



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1795009 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 09

(21) 申请号 200380102406. 0

C12N 15/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2003. 11. 05

C12N 5/06 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 5/16 (2006. 01)

60/424, 332 2002. 11. 07 US

C07H 21/04 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2005. 04. 29

W0 94/10332 A1, 1994. 05. 11, 说明书第 23 页.

(86) PCT国际申请的申请数据

Sievers EL. Efficacy and safety of gentuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *Expert Opin Biol Ther* 15. 2001, 1(5), 893-901.

PCT/US2003/032737 2003. 11. 05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02004/043344 EN 2004. 05. 27

(73) 专利权人 伊谬诺金公司

审查员 田园

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 M·G·霍费 D·塔瓦雷斯

R·J·卢茨

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

A61K 39/40 (2006. 01)

A61K 39/42 (2006. 01)

A61K 39/44 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书27页

序列表32页 附图25页

(54) 发明名称

抗-CD33 抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及结合 CD33 的抗体。更特别地是，本发明涉及抗 CD33 抗体，所述抗体的片段和同源物，所述抗体的人源化和表面重整形式，所述抗体的功能等价物和改良形式，含有所述抗体的免疫偶联物和组合物，及其在诊断、研究和治疗中的应用。本发明也涉及编码该抗体的多核苷酸，含有该多核苷酸的载体，用多核苷酸转化的宿主细胞，以及制备该抗体的方法。

1. 一种抗体,其具有与 CD33 结合的能力,包括至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区,

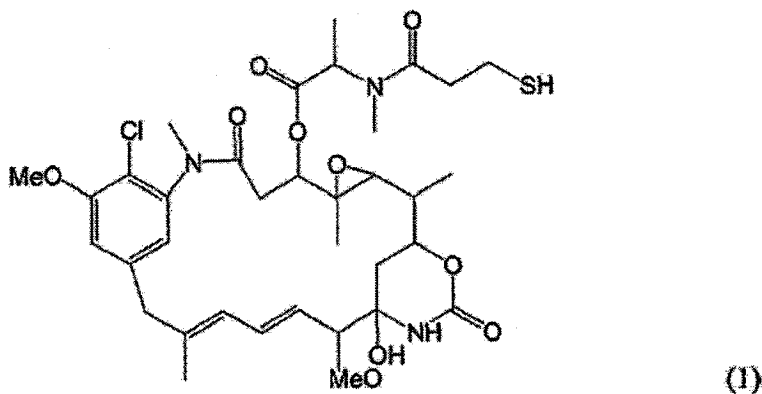
其中所述重链可变区由 SEQ ID NO :7 或由 SEQ ID NO :9 所示的氨基酸序列组成,和其中轻链可变区由 SEQ ID NO :8 或 SEQ ID NO :10 所示的氨基酸序列组成。

2. 权利要求 1 的抗体,其包括具有 SEQ ID NO :7 或 SEQ ID NO :9 所示氨基酸序列的重链可变区和具有 SEQ ID NO :8 或 SEQ ID NO :10 所示氨基酸序列的轻链可变区。

3. 一种与 CD33 特异性结合的纯化的抗体,其中所述抗体的重链可变区部分由 SEQ ID NO :7 所示的氨基酸序列组成,且其中所述抗体的轻链可变区部分由 SEQ ID NO :8 所示的氨基酸序列组成。

4. 一种与 CD33 特异性结合的人源化或表面重整抗体,其中所述抗体的重链可变区部分由 SEQ ID NO :9 所示的氨基酸序列组成,且其中所述抗体的轻链可变区由 SEQ ID NO :10 所示的氨基酸序列组成。

5. 一种免疫-偶联物,包括与药物或前体药物连接的权利要求 1 所述的抗体,其中所述药物或前体药物是由下述结构式 (I) 表示的美登木素生物碱:



6. 一种组合物,包括权利要求 1 所述的抗体和未连接的药物或前体药物。

7. 一种药学组合物,包括权利要求 5 所述的免疫-偶联物,以及药学上可接受试剂。

8. 一种药学组合物,包括权利要求 6 所述的组合物,以及药学上可接受试剂。

9. 一种诊断试剂,包括权利要求 1 所述的抗体,其中所述的抗体是被标记的。

10. 权利要求 9 的诊断试剂,其中所述的标记选自生物素标记,酶标记,放射性标记,荧光基团,发色团,显影剂和金属离子。

11. 一种体外抑制表达 CD33 的细胞之生长的方法,包括将所述的细胞与权利要求 5 所述的免疫-偶联物接触。

12. 一种体外抑制表达 CD33 的细胞之生长的方法,包括将所述的细胞与权利要求 6 所述的组合物接触。

13. 一种体外抑制表达 CD33 的细胞之生长的方法,包括将所述的细胞与选自权利要求 7 或 8 其中之一所述药学组合物接触。

14. 权利要求 1 所述的抗体在制备用于治疗患有其中表达 CD33 的疾病的受试对象的药物中的用途。

15. 权利要求 5 所述的免疫-偶联物在制备用于治疗患有其中表达 CD33 的疾病的受试对象的药物中的用途。

16. 权利要求6所述的组合物在制备用于治疗患有其中表达CD33的疾病的受试对象的药物中的用途。

17. 包括权利要求1所述的抗体以及药学上可接受试剂的药学组合物在制备用于治疗患有其中表达CD33的疾病的受试对象的药物中的用途。

18. 权利要求7所述的药学组合物在制备用于治疗患有其中表达CD33的疾病的受试对象的药物中的用途。

19. 权利要求8所述的药学组合物在制备用于治疗患有其中表达CD33的疾病的受试对象的药物中的用途。

20. 权利要求1所述的抗体在制备用于治疗患有其中表达CD33的疾病的受试对象的药物中的用途,其中所述药物被离体使用,包括将所述受试对象的一个或多个细胞离体接触有效量的所述药物。

21. 权利要求5所述的免疫-偶联物在制备用于治疗患有其中表达CD33的疾病的受试对象的药物中的用途,其中所述药物被离体使用,包括将所述受试对象的一个或多个细胞离体接触有效量的所述药物。

22. 权利要求6所述的组合物在制备用于治疗患有其中表达CD33的疾病的受试对象的药物中的用途,其中所述药物被离体使用,包括将所述受试对象的一个或多个细胞离体接触有效量的所述药物。

23. 选自包括权利要求1所述的抗体以及药学上可接受试剂的药学组合物,或权利要求7或8其中之一所述的药学组合物在制备用于治疗患有其中表达CD33的疾病的受试对象的药物中的用途,其中所述药物被离体使用,包括将所述受试对象的一个或多个细胞离体接触有效量的所述药物。

24. 权利要求14中的用途,其中所述疾病选自骨髓增生异常综合症(MDS),急性髓性白血病(AML),慢性髓性白血病(CML)和前髓细胞性白血病(PML)。

25. 权利要求15中的用途,其中所述的疾病选自骨髓增生异常综合症(MDS),急性髓性白血病(AML),慢性髓性白血病(CML)和前髓细胞性白血病(PML)。

26. 权利要求16中的用途,其中所述的疾病选自骨髓增生异常综合症(MDS),急性髓性白血病(AML),慢性髓性白血病(CML)和前髓细胞性白血病(PML)。

27. 权利要求17中的用途,其中所述的疾病选自骨髓增生异常综合症(MDS),急性髓性白血病(AML),慢性髓性白血病(CML)和前髓细胞性白血病(PML)。

28. 权利要求18中的用途,其中所述的疾病选自骨髓增生异常综合症(MDS),急性髓性白血病(AML),慢性髓性白血病(CML)和前髓细胞性白血病(PML)。

29. 权利要求19中的用途,其中所述的疾病选自骨髓增生异常综合症(MDS),急性髓性白血病(AML),慢性髓性白血病(CML)和前髓细胞性白血病(PML)。

30. 权利要求20中的用途,其中所述的疾病选自骨髓增生异常综合症(MDS),急性髓性白血病(AML),慢性髓性白血病(CML)和前髓细胞性白血病(PML)。

31. 权利要求21中的用途,其中所述的疾病选自骨髓增生异常综合症(MDS),急性髓性白血病(AML),慢性髓性白血病(CML)和前髓细胞性白血病(PML)。

32. 权利要求22中的用途,其中所述的疾病选自骨髓增生异常综合症(MDS),急性髓性白血病(AML),慢性髓性白血病(CML)和前髓细胞性白血病(PML)。

33. 权利要求 23 中的用途,其中所述的疾病选自骨髓增生异常综合症 (MDS),急性髓性白血病 (AML),慢性髓性白血病 (CML) 和前髓细胞性白血病 (PML)。

34. 权利要求 9 所述的诊断试剂在制备用于测定生物样品中是否含有骨髓性癌细胞的药物中的用途。

35. 权利要求 34 的用途,其中所述癌症选自急性髓性白血病 (AML),慢性髓性白血病 (CML) 和前髓细胞性白血病 (PML)。

36. 一种分离的多核苷酸,编码权利要求 1 所述的抗体。

37. 一种重组载体,含有权利要求 36 所述的多核苷酸。

38. 一种宿主细胞,用权利要求 37 所述的重组载体转化。

39. 一种用于产生具有结合 CD33 能力的抗体的方法,所述方法包括 (a) 培养权利要求 38 所要求保护的宿主细胞,在所述宿主细胞表达所述抗体的条件下,和 (b) 收集如此表达的抗体。

40. 一种用于从生物材料中获得 CD33 的方法,所述方法包括:

(a) 将生物材料与权利要求 1 所述的抗体接触,

(b) 允许权利要求 1 所述的抗体与所述生物材料中的 CD33 结合,和

(c) 从该生物材料中分离与 CD33 结合的抗体,从而从生物材料中获得 CD33。

抗-CD33 抗体及其用途

[0001] 本发明要求 2002 年 11 月 7 日提交的临时申请号为 60/424,332 的权益,该临时申请的公开内容并入本文,作为参考。

技术领域

[0002] 本发明涉及结合 CD33 的抗体。更特别地是,本发明涉及抗 CD33 抗体,所述抗体的片段和同源物,所述抗体的人源化和表面重整 (resurfaced) 形式,抗体的功能等价物和改良形式,含有所述抗体的免疫偶联物 (immunoconjugate) 和组合物,以及其在诊断、研究和治疗中的应用。

[0003] 在另一个方面,本发明涉及编码该抗体的多核苷酸,含有该多核苷酸的载体,用多核苷酸转化的宿主细胞和产生该抗体的方法。

背景技术

[0004] 白细胞分化抗原 (leukocyte differentiation antigen)CD33 是一个具有 364 个氨基酸的跨膜糖蛋白,其与唾液酸粘附素家族的成员具有序列同源性,包括髓鞘相关糖蛋白和 CD22,以及唾液酸粘附素本身 (S.Peiper,2002, Leucocyte Typing VII, White Cell Differentiation, Antigens, Proceedings of the Seventh International Workshop and Conference, Oxford University Press, p. 777)。

[0005] CD33 的表达似乎对造血区室 (hematopoietic compartment) 有高度的特异性,由骨髓前体细胞进行强表达 (S.Peiper,2002)。它可被下列细胞表达,骨髓祖细胞 (myeloid progenitor cells),如 CFU-GEMM、CFU-GM、CFU-G 和 BFU-E,单核细胞 / 巨噬细胞,粒细胞前体如前髓细胞和髓细胞细胞,尽管在成熟和分化过程中表达降低,以及可被成熟的粒细胞表达,尽管其表达水平低 (S.Peiper,2002)。

[0006] 相反,在体外产生“胚细胞集落 (blast colonies)” (Leary, A. G. et al., 1987, Blood 69 :953)、并诱导造血骨髓长期培养 (Andrews R. G. et al., 1989, J. Exp. Med. 169 : 1721 ;Sutherland, H. J. 等人,1989, Blood 74 :1563) 的多能造血干细胞似乎缺乏 CD33 的表达。

[0007] 尽管 CD33 的特殊功能还不清楚,但其与唾液酸粘附素的同源性提示其在凝集素家族的碳水化合物结合特性中的作用,这种作用随后被证实 (S.Peiper,2002)。

[0008] 重要的是,抗-CD33 单克隆抗体已经显示:CD33 可在超过 80% 的人类病例的克隆发生性,急性骨髓性白血病 (AML) 细胞上表达 (LaRussa, V. F. et al., 1992, Exp. Hematol. 20 :442-448)。

[0009] 由于 CD33 的选择性表达,结合细胞毒类药物的免疫偶联物,能特异识别和结合 CD33 的单克隆抗体,已经被建议用于选择性靶向 AML 细胞。这种治疗法期望可使干细胞和原始的造血祖细胞不受影响。使用抗 CD33 抗体的免疫偶联物,包括抗-CD33-蓖麻毒素免疫偶联物,其已经显示对 AML 细胞是高度致死性的 (Roy, D. C. et al., 1991, Blood 77 :2404 ; Lambert, J. M. et al., 1991, Biochemistry 30 :3234),然而却不伤害支持正常的造血作用

和造血系统重建的干细胞 (LaRussa, V. F. et al., 1992, Exp. Hemato. 20 :442-448)。

[0010] 使用免疫偶联物的其他研究显示:当静脉给药时,放射性标记的抗 CD33 抗体可迅速靶向外周血和骨髓中的白血病母细胞 (Scheinberg, D. A. et al., 1991, J. Clin. Oncol. 9 :478-490 ;Schwartz, M. A. et al., 1993, J. Clin. Oncol. 11 :294-303)。在体外研究中也观察到靶细胞对抗体的迅速内化 (Tanimot, M. et al., 1989, Leukemia 3 :339-348 ;Divgi, C. R. et al., 1989, Cancer Res. Suppl. Vol. 30 :404a)。在临床前研究中,对与强力抗肿瘤抗生素卡奇霉素 (卡奇霉素吉妥组单抗 (Gemtuzumab ozogamicin)) 偶联的人源化抗 -CD33 抗体的评价表明了对 HL-60 细胞培养物、小鼠 HL-60 肿瘤异种移植物和 AML 患者的骨髓样品中的白血病细胞的特异性杀伤作用 (Hamann, P. R. et al., 2002, Bioconjugate Chem. 13 :47-58)。

