lys Asp	Ser Thr Tyr Ser Leu	Ser Ser Thr Leu	Thr
170	175	180	
Leu Ser Lys Ala Asp	Tyr Glu Lys His Lys	Val Tyr Ala Cys	Glu
185	190	195	
Val Thr His Gln Gly	Leu Ser Ser Pro Val	Thr Lys Ser Phe	Asn
200	205	210	
Arg Gly Glu Cys			
<210> 14			
<211> 449			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 序列是合成的			
<400> 14			
Glu Val Gln Leu Val	Glu Ser Gly Gly Gly	Leu Val Gln Pro	Gly
1	5	10	15
Gly Ser Leu Arg Leu	Ser Cys Ala Ala Ser	Gly Phe Asn Ile	Lys
20	25	30	
Asp Thr Tyr Ile His	Trp Val Arg Gln Ala	Pro Gly Lys Gly	Leu
35	40	45	
Glu Trp Val Ala Arg	Ile Tyr Pro Thr Asn	Gly Tyr Thr Arg	Tyr
50	55	60	
Ala Asp Ser Val Lys	Gly Arg Phe Thr Ile	Ser Ala Asp Thr	Ser
65	70	75	
Lys Asn Thr Ala Tyr	Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu	Asp
80	85	90	
Thr Ala Val Tyr Tyr	Cys Ser Arg Trp Gly	Gly Asp Gly Phe	Tyr
95	100	105	
Ala Met Asp Tyr Trp	Gly Gln Gly Thr Leu	Val Thr Val Ser	Ser
110	115	120	
Ala Ser Thr Lys Gly	Pro Ser Val Phe Pro	Leu Ala Pro Ser	Ser
125	130	135	
Lys Ser Thr Ser Gly	Gly Thr Ala Ala Leu	Gly Cys Leu Val	Lys
140	145	150	

[0006]

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala	155	160	165
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser	170	175	180
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser	185	190	195
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser	200	205	210
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys	215	220	225
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	245	250	255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser	260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn	290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	305	310	315
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	320	325	330
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	335	340	345
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu	350	355	360
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe	365	370	375
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	380	385	390
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly	395	400	405
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	410	415	420
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu	425	430	435
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly	440	445	

<210> 15

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 15

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

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

Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys	35	40	45
---	----	----	----

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser	50	55	60
---	----	----	----

[0007]

```

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
   65                               70                               75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
   80                               85                               90
Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
   95                               100                              105
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
  110                               115                               120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
  125                               130                               135
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
  140                               145                               150
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
  155                               160                               165
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
  170                               175                               180
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
  185                               190                               195
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
  200                               205                               210

Arg Gly Glu Cys

```

<210> 16

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 16

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
   1                               5                               10                               15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
  20                               25                               30
Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
  35                               40                               45
Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
  50                               55                               60
Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
  65                               70                               75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
  80                               85                               90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
  95                               100                              105
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
  110                              115                              120
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
  125                              130                              135
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
  140                              145                              150
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
  155                              160                              165
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
  170                              175                              180
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

```

[0008]

	185		190		195
Gly Thr Gln Thr Tyr	Ile Cys Asn Val	Asn His Lys Pro Ser	Asn		
200		205			210
Thr Lys Val Asp Lys	Lys Val Glu Pro	Lys Ser Cys Asp Lys	Thr		
215		220			225
His Thr Cys Pro Pro	Cys Pro Ala Pro	Glu Leu Leu Gly Gly	Pro		
230		235			240
Ser Val Phe Leu Phe	Pro Pro Lys Pro	Lys Asp Thr Leu Met	Ile		
245		250			255
Ser Arg Thr Pro Glu	Val Thr Cys Val	Val Val Asp Val Ser	His		
260		265			270
Glu Asp Pro Glu Val	Lys Phe Asn Trp	Tyr Val Asp Gly Val	Glu		
275		280			285
Val His Asn Ala Lys	Thr Lys Pro Arg	Glu Glu Gln Tyr Asn	Ser		
290		295			300
Thr Tyr Arg Val Val	Ser Val Leu Thr	Val Leu His Gln Asp	Trp		
305		310			315
Leu Asn Gly Lys Glu	Tyr Lys Cys Lys	Val Ser Asn Lys Ala	Leu		
320		325			330
Pro Ala Pro Ile Glu	Lys Thr Ile Ser	Lys Ala Lys Gly Gln	Pro		
335		340			345
Arg Glu Pro Gln Val	Tyr Thr Leu Pro	Pro Ser Arg Glu Glu	Met		
350		355			360
Thr Lys Asn Gln Val	Ser Leu Thr Cys	Leu Val Lys Gly Phe	Tyr		
365		370			375
Pro Ser Asp Ile Ala	Val Glu Trp Glu	Ser Asn Gly Gln Pro	Glu		
380		385			390
Asn Asn Tyr Lys Thr	Thr Pro Pro Val	Leu Asp Ser Asp Gly	Ser		
395		400			405
Phe Phe Leu Tyr Ser	Lys Leu Thr Val	Asp Lys Ser Arg Trp	Gln		
410		415			420
Gln Gly Asn Val Phe	Ser Cys Ser Val	Met His Glu Ala Leu	His		
425		430			435
Asn His Tyr Thr Gln	Lys Ser Leu Ser	Leu Ser Pro Gly			
440		445			

<210> 17
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 17
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
 1 5 10 15
 Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 20 25 30
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser
 35 40 45
 Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 50 55 60
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
 65 70 75
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 80 85 90

[0009]

```

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
      95                      100                      105

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
      110                      115                      120

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
      125                      130                      135

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
      140                      145                      150

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
      155                      160                      165

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
      170                      175                      180

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
      185                      190                      195

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
      200                      205                      210

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
      215                      220                      225

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      230

```

<210> 18

<211> 467

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 18

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
  1          5          10          15

Gly Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
  20          25          30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
  35          40          45

Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro
  50          55          60

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly
  65          70          75

Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser
  80          85          90

Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
  95          100         105

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly
  110         115         120

Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
  125         130         135

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
  140         145         150

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
  155         160         165

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
  170         175         180

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
  185         190         195

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
  200         205         210

```

[0010]

```

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
215 220 225
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
230 235 240
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
245 250 255
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
260 265 270
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
290 295 300
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
305 310 315
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
320 325 330
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
335 340 345
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
350 355 360
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
365 370 375
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
380 385 390
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
395 400 405
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
410 415 420
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
425 430 435
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
440 445 450
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
455 460 465
Pro Gly

```

<210> 19
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

```

<400> 19
Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala
1 5 10 15
Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly
20 25 30
Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr
35 40 45
Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly
50 55 60
Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln
65 70 75
Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
80 85 90
Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr

```

[0011]

	95		100		105
Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu					
110			115		120
Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg					
125			130		135
Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile					
140			145		150
Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn					
155			160		165
Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser					
170			175		180
Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg					
185			190		195
<210> 20					
<211> 124					
<212> PRT					
<213> 人(Homo sapiens)					
<400> 20					
Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro					
1		5	10		15
Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro					
20			25		30
Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly					
35			40		45
Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp					
50			55		60
Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly					
65			70		75
Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp					
80			85		90
Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val					
95			100		105
Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro					
110			115		120
Cys Ala Arg Val					
<210> 21					
<211> 169					
<212> PRT					
<213> 人(Homo sapiens)					
<400> 21					
Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val					
1		5	10		15
Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe					
20			25		30
Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala					
35			40		45
Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu					
50			55		60
Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro					
65			70		75
Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile					
80			85		90
Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln					
95			100		105

[0012]

Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu
 110 115 120

Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe
 125 130 135

Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln
 140 145 150

Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly
 155 160 165

Glu Gly Leu Ala

<210> 22
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 22
 Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro
 1 5 10 15

Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys
 20 25 30

Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val
 35 40 45

Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln
 50 55 60

Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val
 65 70 75

Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys
 80 85 90

Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys
 95 100 105

Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys
 110 115 120

Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu
 125 130 135

Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr
 140

<210> 23
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 23
 Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 1 5 10 15

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

Asp Val Ser Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly
 50 55 60

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 65 70 75

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 80 85 90

Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 95 100 105

[0013]

```

Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
110 115 120
Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
125 130 135
Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
140 145 150
Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
155 160 165
Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
170 175 180
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
185 190 195
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
200 205 210
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215
<210> 24
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 24
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
20 25 30
Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
50 55 60
Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
95 100 105
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
110 115 120
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
125 130 135
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
140 145 150
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
155 160 165
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
170 175 180
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
185 190 195
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
200 205 210
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
215 220 225
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

```

[0014]

	230		235		240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile					
	245		250		255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His					
	260		265		270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu					
	275		280		285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser					
	290		295		300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp					
	305		310		315
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu					
	320		325		330
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro					
	335		340		345
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met					
	350		355		360
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr					
	365		370		375
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu					
	380		385		390
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser					
	395		400		405
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln					
	410		415		420
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His					
	425		430		435
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
	440		445		

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 25

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

Lys Arg

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0015]

<223> 序列是合成的

<400> 26

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
95 100 105

Lys Arg

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 27

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

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 28

<211> 122

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 28

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

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

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

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

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
65 70 75

[0016]

```

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
      80                      85                      90
Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
      95                      100                     105
Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val
      110                     115                     120

```

Ser Ser

<210> 29

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 29

```

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

```

Ser Ser

<210> 30

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 30

```

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

```

[0017]

110

115

<210> 31
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的。

<400> 31
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Ile Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys
 35 40 45
 Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 95 100 105
 Ile Lys

<210> 32
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 32
 Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
 50 55 60
 Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Glu Thr Ser
 65 70 75
 Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Asp Asp
 80 85 90
 Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser
 95 100 105
 Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr
 110 115 120
 Val Ser Ser

<210> 33
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 33

[0018]

```

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

```

Ile Lys

<210> 34
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

```

<400> 34
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1              5              10              15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
              20              25              30
Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
              35              40              45
Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
              50              55              60
Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser
              65              70              75
Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
              80              85              90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser
              95              100             105
Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
              110             115             120

```

Val Ser Ser

<210> 35
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

```

<400> 35
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1              5              10              15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser
              20              25              30
Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
              35              40              45
Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
              50              55              60

```

[0019]

```

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
    65              70              75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
    80              85              90
Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
    95              100             105
Ile Lys

```

<210> 36
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

```

<400> 36
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
  1              5              10             15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr
  20             25             30
His Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
  35             40             45
Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
  50             55             60
Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser
  65             70             75
Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
  80             85             90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr
  95            100            105
Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 110            115            120
Val Ser Ser

```

<210> 37
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

```

<400> 37
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
  1              5              10             15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp
  20             25             30
Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
  35             40             45
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
  50             55             60
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
  65             70             75
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
  80             85             90
Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
  95            100            105
Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe

```

[0020]

	110	115	120
Ile Phe Pro Pro Ser	Asp Glu Gln Leu Lys	Ser Gly Thr Ala Ser	
125	130	135	
Val Val Cys Leu Leu	Asn Asn Phe Tyr Pro	Arg Glu Ala Lys Val	
140	145	150	
Gln Trp Lys Val Asp	Asn Ala Leu Gln Ser	Gly Asn Ser Gln Glu	
155	160	165	
Ser Val Thr Glu Gln	Asp Ser Lys Asp Ser	Thr Tyr Ser Leu Ser	
170	175	180	
Ser Thr Leu Thr Leu	Ser Lys Ala Asp Tyr	Glu Lys His Lys Val	
185	190	195	
Tyr Ala Cys Glu Val	Thr His Gln Gly Leu	Ser Ser Pro Val Thr	
200	205	210	
Lys Ser Phe Asn Arg	Gly Glu Cys		
215			

<210> 38
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 38
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp
20 25 30
Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
50 55 60
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
80 85 90
Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105
Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
110 115 120
Ile Phe Pro Pro Ser Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
125 130 135
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
140 145 150
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
155 160 165
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
170 175 180
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
185 190 195
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
200 205 210
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
215

<210> 39
 <211> 218
 <212> PRT

[0021]

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 39

```

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1           5           10           15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp
 20           25           30
Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 35           40           45
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
 50           55           60
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65           70           75
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 80           85           90
Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
 95          100          105
Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
110          115          120
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
125          130          135
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
140          145          150
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
155          160          165
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
170          175          180
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
185          190          195
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
200          205          210
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

```

<210> 40

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 40

```

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

```

[0022]

```

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
110 115 120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
125 130 135
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
140 145 150
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
155 160 165
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
170 175 180
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
185 190 195
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
200 205 210
Arg Gly Glu Cys

```

<210> 41

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 41

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
20 25 30
Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
35 40 45
Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr
50 55 60
Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His
95 100 105
Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
110 115 120
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
125 130 135
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
140 145 150
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
155 160 165
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
170 175 180
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
185 190 195
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
200 205 210
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
215 220 225
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

```

[0023]

	230		235		240
Gly Pro Ser Val	Phe Leu Phe Pro Pro	Lys Pro Lys Asp Thr	Leu		
	245	250	255		
Met Ile Ser Arg	Thr Pro Glu Val Thr	Cys Val Val Val Asp	Val		
	260	265	270		
Ser His Glu Asp	Pro Glu Val Lys Phe	Asn Trp Tyr Val Asp	Gly		
	275	280	285		
Val Glu Val His	Asn Ala Lys Thr Lys	Pro Arg Glu Glu Gln	Tyr		
	290	295	300		
Asn Ser Thr Tyr	Arg Val Val Ser Val	Leu Thr Val Leu His	Gln		
	305	310	315		
Asp Trp Leu Asn	Gly Lys Glu Tyr Lys	Cys Lys Val Ser Asn	Lys		
	320	325	330		
Ala Leu Pro Ala	Pro Ile Glu Lys Thr	Ile Ser Lys Ala Lys	Gly		
	335	340	345		
Gln Pro Arg Glu	Pro Gln Val Tyr Thr	Leu Pro Pro Ser Arg	Glu		
	350	355	360		
Glu Met Thr Lys	Asn Gln Val Ser Leu	Thr Cys Leu Val Lys	Gly		
	365	370	375		
Phe Tyr Pro Ser	Asp Ile Ala Val Glu	Trp Glu Ser Asn Gly	Gln		
	380	385	390		
Pro Glu Asn Asn	Tyr Lys Thr Thr Pro	Pro Val Leu Asp Ser	Asp		
	395	400	405		
Gly Ser Phe Phe	Leu Tyr Ser Lys Leu	Thr Val Asp Lys Ser	Arg		
	410	415	420		
Trp Gln Gln Gly	Asn Val Phe Ser Cys	Ser Val Met His Glu	Ala		
	425	430	435		
Leu His Asn His	Tyr Thr Gln Lys Ser	Leu Ser Leu Ser Pro	Gly		
	440	445	450		

Lys

<210> 42

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 42

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

[0024]