[0011] 基于这些临床前研究的阳性结果,卡奇霉素吉妥组单抗在 I 期和 II 期临床研究中被进行评价。在临床 I 期研究中,观察到的主要毒性是骨髓抑制 (myelosuppression), 其原因是骨髓祖细胞上 CD33 的表达 (Sievers, E. L. et al., 1999, Blood 93 :3678-3684 ;Sievers E. L. et al., 2001, J. Clin. Oncol. 19 :3244-3254)。在 II 期临床研究中,静脉给药剂量为 $9\text{mg}/\text{m}^2$, 超过 4 小时, 14 天后重复, 产生的响应率为 30%。FDA 于 2000 年 5 月批准了卡奇霉素吉妥组单抗的市场准入, 适应征是治疗首次复发的 CD33 阳性 AML 患者, 年龄在 60 岁或 60 岁以上并被认为是不能进行细胞毒性化疗的候选人。进入市场后的研究报告表明其可能具有显著的毒性, 特别是静脉闭塞性疾病 (VOD), 这已经导致标签修正, 并启动患者监控程序。大多数这种毒性涉及药物组分卡奇霉素, 其显示可在临床前模型中引起肝毒性, 因此不是靶向 CD33 的直接结果。

[0012] 尽管上述讨论的结果表明含有抗 CD33 抗体和细胞毒类药物的免疫偶联物可成功地用于治疗 AML, 但仍需要既安全又有效的免疫偶联物。本发明就是涉及这些和其他重要的目标。

发明概述

[0013] 因此, 本发明的一个目标是提供可特异性结合 CD33 和可用于治疗 AML 的抗体。

[0014] 因此, 在第一种实施方案中, 提供了抗体或其抗原决定簇结合片段 (epitope-binding fragment), 它们具有结合 CD33 的能力。

[0015] 在第二种实施方案中, 提供了鼠抗体 My9-6, 就它的轻链和重链可变区的氨基酸序列, 针对该轻链和重链可变区的基因的 cDNA 序列, 它的 CDRs (互补决定区) 的鉴定, 它的表面氨基酸的鉴定, 以及它的以重组形式的表达手段在本文已充分描述。

[0016] 在第三种实施方案中, 提供了 My9-6 抗体的人源化或表面重整版本。其中 My9-6 抗体或其抗原决定簇结合片段的表面暴露残基 (surface-exposed residues) 在轻链和重链中都被替换, 以与已知的人抗体表面更相似。这种人源化抗体与鼠 My9-6 相比, 作为治疗性或诊断性试剂, 其效用增加。鼠抗体 My9-6 的人源化版本在本文中从以下方面进行了详尽描述: 它们各自的轻链和重链可变区的氨基酸序列, 轻链和重链可变区基因的 cDNA 序列, CDRs (互补决定区) 的鉴定, 表面氨基酸的鉴定, 以及以重组形式表达的方法的公开。

[0017] 在进一步的实施方案中, 提供了包括至少一个互补决定区的抗体或其抗原决定簇结合片段, 其中互补决定区具有选自 SEQ ID NO:1-6 中的氨基酸序列: SYIYH

(SEQ ID NO:1), VIYPGNDDISYNQKFXG (SEQ ID NO:2), 其中 X 是 K 或 Q, EVRLRYFDV (SEQ ID NO:3), KSSQSVFFSSSQKNYLA (SEQ ID NO:4), WASTRES (SEQ IDNO:5), HQYLSSRT (SEQ ID NO:6),并具有与 CD33 结合的能力。

[0018] 在进一步的实施方案中,提供了包括至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区的抗体或其抗原决定簇结合片段,其中所述重链可变区含有三个互补决定区,其分别具有由 SEQ ID NO:1-3 表示的氨基酸序列, SYYIH (SEQ ID NO:1), VIYPGNDDISYNQKFXG (SEQ ID NO:2),其中 X 是 K 或 Q, EVRLRYFDV (SEQ ID NO:3),和其中所述轻链可变区含有三个互补决定区,其分别具有由 SEQ IDNO:4-6 表示的氨基酸序列, KSSQSVFFSSSQKNYLA (SEQ ID NO:4), WASTRES (SEQ ID NO:5), HQYLSSRT (SEQ ID NO:6)。

[0019] 在进一步的实施方案中,提供了具有一个重链可变区的抗体,其中该重链可变区的氨基酸序列与 SEQ ID NO:7 所表示的氨基酸序列: QVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQG LEWVGVIYPGNDDISYNQKFKGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSED SAVYY CAREVRLRYFDVWGAGTTVTVS S 具有至少 90% 的序列同一性,更优选与 SEQ ID NO:7 具有 95% 的序列同一性,最优选与 SEQ ID NO:7 具有 100% 的序列同一性。

[0020] 类似地,提供了含有一个轻链可变区的抗体,其中该轻链可变区的氨基酸序列与 SEQ ID NO:8 所表示的氨基酸序列: NIMLTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLA WYQQIP GQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQSEDLAIYY CHQYLSSRTFGGGTKLEIKR 具有至少 90% 的序列同一性,更优选与 SEQ ID NO:8 具有 95% 的序列同一性,最优选与 SEQ ID NO:8 具有 100% 的序列同一性。

[0021] 在进一步的实施方案中,提供了具有人源化或表面重整的重链可变区的抗体,其中该人源化或表面重整的重链可变区与 SEQ ID NO:9 所表示的氨基酸序列: QVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQG LEWVGVIYPGNDDISYNQKFKGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSED SAVYY CAREVRLRYFDVWGQGTITVTVS 具有至少 90% 的序列同一性,更优选与 SEQ ID NO:9 具有 95% 的序列同一性,最优选与 SEQ ID NO:9 具有 100% 的序列同一性。

[0022] 类似地,提供了具有一个人源化或表面重整的轻链可变区的抗体,该人源化或表面重整的轻链可变区与对应于 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列: EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLA WYQQIPG QSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYC HQYLSSRTFGGQTKLEIKR,具有至少 90% 的序列同一性,更优选与 SEQ ID NO:10 具有 95% 的序列同一性,最优选与 SEQ ID NO:10 具有 100% 的序列同一性。

[0023] 在进一步的实施方案中,本发明提供了免疫偶联物,该免疫偶联物含有与本发明的抗体或其抗原决定簇结合片段共价连接的药物或前体药物,直接或通过可切割或非切割性连接子共价连接。在优选的实施方案中,药物或前体药物是细胞毒性药物或前体药物,如美登木素生物碱 (maytansinoid)、紫杉醇 (taxoid)、CC-1065、CC-1065 类似物,海兔毒肽和海兔毒肽类似物。

[0024] 在进一步的实施方案中,本发明提供了一种组合物,包括本发明的抗体或其抗原决定簇结合片段和药物或前体药物的。

[0025] 在进一步的实施方案中,本发明包括药物组合物,该药物组合物包括 本发明的抗体、其抗原决定簇结合片段或免疫偶联物,或者单独,或者与药物或前体药物或其他治疗剂组合,在存在一种或多种药学上可接受试剂的情况下。

[0026] 在进一步的实施方案中,本发明提供了抗体或其抗原决定簇结合片段,被标记用于研究或诊断应用中。在优选的实施方案中,标记是生物素标记,酶标记,放射性标记,荧光基团,发色基团,显像剂或金属离子。

[0027] 在进一步的实施方案中,本发明提供了用于抑制表达 CD33 的细胞的生长的方法,该方法通过使用本发明的抗体、其抗原决定簇结合片段或免疫偶联物,或者单独,或者与药物或前体药物或其他治疗剂组合,进一步地,单独或在存在一种或多种药学上可接受试剂的情况下。

[0028] 在进一步的实施方案中,本发明提供了治疗患有表达 CD33 的疾病的患者的方法,包括给予本发明的抗体、其抗原决定簇结合片段或免疫偶联物,或者单独或者与药物或前体药物或其他治疗剂组合,进一步地,单独或在存在一种或多种药学上可接受试剂的情况下。所述疾病可以是一种或多种,例如骨髓增生异常综合征 (MDS)、急性髓性白血病 (AML)、慢性髓性白血病 (CML) 和前髓细胞性白血病 (PML),或其他被确定其中表达 CD33 的疾病。

[0029] 治疗方法,包括体内、离体和体外应用本发明的抗体、抗体片段和免疫偶联物,或者单独使用或者与药物或前体药物或其他治疗药剂组合使用,进一步地,单独地或在存在一种或多种药学上可接受试剂的情况下使用。

[0030] 在进一步的实施方案中,提供了确定生物学样品中是否含有骨髓性癌细胞的方法,其中,生物学样品与诊断试剂,如标记的本发明的抗体或其抗原决定簇结合片段相接触,并检测该试剂在样品中的分布。这种方法可用来诊断如急性髓性白血病 (AML)、慢性髓性白血病 (CML) 和前髓细胞性白血病 (PML)。

[0031] 在进一步的实施方案中,提供了具有改良特性的本发明的抗体或抗原决定簇结合片段。例如,可通过采用动物免疫、杂交瘤形成和选择具有特殊特性的抗体的标准技术,来制备与 CD33 亲和性提高的抗体或抗原决定簇结合片段。

[0032] 改良的抗体也可通过本发明的抗体或其抗原决定簇结合片段的亲合力成熟来制备,例如通过使用寡核苷酸介导的定点诱变、盒式诱变、易错 PCR, DNA 改组和应用大肠杆菌增变菌。

[0033] 在进一步的实施方案中,本发明提供了编码本发明抗体或其抗原决定簇结合片段的多核苷酸,包含该多核苷酸的重组载体,用该重组载体转化的宿主细胞,和通过培养所述宿主细胞产生所述抗体和其抗原决定簇结合片段的方法。

[0034] 在最后一中实施方案中,本发明提供了一种通过使用本发明抗体或其抗原决定簇结合片段从生物学材料中获得 CD33 的方法。

附图说明

[0035] 图 1 显示了竞争结合试验的结果,其中,在存在浓度不断增加的 My9 抗体或 My9-6 抗体下,测定了 ^{125}I - 标记的 My9-6 抗体 ($3 \times 10^{-9}\text{M}$) 与 CD33 阳性 U-937 细胞的结合作用。

[0036] 图 2 显示了用于轻链信号序列的 My9-6 简并引物。

[0037] 图 3 显示了来自 Brookhaven 数据库的 127 个抗体结构的文件名,其可被用来预测 muMy9-6 可变区的表面。

[0038] 图 4 显示了用来构建该 16 个表面重整 My9-6 版本以及嵌合 My9-6 抗体的 PCR 引物。

[0039] 图 5 显示了用来构建和表达人源化抗体的质粒。(A):轻链克隆质粒。(B):重链克隆质粒。(C):哺乳动物抗体表达质粒。

[0040] 图 6A 显示了 muMy9-6 轻链的 Edman 测序结果,与由 RT-PCR 产生的 cDNA 克隆所得的氨基酸序列进行比较。

[0041] 图 6B 显示了 1319Da 和 1122Da 肽片段的 MS-MS 序列分析结果,其中所述 1319Da 和 1122Da 肽片段分别含有 CDR1 和 CFR2 序列的。CDR 序列以粗体表示。

[0042] 图 7 显示了 1788Da 肽和来自两个 cDNA 克隆的相应序列的 MS-MS 序列分析结果。

[0043] 图 8A 显示了鼠 My9-6 抗体的 cDNA 序列和推算的轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :95)。三个 CDR 用下划线表示。

[0044] 图 8B 显示了鼠 My9-6 抗体的 cDNA 序列和推算的重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :96)。三个 CDR 用下划线表示。

[0045] 图 9 显示了由 Kabat 定义所确定的轻链和重链 CDR。

[0046] 图 10 显示了鼠 My9-6 抗体的轻链和重链氨基酸序列,与 8-27 和 V102 基因的胚系序列进行比对。点 (.) 表示序列同一性。

[0047] 图 11A & B 显示了与 muMy9-6 序列最同源的 10 个轻链 (A) 和重链 (B) 抗体序列,在 Brookhaven 数据库中有解答文件 (solved file)。序列以同源性从最大至最小的顺序进行排列。

[0048] 图 12A & B 显示了 muMy9-6 抗体轻链 (A) 和重链 (B) 的每个 Kabat 位点的平均可及性 (accessibility)。10 个最同源的轻链和重链序列的每个 Kabat 位点的相对溶剂可及性 (solvent accessibilities) 被平均,并沿 x 轴显示。

[0049] 图 13A 显示了 10 个最同源的轻链结构的残基溶剂可及性,用 MC 软件计算,并显示了每个 Kabat 位点的平均值,用 Excel 制表。本表显示了平均溶剂可及性超过 25% 的非 CDR 位点的数据。表面残基被规定为具有超过 30% 平均溶剂可及性的残基。进一步分析具有 25% -35% 平均可及性的位点,是可通过计算仅在该位点以及其两侧侧向位点具有相同残基的结构的可及性而进行。NA 是指没有相同的侧向位点。位点 15 和 70 需要进一步的计算,以获得在最后一列中给定的最终的表面预测值。

[0050] 图 13B 显示了 10 个最同源的轻链结构的残基溶剂可及性,用 MC 软件计算,并显示了每个 Kabat 位点的平均值,用 Excel 制表。本表显示了平均溶剂可及性超过 25% 的非 CDR 位点的数据。表面残基被规定为具有超过 30% 平均溶剂可及性的残基。进一步分析具有 25% -35% 平均可及性的位点,是通过计算仅在该位点以及其两侧侧向位点具有相同残基的结构的可及性而进行。NA 是指没有相同的侧向位点。

[0051] 图 14 显示了 My9-6 框架表面残基 (framework surface residues),其落在 CDR 残基 5 Å 之内。

[0052] 图 15 显示了从 Kabat 数据库中获取的前 5 个人抗体序列。通过 SR 生成对比 (Pedersen, 1993)。进入 CDR 的 5 Å 范围内的 muMy9-6 残基用下划线表示。

[0053] 图 16A & B 显示了 16 个人源化 My9-6 轻链可变区序列 (A) 和 16 个人源化 My9-6 重链可变区序列 (B),是与鼠 My9-6 比对的。点 (.) 表示相对于人源化版本 1.0 的序列同一性。在鼠和人 My9-6 之间有差异的表面残基,用下划线标出。

[0054] 图 17 显示了 My9-6K_D 值,是通过在 HL-60 膜和 HL-60 全细胞上的直接结合测定

(direct binding assay)、以及在 HL-60 膜上的竞争结合测定计算得到。除了 * 处 $N = 2$ 以外, $N = 3$ 。

[0055] 图 18 显示了 huMy9-6 V1.0 的结合曲线。(A): 在 HL-60 膜上的直接结合。(B): 在 HL-60 全细胞上的直接结合。(C): 在 HL-60 膜上的竞争结合。

[0056] 图 19 显示了 My9-6-DM1 与 My9-6 抗体结合的比较, 在 HL-60 细胞上进行。

[0057] 图 20 显示了 My9-6-DM1 对于表达 CD33 的人肿瘤细胞的体外细胞毒性。

[0058] 图 21 显示了 My9-6-DM1 在携带 HL-60 异种移植物的 SCID 小鼠中的效能试验结果。My9-6-DM1 (A) 和未修饰 My9-6 抗体 (C) 对 HL-60 肿瘤生长的作用被评价。小鼠的体重作为毒性的指征 (indication) 被监测 (B, D)。

[0059] 图 22 显示了 My9-6-DM1 与游离药物美登素在携带 HL-60 异种移植物的 SCID 小鼠中的效能比较 (A)。小鼠的体重作为毒性的一个指征被监测 (B)。在两个被治疗小鼠中复发的肿瘤用第二个疗程的 My9-6-DM1 治疗。

[0060] 图 23 A & B 显示了 My9-6-DM1 和标准化疗在携带 HL-60 异种移植物的 SCID 小鼠中的抗肿瘤效能比较 (A)。小鼠的体重作为毒性的一个指征被监测 (B)。在两个被治疗的小鼠中的复发肿瘤用第二个疗程的 My9-6-DM1 治疗。

[0061] 图 24A & B 显示了 My9-6-DM1 与卡奇霉素吉妥组单抗和标准化疗在 HL-60 生存模型 (survival model) 中的抗肿瘤功效的比较。HL-60 细胞被静脉注射进 SCID 小鼠中。指示治疗在注射细胞之后 11 天开始。除了卡奇霉素吉妥组单抗 (Q4D $\times$ 3) 以外, 治疗为静脉注射每天 $\times$ 5。

发明详述

[0062] 本发明提供了新型鼠抗 -CD33 抗体和该抗体的人源化版本。进一步提供的是含有一种或多种鼠抗 CD33 抗体或其人源化版本的 CDR 的抗体, 其特异地识别和结合 CD33。

[0063] 鼠 My9-6 抗体

[0064] 本发明的鼠抗 -CD33 抗体 (murine anti-CD33 antibody), 在本文中有许多名称, 称为 “My9-6”, “鼠 My9-6 (murine My9-6)” 和 “muMy9-6”, 就其轻链和重链可变区的推断的胚系氨基酸序列 (germline amino acid sequence) (图 10), 轻链和重链可变区的氨基酸序列 (图 8A&B), CDR 的鉴定 (图 9), 表面氨基酸的鉴定 (图 13A&B) 和其以重组版本表达的方法而言, 已被充分描述。

[0065] My9-6 抗体的功能已经进一步被描述, 显示与存在于 CD33 阳性 U-937 细胞的表面上的 CD33 具有很高的结合亲和性 (图 1)。¹²⁵I- 标记的 My9-6 结合 U-937 细胞, 它可被未标记的 My9-6 和以前描述的抗 CD33 抗体 My9 从细胞上竞争下来 (BioGenex, cat. no. 267M)。

[0066] 术语 “可变区 (variable region)” 在此用来描述抗体重链和轻链的某些部分, 它们在抗体之间序列不同, 且协同决定每个特定抗体对其抗原的结合和特异性。可变性并不经常均匀地分布在抗体可变区。其通常集中在称为互补性决定区 (CDR) 或超变区的可变区的三个片段内, 均在轻链和重链可变区内。可变区的更高度保守部分称为框架区。重链和轻链的可变区包括四个框架区, 主要采用 β -片层构型, 每个框架区连接三个 CDR, 形成与 β -片层结构连接的环, 在一些情况下形成 β -片层结构的一部分。每条链中的 CDR 被框架区固定紧靠其他链的 CDR, 这样形成了抗体的抗原结合位点 (E. A. Kabat et al., Sequences

of Proteins of Immunological Interest, 第五版, 1991, NIH)。

[0067] “恒定 (constant region) 区”不直接参与抗体与抗原的结合, 但显示多种效应子功能, 如抗体参与的抗体依赖性细胞毒性。

[0068] 人源化 My9-6 抗体

[0069] My9-6 的人源化版本 (Humanized versions of My9-6), 在本文中有不同名称: “huMy9-6”, 和“人源化 My9-6”, 也已制备得到。

[0070] 人源化的目标是减少异种抗体如鼠抗体的免疫原性, 用于导入进人体内后, 在保持抗体的全部抗原结合亲和性和特异性的同时减少免疫原性。

[0071] 人源化抗体可采用若干技术来产生, 如表面重整 (resurfacing) 和 CDR 嫁接 (CDR grafting) 技术。如在此所使用的, 表面重整技术综合使用分子建模, 统计学分析和诱变, 以便改变抗体可变区的非 CDR 表面, 从而模拟目标宿主的已知抗体的表面。

[0072] 抗体的表面重整的策略和方法, 和在不同的宿主中减少抗体免疫原性的其他方法, 公开在美国专利 5, 639, 641 (Pedersen 等人) 中, 在此整体引入, 作为参考。简言之, 在一个优选方法中, (1) 生成许多抗体重链和轻链可变区的位点对比, 得到一组重链和轻链可变区框架表面暴露位点, 其中所有可变区的对比位点至少大约 98% 是相同的; (2) 针对啮齿类抗体 (或其片段) 确定一组重链和轻链可变区框架表面暴露的氨基酸残基; (3) 鉴定与该组啮齿类表面暴露氨基酸残基最相似的一组重链和轻链可变区框架表面暴露氨基酸残基; (4) 步骤 (2) 中确定的该组重链和轻链可变区框架表面暴露氨基酸残基被步骤 (3) 中鉴定的该组重链和轻链可变区框架表面暴露氨基酸残基替代, 除了那些位于该啮齿类抗体的互补决定区的任何残基的任何原子的 5 Å 范围内的氨基酸残基; 和 (5) 产生具有结合特异性的人源化啮齿类抗体。

[0073] 可以使用多种其他的技术对抗体进行人源化, 包括 CDR 嫁接 (EP0239 400; WO 91/09967; 美国专利 5, 530, 101; 和 5, 585, 089), 镶饰 (veneering) 或表面重整 (EP 0592 106; EP 0 519 596; Padlan E. A., 1991, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498; Studnicka G. M. et al., 1994, Protein Engineering 7(6): 805-814; Roguska M. A. et al., 1994, PNAS 91: 969-973), 和链改组 (chain shuffling) (美国专利 No. 5, 565, 332)。人抗体可通过本领域中已知的多种方法来制备, 包括噬菌体展示法。也参见美国专利 No. 4, 444, 887; 4, 716, 111; 5, 545, 806 和 5, 814, 318; 和国际专利申请公开号 WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735 和 WO 91/10741 (所述文献整体参考并入, 作为参考)。

[0074] 如本文中进一步描述地, 通过建模鉴定 My9-6 的 CDR, 并预测它的分子结构。然后制备人源化 My9-6 抗体, 其序列已经被完全表征。许多 huMy9-6 抗体的轻链和重链的氨基酸序列, 被显示在图 16A 和 16B 中。鼠和人源化 My9-6 抗体的比较结合值, 被提供在图 17 中。抗体的结合曲线显示在图 18 中。

[0075] My9-6 抗体的抗原决定簇结合片段

[0076] 尽管鼠 My9-6 抗体和人源化 My9-6 抗体的抗原决定簇结合片段在此与鼠 My9-6 抗体和人源化版本分别进行讨论, 但要理解的是本发明的术语“抗体 (antibody)”或“多种抗体 (antibodies)”可包含全长的 muMy9-6 和 huMy9-6 抗体, 以及这些抗体的抗原决定簇结合片段。

[0077] 如本文中所使用的,“抗体片段”包括保留了与 CD33 结合的能力的抗体的任何部分,通常称为“抗原决定簇结合片段”。抗体片段的实例优选包括但不限于, Fab、Fab' 和 F(ab')₂、Fd、单链 Fvs(scFv)、单链抗体,二硫键连接的 Fv(sdFv) 和含有 V_L 或 V_H 结构域的片段。抗原决定簇结合片段,包括单链抗体,可单独包含可变区或组合了下列的一部分或全部:铰链区、C_H1、C_H2、和 C_H3 结构域。

[0078] 这种片段可含有一个或两个 Fab 片段或 F(ab')₂ 片段。优选地,抗体片段含有整个抗体的所有 6 个 CDR,尽管含有少于所有这些区域的片段,如三个,四个或 5 个 CDR,也是有功能的。更进一步,功能等价物可能是下列任何一种免疫球蛋白类型的成员或它们的组合: IgG、IgM、IgA、IgD、或 IgE,及其亚型。

[0079] Fab 和 F(ab')₂ 片段可通过使用酶进行蛋白水解裂解而产生,使用的酶如木瓜蛋白酶(Fab 片段)或胃蛋白酶(F(ab')₂ 片段)。

[0080] 单链 FV(scFv) 片段是抗原决定簇结合片段,其含有与抗体轻链可变区(V_L)的至少一个片段连接的抗体重链可变区(V_H)的至少一个片段。连接子可以选择短的,柔性的肽,以保证(V_L)和(V_H)区域一旦连接就形成合适的三维折叠,以维持全抗体的靶分子结合特异性,而单链抗体片段来源于该全抗体。(V_L)或(V_H)序列的羧基末端可通过连接子共价连接于互补的(V_L)和(V_H)序列的氨基酸末端。单链抗体片段可通过分子克隆,抗体噬菌体展示文库或专业技术人员熟知的类似技术来产生。这些蛋白可在例如真核细胞或原核细胞,包括细菌中产生。

[0081] 本发明的抗原决定簇结合片段也可使用本领域中已知的多种噬菌体展示法来产生。在噬菌体展示方法中,功能性抗体结构区被展示在携带编码它们的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面上。特别的是,这种噬菌体可用来展示从抗体谱(repertoire)或组合抗体文库(例如,人或鼠)表达的抗原决定簇结合结构区。表达可结合目的抗原的抗原决定簇结合结构域的噬菌体可用抗原选择或鉴定,例如使用标记的 CD33 或被结合或俘获到固体表面或珠上的 CD33。用于这些方法中的噬菌体通常的是丝状噬菌体,包括 fd 和 M13,结合结构域由具有重组融合到噬菌体基因 III 或基因 VIII 蛋白的 Fab、Fv 或二硫键固定的 Fv 抗体结构域的噬菌体表达。

[0082] 可用来制备本发明的抗原决定簇结合片段的噬菌体展示方法的实例包括在下列文献中公开的方法:Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic et al., 1997, Gene 187:9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology 57:191-280; PCT 申请 No. PCT/GB91/01134; PCT 公布 WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; 和美国专利 No. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 和 5,969,108,每一篇文献整体引入本文,作为参考。

[0083] 噬菌体筛选后,编码片段的噬菌体的区域可被分离,并通过使用重组 DNA 技术,例如在下面所详述的,在被选择的宿主中表达来产生抗原决定簇结合片段,宿主包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌。例如,重组产生 Fab、Fab' 和 F(ab')₂ 片段的技术也可应用,使用本领域已知的方法,如在 PCT 公布 WO 92/22324; Mullinax et

al., 1992, *BioTechniques* 12(6):864-869; Sawai et al., 1995, *AJRI* 34:26-34; 和 Better et al., 1988, *Science* 240:1041-1043 中所公开的方法; 所述文献整体引入本文, 作为参考。用来产生单链 Fv 和抗体的技术的例子包括那些在美国专利 No. 4, 946, 778 和 5, 258, 498; Huston et al., 1991, *Methods in Enzymology* 203:46-88; Shuet et al., 1993, *PNAS* 90:7995-7999; Skerra et al., 1988, *Science* 240:1038-1040 中所描述的。

[0084] 功能等价物 (functional equivalents)

[0085] 也包括在本发明范围内的是 My9-6 抗体和人源化 My9-6 抗体的功能等价物 (functional equivalent)。术语“功能等价物”包括具有同源序列的抗体, 嵌合的抗体, 修饰抗体和人工抗体, 例如, 其中规定了每个功能等价物具有结合 CD33 的能力。专业技术人员将会理解在称为“抗体片段 (antibody fragments)”的一组分子和称为“功能等价物”的一组分子中是有重叠的。

[0086] 具有同源序列的抗体是具有与本发明的鼠 My9-6 和人源化 My9-6 抗体的氨基酸序列具有序列同一性或同源性的氨基酸序列的抗体。优选与本发明的鼠 My9-6 和人源化 My9-6 抗体的可变区氨基酸序列具有同一性。“序列同一性 (sequence identity)”和“序列同源性 (sequence homology)”当用于本文的氨基酸序列时, 被规定为与另一条氨基酸序列具有至少大约 90%、91%、92%、93% 或 94% 的序列同一性, 更优选至少大约 95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性的序列, 同一性例如根据 Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444-2448 (1988) 通过 FASTA 搜索法测定。

[0087] 如本文中所使用的, 嵌合抗体是其中抗体的不同部分来自不同动物种的抗体。例如, 含有来自鼠单克隆抗体的可变区的抗体与人免疫球蛋白恒定区配对。产生嵌合抗体的方法在本领域中是已知的。见, 例如, Morrison, 1985, *Science* 229:1202; Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4:214; Gillies et al., 1989, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; 美国专利 No. 5, 807, 715; 4, 816, 567; 和 4, 816, 397, 在此整体引入本文, 作为参考。

[0088] 人工抗体包括 scFv 片段、双链抗体、三链抗体、四链抗体和 mru (见 Winter, G. and Milstein, C., 1991, *Nature* 349:293-299; Hudson, P. J., 1999, *Current Opinion in Immunology* 11:548-557 的综述), 每种都具有抗原结合能力。在单链 Fv 片段 (scFv) 中, 抗体的 V_H 和 V_L 结构区被一个可变形肽连接。一般这种连接子肽大约 15 个氨基酸残基长。如果该连接子更小, 例如, 5 个氨基酸, 可形成双链抗体, 其是二价 scFv 二聚体。如果连接子减少到少于 3 个氨基酸残基, 可形成三聚和四聚体结构, 称为三链抗体和四链抗体。抗体的最小结合单位是 CDR, 一般是具有足够特异性识别和结合能力的重链 CDR2, 其可单独使用。这样一个片段被称为分子识别单位或 mru。几个这种 mru 可用短的连接肽连接在一起, 因而形成了具有较单个 mru 更高亲和力的人工结合蛋白。