```

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
125 130 135
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
140 145 150
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
155 160 165
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
170 175 180
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
185 190 195
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
200 205 210
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
215 220 225
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
320 325 330
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
335 340 345
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
350 355 360
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
365 370 375
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
380 385 390
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
395 400 405
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
410 415 420
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
425 430 435
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445 450

```

Lys

<210> 43

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 43

```

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

```

[0025]

Gly Ser Leu Arg	Leu Ser Cys Ala Val	Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
	20	25 30
Ser Gly Tyr Ser	Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly	
	35	40 45
Leu Glu Trp Val	Ala Ser Ile Lys Tyr Ser Gly Glu Thr Lys Tyr	
	50	55 60
Asn Pro Ser Val	Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser	
	65	70 75
Lys Asn Thr Phe	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp	
	80	85 90
Thr Ala Val Tyr	Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His	
	95	100 105
Trp His Phe Ala	Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	
	110	115 120
Ser Ala Ser Thr	Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser	
	125	130 135
Ser Lys Ser Thr	Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val	
	140	145 150
Lys Asp Tyr Phe	Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly	
	155	160 165
Ala Leu Thr Ser	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser	
	170	175 180
Ser Gly Leu Tyr	Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser	
	185	190 195
Ser Leu Gly Thr	Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro	
	200	205 210
Ser Asn Thr Lys	Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp	
	215	220 225
Lys Thr His Thr	Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly	
	230	235 240
Gly Pro Ser Val	Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu	
	245	250 255
Met Ile Ser Arg	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	
	260	265 270
Ser His Glu Asp	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly	
	275	280 285
Val Glu Val His	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	
	290	295 300
Asn Ser Thr Tyr	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	
	305	310 315
Asp Trp Leu Asn	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	
	320	325 330
Ala Leu Pro Ala	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
	335	340 345
Gln Pro Arg Glu	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu	
	350	355 360
Glu Met Thr Lys	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly	
	365	370 375
Phe Tyr Pro Ser	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln	
	380	385 390
Pro Glu Asn Asn	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp	
	395	400 405
Gly Ser Phe Phe	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg	

[0026]

	410		415		420
Trp Gln Gln Gly	Asn Val Phe Ser Cys	Ser Val Met His Glu Ala			
	425		430		435
Leu His Asn His	Tyr Thr Gln Lys Ser	Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	440		445		450
Lys					
<210> 44					
<211> 453					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 序列是合成的					
<400> 44					
Gln Val Gln Leu Val	Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly				
1	5		10		15
Ala Ser Val Lys Val	Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser				
	20		25		30
Met Tyr Trp Leu Glu	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu				
	35		40		45
Glu Trp Val Gly Glu	Ile Ser Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr				
	50		55		60
Asn Glu Lys Phe Lys	Ala Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser				
	65		70		75
Thr Asn Thr Ala Tyr	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp				
	80		85		90
Thr Ala Val Tyr Tyr	Cys Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser				
	95		100		105
Asn Tyr Asp Tyr Phe	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr				
	110		115		120
Val Ser Ser Ala Ser	Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala				
	125		130		135
Pro Ser Ser Lys Ser	Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys				
	140		145		150
Leu Val Lys Asp Tyr	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn				
	155		160		165
Ser Gly Ala Leu Thr	Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu				
	170		175		180
Gln Ser Ser Gly Leu	Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro				
	185		190		195
Ser Ser Ser Leu Gly	Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His				
	200		205		210
Lys Pro Ser Asn Thr	Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser				
	215		220		225
Cys Asp Lys Thr His	Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu				
	230		235		240
Leu Gly Gly Pro Ser	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp				
	245		250		255
Thr Leu Met Ile Ser	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val				
	260		265		270
Asp Val Ser His Glu	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val				
	275		280		285
Asp Gly Val Glu Val	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu				
	290		295		300

[0027]

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 320 325 330
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 335 340 345
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 350 355 360
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 365 370 375
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 380 385 390
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 395 400 405
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 410 415 420
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 425 430 435
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 440 445 450
 Pro Gly Lys

<210> 45
 <211> 1042
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)

<220>
 <221> 不确定
 <222> 447
 <223> N是T或G

<400> 45
 ttctctcact gactataaaa gaatagagaa ggaagggctt cagtgaaccg 50
 ctgccttggt gacttacagc agtcagactc tgacaggatc atggctatga 100
 tggagggtcca ggggggaccc agcctgggac agacctgcgt gctgatcgtg 150
 atcttcacag tgctctcgca gtctctctgt gtggctgtaa cttacgtgta 200
 ctttaccac gagctgaagc agatgcagga caagtactcc aaaagtggca 250
 ttgcttggtt cttaaaagaa gatgacagtt attgggaccc caatgacgaa 300
 gagagtaiga acagcccttg ctggcaagtc aagtggcaac tccgtcagct 350
 cgttagaaag atgattttga gaacctctga ggaaccatt tctacagttc 400
 aagaaaagca acaaaatatt tctcccttag tgagagaaag aggtccncag 450
 agagtagcag ctacataac tgggaccaga ggaagaagca acacattgtc 500
 ttctccaaac tccaagaatg aaaaggctct gggccgcaaa ataaactcct 550
 gggaatcacc aaggagtggt cattcattcc tgagcaactt gcacttgagg 600
 aatggtgaac tggcatcca tgaaaaagg ttttactaca tctattccca 650
 aacatacttt cgatttcagg aggaataaaa agaaaacaca aagaacgaca 700
 aacaaatggt ccaatatatt tacaalaca caagttatcc tgacctata 750
 ttgttgatga aaagtgctag aaatagttgt tggctctaaag atgcagaata 800
 tggactctat tccatctatc aagggggaat atttgagctt aaggaaaaatg 850
 acagaatttt tgtttctgta acaaatgagc acttgataga catggacat 900

[0028]

gaagccagtt ttttcgggc ctttttagtt ggctaactga cctggaaaga 950
 aaaagcaata acctcaaagt gactattcag ttttcaggat gatacactat 1000
 gaagatgitt caaaaaatct gacccaaaaca aacaaacaga aa 1042

<210> 46
 <211> 281
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 46
 Met Ala Met Met Glu Val Gln Gly Gly Pro Ser Leu Gly Gln Thr
 1 5 10 15
 Cys Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu Cys
 20 25 30
 Val Ala Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met
 35 40 45
 Gln Asp Lys Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu
 50 55 60
 Asp Asp Ser Tyr Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser
 65 70 75
 Pro Cys Trp Gln Val Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys
 80 85 90
 Met Ile Leu Arg Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu
 95 100 105
 Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln
 110 115 120
 Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr
 125 130 135
 Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys
 140 145 150
 Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser
 155 160 165
 Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly
 170 175 180
 Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu
 185 190 195
 Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile
 200 205 210
 Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser
 215 220 225
 Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
 230 235 240
 Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg
 245 250 255
 Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His
 260 265 270
 Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 275 280

<210> 47
 <211> 411
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<220>
 <221> Xaa
 <222> 410
 <223> Xaa 是 L 或 M

<400> 47

[0029]

Met	Glu	Gln	Arg	Gly	Gln	Asn	Ala	Pro	Ala	Ala	Ser	Gly	Ala	Arg		1	5	10	15
Lys	Arg	His	Gly	Pro	Gly	Pro	Arg	Glu	Ala	Arg	Gly	Ala	Arg	Pro		20	25	30	
Gly	Leu	Arg	Val	Pro	Lys	Thr	Leu	Val	Leu	Val	Val	Ala	Ala	Val		35	40	45	
Leu	Leu	Leu	Val	Ser	Ala	Glu	Ser	Ala	Leu	Ile	Thr	Gln	Gln	Asp		50	55	60	
Leu	Ala	Pro	Gln	Gln	Arg	Ala	Ala	Pro	Gln	Gln	Lys	Arg	Ser	Ser		65	70	75	
Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	Cys	Pro	Pro	Gly	His	His	Ile	Ser	Glu	Asp		80	85	90	
Gly	Arg	Asp	Cys	Ile	Ser	Cys	Lys	Tyr	Gly	Gln	Asp	Tyr	Ser	Thr		95	100	105	
His	Trp	Asn	Asp	Leu	Leu	Phe	Cys	Leu	Arg	Cys	Thr	Arg	Cys	Asp		110	115	120	
Ser	Gly	Glu	Val	Glu	Leu	Ser	Pro	Cys	Thr	Thr	Thr	Arg	Asn	Thr		125	130	135	
Val	Cys	Gln	Cys	Glu	Glu	Gly	Thr	Phe	Arg	Glu	Glu	Asp	Ser	Pro		140	145	150	
Glu	Met	Cys	Arg	Lys	Cys	Arg	Thr	Gly	Cys	Pro	Arg	Gly	Met	Val		155	160	165	
Lys	Val	Gly	Asp	Cys	Thr	Pro	Trp	Ser	Asp	Ile	Glu	Cys	Val	His		170	175	180	
Lys	Glu	Ser	Gly	Ile	Ile	Ile	Gly	Val	Thr	Val	Ala	Ala	Val	Val		185	190	195	
Leu	Ile	Val	Ala	Val	Phe	Val	Cys	Lys	Ser	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys		200	205	210	
Val	Leu	Pro	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ile	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp		215	220	225	
Pro	Glu	Arg	Val	Asp	Arg	Ser	Ser	Gln	Arg	Pro	Gly	Ala	Glu	Asp		230	235	240	
Asn	Val	Leu	Asn	Glu	Ile	Val	Ser	Ile	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Val		245	250	255	
Pro	Glu	Gln	Glu	Met	Glu	Val	Gln	Glu	Pro	Ala	Glu	Pro	Thr	Gly		260	265	270	
Val	Asn	Met	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Ser	Glu	His	Leu	Leu	Glu	Pro		275	280	285	
Ala	Glu	Ala	Glu	Arg	Ser	Gln	Arg	Arg	Arg	Leu	Leu	Val	Pro	Ala		290	295	300	
Asn	Glu	Gly	Asp	Pro	Thr	Glu	Thr	Leu	Arg	Gln	Cys	Phe	Asp	Asp		305	310	315	
Phe	Ala	Asp	Leu	Val	Pro	Phe	Asp	Ser	Trp	Glu	Pro	Leu	Met	Arg		320	325	330	
Lys	Leu	Gly	Leu	Met	Asp	Asn	Glu	Ile	Lys	Val	Ala	Lys	Ala	Glu		335	340	345	
Ala	Ala	Gly	His	Arg	Asp	Thr	Leu	Tyr	Thr	Met	Leu	Ile	Lys	Trp		350	355	360	
Val	Asn	Lys	Thr	Gly	Arg	Asp	Ala	Ser	Val	His	Thr	Leu	Leu	Asp		365	370	375	
Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Gly	Glu	Arg	Leu	Ala	Lys	Gln	Lys	Ile	Glu		380	385	390	
Asp	His	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Lys	Phe	Met	Tyr	Leu	Glu	Gly	Asn		395	400	405	

[0030]

Ala Asp Ser Ala Xaa Ser
410

<210> 48
<211> 1799
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 48
cccacgcgtc cgcataaatc agcacgcggc cggagaaccc cgcaatctct 50
gcgcccacaa aatacaccga cgatgccga tctactttiaa gggctgaaac 100
ccacgggcct gagagactat aagagcggtc cctaccgcca tggaacaacg 150
gggacagaac gccccggccg cticgggggc cggaaaagg cacggcccag 200
gaccagggga ggcgcgggga gccaggcctg ggctccgggt cccaagacc 250
cttgtgctcg ttgtgcgcgc ggicctgctg ttggtctcag ctgagtctgc 300
tctgatcacc caacaagacc tagctcccca gcagagagcg gcccacaaac 350
aaaagaggtc cagccctca gagggattgt gtccacctgg acaccatata 400
tcagaagacg gtagagattg catctcctgc aaatatggac aggactatag 450
cactcactgg aatgacctcc ttttctgctt gcgctgcacc aggtgtgatt 500
caggtagaagt ggagctaagt cctgcacca cgaccagaaa cacagtgtgt 550
cagtgcaag aaggcacctt ccgggaagaa gattctcctg agatgtgccg 600
gaagtgccgc acagggtgtc ccagagggat ggtcaaggic ggtgattgia 650
caccctggag tgacatcgaa tgtgtccaca aagaatcagg catcatcata 700
ggagtcacag ttgcagccgt agtcttgatt gtggtgtgtt ttgtttgcaa 750
gtctttactg tggaagaaag tccttcctta cctgaaaggc atctgctcag 800
gtgggtgggg ggacccctgag cglgtggaca gaagctcaca acgacctggg 850
gctgaggaca atgtctcaaa tgagatcgtg agtatcttgc agcccaccca 900
ggtccctgag caggaaatgg aagtccagga gccagcagag ccaacagggt 950
tcaacatggt gtccccggg gagtcagagc atctgctgga accggcagaa 1000
gctgaaaggt ctgagaggag gaggctgctg gttccagcaa atgaagggtga 1050
tcccactgag actctgagac agtgccttga tgactttgca gacttggtgc 1100
cctttgactc ctgggagccg ctcatgagga agttgggcct catggacaat 1150
gagataaagg tggctaaagc tgaggcagcg ggccacaggg acaccttgta 1200
cacgatgctg ataaagtggg tcaacaaaac cgggcgagat gcctctgtcc 1250
acacctgct ggatgccttg gagacgctgg gagagagact tgccaagcag 1300
aagattgagg accacttggt gagctctgga aagttcatgt atctagaagg 1350
taatgcagac tetgcewtgt cctaagtgtg attctcttca ggaagtgaga 1400
ccttccctgg tttaaccttt ttctggaaaa agcccacttg gactccagtc 1450
agtaggaaag tgccacaatt gtcacatgac cggctactgga agaaactctc 1500
ccatccaaca tccccagtg gatggaacat cctgtaactt ttcactgcac 1550
ttggcattat ttttataagc tgaatgtgat aataaggaca ctatggaaat 1600
gtctggatca ttccgtttgt gcgtactttg agatttggtt tgggatgtca 1650
ttgttttcac agcacttttt tatectaag taaatgcttt atttatttat 1700
ttgggtaca ttgtaagatc catctacaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaag 1750

[0031]

```

ggcgccgcgcg acctctagagt cgacctgcag aagcttggcc gccatggcc 1799
<210> 49
<211> 440
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 49
Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg
 1          5          10          15
Lys Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro
 20          25          30
Gly Pro Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val
 35          40          45
Leu Leu Leu Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp
 50          55          60
Leu Ala Pro Gln Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser
 65          70          75
Pro Ser Glu Gly Leu Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp
 80          85          90
Gly Arg Asp Cys Ile Ser Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr
 95          100         105
His Trp Asn Asp Leu Leu Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp
 110         115         120
Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr
 125         130         135
Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro
 140         145         150
Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met Val
 155         160         165
Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile Glu Cys Val His
 170         175         180
Lys Glu Ser Gly Thr Lys His Ser Gly Glu Ala Pro Ala Val Glu
 185         190         195
Glu Thr Val Thr Ser Ser Pro Gly Thr Pro Ala Ser Pro Cys Ser
 200         205         210
Leu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala Ala Val Val Leu
 215         220         225
Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp Lys Lys Val
 230         235         240
Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly Asp Pro
 245         250         255
Glu Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp Asn
 260         265         270
Val Leu Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val Pro
 275         280         285
Glu Gln Glu Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val
 290         295         300
Asn Met Leu Ser Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala
 305         310         315
Glu Ala Glu Arg Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn
 320         325         330
Glu Gly Asp Pro Thr Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe
 335         340         345
Ala Asp Leu Val Pro Phe Asp Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys
 350         355         360

```

[0032]

Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu Ile Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala
 365 370 375
 Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Tyr Thr Met Leu Ile Lys Trp Val
 380 385 390
 Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala Ser Val His Thr Leu Leu Asp Ala
 395 400 405
 Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu Ala Lys Gln Lys Ile Glu Asp
 410 415 420
 His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met Tyr Leu Glu Gly Asn Ala
 425 430 435
 Asp Ser Ala Met Ser
 440

<210> 50
 <211> 1323
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 50
 atggaacaac ggggacagaa cgcgccggcc gcttcggggg cccggaaaag 50
 gcacggccca ggaccaggg aggcgcgggg agccaggcct gggccccggg 100
 tcccaagac ccttgtgtc gtgtgcgcg cggtcctgt gtgtgtctca 150
 gctgagtctg ctcgtatcac ccaacaagac ctgctcccc agcagagagc 200
 ggccccacaa caaaagaggt ccagcccctc agagggtatg tgtccacctg 250
 gacaccatat ctcagaagac ggtagagatt gcattctctg caaatatgga 300
 caggactata gcactcactg gaatgacct cttttctgt tgcgtgcac 350
 cagggtgtat tcagggtgaag tggagctaag tccgtgcacc acgaccagaa 400
 acacagtgig tcagtgcgaa gaaggcacct tccgggaaga agattctcct 450
 gagatgtgcc ggaagtgcgc cacagggtgt cccagaggga tggicaaggt 500
 cgggtattgt acacctgga gtgacatcga atgtgtccac aaagaatcag 550
 gtacaaagca cagtggggaa gccccagctg tggaggagac ggtgacctcc 600
 agcccaggga ctctgcctc tccctgttct ctctcagga tcatcatagg 650
 agtcacagtl gcagccgtag tcttgattgt ggctgtgttt gtttgcaagt 700
 ctttactgtg gaagaaagtc ctctcttacc tgaaaggcat ctgctcaggt 750
 ggtggtgggg accctgagcg tgtggacaga agtcacaaac gacctggggc 800
 tgaggacaat gtctcaatg agatcgtgag tatcttgag cccaccaggt 850
 tccctgagca ggaatggaa gtccaggagc cagcagagcc aacagggtgc 900
 aacatgttgt cccccggga gtcagagcat ctgctggaac cggcagaagc 950
 tgaaagggtc cagaggagga ggctgctggg tccagcaaat gaagggtgatc 1000
 ccactgagac tctgagacag tgcctcgatg actttgcaga cttggtgccc 1050
 ttgactcct gggagccgct catgaggaag ttgggcctca tggacaatga 1100
 gataaagggt gctaaagctg aggcagcggg ccacagggac acctgtgaca 1150
 cgatgtgat aaagtgggtc aacaaaaccg ggcgagatgc ctctgtccac 1200
 accctgctgg atgcttggga gacgttggga gagagacttg ccaagcagaa 1250
 gattgaggac cacttgttga gctctggaaa gttcatgtat ctagaaggta 1300
 atgcagactc tgccatgtcc taa 1323

<210> 51
 <211> 451

[0033]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 51

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Glu Arg Pro Gly
 1          5          10          15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp
 20          25          30
Asp Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35          40          45
Glu Trp Val Ser Gly Ile Asn Trp Gln Gly Gly Ser Thr Gly Tyr
 50          55          60
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 65          70          75
Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80          85          90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ile Leu Gly Ala Gly Arg Gly
 95          100          105
Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 110          115          120
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 125          130          135
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 140          145          150
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 155          160          165
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 170          175          180
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 185          190          195
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 200          205          210
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 215          220          225
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 230          235          240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245          250          255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260          265          270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275          280          285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290          295          300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305          310          315
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 320          325          330
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 335          340          345
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 350          355          360
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

```

[0034]

[illegible] $\langle 220 \rangle$

105

<223> 序列是合成的

<400> 53

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Glu	Arg	Pro	Gly	1	5	10	15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	20	25	30	
Asp	Tyr	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	35	40	45	
Glu	Trp	Val	Ser	Gly	Ile	Asn	Trp	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Gly	Tyr	50	55	60	
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	65	70	75	
Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	80	85	90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Ile	Leu	Gly	Ala	Gly	Arg	Gly	95	100	105	
Trp	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp	Gly	Lys	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	110	115	120	
Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	125	130	135	
Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	140	145	150	
Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	155	160	165	
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	170	175	180	
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	185	190	195	
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	200	205	210	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	215	220	225	
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	230	235	240	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	245	250	255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	260	265	270	
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	275	280	285	
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	290	295	300	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	305	310	315	
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	320	325	330	
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	335	340	345	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	350	355	360	
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	365	370	375	
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	380	385	390	

[0036]

```

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
395                               400                               405

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
410                               415                               420

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
425                               430                               435

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440                               445                               450

```

Lys

<210> 54
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

```

<400> 54
Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1           5           10           15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr
20          25          30

Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val
35          40          45

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

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
65          70          75

Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp
80          85          90

Ser Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
95          100         105

Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
110         115         120

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys
125         130         135

Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys
140         145         150

Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro
155         160         165

Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser
170         175         180

Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln
185         190         195

Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr
200         205         210

```

Glu Cys Ser

<210> 55
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

```

<400> 55
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Glu Arg Pro Gly

```

[0037]

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

<210> 56
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 56
Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr
20 25 30
Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
65 70 75
Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ala Asp
80 85 90
Ser Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
95 100 105
Val Leu Gly

<210> 57
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 57
Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
5 10

<210> 58
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的.

<400> 58

[0038]

```

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser
5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 59
Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
5

<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 60
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
5 10

<210> 61
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 61
Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 62
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 62
Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
5 10

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

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 63
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90

```

[0039]

```

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
          95                      100                      105

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
          110                      115                      120

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
          125                      130                      135

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
          140                      145                      150

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
          155                      160                      165

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
          170                      175                      180

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
          185                      190                      195

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
          200                      205                      210

Gly Glu Cys

```

<210> 64
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

```

<400> 64
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
  1                      5                      10                      15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
          20                      25                      30

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

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
          80                      85                      90

Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
          95                      100                      105

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
          110                      115                      120

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
          125                      130                      135

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
          140                      145                      150

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
          155                      160                      165

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
          170                      175                      180

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
          185                      190                      195

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
          200                      205                      210

Gly Glu Cys

```

[0040]

<210> 65
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 65
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
 95 100 105
 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 155 160 165
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 170 175 180
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190 195
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 200 205 210
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 215 220 225
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 320 325 330
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345

[0041]

```

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
350                               355                               360

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
365                               370                               375

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
380                               385                               390

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
395                               400                               405

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
410                               415                               420

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
425                               430                               435

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
440                               445                               450

```

Gly Lys

<210> 66

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 66

```

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20           25           30

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35           40           45

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
50           55           60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65           70           75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80           85           90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg
95           100          105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110          115          120

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
125          130          135

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
140          145          150

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
155          160          165

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
170          175          180

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
185          190          195

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
200          205          210

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
215          220          225

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
230          235          240

```

[0042]

```

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300
Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305 310 315
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
320 325 330
Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys
335 340 345
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
350 355 360
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
365 370 375
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
380 385 390
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
395 400 405
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
410 415 420
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
425 430 435
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
440 445 450

```

Gly Lys

<210> 67
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<220>
 <221> Xaa
 <222> 9
 <223> Xaa 是 M 或 L

<400> 67
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Xaa His
 5 10

<210> 68
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<220>
 <221> Xaa
 <222> 4
 <223> Xaa 是 S 或 A

<400> 68
 Gln Gln Trp Xaa Phe Asn Pro Pro Thr
 5

[0043]

<210> 69
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列是合成的

 <220>
 <221> Xaa
 <222> 8
 <223> Xaa 是 D 或 A

 <400> 69
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Xaa Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 1 5 10 15

 Lys Gly

 <210> 70
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列是合成的

 <220>
 <221> Xaa
 <222> 6
 <223> Xaa 是 N, A, Y, W 或 D

 <220>
 <221> Xaa
 <222> 7
 <223> Xaa 是 S 或 R

 <400> 70
 Val Val Tyr Tyr Ser Xaa Xaa Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 5 10

 <210> 71
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列是合成的

 <400> 71
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30

 Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

 Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
 50 55 60

 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75

 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
 95 100 105

 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120

 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135

 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150

[0044]

Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	
				155					160					165	
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
				170					175					180	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				185					190					195	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
				200					205					210	
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
				215					220					225	
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	
				230					235					240	
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
				245					250					255	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
				260					265					270	
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
				275					280					285	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	
				290					295					300	
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
				305					310					315	
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
				320					325					330	
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	
				335					340					345	
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	
				350					355					360	
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
				365					370					375	
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	
				380					385					390	
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
				395					400					405	
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
				410					415					420	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	
				425					430					435	
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
				440					445					450	
Gly															
<210>	72														
<211>	451														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	序列是合成的														
<400>	72														
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	
1				5					10					15	
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	
				20					25					30	
Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	

[0045]

[0046]

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
440 445 450

Gly

<210> 73
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 73
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30
Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
35 40 45
Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90
Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
95 100 105

Lys Arg

<210> 74
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 74
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
50 55 60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg
95 100 105
Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120
Ser Ser

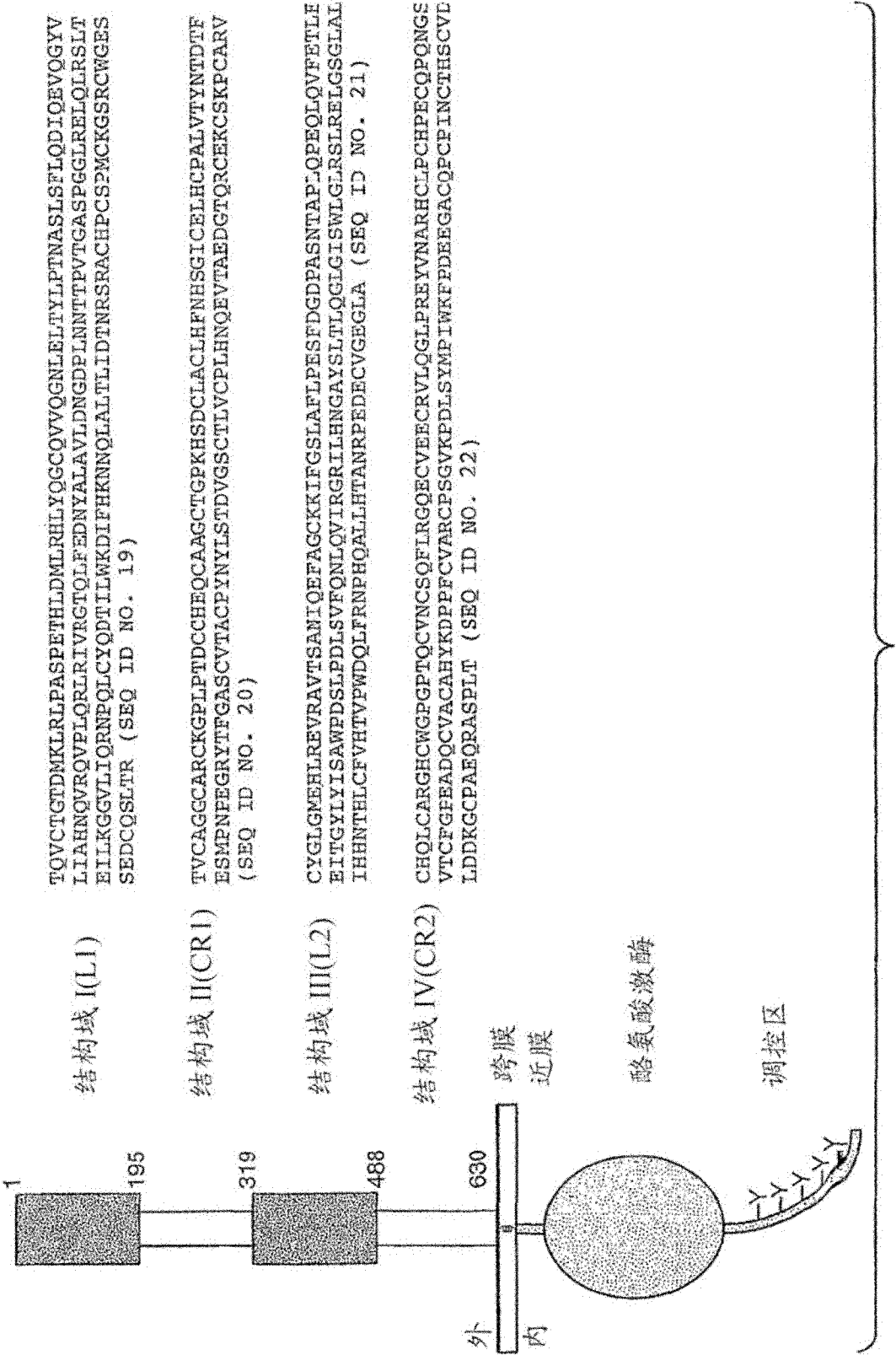


图 1

轻链可变区

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDV SIGVA]	WYQQR	P
	** * * * * *	*		*
574	DIQMTQSEPSLSASVGDRVTITC	[KASQDV SIGVA]	WYQQK	P
		* * * * * *		
hum κI	DIQMTQSEPSLSASVGDRVTITC	[RASQSI NYLA]	WYQQK	P