[0089] 本申请的功能等价物也包括修饰抗体, 例如通过任何类型的分子共价附着于抗体上而对抗体进行修饰的抗体。例如, 修饰的抗体包括已经被下述方法修饰的抗体: 例如被糖基化, 乙酰化, 聚乙二醇化 (pegylation), 磷酸化, 酰胺化, 通过已知的保护 / 封闭基团衍生作用, 蛋白水解裂解, 与细胞配体或其他蛋白连接, 等等。共价附着不会阻止抗体产生抗独特型 (anti-idiotypic) 应答。这些修饰作用可通过已知的技术来完成, 包括但不限于, 特异化学性裂解, 乙酰化, 甲酰化, 衣霉素的代谢合成, 等等。另外, 被修饰的抗体可含有 1 个或更多个非典型氨基酸 (non-classical amino acids)。

[0090] 通过在不同的框架内、不同的链上互相交换不同的 CDR 产生功能等同物。因此,例如,对于指定组的 CDR 可通过取代不同的重链可能形成不同类型的抗体,由此,例如 IgG₁₋₄、IgM、IgA₁₋₂、IgD、IgE 抗体类型和同型抗体可被产生。同样,在本发明范围内的人工抗体可通过将给定的一组 CDR 嵌入进整个合成框架区中而产生。

[0091] 功能等价物很容易在特定组 CDR 侧向的可变区和 / 或恒定区序列内使用本领域中已知的多种方法通过突变,删除和 / 或插入来产生。

[0092] 本发明的抗体片段和功能等价物包括与鼠 My9-6 抗体相比,与 CD33 的结合达到可检测程度的分子。结合的可检测程度包括鼠 My9-6 抗体与 CD33 结合能力的至少 10-100% 范围内的所有值,优选至少 50%、60% 或 70%,更优选至少 75%、80%、85%、90%、95% 或 99%。

[0093] 改良抗体 (improved antibodies)

[0094] CDR 对抗原决定簇识别和抗体结合具有首要的重要性。但是,对于包括 CDR 的残基可进行一些改变,而影响抗体识别和结合其同类抗原决定簇的能力。例如,可以制造不影响抗原决定簇识别,但增加抗体与抗原决定簇的结合亲和性的改变。

[0095] 因此,也包含在本发明范围内的是改良形式的鼠和人源化抗体,它们也特异性识别和结合 CD33,优选具有增加的亲和性。

[0096] 几个研究已经调查了抗体序列中不同位点上引入一个或多个氨基酸改变的影响,这基于对原始抗体序列和其特性如结合和表达水平的了解 (Yang, W. P. et al., 1995, J. Mol. Biol., 254, 392-403; Rader, C. et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 8910-8915; Vaughan, T. J. et al., 1998, Nature Biotechnology, 16, 535-539)。

[0097] 在这些研究中,已经通过改变 CDR1、CDR2、CDR3 或框架区内重链和轻链基因序列产生了原始抗体的等价物,使用的方法如寡核苷酸介导的定点诱变、盒式诱变、易错 PCR、DNA 改组或大肠杆菌的突变株 (Vaughan, T. J. et al., 1998, Nature Biotechnology, 16, 535-539; Adey, N. B. 等人., 1996, 第 16 章, 277-291 页, 见“肽类和蛋白的噬菌体展示”, 主编, Kay, B. K. 等人, Academic Press)。改变原始抗体序列的这些方法已使二级抗体的亲和性改善 (Gram, H. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3576-3580; Boder, E. T. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 10701-10705; Davies, J. and Riechmann, L., 1996, Immunotechnology, 2, 169-179; Thompson, J. et al., 1996, J. Mol. Biol., 256, 77-88; Short, M. K. et al., 2002, J. Biol. Chem., 277, 16365-16370; Furukawa, K. et al., 2001, J. Biol. Chem., 276, 27622-27628)。

[0098] 通过改变抗体的一个或多个氨基酸残基的类似的定向策略,在此描述的抗体序列可用来开发具有改进功能,包括与 CD33 改进的亲和性,的抗 CD33 抗体。

[0099] 改良的抗体也包括具有改良特性的抗体,其可通过标准的动物免疫,杂交瘤形成和具有特殊特性的抗体的选择技术来制备。

[0100] 免疫偶联物 (immunoconjugates)

[0101] 本发明也涉及免疫偶联物,包括本文中所公开的与药物或前体药物连接的抗体、抗体片段、功能等价物、改良抗体及其类似物。优选的药物或前体药物是细胞毒性剂,并包括例如美登木素生物碱和美登木素生物碱类似物、紫杉醇、CC-1065 和 CC-1065 类似物,海兔毒肽和海兔毒肽类似物。

[0102] 免疫偶联物可通过体外方法制备。为了将药物或前体药物与抗体连接,可使用连接基团。合适的连接基团在本领域中是为人所熟知的,包括二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团和酯酶不稳定基团。优选的连接基团是二硫化物基团和硫醚基团。例如,可使用二硫化物交换反应(disulfide exchange reaction)或通过在抗体和药物或前体药物之间形成硫醚键构建偶联物。

[0103] 美登木素生物碱和美登木素生物碱类似物是优选的细胞毒剂之一。合适的美登木素生物碱的例子包括美登木醇和美登木醇类似物。合适的美登木素生物碱公开在美国专利 No. 4, 424, 219 ;4, 256, 746 ;4, 294, 757 ;4, 307, 016 ;4, 313, 946 ;4, 315, 929 ;4, 331, 598 ;4, 361, 650 ;4, 362, 663 ;4, 364, 866 ;4, 450, 254 ;4, 322, 348 ;4, 371, 533 ;6, 333, 410 ;5, 475, 092 ;5, 585, 499 ;和 5, 846, 545 中。

[0104] 关于美登木素生物碱,连接基团可包含反应性化学基团。在一个优选的实施方案中,反应性化学基团可通过一个二硫键连接部分与美登木素生物碱共价结合。

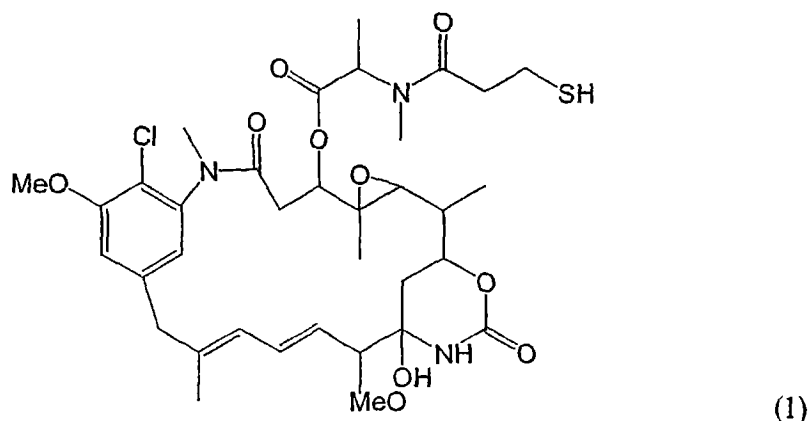
[0105] 特别优选的反应性化学基团是 N-琥珀酰亚胺酯(N-succinimidylester) 和 N-磺基琥珀酰亚胺酯(N-sulfosuccinimidyl ester)。

[0106] 特别优选的包含连接基团的美登木素生物碱是美登木醇的 C-3 酯及其类似物,上述连接基团中含有反应性化学基团,其中连接部分含有二硫键,化学反应基团包括 N-琥珀酰亚胺酯或 N-磺基琥珀酰亚胺酯。

[0107] 美登木素生物碱上的许多位点可作为化学性连接连接部分的位点。例如,具有羟基基团的 C-3 位点、用羟甲基修饰的 C-14 位点、用羟基修饰的 C-15 位点和具有羟基的 C-20 位点均被认为是有用的。但 C-3 位点是优选的,美登木醇的 C-3 位点是特别优选的。

[0108] 其他的化学键包括酸不稳定键,光不稳定键,肽酶不稳定键和酯酶不稳定键。并入本文的美国专利 No. 5, 208, 020 的公开内容,教导了携带这些键的美登木素生物碱的生产。

[0109] 如下面所详述的,免疫偶联物 My9-6-DM1 使用含硫醇的美登木素生物碱(DM1)。DM1 由下面的结构分子式 (1) 表示:



[0110] 紫杉烷也是优选的细胞毒剂。适合用于本发明的紫杉烷公开在美国专利 No. 6, 372, 738 和 6, 340, 701 中。本发明的紫杉烷交联物和细胞结合剂可使用目前已知的或以后开发的任何技术来形成。许多偶联的方法在 US 专利 5, 416, 064 和 US 专利 5, 475, 092 中被讲授。

[0111] CC-1065 及其类似物也是优选用于本发明中的细胞毒性药物。CC-1065 及其类似物公开在美国专利 No. 6, 372, 738 ;6, 340, 701 ;5, 846, 545 ;和 5, 585, 499。CC-1065 是一种

从 *zelensis* 链霉菌 (*Streptomyceszelensis*) 培养肉汤中分离的强力抗肿瘤抗生素。在体外 CC-1065 较普遍使用的抗癌药物,如阿霉素,氨甲喋呤和长春花新碱,效价大约 1000 倍 (B. K. Bhuyan et al., *Cancer Res.*, 42, 3532-3537 (1982))。

[0112] 药物如氨甲喋呤、道诺红菌素、阿霉素、长春花新碱、长春花碱、苯丙氨酸氮芥、丝裂霉素 C、苯丁酸氮芥,加利车霉素,海兔毒肽和海兔毒肽类似物也适合制备本发明的交联物。药物分子也可通过中间载体分子如血清白蛋白与抗体分子连接。

[0113] 抑制表达 CD33 的细胞的生长

[0114] 也包括在本发明中的是抑制表达 CD33 的细胞生长的方法。这些方法使用本发明的抗体或免疫偶联物,以及本发明的抗体或免疫偶联物结合一种或多种其他的治疗药剂。合适的治疗性药剂包括那些直接或间接抑制表达 CD33 的细胞生长的药剂。

[0115] 如在此所使用的术语“抑制 (inhibit)”和“抑制作用的 (inhibiting)”应该理解为包括对细胞生长的任何抑制性作用,包括细胞死亡。抑制性作用包括瞬时的作用,持续的作用和永久的作用。

[0116] 治疗性应用

[0117] 本发明也包括本发明的抗体或免疫偶联物的治疗性应用,其中所述的抗体或免疫偶联物可以药学上可接受的剂型给予受试对象。可以静脉推注或持续输注一段时间,通过肌肉内、皮下、关节内、鞘内、口服、局部或吸入途径给药。它们也可通过肿瘤内,肿瘤旁,病灶内或病灶旁途径给药以发挥局部以及全身性治疗作用。

[0118] 药学上可接受的药物剂型一般包括药学上可接受的药剂如载体,稀释剂和赋形剂。这些药剂是为人所熟知的,最合适的药剂可由本领域的专业技术人员根据临床情况需要来确定。合适的载体,稀释剂和 / 或赋形剂的实例包括:(1) Dulbecco 氏磷酸缓冲盐水, pH ~ 7.4, 含有大约 1mg/ml 至 25mg/ml 人血清白蛋白, (2) 0.9% 盐水 (0.9% w/v NaCl), 和 (3) 5% (w/v) 葡萄糖。

[0119] 在其他的治疗性应用中,本发明的抗体或免疫偶联物可与一种或多种其他的治疗剂共同给药。治疗剂是可以寻求杀死或限制癌细胞生长,同时对宿主的损害最小的药物。因此,这种治疗剂可利用癌细胞特性(例如,代谢,血管化作用或细胞表面抗原的递呈)与健康宿主细胞之间的任何差异。肿瘤形态学的差异是干预的潜在部位。例如,治疗剂可以是抗体如抗 VEGF 抗体,其可用来延缓实体肿瘤内部的血管化作用,因此降低其生长速率。

[0120] 合适的治疗剂包括但不限于,细胞毒性或细胞生长抑制剂 (cytostatic agents)。紫杉醇是优选的治疗剂,它也是一种细胞毒剂。其他的治疗剂包括但不限于,佐剂如盐酸格拉司琼,雄激素抑制剂如醋酸亮丙瑞林,抗生素如阿霉素,抗雌激素药物如它莫西芬,抗代谢药物如干扰素 α -2a, 酶抑制剂如 ras 法呢基转移酶抑制剂,免疫调节物如阿地白介素 (aldesleukin), 和氮芥衍生物如盐酸苯丙氨酸氮芥,和类似物。

[0121] 当以含水剂型存在,而不是被冻干时,抗体一般配制的浓度为大约 0.1mg/ml 至 100mg/ml, 尽管该范围以外较大的变化也是允许的。对于疾病的治疗,抗体或偶联物的合适剂量要依赖于要治疗的疾病类型,如上所规定,疾病的严重性和病程,抗体应用的目的是否是预防性或治疗性的,以往治疗的疗程,患者的临床病史和对抗体的反应,以及主治医师的判断。抗体适合在一个时间或在一系列治疗过程中给予患者。

[0122] 根据疾病的类型和严重性,大约 0.015 至 15mg 抗体 / 患者体重 (kg) 是给予患者

的初始候选剂量,例如一次或多次单独给药,或连续输注。对于在几天或更长时间内重复给药,根据情况,治疗要一直重复直至达到对疾病症状所需的抑制。但不排除可使用其他的给药方案。

[0123] 本发明的治疗性应用包括治疗患病受试对象的方法。用本发明的方法治疗的疾病是以表达 CD33 为特征的疾病。这种疾病包括骨髓增生异常综合征 (MDS) 和癌症如急性髓性白血病 (AML),慢性髓性白血病 (CML) 和前髓细胞性白血病 (PML)。专业技术人员要理解的是本发明的方法也可用来治疗还未描述但特征是表达 CD33 的其他疾病。

[0124] 本发明的治疗性应用也可在体外和离体实施。

[0125] 体外应用的实例包括纯化被 CD33 阳性细胞如髓系细胞污染的细胞群。该法包括在存在细胞毒 My9-6 免疫偶联物的情况下培养细胞群,然后去掉死的 CD33 阳性细胞。体外非临床应用的条件是为人所熟知的(见,例如 Uckunet al.,1986, J Exp. Med. 163, 347-368;Uckunet al.,1985, J. Immunol. 134, 3504-3515;Ramakrishnanet al.,1985, J Immunol. 3616-3622)。

[0126] 临床离体应用的实例包括在自体骨髓在回输给相同患者之前的处理,以便杀死患病或恶性髓系细胞 (Roy D. C. et al.,1995, J. Clin. Immunol. 15, 51-57)。