	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA		
	** *	* *	*	*
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ		
		* * * * * *		
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ		

	90	100	
2C4	EDLAVYYC [QQYIYPYT]	FGGGTKLEIK	(SEQ ID NO:1)
	* *	*	*
574	EDFATYYC [QQYIYPYT]	FGQGTKVEIK	(SEQ ID NO:3)
		* * * *	
hum κI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIK	(SEQ ID NO:5)

图 2A

重链可变区

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS	[GFTFTDYTMD]	WVKQS	
	** * * * * *		*	*
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYTMD]	WVRQA	
		* * * *		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	

	50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG [DVNPNSGSGSIYNQRFKG]	KASLTVDRSSRIVYM		
	* * * *	* * * *	* * * * *	
574	PGKGLEWVA [DVNPNSGSGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL		
	* * * * * * * * * *	* *		
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDN SKNTLYL		

	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:2)
	* * * *		*	
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:4)
		* * * * * *		
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO:6)

图 2B

Pertuzumab 轻链的氨基酸序列

```

1      10      20      30      40      50      60
|      |      |      |      |      |      |
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASYRYTGVP
70      80      90      100     110     120
|      |      |      |      |      |
RFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
130     140     150     160     170     180
|     |     |     |     |     |
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDDSTYLSSTLT
190     200     210
|     |     |
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

```

图 3A

Pertuzumab 重链的氨基酸序列

```

1      10      20      30      40      50      60
|      |      |      |      |      |
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDWRQAPGKGLLEWVADVNPNSGGSIY
70      80      90      100     110     120
|      |      |      |      |      |
NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSA
130     140     150     160     170     180
|     |     |     |     |     |
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
190     200     210     220     230     240
|     |     |     |     |     |
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
250     260     270     280     290     300
|     |     |     |     |     |
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
310     320     330     340     350     360
|     |     |     |     |     |
TYRVVSVLTIVLHQLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
370     380     390     400     410     420
|     |     |     |     |     |
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
430     440     448
|     |     |
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

```

图 3B

1 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S 45
46 Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F 90
91 T L T I S S L Q P E D F A F Y Y C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F 135
136 I F P P S L E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E 180
181 S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T 225
226 K S F N R G E C 233 (SEQ ID NO. 17)

图 4A

1 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G 45
46 F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S 90
91 V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T 135
136 V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N 180
181 S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H 225
226 K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D 270
271 T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E 315
316 Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A 360
361 K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N 405
406 G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H 450
451 E A L H N H Y T Q K S L S L S P G (SEQ ID NO. 18) 465

图 4B

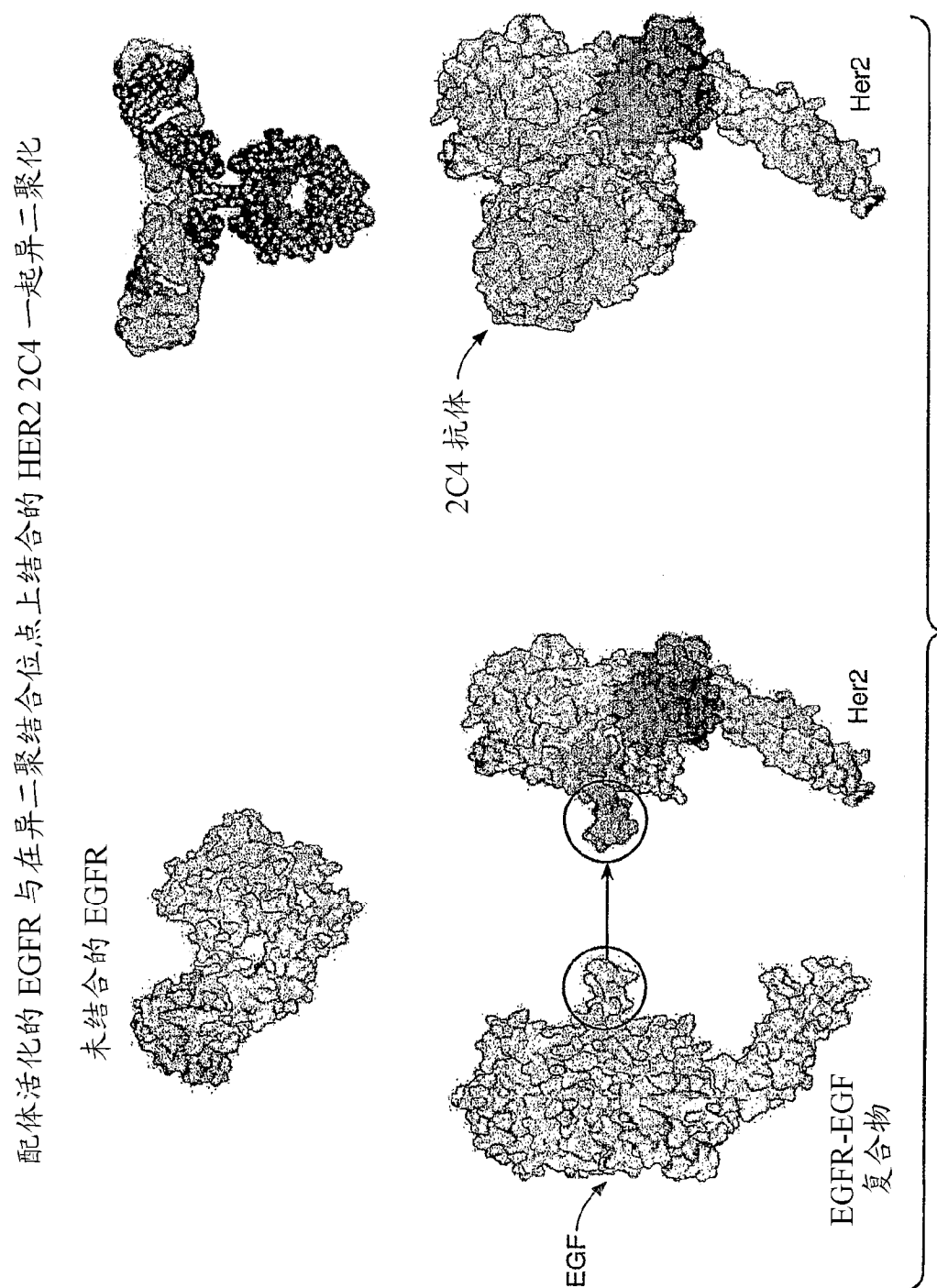


图 5

HER2/3 偶联到 MAPK 和 Akt 途径

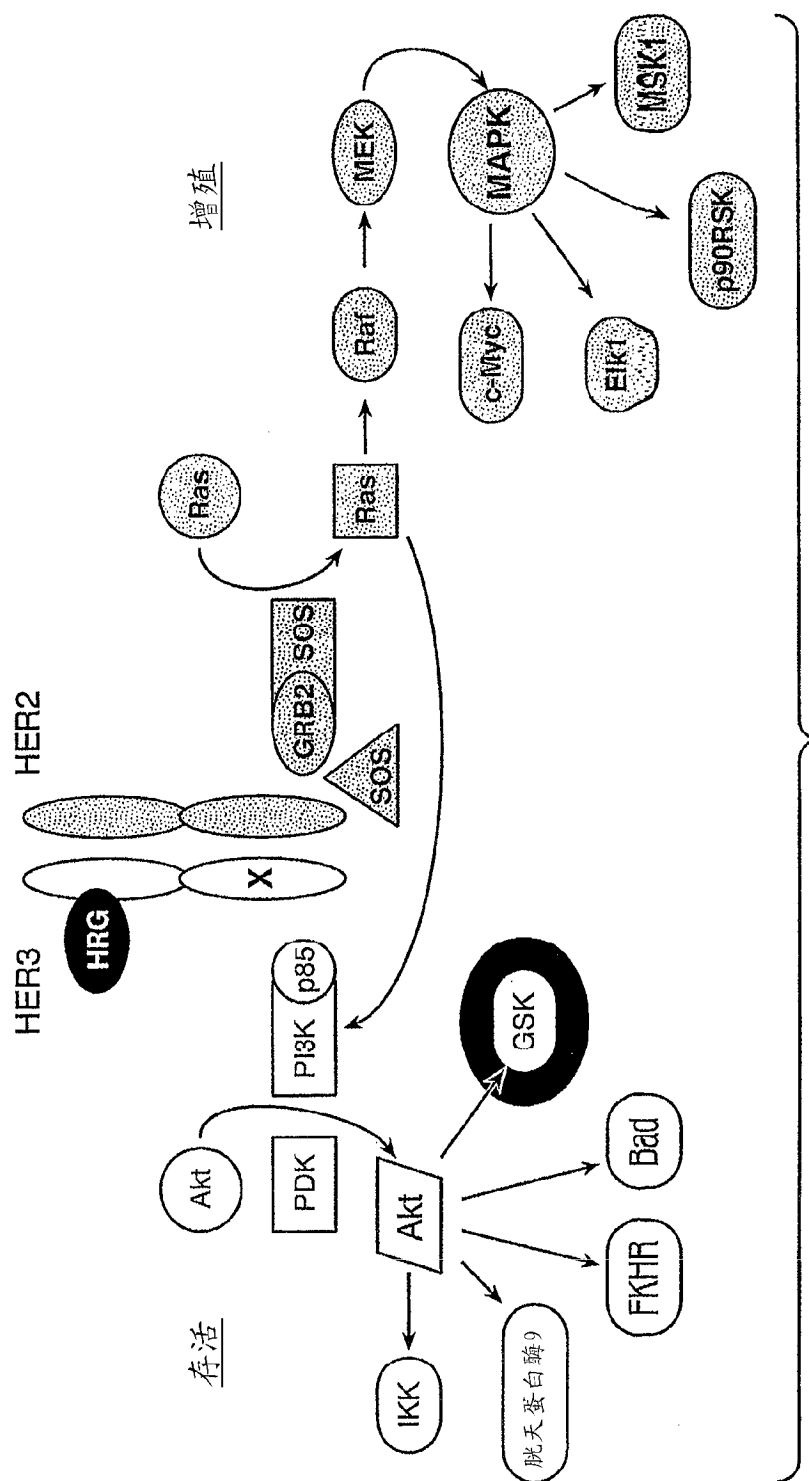


图 6

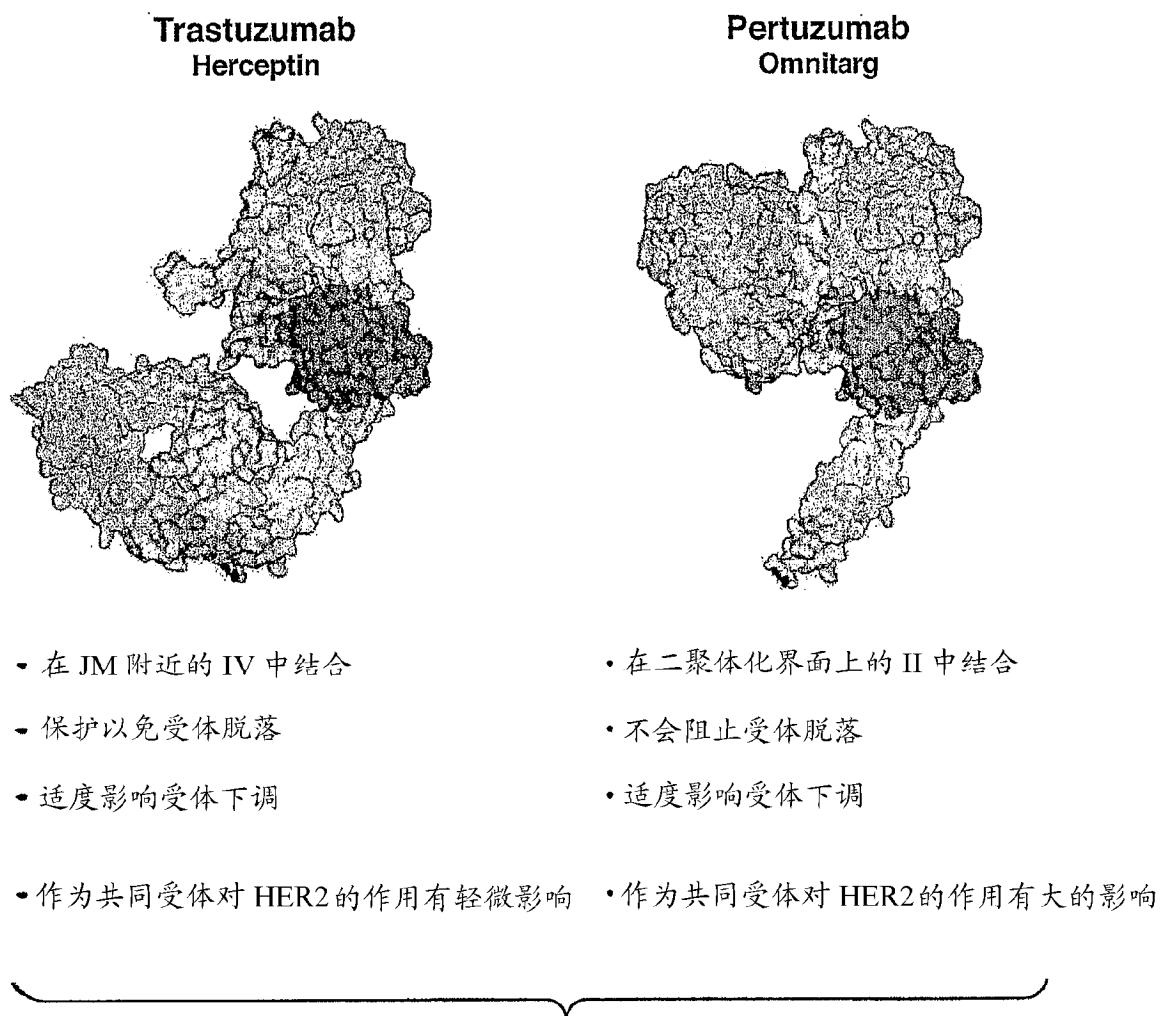


图 7

来自 IEX 的主峰的假一级动力学分析

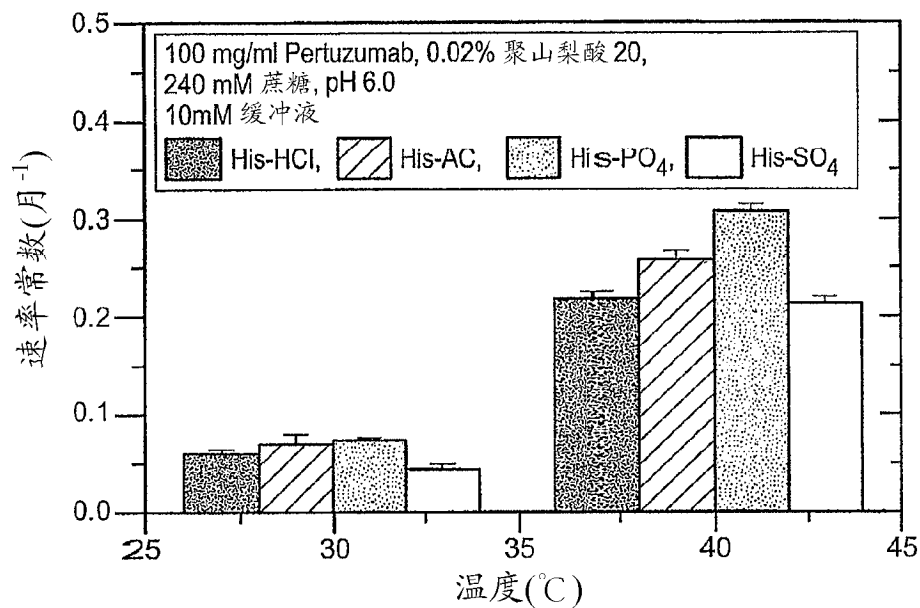


图 8

来自 SEC 的主峰的假一级动力学分析

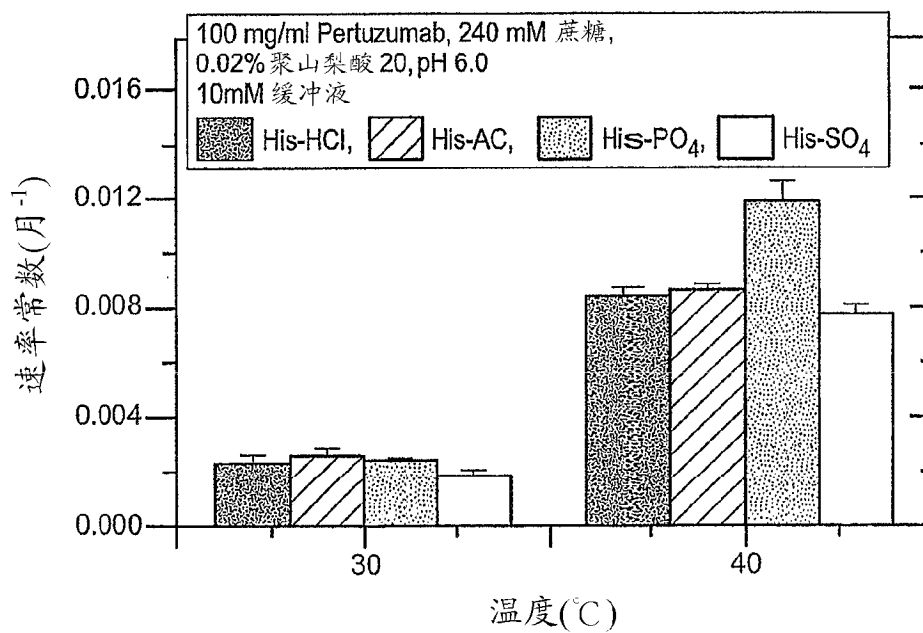


图 9

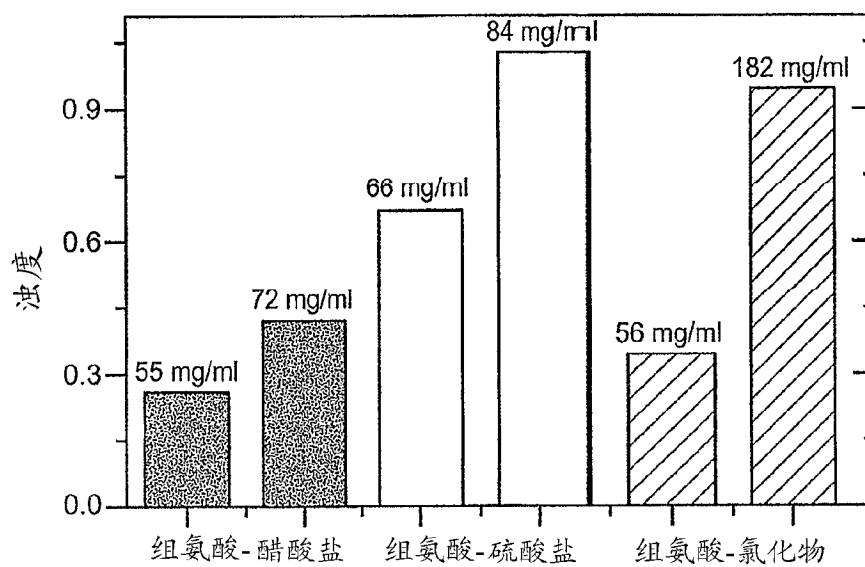


图 10

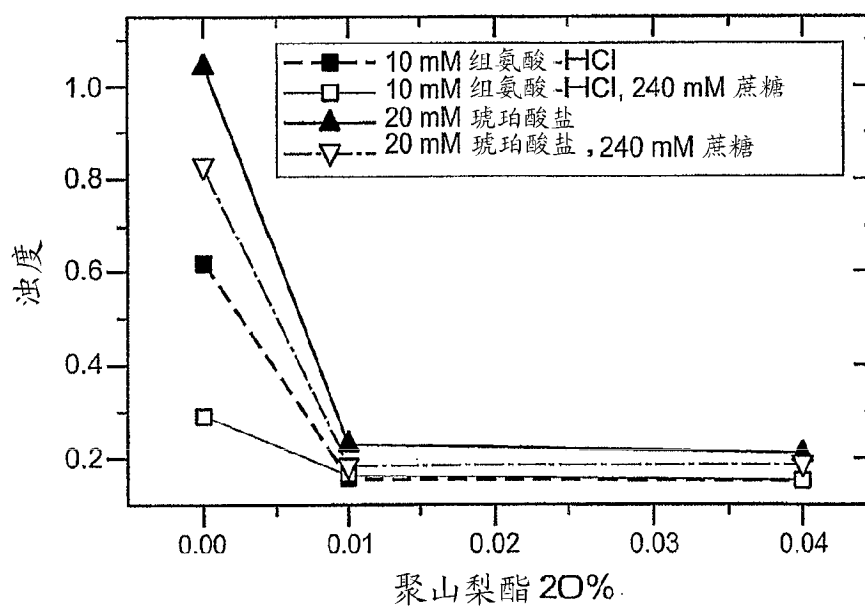


图 11

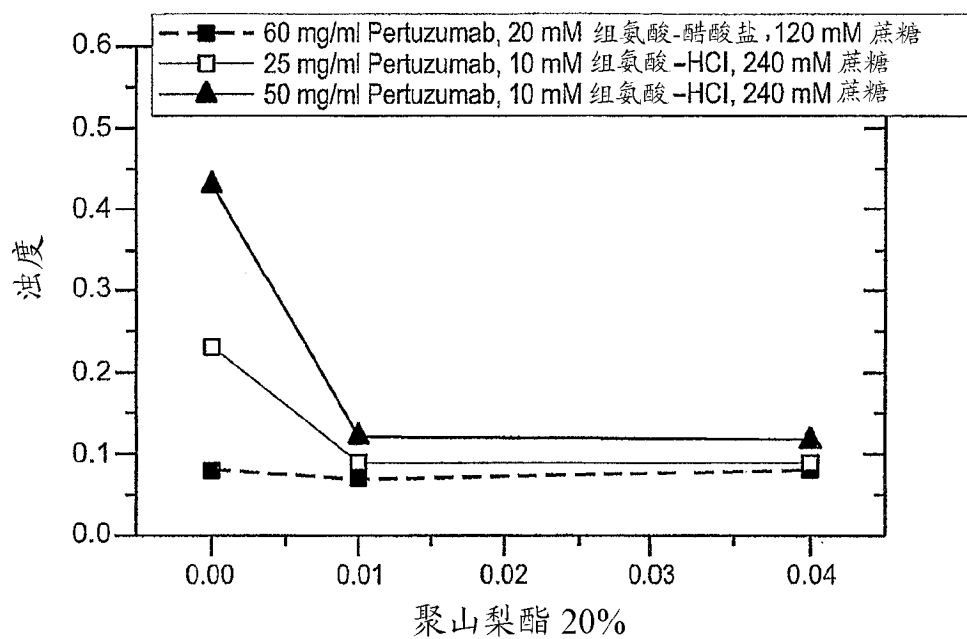


图 12

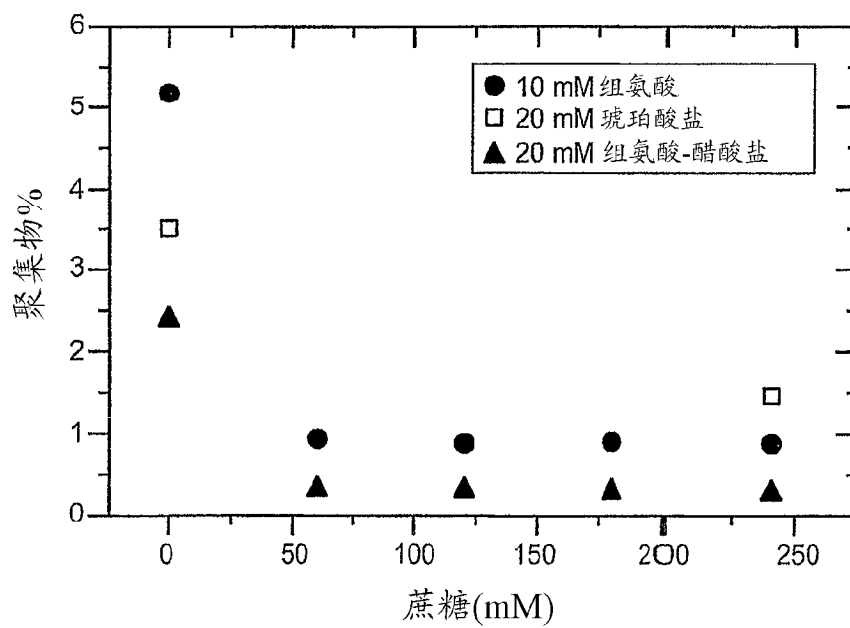


图 13

轻链

1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	N	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	45	
46	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	R	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	90
91	H	Y	T	T	P	P	T	F	G	Q	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	135	
136	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	180
181	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C											214	

图 14A

重链

1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	15	30	45
	FNICKDTYIHWV			QAPGKGL
46	EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN	60	75	90
	SLRAED			
91	TAVYYCSRWG	105	120	135
	DDGFYAMDYWGQGT			LVTVSSASTKGP
	SVFFPLAPSS			
136	KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	150	165	180
181	GLYSSLSSVTVPS	195	210	225
	SSSLG			QTYSICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
226	THTCP	240	255	270
	PCPAPELLGGP			SVFLFPKPKD
	TLMLISRTPEVTCVV			VDVS
271	HEDPEVKFNWYVDGVEVHN	285	300	315
	AKTKPREEQYN			STYRVSVLTLHQD
316	WLN	330	345	360
	GKEYKCKVSNKALPAPIEK			TSKAKGQPREPQVY
	TLPPSREE			
361	MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES	375	390	405
	NGQPENNYK			TTPPVLDSDG
406	SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV	420	435	449
	FS			CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

图 14B

1 V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I C V A W Y Q Q K P G K 45
46 A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P F E D F A T Y Y 90
91 C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V 135
136 V C I L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E E Q D S K D S T Y S L S S 180
181 T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C 217 (SEQ ID NO. 23)

图 15A

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGL 45
 46 EWVADVNPNSSGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSSLRAED 90
 91 TAVYYCARNLLGPFYFYFDYWGGQLLVTVSSASTKGPSSVFPPLAPSSK 135
 136 STSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALLTSGVHTFPAVLQSSG 180
 181 LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKT 225
 226 HTPCPAPPELLLGPPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCTVVDVSH 270
 271 EDPFVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPRFEHQYNSSTYRVVSVLTVLHQDW 315
 316 LNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISSKAKGQPRPEPQVYFTLPSPSEEM 360
 361 TKNQVSLTCLVKGFYPPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS 405
 406 FFLYSKLTVDKSRWQQGNGVFSSCSVMHFAALHNHYTQKSSLSPGK 449
 (SEQ ID NO. 24)

图 15B

在 IgG 抗体中共同观察到的寡糖结构

结构	缩写	分子量
$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc-}$	Man5	1235
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2) \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc-} \\ \text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6) \text{ } \end{array}$	G-1	1260
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc-}$	G0-F	1317
$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc-}$	Man6	1398