[0127] 诊断和研究应用

[0128] 除了在此所讨论的抗体治疗性应用以外,本发明的抗体可用于许多已知的诊断和研究应用中。例如,本发明的抗体可用于 CD33 的纯化,检测,和靶向,包括在体外和体内的诊断方法中。例如,抗体可用于免疫测定中,定量和定性测量生物学样品中细胞表达的 CD33 水平。见,例如 Harlow et al., Antibodies :A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988),在此整体合并为参考文献。

[0129] 例如,本发明的抗体可用于竞争结合测定,直接和间接夹心测定 (sandwich assays),以及免疫沉淀测定 (immunoprecipitation assays) 中 (Zola, Monoclonal Antibodies :A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987))。

[0130] 本发明的抗体也可用于体内的成像,其中将用可检测部分如不透射线试剂或放射性同位素标记的抗体给予受试对象,优选进入血流,检测宿主中标记抗体的出现和位置。这种成像技术可用于恶性肿瘤的分期和治疗。抗体用在宿主中可检测到的任何部分来标记,不管是核磁共振、放射学,或本领域中已知的其他检测方式。

[0131] 标记可以是能够直接或间接产生可检测信号的任何可检测部分。例如,标记可以是生物素标记,酶标记(例如,荧光素酶,碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶和辣根过氧化物酶),放射标记(例如, ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 和 ^{125}I),荧光基团如荧光或化学发光化合物(例如,异硫氰酸荧光素、若丹明),成像剂(例如, Tc-m99 和铟 (^{111}In)) 和金属离子(例如,镓和铈)。

[0132] 可应用本领域中已知的任何方法将抗体与标记偶联,包括在 Hunter et al., 1962, Nature 144 :945;David et al.,1974, Biochemistry 13 :1014;Painet et al.,1981, J. Immunol. Meth. 40 :219;Nygren, J., 1982, Histochem. and Cytochem. 30 :407 中描述的那些方法。

[0133] 本发明的抗体也可用作亲和纯化剂。在此过程中,采用本领域中为人所熟知的方法,抗体被固定在合适的支持物上,如 Sephadex 树脂或滤纸。因此,CD33 可从生物学样品中分离和纯化。

[0134] 多核苷酸,载体,宿主细胞和制备抗体的方法

[0135] 本发明进一步提供了含有编码本发明的抗体或其抗原决定簇结合片段的核苷酸序列的多核苷酸。

[0136] 本发明也包括了编码可结合 CD33 的多肽,,和在严谨型杂交条件下与编码本发明抗体的多核苷酸杂交的多核苷酸,其中所述的严谨型杂交条件包括:在 60℃,6×SSC、0.5% SDS、5×Denhardt 溶液,和 100 μg/ml 热变性的鲑鱼精 DNA 中预杂交 2 小时;60℃ 杂交 18 小时;在 4×SSC,0.5% SDS,0.1% 焦磷酸钠中 60℃ 30 分钟,冲洗 2 次;2×SSC,0.1% SDS 60℃ 30 分洗涤 2 次。

[0137] 多核苷酸可通过本领域中已知的任何方法获得,多核苷酸的核苷酸序列可通过本领域中已知的任何方法测定。例如,如果抗体的核苷酸序列是已知的,编码抗体的多核苷酸可从化学合成的寡核苷酸组合而成(例如,如 Kutmeier et al.,1994,BioTechniques 17:242 中所述),简言之,涉及合成含有部分编码抗体的序列的重叠寡核苷酸,对这些寡核苷酸退火和连接,然后通过 PCR 扩增被连接的寡核苷酸。

[0138] 构建含有抗体编码序列和合适的转录和翻译控制信号的重组载体的方法在本领域中是为人所熟知的。这些方法包括,例如,体外重组 DNA 技术,合成技术,和体内遗传重组。因此本发明提供了可复制的载体,该载体含有编码本发明抗体分子,或其重链或轻链,或重链或轻链可变结构区,或任何之一的抗原决定簇结合片段的核苷酸序列,可操作地与启动子连接。

[0139] 重组载体通过传统的技术被转移至宿主细胞,然后转染的细胞通过传统的技术培养产生本发明的抗体。因此,本发明包括含有编码本发明抗体,或其抗原决定簇结合片段的核苷酸的宿主细胞,所述的多核苷酸可操作地与异源启动子相连。在优选的实施方案中,为了表达整个免疫球蛋白分子,编码重链和轻链的载体可在宿主细胞中共表达。

[0140] 多种宿主表达载体系统可用来表达本发明的抗体分子。这种宿主表达系统代表一些载体,通过这些载体可产生并随后纯化目的编码序列,但也代表一些细胞,当用合适的核苷酸编码序列转化或转染时,可原位表达本发明的抗体分子。这些包括但不限于微生物如用含有抗体编码序列的重组细菌噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌(例如,大肠杆菌,枯草杆菌),;用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,酿酒酵母和毕赤酵母);用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用重组病毒表达载体感染的(例如,花椰菜花叶病毒, CaMV;烟草花叶病毒, TMV)或用含有抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如, Ti 质粒)转化的植物细胞系统;或携带了重组表达构建物的哺乳动物细胞系统(例如, COS, CHO, BHK, 293, 3T3 细胞),所述构建物含有来自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子)或来自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒后期启动子;牛痘病毒 7.5K 启动子)。

[0141] 优选地,细菌细胞如大肠杆菌,更优选地,真核细胞,特别是为了表达整个重组抗体分子,可用来表达重组抗体分子。例如,哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢细胞(CHO),与一种载体,如来自人巨细胞病毒的主要中间体早期基因启动子组合在一起,是抗体的有效表达系统(Foecking et al.,1986, Gene 45:101;Cockett et al.,1990, Bio/Technology 8:2)。

[0142] 对于长期,高产量的生产重组蛋白,优选稳定的表达。例如,稳定表达抗体分子的

细胞系可被工程化。与其使用含有病毒复制起始点的表达载体,宿主细胞不如用合适表达控制元件控制的 DNA(例如,启动子,增强子,序列,转录终止子,聚腺苷酰位点等等)和可选择标记物转化。在导入外源 DNA 后,工程化细胞可在富营养培养基中生长 1-2 天,然后转至选择性培养基中。重组质粒中的可选择标记物为选择提供了抗性,使细胞稳定地将质粒整合进其染色体中,生长形成转化灶,依次被克隆,扩大成为细胞系。这种方法的优势是可用来工程化表达抗体分子的细胞系。这种工程化细胞系特别用于筛选和评价可直接或间接与抗体分子相互作用的化合物。

[0143] 一旦本发明的抗体分子被重组表达,可通过本领域中已知的纯化免疫球蛋白分子的任何方法来纯化,例如通过色谱(例如,离子交换色谱,亲和性,特别是在蛋白 A 和筛分柱色谱后与特异抗原的亲和色谱),离心,差示溶解性(differential solubility),或通过纯化蛋白的任何其他标准技术。

[0144] 实施例

[0145] 本发明现通过参照下面的实施例来进行描述,其目的仅为说明,并不限制本发明。

[0146] 实施例 1 鼠 My9-6 抗体

[0147] 在此第一个实施例中,公开了本发明鼠 My9-6 抗体的完全基本氨基酸结构和 cDNA 序列,以及其结合特性和以重组形式表达的方式。因此,提供了本发明抗体及其制备的全部和完全的公开,这样免疫学领域中的普通技术人员将能够制备所述的抗体,不需创造性试验。

[0148] 1.1. My9-6 抗体的产生,生产和特性

[0149] 用 CD33 抗原转染的 3T3 鼠成纤维细胞系用来进行免疫。

[0150] 5 月龄 BALB/c 雌鼠在 0 天用转染的 3T3 鼠成纤维细胞系 (2.5×10^6 细胞,悬浮在 0.2mL PBS 中)腹腔内免疫。用 0.2mL 细胞悬液如下激发动物:第 13 天, 5×10^6 细胞;第 21 天, 5×10^6 细胞。在第 24 天,处死小鼠,取其脾脏。

[0151] 脾脏置于两个毛玻璃片之间以获得单细胞悬液,用含有青霉素和链霉素(SFM)的无血清 RPMI 培养基洗涤。在冰上,脾细胞团重新悬浮于 10mL、0.83% (w/v) 氯化铵水溶液 10 分钟以溶解红细胞,然后用无血清培养基(SFM)洗涤。脾细胞 (1.6×10^8) 与来自非分泌性鼠骨髓瘤细胞系 P3X63Ag8.653(ATCC, Rockville, MD; cat. no. CRL1580) 的骨髓瘤细胞 (5.4×10^7) 混合在试管中,用无血清 RPMI 培养基(SFM)洗涤。去掉上清液,细胞团稀释至 2×10^7 细胞/mL。细胞以 2×10^7 细胞/板接种在包被以 15mg/mL 刀豆素 A 的组织培养板中。培养板 37°C 温育温育 1 小时。轻轻地从培养板中去掉上清液。逐滴缓慢加入 1mL 聚乙二醇溶液(40% PEGw/v)。晃动培养板,温育 30 秒。去掉 PEG 并弃除。缓慢加入 5mL SFM 冲洗板两次,然后弃液。最后一次冲洗后,加入 5mL 添加了 5% 胎牛血清(FBS)的 SFM。培养板 37°C 温育过夜。温育后,用细胞刮从板上刮除细胞,并集中。冲洗培养板,并收集细胞。离心获得细胞团,并重新悬浮在添加了 5% FBS,青霉素-链霉素和次黄嘌呤/氨基蝶呤/胸腺嘧啶(HAT)的 RPMI-1640 生长培养基中。细胞以 2×10^5 细胞/孔接种在含有巨噬细胞培养层的 96 孔平底组织培养板中。用于免疫和杂交瘤生产的一般条件的描述见 J. Langone 和 H. Vunakis(主编,Methods in Enzymology, Vol. 121, "Immunochemical Techniques, Part I"; 1986; Academic Press, Florida) 和 E. Harlow 和 D. Lane("Antibodies: A Laboratory Manual"; 1988; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)。也可使

用生产免疫杂交瘤的其他技术,如本领域中专业技术人员所熟知的。

[0152] 从杂交瘤克隆的培养上清液筛选与用 CD33 抗原转染的细胞和人组织细胞淋巴瘤细胞系 U-937 (ATCC CRL-1953. 2) 结合,和缺少与鼠成纤维细胞系结合能力的克隆。这些克隆被扩大并进行亚克隆。亚克隆的培养上清液通过上述的结合测定被进一步筛选。通过这种步骤,亚克隆 3E7-H2-3D8 (My9-6) 被选择重链和轻链基因被克隆和测序,描述如下。

[0153] 使用 ELISA 对表达 CD33 抗原的细胞系和这种抗原的阴性细胞系 筛选杂交瘤上清液对 CD33 抗原的特异结合。细胞分别从组织培养瓶中收获,悬浮在含有 10% FBS 的生长培养基中,离心成团,用 PBS 洗涤。洗涤的细胞 ($100\ \mu\text{L}$ 大约 $1-3\times 10^6$ 细胞 /mL) 加入至包被以植物血球凝集素 ($100\ \mu\text{L}$ $20\ \mu\text{g/mL}$ PHA) 的 Immulon-2HB 板的孔中,离心并在 PHA 包被的孔中粘附 10 分钟。轻弹有细胞的培养板去掉 PBS,然后 37°C 过夜干燥。 37°C 下用 5mg/mL BSA 的 PBS 溶液封闭孔 1 小时,然后用 PBS 温柔洗涤。然后将等体积的杂交瘤克隆的上清液 ($100\ \mu\text{L}$;在封闭缓冲液中稀释) 加入至含有表达 CD33 抗原和不表达 CD33 的细胞的孔中,并在环境温度下温育 1 小时。用 PBS 冲洗孔,与羊抗鼠 IgG 抗体辣根过氧化物酶偶联物 ($100\ \mu\text{L}$;封闭缓冲液中) 温育 1 小时,然后冲洗多次,使用 ABTS/ H_2O_2 底物检测结合作用。来自 3E7 杂交瘤亚克隆的典型上清液在与过度表达 CD33 抗原的细胞温育过程中产生的信号为 0.50 吸光度单位,相比而言,与 CD33 抗原阴性的细胞温育过程中获得的值为 0.10。

[0154] 杂交瘤生长在 BALB/c 小鼠的腹水中。解冻一瓶冰冻的杂交瘤细胞,细胞在组织培养瓶中扩大获得产生腹水所必需数量的细胞。接触过抗原的 BALB/c 小鼠 (已经预先用 0.5mL 降植烷经腹腔注射 10-14 天) 腹腔注射 0.5mL 磷酸缓冲盐水 (PBS) 中的 1×10^6 细胞。注射细胞后 12 至 18 天,用注射器从小鼠的腹腔吸取腹水。收集的腹水液 1000rpm 离心 5 分钟,然后将上清液 12,000rpm 离心 30 分钟。从清澈的上清液中按如下纯化抗体:步骤 1:硫酸铵沉淀。置于冰上的上清液用 2 体积的冷 PBS 稀释,搅拌,然后缓慢地用 1 体积冷的,饱和的 (100%) 硫酸铵溶液处理。当通过离心收集沉淀物时,溶液置于冰上大约 5 小时。沉淀团以小量的 PBS 溶解,得到的溶液在缓冲液中透析以进行蛋白 A 的亲和纯化步骤。步骤 2:Sepharose-蛋白 A 的亲和纯化。鼠 My9-6 的同型是具有 κ 轻链的 IgG1。因此亲和柱在含有 3M NaCl,8.0 的 0.1M tris.HCl 缓冲液中进行平衡。相同缓冲液中抗体溶液流经亲和柱,用平衡缓冲液充分冲洗柱子,然后用含有 0.15M NaCl 的 0.1M 乙酸进行洗脱。通过测定 280nm 处的 UV 吸光度检测各馏分,用 1M tris 中和,然后在 PBS 中透析以便使用和储存。

[0155] 纯化的抗体首先鉴定与表达 CD33 的细胞,如转染的鼠 3T3 成纤维细胞系和人 U-937 细胞系的结合和不能与在杂交瘤上清液筛选中描述的 抗原阴性细胞系结合。