图 16A

在 IgG 抗体中共同观察到的寡糖结构

<u>结构</u>	<u>缩写</u>	<u>分子量</u>
$\begin{array}{c} \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\left\{\begin{array}{l} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array}\right\} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}- \end{array}$	G1-1	1423
$\begin{array}{c} \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}- \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array}$	G0	1463
$\begin{array}{c} \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}- \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array}$	G1 (1-6)	1626
$\begin{array}{c} \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}- \\ \text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array}$	G1 (1-3)	1626
$\begin{array}{c} \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}- \\ \text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array}$	G2	1788

此图中所示的质量对应于(M+Na)⁺值

图 16B

抗 IgE 抗体: 重链(V_H 和 C_H 结构域)

	10	20	30	40	50 a	60	70	80	90
E25	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVGYSIT	SIGYSNNW	IRQ	APGKGLEWVA	[SITYDGSINY	NPSVKG]RTI	SRDDSKNTFY
E26	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVGYSIT	SIGYSNNW	IRQ	APGKGLEWVA	[SITYDGSINY	NPSVKG]RTI	SRDDSKNTFY
HAE1	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVGYSIT	SIGYSNNW	IRQ	APGKGLEWVA	[SITYDGSINY	NPSVKG]RTI	SRDDSKNTFY
Hu-901	[QVQLVQSGAE	VKKPKASVKV	SKASGVTF	S	[MIMLEW	VRQ	APGKGLEWVG	EISPGFTTINY	NEKFKQ
									RAHE
									[TADTSTNTAY
									MELSSLRSED
	100	110ab	120	C_H	starts				
E25	TAVYYCAR	[GS HYFGHWHEAV]	WGQCTLVTVSS	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP	PTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYELSS				
E26	TAVYYCAR	[GS HYFGHWHEAV]	WGQCTLVTVSS	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP	PTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYELSS				
HAE1	TAVYYCAR	[GS HYFGHWHEAV]	WGQCTLVTVSS	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP	PTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYELSS				
Hu-901	TAVYYCAR	[ES HFSGSNYDYFDY]	WGQCTLVTVSS	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP	PTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYELSS				
E25	VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE								
E26	VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE								
HAE1	VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE								
Hu-901	VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE								
E25	VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI	ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE							
E26	VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI	ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE							
HAE1	VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI	ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE							
Hu-901	VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI	ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE							
E25	SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO.: 41							
E26	SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO.: 42							
HAE1	SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO.: 43							
Hu-901	SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO.: 44							

图 17B

轻链可变结构域的序列比对

	FR1	CDR1	
	10 20 30 40		
2H7	QIVLSQSPAILSA SPGEKVTMTC	[RASSSVS-YMH]	WYQQKP
	* ** *		
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVITTC	[RASSSVS-YMH]	WYQQKP
		* * * *	
hum kI	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVITTC	[RASQISNYLA]	WYQQKP
	FR2 CDR2 FR3		
	50 60 70 80		
2H7	GSSPKPWIY [APSNLAS]	GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEA	
	** *	*	*** **
hu2H7.v16	GKAPKPLIY [APSNLAS]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP	
	*	* * *	
hum kI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP	
	CDR3 FR4		
	90 100		
2H7	EDAATYYC [QQWSFNPPT]	FGAGTKLELKR	
	*	* * *	
hu2H7.v16	EDFATYYC [QQWSFNPPT]	FGQGTKVEIKR	
		* * * *	
hum kI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIKR	

图 18A

重链可变结构域的序列比对

	FR1	CDR1	
	10 20 30 40		
2H7	QAYLQQSGAELVR PGASVKMSCKAS	[GYTFTSYNMH]	WVKQT
	*** ** *		* *
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRTSCAAS	[GYTFTSYNMH]	WVRQA
		* * *	
hum III	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA
	FR2 CDR2 FR3		
	50 a 60 70 80		
2H7	PRQGLEWIG [AI YPGNGDTSYNQKFKG]	KATLTVDKSSSTAYM	
	** *	** ** *	** *
hu2H7.v16	PGKGLEWVG [AI YPGNGDTSYNQKFKG]	RFTISVDKSKNTLYL	
	*	* * * * *	*
hum III	PGKGLEWVA [VI SGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLYL	
	CDR3 FR4		
	abc 90 100abcde 110		
2H7	QLSSLTSEDSAVYFCAR [VVIYSNSYWFYFDV]	WGTGTTVTVSS	
	** ** *	*	
hu2H7.v16	QMNSLRAEDTAVYYCAR [VVIYSNSYWFYFDV]	WGQGTLLTVSS	
		***** ** *	
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRVGYSLY---DY]	WGQGTLLTVSS	

图 18B

抗 VEGF 抗体可变结构域序列

抗 VEGF 轻链可变结构域序列:

DIQMTQTSSLSASLGDRVLIISCSASQDISNYLNWYQQKPDGTVKVLIIYFTSSLEHSGVPSRFSGS
GSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSTVPWTFGGGKLEIK
(SEQ ID NO: 31)

抗 VEGF 重链可变结构域序列:

EIQLVQSGPELKQPGETVRIISCKASGYTFITNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPITYAADFK
RRFTFSLETSASTAYLQISNLKNDTATYFCAKYPHYYGSSHWYFDVWGAGTTVTVSS
(SEQ ID NO: 32)

抗 VEGF 抗体轻链可变结构域序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLEHSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGGGKVEIK
(SEQ ID NO: 33)

抗 VEGF 抗体重链可变结构域序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFITNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPITYAADFK
RRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLYTVSS
(SEQ ID NO: 34)

抗 VEGF 抗体轻链可变结构域序列:

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLEHSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGGGKVEIK
(SEQ ID NO: 35)

抗 VEGF 抗体重链可变结构域序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPITYAADFK
RRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGTLYTVSS
(SEQ ID NO: 36)