[0156] 为了进一步明确其与 CD33 抗原结合的特异性,在标记的 muMy9-6 和市售的抗 CD33 抗体 My9 之间进行竞争结合实验。使用 Goldmacheretal., (1989, J. Cell. Physiol. 141, 222-234) 所述的方法进行结合试验。鼠 My9-6 抗体采用 Iodo-gen 技术用 ^{125}I 进行放射标记 (Fraker, P. J. and Speck, J. C., 1978, Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849-857)。恒定量 ($3\times 10^{-9}\text{M}$) 的 ^{125}I - 标记的 muMy9-6 与不断增加浓度的非放射活性抗体,未标记的 muMy9-6 或未标记的 My9 混合,混合物与细胞 (每个样品 1×10^6 细胞) 4°C 温育 30 分钟。这些温育在 $60\ \mu\text{L}$ 缓冲液中进行,该缓冲液由添加了 2.5% 人血清的修改用于悬浮培养物的极限必需培养基 (SMEM) 组成。然后从含有未结合物质的培养基中分离细胞,离心通过浓度为 1.009g/ml 的硅油 (Aldrich) 和石蜡油 (Baker) 混合物而进行。然后通过油界面上切

割离心管去掉细胞团,并用来在 γ 计数器 (LKB 的 RIAgamma 1274 型) 上测定细胞相关的放射活性。测定的细胞相关放射活性与未标记的,竞争抗体的浓度作图。结果在图 1 中显示:两种抗体,My9 和 My9-6,获得非常相似的竞争结合曲线。这证明了 My9 和 My9-6 与相同的抗原结合,而且两种抗体具有非常相似的结合亲和力。因为 My9 是已被公开和接受的抗 CD33 标准品,因此可以得出结论 My9-6 是一种抗 CD33 抗体。My9 抗体可从 BioGenex (San Ramon, Ca 94583 ;cat. no. AM267-5M) 购得。

[0157] 1. 2. My9-6 抗体重链和轻链基因的克隆

[0158] 如在 Molecular Protocols (NB1455-p173) 中所述,从汇合的 T175 瓶中的 My9-6 杂交瘤细胞中纯化总 RNA。在 1% MOPS 凝胶上检查 RNA 的完整性,通过 UV 分光光度法测定浓度。使用 Gibco Superscript II 试剂盒和或寡 dT 或随机六聚体引物,用 4-5 μ g 总 RNA 进行 RT 反应。

[0159] 可通过使用 Co 等人 (1992, J. Immunol. 148(4) :1149-54) 所述的 RACE 法和 Wang 等人 (2000, J. Immunol. Methods. 233 :167-177) 所述的简并引物来实施 PCR 反应。RACE PCR 需要一个中间步骤将聚 dG 尾加至第一条 cDNA 链的 3' 末端上。用 Qianeasy 柱 (Qiagen) 纯化 RT 反应,在 50 μ l 1 $\times$ NEB 缓冲液 4 中洗脱。用 0.25mM CoCl₂、1mM dGTP 和 5 单位末端转移酶 (NEB),在 1 $\times$ NEB 缓冲液 4 中对洗脱液进行 dG 加尾反应。混合物在 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟,然后 1/5 的反应混合物 (10 μ l) 直接加入至 PCR 反应混合物中作为模板 DNA。

[0160] RACE 和简并 PCR 反应是相同的,除了在引物和模板上有差异以外。如上面所提到的,末端转移酶反应混合物直接用作 RACE PCR 模板,而 RT 反应混合物直接用作简并 PCR 反应。在两种反应组中,使用相同的 3' 轻链引物, HindKL : TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAA GATGGATACAGTTGGTGC (SEQ ID NO :11) 和 3' 重链引物, Bgl2IgG1 : GGAAGATCTATAGACAGAT GGGGGTGTCTTTTGGC (SEQ ID NO :12)。

[0161] 在 RACE PCR 中,1 个聚 dC 5' 引物被用于重链和轻链, EcoPolydC :TATATCTAGAAT TCCCCCCCCCCCCCCCCC (SEQ ID NO :13),而简并 5' 末端 PCR 引物为 Sac1MK : GGGAGCTCGAYA TTGTGMTSACMCARWCTMCA (SEQ ID NO :14) 用于轻链,等量的 EcoR1MH1 : CTTCCGGAATTCSARGT NMAGCTGSAGSAGTC (SEQ ID NO :15) 和 EcoR1MH2 :CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG (SEQ ID NO :16) 的混合物,用于重链 (混合碱基 :H = A+T+C, S = G+C, Y = C+T, K = G+T, M = A+C, R = A+G, W = A+T, V = A+C+G, N = A+T+G+C)。

[0162] 在 MJ 研究热循环仪上使用由 Wang 等人 (2000, J. Immunol. Methods. 233 : 167-177) 改编的程序进行 PCR 反应 :1) 94 $^{\circ}$ C, 3 分钟 ;2) 94 $^{\circ}$ C, 15 秒 ;3) 45 $^{\circ}$ C, 1min ;4) 72 $^{\circ}$ C, 2 分钟 ;5) 循环返回步骤 #2 29 次 ;6) 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟,完成反应。PCR 产物使用 PCR 引物产生的的限制性酶被克隆进 pBluescript II SK+ (Stratagene) 中。重链和轻链克隆通过 Lark Technologies 或 Seqwright 测序服务进行测序。

[0163] RACE PCR 对 My9-6 轻链从未成功过。因此,为了证实 cDNA 序列的 5' 末端,进行另外简并 PCR 和克隆。从简并 PCR 克隆中测得的 My9-6 轻链 cDNA 序列,被输入至 NCBI 的 Blast 搜索网址上 (ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/),保存最上面的提交信号序列的 5 个鼠抗体序列。从这些信号肽使用 Codehop 网络软件 (blocks.fhcrc.org/codehop.html) 设计简并 PCR 引物。EcoRI 限制性位点加入至 3 个 Codehop 简并引物中 (图 2),如上所述这些用于 RT-PCR 反应中。

[0164] 1.3. 重链和轻链样品的制备和测序

[0165] muMy9-6 抗体的重链和轻链通过 SDS-PAGE 在还原条件下被分离。还原和变性的抗体在 12% Tris- 甘氨酸凝胶上进行电泳 (Novex, San Diego, CA)。电泳后, 使用 CAPS/MeOH 缓冲液将凝胶点至 Immobilon^{PSQ} 膜上。转移后, 用 Ponceau S 对膜进行染色。切除对应轻链和重链的带, 用于蛋白质测序。

[0166] 抗体的轻链从膜上通过自动 Edman 降解化学法在 ABI 494 Procise 测序仪上直接测序。

[0167] 重链的 N 末端被封闭, 因此根据 Gharahdaghi 等人 (1996) 用胰蛋白酶原位消化蛋白。消化的混合物然后通过 MALDI-TOF 质谱法在 Kratos Kompact SEQ 装置上进行分析。被选择的肽进行 MS/MS 以测定其序列。

[0168] 实施例 2. 通过表面重整对抗体可变区进行人源化

[0169] 表面重整 My9-6 抗体以提供适合作为治疗或诊断试剂的人源化版本, 一般根据美国专利 5,639,641 中公开的原理和方法进行, 如下所述。

[0170] 2.1. 表面预测 (surface prediction)

[0171] 对于一组具有可溶解结构的抗体, 可变区残基的溶剂可及性用来预测鼠 My9-6 抗体可变区的表面残基。一组 127 个独特抗体结构的文件 (file) (图 3) 的氨基酸溶剂可及性使用 MC 软件包进行计算 (Pedersen et al., 1994, J. Mol. Biol. 235(3):959-973)。来自该组 127 个结构的 10 个最相似的轻链和重链氨基酸序列使用 NCBI 网址 ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ 上的序列比对软件进行测定。这 10 个抗体可变区每个可变区残基的平均溶剂可及性使用 Excel 电子表格进行计算, 平均可及性超过 30% 的位点被认为是表面残基。平均可及性在 25% 和 35% 之间的位点进一步通过计算侧向于两侧的两个残基相同的结构的个别残基可及性来考虑。

[0172] 2.2. 分子建模 (molecular modeling)

[0173] 鼠 My9-6 可变区的分子模型使用牛津分子软件包 AbM 来产生。抗体框架区从具有最相似的氨基酸序列的抗体的结构文件中构建 (轻链为 1sb, 重链为 1bbj), 非典型 CDR 通过搜索含有非冗余可溶解结构的 C- α 结构数据库来构建。用 GlaxoSmithKline Swiss-Pdb Viewer 来观察构型, 确定位于 CDR 5 Å 内的残基。

[0174] 2.3. 人抗体选择

[0175] 鼠 My9-6 可变区的表面位置与 Kabat 数据库中人抗体序列中的相应位置进行比较 (Johnson and Wu, 2001, Nucleic Acids Res. 29(1):205-6)。抗体数据库管理软件 SR (Searle, 1998) 用来从天然重链和轻链人抗体对中提取和比对表面残基。具有最相同的表面残基的人抗体可变区表面, 特别关注位于 CDR 5 Å 之内的位点, 被选择来替换鼠 My9-6 抗体可变区的表面残基。

[0176] 2.4. 通过 PCR 诱变构建人源化抗体基因

[0177] 对鼠 My9-6 可变区 cDNA 克隆进行 PCR 诱变, 来首先改变 5' 末端序列以匹配肽序列, 然后构建表面重整的, 人 My9-6 基因。设计引物组建立原来未在初始简并 PCR 克隆中测序的鼠源性残基 (轻链位点 N1, M3, L4, 和 S7, 和重链位点 Q3 和 P7)。

[0178] 设计人源化的引物组制造所有形式的 huMy9-6 所需的 6 个氨基酸改变, 并设计其他的引物可选择改变 4 个 5 Å 残基 (图 4)。PCR 反应在 MJ 研究热循环仪上根据下列程序

进行:1)94℃,1分钟;2)94℃,15秒;3)55℃,1分钟;4)72℃,1分钟;5)循环返回步骤#2 29次;6)终止于最后的延伸步骤,72℃ 4分钟。PCR产物用其相应的限制性酶消化,并克隆进 pBluescript 克隆载体中。克隆被测序以证实氨基酸改变。

[0179] 2.5. 人源化抗体的表达载体

[0180] 轻链和重链配对序列被克隆进单个哺乳动物表达载体中。人可变序列的 PCR 引物产生了可使人信号序列加入进 pBluescriptII 克隆载体中的限制性位点。然后可变序列能被克隆进哺乳动物表达质粒中,该质粒中对于轻链或重链分别具有 EcoRI 和 BsiWI 或 HindIII 和 ApaI (图 5)。轻链可变区序列可在框内被克隆在人 Ig κ 恒定区上,重链可变序列被克隆在人 Ig γ 恒定区序列上。在最终的表达质粒中,人 CMV 启动子驱动轻链和重链 cDNA 序列的表达。

[0181] 2.6. 人源化抗体的瞬时表达

[0182] 293T 细胞在 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, BioWhittaker, 12-614F), 10% 热灭活的胎牛血清 (Hyclone, SH30071.03), 4mM L-谷氨酰胺 (BioWhittaker, 17-604E), 和 1% 青霉素/链霉素混合物 (Bio Whittaker, 17-603E) 中, 6% CO₂ 37℃ 孵箱中培养。细胞每周以 1:10 的稀释度分离三次, 保持亚汇合状细胞群。转染前 24 小时, 用胰蛋白酶 (BioWhittaker, 17-161E) 消化细胞; 用台盼兰排除法 (trypan blue exclusion method) 计数活细胞, 接种在 10cm 组织培养处理板 (Corning, 430167) 上, 密度为每板 2×10^6 细胞。转染前一刻, 用磷酸缓冲盐水 (PBS, 用 BioWhittaker 10×PBS, 17-517Q 稀释) 轻轻地洗涤细胞, 向细胞覆盖含有 1% 超低 IgG 血清 (Gibco BRL, 16250-078) 的 7mL 杂交瘤 SFM (InvitroGen, 12045-076)。

[0183] 瞬时转染法由标准的 Qiagen Polyfect 方案改变而来。对于要转染的 1 个 10cm 板, 将 8 μ g CsCl 级 DNA 与 300 μ L 杂交瘤 SFM 和 80 μ L Polyfect 转染试剂 (Qiagen, 301107) 混合。转染混合物低速旋转混合大约 5 秒, 在环境温度下温育 5 分钟。温育后, 向转染混合物中加入 1mL 杂交瘤 SFM, 1% 超低 IgG 血清, 用吸液管上下吸放大约 5 次以混和。然后将转染混合物加入至覆盖细胞的 7mL 杂交瘤 SFM 中, 轻轻晃动平板保证均匀分布。转染反应在组织培养箱中温育过夜, 一般 16 小时。然后小心地从细胞中去除转染培养基, 替换以 20mL 杂交瘤 SFM, 1% 超低 IgG。然后将转染的细胞放回培养箱继续 72 小时, 此后收获上清液, 通过 ELISA 对抗体的产量定量。收获的上清液 4℃ 储存至纯化。

[0184] 2.7. 人源化抗体的纯化

[0185] 通过添加 1/10 体积的 1M Tris/HCl 缓冲液, pH8.0 为蛋白 A 亲和色谱制备上清液。pH 调整后的上清液通过 0.22 μ m 的滤膜过滤, 并负载在蛋白 A Sepharose 柱 (HiTrap Protein A HP, 1mL, Amersham Biosciences) 上, 并用结合缓冲液 (PBS, pH7.3) 平衡。在样品负载的过程中 Q-Sepharose 前置柱 (10mL) 连接在蛋白 A 的上游以减少细胞物质如 DNA 的污染。在样品负载后, 去掉前置柱, 倒转蛋白 A 柱的方向以进行冲洗和洗脱。用结合缓冲液冲洗柱直至获得稳定的基线在 280nm 处没有吸光度。抗体用含有 0.15M NaCl, pH2.8 的 0.1M 醋酸缓冲液洗脱, 使用的流速为 0.5mL/min。收集大约 0.25mL 的馏分, 加入 1/10 体积的 1M Tris/HCl, pH8.0 进行中和。峰馏分在 PBS, pH7.3 中透析过夜。通过测定 280nm 处的吸光度对抗体进行定量, 计算抗体的浓度, 假定 $E_{280}^{0.1\%} = 1.4$ 。对抗体馏分进行吸光度光谱分析和 SDS-PAGE 以证实其纯度。

[0186] 实施例 3. 人源化抗体的检测

[0187] 3.1. 生长细胞进行结合分析

[0188] 从美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) (ATCC#CCL-240) 处获得 HL-60 细胞。将细胞置于 5% CO₂ 空气, 37°C 水套温育箱 (Napco Scientific Co., Tualitan, Oregon)。细胞生长在添加了 L- 谷氨酰胺 (Bio Whittaker, Walkersville, MD) 含有 10% 胎牛血清 (Hyclone, Logan, Utah), 以及 50 μg/mL 硫酸庆大霉素 (Life Technologies, Grand Island, NY) 的 RPMI 培养基中。