图 19

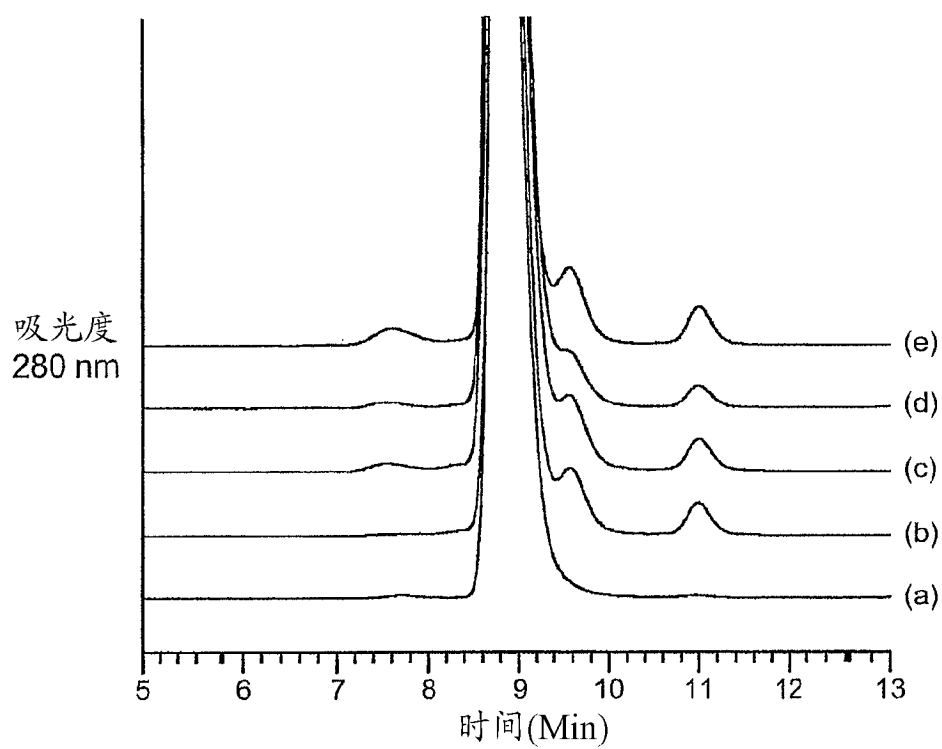


图 20

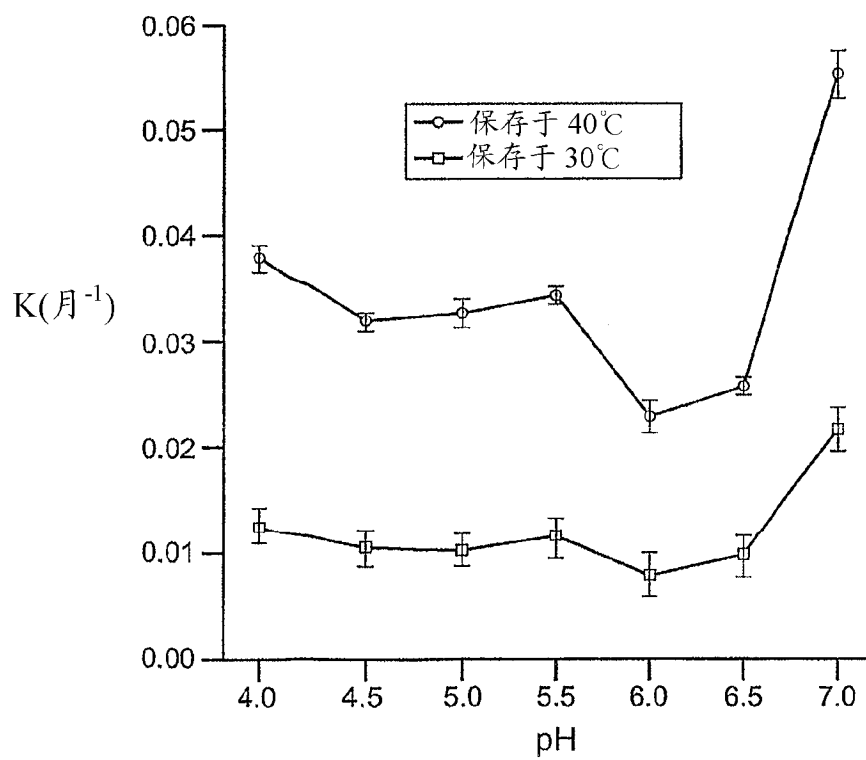


图 21

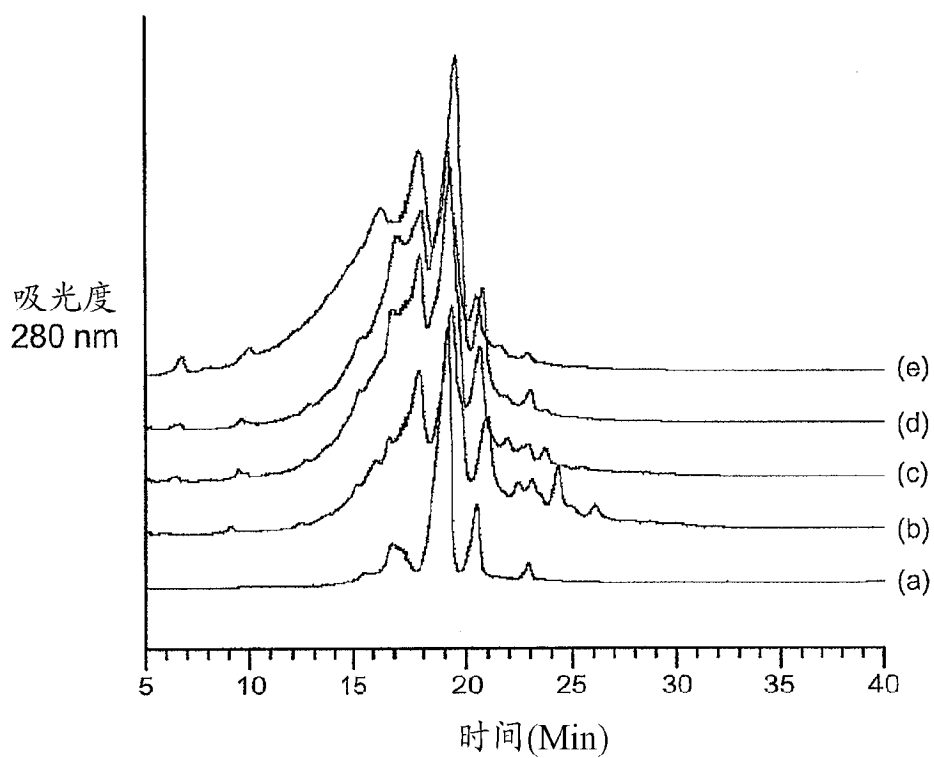


图 22

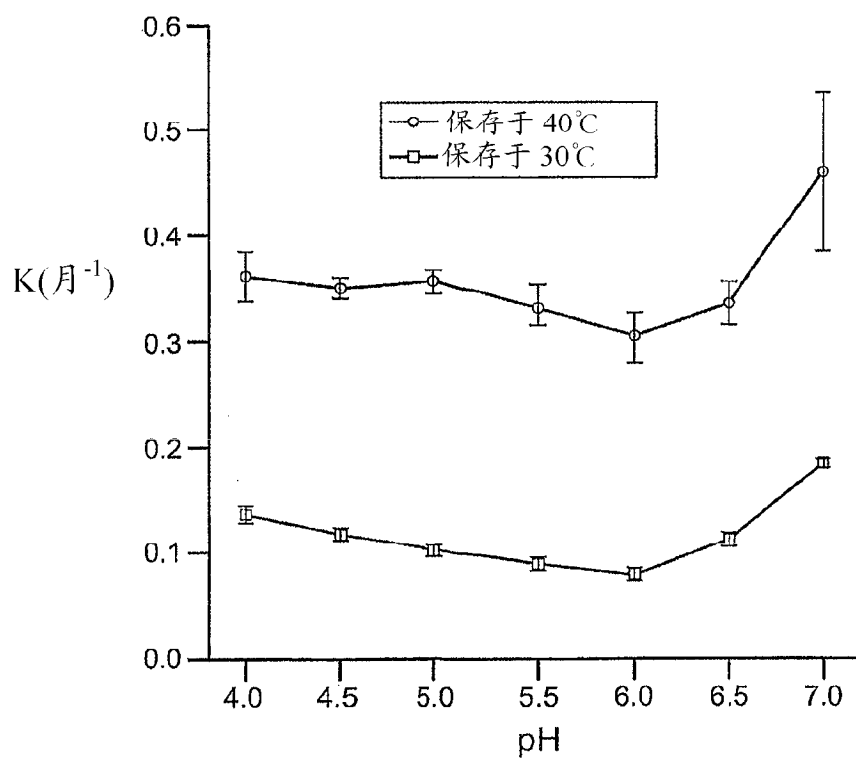


图 23

1 TTTCCCTCACTGACTATATAAAGAAATAGACAAAGGAAGGGCTTACGTGACCGGCTGCCTGGCTGACTTACAGCAGTCAGACTCTGTGACAGGGATC
 1 ATGGCTATGATGGAGGTCCAGGGGGAGCCAGCCCTGGGACACAGACCTGCGTGTGATCGTGTGATCTTTCACAGTGTCTCCTGCAGTCTCTCTGT
 1 MetAlaMetMetGluValGlnGlyGlyProSerLeuGlyGlnThrCysValLeuIleValIlePheThrValLeuLeuGlnSerLeuCys
 181 GTGGCTGTAACTTACGTGTACTTTACCAACGAGCTGAACGAGATGCAGGACAAGTACTCCAAAAGTGGCATTTGTTCTTCTTAAAGAA
 31 ValAlaValThrTyrrValTyrrPheThrAsnGluLeuLysGlnMetGlnAspLysTyrrSerLysSerGlyIleAlaCysPheLeuLysGlu
 271 GATGACAGTTATTGGGACCCCAATGACGAAGAGAGATATCAACAGCCCTGCTGGCAAGTCAAGTGGCAACTCCGTCAAGCTCGTTAGAAAG
 61 AspAspSerTyrrTrpAspProAsnAspGluGluSerMetAsnSerProCysTrpGlnValLysTrpGlnLeuArgGlnLeuValArgLys
 361 ATGATTTTGAGAACTCTCTGAGGAAACCAATTTCTACAGTTCAAGAAAGCAACAATAATTTCTCCCTAGTGAGAGAAAGAGGTCCNCAG
 91 MetIleLeuArgThrSerGluGluThrIleSerThrValGlnGluLysGlnGlnAsnIleSerProLeuValArgGluArgGlyProGln
 451 AGAGTAGCAGCTCACATAACTGGGACCAGAGGAAGCAACACATTTCTCTCCAAACTCCAAAGATGAAAAGGCTCTGGGCCGCAAA
 121 ArgValAlaAlaHisIleThrGlyThrArgGlyArgSerAsnThrLeuSerSerProAsnSerLysAsnGluLysAlaLeuGlyArgLys
 541 ATAAACTCCTGGGAATCATCAAGGAGTGGGCATTCATCCTGAGCAACTTGCACTTGAGGAAATCGTGAACTGGTCAATCCATGAAAAAGGG
 151 IleAsnSerTrpGluSerSerArgSerGlyHisSerPheLeuSerAsnLeuHisLeuArgAsnGlyGluLeuValIleHisGluLysGly
 631 TTTTACTACATCTATTCCCAACACATACTTTCCGATTTTACGGAGGAATAAAGAAAACACAAACGACACAATAATGGTCCCAATATATT
 181 PheTyrrTyrrIleTyrrSerGlnThrTyrrPheArgPheGlnGluGluIleLysGluAsnThrLysAsnAspLysGlnMetValGlnTyrrIle
 721 TACAAATACACAAAGTTATCCTGACCCCTATATTGTTGATGAAAAGTGCTAGAAAATAGTTGTTGGTCTAAAGATGCAGAATATGGACTCTAT
 211 TyrLysTyrrThrSerTyrrProAspProIleLeuLeuMetLysSerAlaArgAsnSerCysTrpSerLysAspAlaGlnTyrrGlyLeuTyrr
 811 TCCATCTATCAAGGGGGAATATTGTGAGCTTAAGGAAAATGACAGCAATTTTGTCTTCTGTAACAAATGAGCACTTGATAGACATGGACCAT
 241 SerIleTyrrGlnGlyIlePheGluLeuLysGluAsnAspArgIlePheValSerValThrAsnGluHisLeuIleAspMetAspHis
 901 GAAGCCAGTTTTTTTCGGGGCCTTTTGTAGTTGGCTAACTGACCTGGAAAGAAAAGCAATAACCTCAAAGTGACTATTTCAGTTTTCAGGAT
 271 GluAlaSerPhePheGlyAlaPheLeuValGlyStp
 991 GATACACTATGAAGATGTTTCAAAAATCTGACCAAAAACAAACACAGAAA

图 24

1 CCACACGGTC CCATATAATC AGCACGGGC CGGAGAACCC CGCAATCTCT CGGCCACAA AATACACCGA CGATCCCCGA TCTACTTTAA GGGCTGAAAC
 GGGTGCGCAG GCGTATTAG TCGTGCGCG GCGTCTGGG GCGGTAGAGA CGCGGTGTT TTATGTGGT GCTACGGGT AGATGAATTT CCGACTTTG
 101 CCACGGGCTT GAGAGACTAT AAGAGGTTT CCTACCGCA TGGACAACG GGGACAGAC GCGCGGGCG CTTCCGGGG CCGGAAGG CACGGCCCG
 GGTGCCCGGA CTCTCTGATA TTCTCGCAAG GGATGGCGT M etGluGlnAr gGlyGlnAsn AlaProAlaA laSerGlyAl aArgLysArg HisGlyProGly
 1 201 GACCCAGGA GCGCGGGA GCCAGGCTG GCGTCCGGT CCCCAAGACC CTTGTGCTCG TTGTGCGCG GGTCTGCTG TTGGTCTCAG CTGAGTCTGC
 CTGGGTCCCT CCGCGCCCT CCGTCCGGAC CCGAGGCCA GGGGTCTGG GAACACGAGC AACAGCGCG CCAGACGAC AACACAGATC GACTCAGACG
 22 ProArgG1 uAlaArgGly AlaArgProG lylLeuArgVa lProLysThr leuValLeuV alValAlaAl aValLeuLeu laGluSerAla
 301 TCTGATCACC CAACAAGACC TAGTCCCCA GAGAGAGCG GCCCACAAAC AAAAGAGTC CAGCCCTCA GAGGATGTT GTCCACCTGG ACACATATC
 AGACTAGTGG GTGTCTCTGG ATCGAGGGT CCGTCTCTGC CGGGTGTGG TTTTCTCAG GTCGGGGAGT CTCCCTAACA CAGGTGGACC TGTTGTATAG
 55 LeuIleThr GlnGlnAspL euAlaProG1 nGlnArgAla AlaProGlnG InLysArgSe rSerProSer GluGlyLeuC ysProProG1 yHisHisIle
 401 TCAGAGACG GTAGAGATTG CATCTCTGC AAATATGGAC AGGACTATAG CACTCACTGG AATGACCTCC TTTTCTGCTT GCGCTGCACC AGGTGTGATT
 AGTCTTCTGC CATCTCTAAC GTAGAGGACG TTTATACCTG TCCTGATATC GTGAGTGACC TTACTGGAGG AAAAGACGAA CCGACGTGG TCCACACTAA
 88 SerGluAspG lylArgAspCy sIleSerCys LysTyrGlyG InAspTyrSe rThrHisTrp AsnAspLeuL euPheCysLe uArgCysThr ArgCysAspSer
 501 CAGGTGAAGT GGAGCTAAGT CCCTGCACCA CGACAGAAA CACAGTGTGT CAGTGGGAG AAGGCACCTT CCGGGAAGAA GATTCTCCTG AGATGTCCG
 GTCCACTTCA CCTCGATTCA GGGACGTGGT GCTGGTCTTT GTGTACACA GTCAAGCTTC TTCCGTGGAA GCGCTTCTT CTAAAGAGGAC TCTACACGGC
 122 GlyGluVa lGluLeuSer ProCysThrT hrThrArgAs nThrValCys GlnCysGluG lylGlyThrPh eArgGluGlu AspSerProG luMetCysArg
 601 GAAGTGCCG ACAGGCTGTC CCAGAGGGAT GGTCAAGGTC GGTGATTGTA CACCTGGAG TGACATCGAA TGTGTCCACA AAGAATCAGG CATCATCATA
 CTTACACGGC TGTCCACAG GGTCTCCCTA CCAGTTCAG CCCTAACAT GTGGGACCTC ACTGTAGCTT ACACAGTGT TTCTTAGTCC GTAGTAGTAT
 155 LysCysArg ThrGlyCysP roArgGlyMe tValLysVal GlyAspCysT hrProTrpSe rAspIleGlu CysValHisL ysGluSerG1 yIleIleIle
 701 GGAGTCACAG TTGCAGCCGT AGTCTTGATT GTGGCTGTGT TTGTTTGC AA GTCTTTACTG TGAAGAAGG TCCTTCTTAA CTTGAAGGC ATCTGTCTCAG
 CCTCAGTGT ACCTTCGCA TCAGAACTAA CACCGACACA AACAAAGTT CAGAAATGAC ACCTTCTTTC AGGAAGGAAT GGACTTTCCG TAGACGAGTC
 188 GlyValThrV alAlaAlaVa lValLeuIle ValAlaValP heValCysLy sSerLeuLeu TrpLysLysV alLeuProTy rLeuLysGly IleCysSerGly
 801 GTGGTGGTGG GGACCCCTGAG CGTGTGGACA GAAGCTACA ACGACTGGG GCTGAGGACA ATGCTCTCAA TGAGATCGTG AGTATCTTGC AGCCACACCA
 CACCACACCC CCTGGGACTC GCACACCTGT CTTGCACTGT TGCTGACCC CGACTCTGTG TACAGGAGTT ACTCTAGCAC TCATAGACG TCGGTGGGT
 222 GlyGlyG1 yAspProGlu ArgValAspA rgSerSerG1 nArgProGly AlaGluAspA snValLeuAs nGluIleVal SerIleLeuG InProThrGln

25A

901 GGTCCCTGAG CAGGAAATGG AAGTCCAGGA GCCAGCAGAG CCAACAGGTG TCAACATGTT GTCCCCCGGG GAGTCAGAGC ATCTGCTGGA ACCGGCAGAA
 CCAGGGACTC GTCCCTTACC TTCAGGTCTT CGGTGCTCTC GGTGTGTCAC AGTTGTACAA CAGGGGGCCC CTCAGTCTCG TAGACGACCT TGGCCCTCTT
 255 ValProGlu GlnGluMetG luValGlnGlu uProAlaGlu uProAlaGlu uProAlaGlu uProAlaGlu uProAlaGlu uProAlaGlu
 1001 GCTGAAAGGT CTCAGAGGAG GAGGCTGCTC GTTCCAGCAA ATGAAGTGA TCCACUGAG ACTCTGAGAC AGTGTTCGA TGACTTTGCA GACTTGTGC
 CGACTTTCCA GAGTCTCTC CTCCGACGAC CAAGTCTGTT TACTTCCACT AGGTGACTC TGAGACTCTG TCACGAGCT ACTGAAACGT CTGAAACACG
 288 AlaGluArgS erGlnArgAr gArgLeuLeu ValProAlaA snGluGlyAs pProThrGlu ThrLeuArgG lnCysPheAs pAspPheAla AspLeuValPro
 1101 CCTTTGACTC CTGGGAGCCG CTCATGAGGA AGTTGGGCCCT CATGGACAAT GAGATAAAGG TGGCTAAAGC TGAGGCAGCG GGCCACAGGG ACACCTTGTA
 GGAAACTGAG GACCTTCGGC GAGTACTCTT TCAACCCGGA GTACCTGTTA CTCTATTTC ACCGATTTCC ACTCCGTCGC CCGGTGTCCT TGTGGAAACAT
 322 PheAspSe rTrpGluPro, LeuMetArgL ysLeuGlyLe uMetAspAsn GluIleLysV alAlaLysAl agluAlaAla GlyHisArgA spThrLeuLyr
 1201 CACGATGCTG ATAAAGTGG TCAACAAAAC CGGGCGAGAT GCCTCTGTCC ACACCTCTCT GGATGCCCTTG GAGACGCTGG GAGAGAGACT TGCCAAAGCAG
 GTGCTACGAC TATTTTCACCC AGTTGTCTTG GCCCGCTCTA CGGAGACAGG TGTGGGACGA CCTACGGAAC CTCTGCGACC CTCTCTCTGA ACGGTTCGTC
 355 ThrMetLeu IleLysTrpV alAsnLysTh rGlyArgAsp AlaSerValH isThrLeuLe uAspAlaLeu GluThrLeuG lyGluArgLe uAlaLysGln
 1301 AAGATTGAGG ACCACTTGTG GAGCTCTGGA AAGTTTCATGT ATCTAGAAGG TAATGCAGAC TCTGCCWTGT CCTAAGTGTG ATTCTCTTCA GGAAGTGAGA
 TTCTAACTCC TGGTGAACAA CTCGAGACCT TTCAAAGTACA TAGATCTTCC ATTACGTCTG AGACGGAACA GGATTCACAC TAAGAGAAAGT CCTTCACTC:
 388 LysIleGluA spHisLeuLe uSerSerGly LysPheMetT yrLeuGluG lYasnAlaasp SerAlaXaaS erOC*
 1401 CCTTCCCTGG TTTACCTTTT TTCTGGAAA AGCCCAACTG GACTCCAGTC AGTAGGAAAG TGCCACAATT GTCACATGAC CGGTACTGGA AGAACTCTC
 GGAAGGGACC AAATGGAAA AAGACCTTTT TCGGGTTGAC CTGAGGTCAG TCATCTCTTC ACGGTGTAA CAGTGTACTG GCCATGACCT TCTTTTGAGAG
 1501 CCATCCAACA TCACCCAGTG GATGGAACAT CCTGTAACCTT TTCACCTGCAC TTGGCATATAT TTTTATAAGC TGAATGTGAT AATAAGGACA CTATGGAAA:
 GGTAGGTTCT AGTGGGTAC CTACCTTGTA GGACATTGAA AAGTGACGTG AACCGTAATA AAAATATTCG ACTTACACTA TTAATTCCTGT GATACCTTTA
 1601 GTCTGGATCA TTCCGTTTGT GGTACTTTTG AGATTGGTT TGGGATGTCA TTGTTTTCAC AGCACTTTT TATCCTAATG TAAATGCTTT ATTTATTTA:
 CAGACCTAGT AAGGCAACA CGCATGAAC TCTAALACCA ACCCTACAGT AACAAAAGTG TCGTGAATAA ATAGGATTAC ATTTTACGAAA TAAATAATA
 1701 TTGGGCTACA TTGTAAGATC CATCTACAAA AAAAAAAA GCGGCGCGG ACTCTAGAGT CGACCTGAG AAGCTTGGCC GCCATGGCC
 AACCAGATCT AACATCTAG GTAGATGTTT TTTTCTTTT TTTTCTTTT TTTTCTTTT TTTTCTTTT TTTTCTTTT TTTTCTTTT TTTTCTTTT