[0189] 3.2. 对 HL-60 细胞的直接结合测定

[0190] 从 T75 培养瓶 (NUNCLONTM, cat. no. 153732) 中收获 HL-60 细胞, 并在 Omnifuge RT tabletop 离心管 (Haereus Separations, Germany) 中 4°C 大约 300xg 离心 5 分钟。细胞以 3×10⁶ 细胞/mL 的密度重新悬浮于 FACS 缓冲液中, 包含 2% (v/v) 羊血清 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) 的 MEMα 培养基, 添加了 L- 谷氨酰胺 (Life Technologies, Grand Island, NY)。使用多通道吸液管, 将 3×10⁵ 细胞加入至 Falcon 96- 孔圆底培养板 (cat. no. 3077) 的孔中, 然后置于冰上。使用 Falcon 96- 孔可变形检测板 (cat. no. 353911), 在 FACS 缓冲液中对每个检测或对照物品制备双份 11 个两倍系列稀释液, 起始浓度从 2×10⁻⁸M 开始。然后, 100 μl 每种检测或对照品与细胞混合。对照孔仅加入 FACS 缓冲液。冰上温育培养板 1 小时, 然后在冷冻离心机中 300xg 离心 5 分钟。在含有 10% 漂白粉的废液烧杯上迅速倒置从培养板中去掉试剂。轻轻旋转晃动重新悬浮细胞, 用冷的 FACS 缓冲液冲洗 1 次, 离心, 然后轻轻旋转晃动重新悬浮。FITC 标记的羊抗人 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, cat. no. 109-096-003) 和 FITC 标记的羊抗鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, cat. no. 109-095-088) 以 1 : 100 在 FACS 缓冲液中稀释, 向测定板上合适的孔中加入 100 μl。然后冰上继续温育测定板 1 小时, 避光。以上述的同样方法冲洗孔中未结合的二抗。轻轻旋转晃动重新悬浮细胞, 然后加入 1% 甲醛的磷酸盐缓冲盐水 (PBS, 10mM 磷酸钾, 150mM 氯化钠, pH7.2) 120 μl/ 孔进行固定。然后在装配了自动 96 孔加样装置的 FACSsan 流式细胞仪 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) 上分析测定板。

[0191] 3.3. 质膜制备

[0192] 根据 Vater 等人 (1995) 所述的方法制备质膜。简言之, HL-60 细胞在含有 10% 胎牛血清和 50 μg/mL 硫酸庆大霉素的添加 L- 谷氨酰胺的 RPMI 中生长至 1×10⁶ 细胞/mL 的密度。当获得总共 1×10⁹ 细胞时, 收获细胞, 在 Omnifuge RT 离心管中大约 300xg 离心, 用 Hanks 平衡盐溶液 (Life Technologies, cat. no. 14175-095) 冲洗, 一起置入 1 个 50mL 圆锥形离心管中。然后沉淀的细胞团在 -80°C 冷冻至少 24 小时, 以促进细胞溶解和匀浆。为了制备质膜, 细胞团在 37°C 迅速复温, 然后在冰上储存; 所有随后的步骤在 4°C 进行。沉淀的 HL-60 细胞团重新悬浮在 8mL 含有 1mM EDTA, 0.25M 蔗糖, 和 1mM 苯甲基磺酰氟化物 (PMSF) 的 10mM, pH7.0 的 Tris-HCl 缓冲液中。然后细胞团被转移至 15mL Dounce 组织磨臼 (Wheaton, Millville, NJ) 中进行细胞破碎 (用紧密联接的硼硅玻璃研杵捣 20 次)。在 Sorval RC-5B 冷冻超速离心机中使用 SS-34 转子 (Wilmington, DE) 6000rpm 离心匀浆 10 分钟, 轻轻地从沉淀的细胞团中去掉上清液。再次用 8mL 缓冲液冲洗细胞团一次, 如上进行处理。合并的上清液加至 1mL 10mM Tris-HCl, 1mM PMSF, 1mM EDTA, pH7.0 的 37%

蔗糖夹层缓冲液上,并进一步在预冷的 Beckman L8- 超速离心机用 SW55ti 转子 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) 33,000rpm 处理 70 分钟。从每个试管中取出正位于蔗糖层上面的乳白色质膜层,并用 4 体积的 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, pH7.0 稀释。然后将该溶液在超速离心机中 18,000rpm 继续离心 30 分钟。小心去掉上清液,得到的沉淀团重新悬浮在 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, pH7.0 中。HL-60 膜制剂等分进 1.5mL 无菌螺帽 Eppendorf 管中,在液氮中冷冻,然后储存在 -80℃ 以备使用。使用 Pierce™ BCA Assay (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, cat. no. 23235) 测定最终制剂的总蛋白浓度。

[0193] 3.4. HL-60 膜的直接结合测定

[0194] 如上所述制得的 HL-60 膜,在去离子水中以 10 μg/mL 的起始浓度,使用 Labconco 真空干燥器 (Labconco, Corp, Kansas City, MO) 在 Immulon 296- 孔测定板 (Dynex Laboratories, Chantilly, VA) 的聚苯乙烯表面上在环境温度下过夜干燥。然后 ELISA 测定板用 Tris 缓冲盐水 (50mM Tris-HCl, 150mM 氯化钠, pH7.5, TBS) 的 1% 馏分 V 牛血清白蛋白 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, cat. no. A-3294), 0.05% Tween-20 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, cat. no. P-2287) 溶液封闭,每孔 300 μL, 37℃ 1 小时。在此封闭步骤后,将板中的封闭缓冲液中排出,在纸巾上吸干。在封闭缓冲液中制备检测或对照试剂的两个三倍系列稀释液,分成四份,在可变形 96 孔检测板上,以 3.13×10^{-9} M 起始向下滴定至 5.29×10^{-14} M。阴性对照孔仅含有封闭缓冲液。50 μL 每种稀释液转移至质膜包被的检测板上指定的孔中,然后 4℃ 温育过夜。然后将孔内容物吸出至一个含有 10% (v/v) 漂白粉的废液瓶中,用含有 0.1% (v/v) Tween-20 (冲洗缓冲液) 的 TBS 冲洗板 3 次,在纸巾上吸干。用封闭缓冲液稀释 1 : 1000 的羊抗鼠 IgG-HRP 或驴抗人 IgG-HRP 在适当的孔中检测结合的抗 My9-6 抗体的量。这些二抗在检测板上室温下温育 1 小时,避光。如前洗板和吸干。检测板使用 TMB (BioFX Laboratories, Randallstown, MD, cat. no. TMBW-0100-01) 显影,然后用终止液 (BioFX Laboratories, Randallstown, MD, cat. no. STPR-0100-01) 淬灭。使用 TITERTEK® Multiskan Plus MK II 平板读数仪 (Huntsville, AL) 在 450nm 对检测板进行读数。

[0195] 3.5. 对 HL-60 膜进行竞争结合测定

[0196] 如上所述制得的 HL-60 膜,在去离子水中以 10 μg/mL 的起始浓度,使用 Labconco 真空干燥器 (Labconco, Corp, Kansas City, MO) 在 Immulon 296- 孔测定板 (Dynex Laboratories, Chantilly, VA) 的聚苯乙烯表面上在环境温度下过夜干燥。然后 ELISA 测定板用 Tris 缓冲盐水 (50mM Tris-HCl, 150mM 氯化钠, pH7.5, TBS) 的 1% 馏分 V 牛血清白蛋白 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, cat. no. A-3294), 0.05% Tween-20 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, cat. no. P-2287) 溶液封闭,每孔 300 μL, 37℃ 1 小时。在此封闭步骤后,将板中的封闭缓冲液中排出,在纸巾上吸干。在封闭缓冲液中制备检测或对照试剂的两个三倍系列稀释液,分成四份,在可变形 96 孔检测板上,以 1.25×10^{-8} M 起始向下滴定至 2.44×10^{-11} M (2x 所需的终浓度)。然后这些未标记的竞争试剂与等体积的 2.5×10^{-10} M 生物素化鼠抗 -My9-6 (ImmunoGen, Inc., Cambridge, MA) 混合;阳性对照不含竞争试剂,而阴性对照仅含封闭缓冲液。50 μL 这些稀释液转移至质膜包被的检测板上指定的孔中,然后 4℃ 温育过夜。然后将孔内容物吸出至一个含有 10% (v/v) 漂白粉的废液瓶中,用

含有 0.1% (v/v) Tween-20 (冲洗缓冲液) 的 TBS 冲洗板 3 次。检测板在纸巾上吸干, 每孔用在封闭缓冲液中 1 : 5,000 稀释的 100 μ l 抗生蛋白链菌素 - 碱性磷酸酶 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, cat.no. 016-050-084) 检测结合的生物素化的鼠抗 My9-6 的量。室温下温育 1 小时后, 冲洗孔中未结合的二抗试剂, 检测板使用 TMB (BioFX Laboratories, Randallstown, MD, cat.no. TMBW-0100-01) 显影, 用终止液 (BioFX Laboratories, Randallstown, MD, cat.no. STPR-0100-01) 淬灭。使用 TITERTEK[®] Multiskan Plus MK II 平板读数仪 (Huntsville, AL) 在 A450nm 对检测板进行读数。

[0197] 3.6. 克隆鼠 My9-6 抗体可变区

[0198] 通过上述的 RT-PCR 法克隆得到鼠 My9-6 抗体的可变区。若干单个的轻链和重链克隆被测序以鉴定和避免聚合酶可能产生的序列错误。对于轻链仅获得一条序列, 但从重链 RT-PCR 克隆中分别得出 2 条序列。

[0199] 为了确定鼠 My9-6 轻链可变区的实际序列, 通过 Edman 降解, 基质辅助激光离子吸收 (MALDI) 和串联质谱 (MS-MS) 进行分析。My9-6 轻链氨基末端的 22 个残基通过 Edman 降解进行测序, 在图 6A 中显示。来自简并 RT-PCR 克隆的初始 cDNA 序列除了可能由简并引物产生的 4 个残基外全部匹配。通过 Edman 降解测定的肽序列后来通过 5' 末端信号肽序列中的简并引物产生的 RT-PCR 克隆而证实。胰蛋白酶消化片段的 MS-MS 分析也证实了轻链 CDR1 和 2 的序列 (图 6B)。总之, 这些肽分析证实了所预测的鼠 My9-6 轻链氨基酸序列来自 RT-PCR 产生的 cDNA 克隆。

[0200] 如重链序列所普遍的一样, muMy9-6 重链氨基末端可被焦谷氨酸残基阻断, 因此不能通过 N 末端 Edman 降解测序。而是通过胰蛋白酶消化产生内部序列数据, 通过基质辅助激光离子吸收 (MALDI) 和串联质谱 (MS-MS) 进行分析。鉴定了一个 1788 道尔顿的片段, 其预测的序列与 cDNA 克隆 2 的一部分相同 (图 7)。对于 cDNA 克隆 2 这个序列包含了 CDR3 的 5 个残基, 因此对于 muMy9-6 重链的阳性鉴定是一个理想的肽, 仅产生最初从简并 RT-PCR 克隆 2 获得的序列的多个 RACE PCR 克隆也可确认该肽序列。

[0201] 来自多个 cDNA 克隆和肽序列分析的综合结果提供了最终的鼠 My9-6 轻链和重链序列, 在图 8 中显示。使用 Kabat 和 AbM 定义法, 鉴定了三个轻链和重链 CDR (图 8 和 9)。搜索 NCBI IgBlast 数据库表明 muMy9-6 抗体轻链可变区最可能来自鼠 IgV κ 8-27 胚系基因, 而重链可变区最可能来自 IgVh V102 胚系基因 (图 10)。

[0202] 3.7 My9-6 抗体的可变区表面残基测定

[0203] Pedersen 等人 (1994, J Mol. Biol. 235:959-973) 和 Roguska 等人 (1996, Protein Eng. 9:895-904) 所述的抗体表面重整技术是以预测鼠抗体可变序列的表面残基开始的。表面残基被定义为其总表面区域的至少 30% 可接触到水分子的氨基酸。缺少可发现 muMy9-6 表面残基的可溶解结构的情况下, 在一组 127 个抗体结构文件中对 10 个具有最同源序列的抗体进行配比 (图 11A & B)。对于这些配比的序列平均每个 Kabat 位点的溶剂可及性, 对于每个残基相对可及性的分布显示在图 12 中。

[0204] 几种表面位点的平均可及性在 25% 和 35% 之间。这些看上去更接近于仅平均具有两个相同的侧向两侧的残基的抗体 (图 13A 和 B)。在另外的分析后, muMy9-6 重链的 25 个预测的表面残基未变化, 但轻链中的 Kabat 位点 15 和 70 需要进一步考虑。轻链位点 15 上的丙氨酸在所有 10 个结构中的平均可及性为 34.4%, 但仅有一个单一结构 1mcp, 与

muMy9-6 具有相同的侧向残基。在这种结构中,Ala15 的相对可及性仅为 18.2%。因为在这个单一结构中,对于位点 15,Ala15 较平均残基可及性大幅度降低,所以侧向残基仅有一处差异的三个结构(lap2,lfrg,和 lhl1)也一起被平均。这三个结构的平均可及性再次达到 33.3%,使 Ala15 成为一个预测的表面残基。最终,表面重整的抗-B4, C242 和表面重整的专利本身预测轻链位点 15 是一个表面残基。总之,保守的方法是假设 muMy9-6 轻链位点 15 是一个表面残基。

[0205] muMy9-6 轻链位点 70 也需要特别的考虑,最终导致其保守预测成为一个表面残基。对于轻链初始的表面预测工作使用仅来自 5 个最同源轻链结构的 MC 数据就完成了,在本组中 Asp70 是一个被预测的表面残基。以后,使用另外 5 个最同源的结构,位点 70 被发现其平均可及性为 29.1%,如图 13A 显示。另外,10 个结构中的 9 个具有相同的侧向残基,本组的平均值为 29.2%的可及性。因为这个残基看上去非常接近于 30%的界值,表面重整专利称位点 70 为表面位点,可及性数据被进一步核对。对于结构 1Ive 位点 70 的相对可及性为 22.5%,较下一个最低的相对可及性 27.2%低 5 个百分点。因为 1Ive 是最同源的结构,它是很低的异常值,因此对除 1Ive 外还对具有相同侧向残基的 8 个结构进行了平均,本组的平均可及性为 30.1%。这与下面的事实,即初始的 muMy9-6 轻链分析和表面重整专利称轻链位点 70 为表面位点,一起形成保守的预测,muMy9-6 轻链 Asp70 是一个表面残基。