 25B

ATC	CAA	CAA	CGG	GGA	CAG	AAC	GCC	CCG	GCC	GCT	TCG	GGG	GCC	CGG	AAA	48
Met	Glu	Gln	Arg	Gly	Gln	Asn	Ala	Pro	Ala	Ala	Ser	Gly	Ala	Arg	Lys	
1				5					10					15		
AGG	CAC	GGC	CCA	GGA	CCC	AGG	GAG	GCG	CGG	GGA	GCC	AGG	CCT	GGG	CCC	96
Arg	His	Gly	Pro	Gly	Pro	Arg	Glu	Ala	Arg	Gly	Ala	Arg	Pro	Gly	Pro	
			20					25					30			
CGG	GTC	CCC	AAG	ACC	CTT	GTG	CTC	GTT	GTC	GCC	GCG	GTC	CTG	CTG	TTG	144
Arg	Val	Pro	Lys	Thr	Leu	Val	Leu	Val	Val	Ala	Ala	Val	Leu	Leu	Leu	
		35					40					45				
GTC	TCA	GCT	GAG	TCT	GCT	CTG	ATC	ACC	CAA	CAA	GAC	CTA	GCT	CCC	CAG	192
Val	Ser	Ala	Glu	Ser	Ala	Leu	Ile	Thr	Gln	Gln	Asp	Leu	Ala	Pro	Gln	
	50					55					60					
CAG	AGA	GCG	GCC	CCA	CAA	CAA	AAG	AGG	TCC	AGC	CCC	TCA	GAG	GGA	TTG	240
Gln	Arg	Ala	Ala	Pro	Gln	Gln	Lys	Arg	Ser	Ser	Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	
65				70						75					80	
TGT	CCA	CCT	GGA	CAC	CAT	ATC	TCA	GAA	GAC	GGT	AGA	GAT	TGC	ATC	TCC	288
Cys	Pro	Pro	Gly	His	His	Ile	Ser	Glu	Asp	Gly	Arg	Asp	Cys	Ile	Ser	
				85					90					95		
TGC	AAA	TAT	GGA	CAG	GAC	TAT	AGC	ACT	CAC	TGG	AAT	GAC	CTC	CTT	TTC	336
Cys	Lys	Tyr	Gly	Gln	Asp	Tyr	Ser	Thr	His	Trp	Asn	Asp	Leu	Leu	Phe	
			100					105					110			
TGC	TTG	CGC	TGC	ACC	AGG	TGT	GAT	TCA	GGT	GAA	GTC	GAG	CTA	AGT	CCG	384
Cys	Leu	Arg	Cys	Thr	Arg	Cys	Asp	Ser	Gly	Glu	Val	Glu	Leu	Ser	Pro	
		115					120					125				
TGC	ACC	ACG	ACC	AGA	AAC	ACA	GTG	TGT	CAG	TGC	GAA	GAA	GGC	ACC	TTC	432
Cys	Thr	Thr	Thr	Arg	Asn	Thr	Val	Cys	Gln	Cys	Glu	Glu	Gly	Thr	Phe	
	130					135					140					
CGG	GAA	GAA	GAT	TCT	CCT	GAG	ATG	TGC	CGG	AAG	TGC	CGC	ACA	GGG	TGT	480
Arg	Glu	Glu	Asp	Ser	Pro	Glu	Met	Cys	Arg	Lys	Cys	Arg	Thr	Gly	Cys	
145					150					155					160	
CCC	AGA	GGG	ATG	GTC	AAG	GTC	GGT	GAT	TGT	ACA	CCC	TGG	AGT	GAC	ATC	528
Pro	Arg	Gly	Met	Val	Lys	Val	Gly	Asp	Cys	Thr	Pro	Trp	Ser	Asp	Ile	
				165				170						175		
GAA	TGT	GTC	CAC	AAA	GAA	TCA	GGT	ACA	AAG	CAC	AGT	GGG	GAA	GCC	CCA	576
Glu	Cys	Val	His	Lys	Glu	Ser	Gly	Thr	Lys	His	Ser	Gly	Glu	Ala	Pro	
			180					185					190			
GCT	GTG	GAG	GAG	ACG	GTG	ACC	TCC	AGC	CCA	GGG	ACT	CCT	GCC	TCT	CCC	624
Ala	Val	Glu	Glu	Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Ser	Pro	
		195					200					205				
TGT	TCT	CTC	TCA	GGC	ATC	ATC	ATA	GGA	GTC	ACA	GTT	GCA	GCC	GTA	GTC	672
Cys	Ser	Leu	Ser	Gly	Ile	Ile	Ile	Gly	Val	Thr	Val	Ala	Ala	Val	Val	
	210					215					220					

图 26A

TTG	ATT	GTG	GCT	GTG	TTT	GTT	TGC	AAG	TCT	TTA	CTG	TGG	AAG	AAA	GTC	720
Leu	Ile	Val	Ala	Val	Phe	Val	Cys	Lys	Ser	Leu	Leu	Trp	Lys	Lys	Val	
225					230					235					240	
CTT	CCT	TAC	CTG	AAA	GGC	ATC	TGC	TCA	GGT	GGT	GGT	GGG	GAC	CCT	GAG	768
Leu	Pro	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ile	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp	Pro	Glu	
				245					250					255		
CGT	GTG	GAC	AGA	AGC	TCA	CAA	CGA	CCT	GGG	GCT	GAG	GAC	AAT	GTC	CTC	816
Arg	Val	Asp	Arg	Ser	Ser	Gln	Arg	Pro	Gly	Ala	Glu	Asp	Asn	Val	Leu	
			260					265					270			
AAT	GAG	ATC	GTG	AGT	ATC	TTG	CAG	CCC	ACC	CAG	GTC	CCT	GAG	CAG	GAA	864
Asn	Glu	Ile	Val	Ser	Ile	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Val	Pro	Glu	Gln	Glu	
			275				280					285				
ATG	GAA	GTC	CAG	GAG	CCA	GCA	GAG	CCA	ACA	GGT	GTC	AAC	ATG	TTG	TCC	912
Met	Glu	Val	Gln	Glu	Pro	Ala	Glu	Pro	Thr	Gly	Val	Asn	Met	Leu	Ser	
			290				295					300				
CCC	GGG	GAG	TCA	GAG	CAT	CTG	CTG	GAA	CCG	GCA	GAA	GCT	GAA	AGG	TCT	960
Pro	Gly	Glu	Ser	Glu	His	Leu	Leu	Glu	Pro	Ala	Glu	Ala	Glu	Arg	Ser	
305					310					315					320	
CAG	AGG	AGG	AGG	CTG	CTG	GTT	CCA	GCA	AAT	GAA	GGT	GAT	CCC	ACT	GAG	1008
Gln	Arg	Arg	Arg	Leu	Leu	Val	Pro	Ala	Asn	Glu	Gly	Asp	Pro	Thr	Glu	
				325					330					335		
ACT	CTG	AGA	CAG	TGC	TTC	GAT	GAC	TTT	GCA	GAC	TTG	GTG	CCC	TTT	GAC	1056
Thr	Leu	Arg	Gln	Cys	Phe	Asp	Asp	Phe	Ala	Asp	Leu	Val	Pro	Phe	Asp	
			340					345					350			
TCC	TGG	GAG	CCG	CTC	ATG	AGG	AAG	TTG	GGC	CTC	ATG	GAC	AAT	GAG	ATA	1104
Ser	Trp	Glu	Pro	Leu	Met	Arg	Lys	Leu	Gly	Leu	Met	Asp	Asn	Glu	Ile	
			355				360					365				
AAG	GTG	GCT	AAA	GCT	GAG	GCA	GCG	GGC	CAC	AGG	GAC	ACC	TTG	TAC	ACG	1152
Lys	Val	Ala	Lys	Ala	Glu	Ala	Ala	Gly	His	Arg	Asp	Thr	Leu	Tyr	Thr	
			370				375					380				
ATG	CTG	ATA	AAG	TGG	GTC	AAC	AAA	ACC	GGG	CGA	GAT	GCC	TCT	GTC	CAC	1200
Met	Leu	Ile	Lys	Trp	Val	Asn	Lys	Thr	Gly	Arg	Asp	Ala	Ser	Val	His	
385					390					395					400	
ACC	CTG	CTG	GAT	GCC	TTG	GAG	ACG	CTG	GGA	GAG	AGA	CTT	GCC	AAG	CAG	1248
Thr	Leu	Leu	Asp	Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Gly	Glu	Arg	Leu	Ala	Lys	Gln	
				405					410					415		
AAG	ATT	GAG	GAC	CAC	TTG	TTG	AGC	TCT	GGA	AAG	TTC	ATG	TAT	CTA	GAA	1296
Lys	Ile	Glu	Asp	His	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Lys	Phe	Met	Tyr	Leu	Glu	
			420					425					430			
GGT	AAT	GCA	GAC	TCT	GCC	ATG	TCC	TAA								1323
Gly	Asn	Ala	Asp	Ser	Ala	Met	Ser	*								
			435				440									

图 26B

EVQLVQSGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGINWQGGSTGY
ADSVKGRVTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKILGAGRGWYFDYWGKGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

<451 残基; 0 终止; 分子量: 49167.50

图 27

SELTQDPAVSVALGQTVRITCSGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGANNRPSGIPDRF
SGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSADSSGNHVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP
PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQSNNKYAASSYLS
LTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

<213 残基; 0 终止; 分子量: 22400.70

图 28

比对, 16ES 和 Apomab 7.3 重链

16E2	1	EVQLVQSGGGVERP	GGSLRLSCAASGFTFDDYGMSW
			*
Apomab7.3	1	EVQLVQSGGGVERP	GGSLRLSCAASGFTFDDYAMSW
16E2	37	VRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRVTISRDN	AKNSLYLQMNSL
			*
Apomab7.3	37	VRQAPGKGLEWVSGINWQGGSTGYADSVKGRVTISRDN	AKNSLYLQMNSL
16E2	87	RAEDTAVYYCAKILGAGRGWYFDLWGKGT	TVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
			*
Apomab7.3	87	RAEDTAVYYCAKILGAGRGWYFDYWGKGT	TVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
16E2	137	KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT	SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
Apomab7.3	137	KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT	SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
16E2	187	SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK	THTCPPCPAP
Apomab7.3	187	SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK	THTCPPCPAP
16E2	237	ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK	FNWYVDGV
Apomab7.3	237	ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK	FNWYVDGV
16E2	287	EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC	KVSNKALPAPI
Apomab7.3	287	EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC	KVSNKALPAPI
16E2	337	EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE
Apomab7.3	337	EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE
16E2	387	SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN	VFSCSVMHEAL
Apomab7.3	387	SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN	VFSCSVMHEAL
16E2.huIgG1	437	HNHYTQKSLSLSPGK	
Apomab7.3	437	HNHYTQKSLSLSPGK	

图 29

比对, 16ES 和 Apomab 7.3 轻链

16E2	1	SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGD [*] SLRSYYASWYQQKPGQ [*] APVLVIYGKN
Apomab7.3	1	SELTQDPAVSVALGQTVRITCSG [*] DSLRSYYASWYQQKPGQ [*] APVLVIYGAN
16E2	51	NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRD [*] SSGNHVVFGG
Apomab7.3	51	NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSAD [*] SSGNHVVFGG
16E2	101	GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF [*] YPGAVTVAWK
Apomab7.3	101	GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF [*] YPGAVTVAWK
16E2	151	ADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEG
Apomab7.3	151	ADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEG
16E2	201	STVEKTVAPTECS
Apomab7.3	201	STVEKTVAPTECS

图 30

Apomab 重链 可变结构域序列

CDR H1

EVQLVQSGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMWVRQAPGKGLEWV

CDR H2

SGINWQGGSTGYADSVKGRVTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK

CDR H3

ILGAGRGWYFDYWGKGTTVTVSSASTKGP

图 31A

Apomab 轻链可变结构域序列

CDR L1
 SELTQDPAVSVALGQTVRITCS**SGDSLRSYYAS**WYQQKPGQAPVLIY

CDR L2CDRL3
GANNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSADSSGNHVV

FGGGTKLTVLG

图 31B

轻链比对

	1	32
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP	
	*****.*****	
hu2H7.v511	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP	
	52	
hu2H7.v16	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQG	
	*****.*****	
hu2H7.v511	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQG	
	102	
hu2H7.v16	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	

hu2H7.v511	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	
	152	
hu2H7.v16	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	

hu2H7.v511	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	
	202	214
hu2H7.v16	SSPVTKSFNRGEC	

hu2H7.v511	SSPVTKSFNRGEC	

图 32

重链比对

hu2H7.v16	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW

hu2H7.v511		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW
hu2H7.v16	37	52a
		82abc
		VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL

hu2H7.v511		VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL
hu2H7.v16	83	100abcde
		113
		RAEDTAVYYCARVYYSNSYWFYFDVWGQGTLLVTVSS

hu2H7.v511		RAEDTAVYYCARVYYSYRYWFYFDVWGQGTLLVTVSS
hu2H7.v16	118	
		ASTKGPSVFPLAPS

hu2H7.v511		ASTKGPSVFPLAPS
hu2H7.v16	132	
		SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTFSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS

hu2H7.v511		SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTFSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
hu2H7.v16	182	
		LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA

hu2H7.v511		LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
hu2H7.v16	232	
		PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG

hu2H7.v511		PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
hu2H7.v16	282	
		VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP

hu2H7.v511		VEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAAALPAP
hu2H7.v16	332	
		IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
		* *****
hu2H7.v511		IAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
hu2H7.v16	382	
		ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEA

hu2H7.v511		ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEA
hu2H7.v16	432	447
		LHNHYTQKSLSLSPGK

hu2H7.v511		LHNHYTQKSLSLSPGK

图 33