[0206] 3.8. 分子建模确定残基是否在 CDR 的 5 Å 范围之内

[0207] 分析用 AbM 软件包产生的分子构型以确定 muMy9-6 表面残基是否位于 CDR 的 5 Å 之内。为了表面重整抗体,CDR 以外的所有表面残基必须被改变为其人的对应副本,但位于 CDR 5 Å 之内的残基也可能对抗原的结合和特异性有决定作用。因此这些 5 Å 残基必须在整个人源化过程中被鉴定和考虑。用来表面重整的 CDR 定义结合了重链 CDR2 的 AbM 定义和其他 5 个 CDR 的 Kabat 定义(图 9)。鼠的模型用 Swiss 观察器软件分析,图 14 显示了在轻链或重链序列的任何 CDR 残基 5 Å 之内的残基。

[0208] 3.9. 选择最同源的人抗体表面

[0209] 使用 SR 软件从 Kabat 抗体序列数据库中为表面重整 muMy9-6 得出了候选的人抗体表面。这个软件提供了一个界面仅搜索抗体数据库中特殊的残基位点。为了保留天然的配对,轻链和重链的表面残基在一起比较。来自 Kabat 数据库中最同源的人抗体表面以序列同一性的等级顺序进行配比。如 SR Kabat 数据库软件所配比的一样,最上面的 5 个表面在图 15 中显示。然后这些表面被比较以鉴定人抗体表面将需要在 CDR 5 Å 之内的最小变化。抗丙型肝炎病毒抗体,LC3bPB(Ivanovski M. et al., 1998, Blood 91(7):2433-42),需要最小数目的表面残基改变(总共 10 个),这些残基中仅有 4 个位于 CDR 的 5 Å 之内。muMy9-6 的全长可变区序列也使用 SR 与 Kabat 人抗体数据库进行配比,LC3bPB 被鉴定为第 14 个最相似的人可变区序列(数据未显示)。因为 LC3bPB 抗体提供了最同源的表面,需要最小数目的 5 Å 残基改变,因此它是表面重整 muMy9-6 的最佳候选物。

[0210] 3.10. 为人源化 My9-6 抗体构建 My9-6 基因

[0211] 如上所述使用 PCR 诱变技术为 huMy9-6 产生 10 个表面残基改变。因为 LC3bPB 的 6 个表面残基超出了 CDR 的 5 Å 以外,因此在所有形式的人源化 My9-6 中这些残基从鼠改变成人(图 16A 和 B)。位于 CDR 的 5 Å 之内的 4 个表面残基,Kabat 轻链位点 1,3 和 45 和重链位点 64,分别被改变为人或保留为鼠的形式,制成了 16 个人源化版本的 My9-6。在这

些中,最人源化的是 1.0 版本,因为它具有所有 10 个人的表面残基。就保证最大结合亲和性而言,最保守的版本是 1.1 版本,它保留了 4 个位于 CDR 的 5 Å 之内的鼠表面残基。每个人源化 My9-6 抗体基因被克隆进抗体表达质粒(图 5)中以进行瞬时和稳定的转染。

[0212] 3.11. 结合数据

[0213] 表面重整人源化的关键强度是通过保留了非表面的鼠框架残基,人源化的 My9-6 应该继续与 CD33 结合,亲和性不改变。但在 CDR 5 Å 之内的 3 个表面残基对抗原结合有作用,因此改变这些残基将对结合产生负效应。为了阐明这种关系,16 种形式的人源化 My9-6 包括了在 4 个 5 Å 残基位点的每一个上人或鼠残基的所有组合。这些组合的范围从在每个非 CDR 表面位点上具有人源化残基的最佳或最近似的人源化版本,1.0,至在 4 个 5 Å 表面位点中的每一个中保留了鼠残基的最保守形式,1.1,因此应该保留野生型的结合能力。通过比较人源化 My9-6 形式与鼠 My9-6 的结合亲和性,保留了野生型结合能力的最近似的人源化形式被选择为表面重整的人源化 My9-6。

[0214] 使用人源化版本的鼠 My9-6 和 muMy9-6 的直接和竞争结合试验在表达 CD33 的人白血病细胞系,HL-60 上进行。在 HL-60 质膜或整个细胞上检测 3 个最近似的人源化版本(V1.0、V1.3、V1.6)以及最保守的版本(V1.1)。图 17 给出了每种条件的 KD 值,图 18 显示了 huMy9-6, V1.0,相比 muMy9-6 的实施例结合曲线。为人源化 My9-6 版本,包括最近似的人源化版本 1.0 计算的 KD 值,位于 muMy9-6 KD 值的试验误差之内。竞争结合试验结果液证明了 huMy9-6 抗体与 muMy9-6 本身一样可同样充分地竞争 CD33 的结合。这些数据证明了全部人源化的 My9-6, V1.0 对 HL-60 质膜和整个细胞的近似野生型结合亲和性,不需要检测其他的形式,因为 1.0 版本是最佳的人源化 My9-6 抗体。

[0215] 鼠 My9-6 抗体已经被完全人源化,不丧失结合活性。从鼠至人表面残基的变化不会引起结合活性的丧失,即使这些表面残基中的 4 个位于 CDR 的 5 Å 内。在 CDR 的 5 Å 的残基被认为可能形成关键的 van derWaal 触点,可能影响这些 CDR 的结构。

[0216] My9-6 人源化的结果表明如果表面重整的抗体数目增长,基于实际的结合数据的完全残基位点分析可能成为较简单查看位于 CDR 的 5 Å 内的任何残基更为有效的靶向可疑残基的方法。

[0217] 人源化 My9-6 V1.0(huMy9-6)是使用上述方法被人源化的第 4 个抗体。通过表面重整鼠抗体的可变区框架进行人源化被发展为标准人源化方法,包括 CDR 嫁接的一种改良方法,需要大量开发和再改造以维持结合活性。这可通过表面重整的 huMy9-6 抗体进行对比,仅涉及改变 10 个表面残基,形成了具有完全人源化表面的完全活性的抗体。

[0218] 实施例 4. My9-6-DM1 免疫偶联物

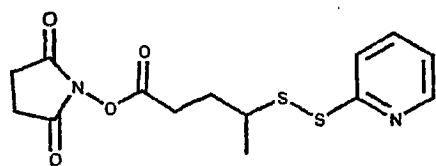
[0219] 使用与美登木素生物碱药物 DM1 交联的 My9-6 抗体进行了人肿瘤异种移植在小鼠中的临床前功效研究。

[0220] 如下所讨论的, My9-6-DM1 保持了未修饰抗体与 CD33 的特异性和结合亲和性,显示在体外对 CD33 阳性肿瘤细胞的有效抗原特异细胞毒性。用 My9-6-DM1 治疗携带已形成皮下 HL-60 肿瘤异种移植物的 SCID 小鼠,多次给药可引起肿瘤的完全消退(regression)(20mg 交联抗体/kg/天,静脉给药×5天),显示没有毒性,在最大可耐受剂量下反应良好。相反,与赋形剂对照相比用 My9-6 抗体单独治疗对 HL-60 肿瘤生长没有影响。在使用 My9-6-DM1 治疗携带皮下 THP-1 异种移植物的鼠过程中也观察到类似的治疗功效。

[0221] 4.1. 试剂

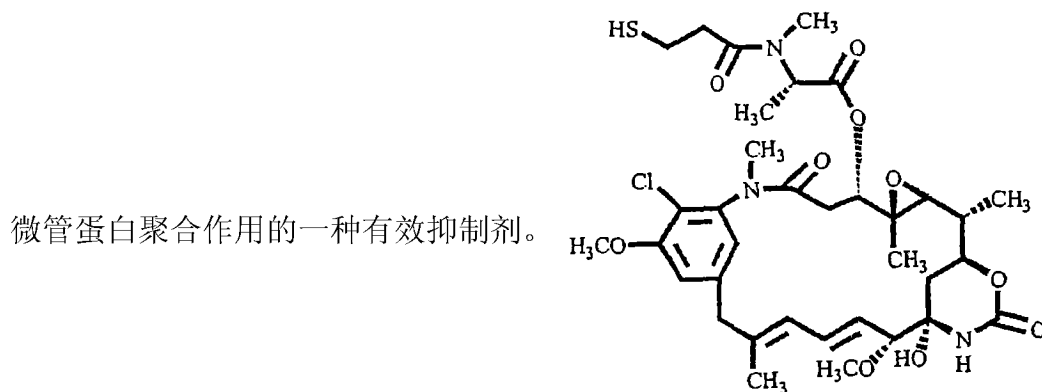
[0222] 抗体是上述针对人 CD33 的鼠单克隆 My9-6 抗体。

[0223] 抗体修饰剂是 N-N-琥珀酰亚胺酯 4-(2-吡啶二硫代)戊酸盐 (SPP) :



SPP

[0224] 细胞毒性剂是美登素类似物, DM1, 可从微生物发酵产物, 安丝菌素 P3 合成。DM1 是

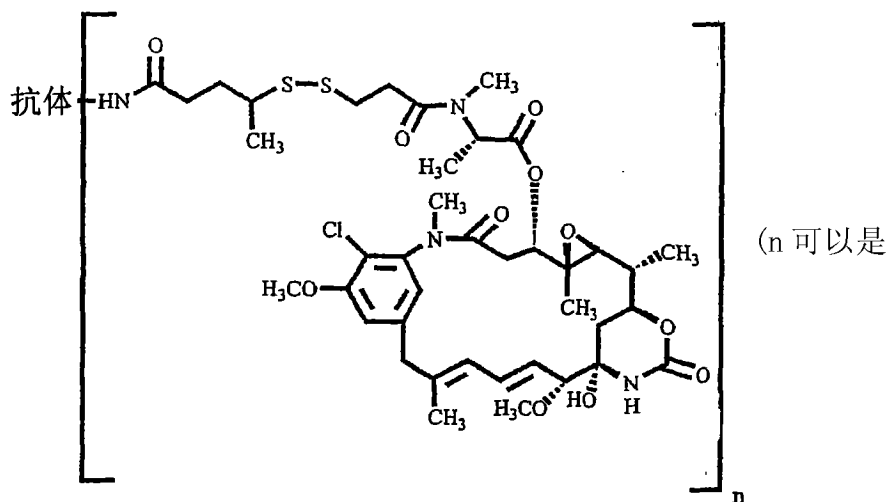


DM1

[0225] 4.2. My9-6-DM1 的制备

[0226] My9-6-DM1 通过用 SPP 修饰 My9-6 抗体, 以每分子抗体导入 3-5 个吡啶二硫代基团而制备。DM1 上硫醇取代基和抗体上的活性二硫化物官能基团之间的二硫化物交换提供了

含有 DM1 的抗体偶联物。



(n 可以是任何整数)

[0227] 4.3. 通过流式细胞计数仪分析抗体和抗体偶联物的结合

[0228] HL-60 细胞与多个浓度的 My9-6 抗体或 My9-6-DM1 温育。然后细胞被冲洗, 与第二个 FITC 标记的抗鼠 IgG 抗体温育。再次冲洗后, 细胞用 2% 甲醛固定, 使用 BD FACScan 流式细胞仪定量细胞相关的荧光。My9-6-DM1 保留了可与未修饰抗体相比的特定 CD33 结合能力 (图 19)。

[0229] 4.4. 体外细胞毒性测定

[0230] 使用表达 CD33 的 THP-1 细胞和 CD33 阴性细胞系 Namalwa 测量 My9-6-DM1 的细胞毒性。细胞接种在含有交联物的培养基的 96 孔板中,在 37°C 温育至集落形成 (2-3 周)。然后对集落进行评分,在计算中使用 Poisson 分布测定存活的部分。

[0231] 4.5. 体内鼠肿瘤异种移植研究

[0232] 皮下肿瘤模型 -HL-60 人前髓细胞性白血病细胞 ($0.1\text{ mL } 5 \times 10^6$ 细胞) 皮下接种至雌性 SCID 小鼠的右侧腹部。当肿瘤的大小达到 100 mm^3 (大肿瘤模型为 400 mm^3) 时通过静脉注射侧尾静脉治疗小鼠。每周测量肿瘤大小和小鼠体重两次。存活模型 -HL-60 细胞 ($0.1\text{ mL } 5 \times 10^6$ 细胞) 被静脉注射进雌性 SCID 小鼠的侧尾静脉内。肿瘤细胞注射处理后 11 天开始治疗。每天检查小鼠的半死状态,肿瘤质量 (tumor mass) 或死亡。每周测量体重两次。

[0233] 4.6. My9-6-DM1 的体外特异性和功效

[0234] 使用克隆源性测定来检测与 CD33 阴性细胞系 (Namalwa) 相比 My9-6-DM1 对表达 CD33 的细胞 (THP-1) 的细胞毒性,其中通过定量治疗后生长的集落数目来测定细胞杀伤活性。My9-6-DM1 显示了在体外对 CD33 阳性人肿瘤细胞有效的细胞杀伤活性 (图 20)。没有观察到对 CD33 阴性细胞的明显毒性,表明 CD33 依赖性细胞毒性是由于抗 CD33 抗体,My9-6 的特异靶向作用。

[0235] 4.7. My9-6-DM1 对小鼠内人肿瘤异种移植物的作用

[0236] 使用携带人 HL-60 肿瘤细胞异种移植物的 SCID 小鼠测定体内 My9-6-DM1 的作用。HL-60 细胞被皮下注射,使肿瘤生长至 100 mm^3 的平均大小。My9-6-DM1 交联物经静脉输送每天一次,持续 5 天,剂量在图 21 中标明。用药剂量表示为交联物中的 mg 抗体,其对应的 DM1 剂量为大约 $15\text{ }\mu\text{g DM1/mg 抗体}$ 。测量肿瘤的体积作为治疗作用的一个标识,监测小鼠的体重以指示治疗引起的毒性。My9-6-DM1 可使携带人 HL-60 细胞异种移植物的鼠产生长期治愈作用,其剂量引起很小的毒性 (图 21)。在被测的两个最高剂量下 (19 和 26 mg/kg),观察到肿瘤完全消退,最大的体重损失小于 10% (图 21A 和 B)。即使是在最低的被测剂量下 (13 mg/kg),5 只小鼠中有 2 只显示完全的治愈,而其他 4 只显示的肿瘤消退为肿瘤生长被延缓了大约 20 天。采用 THP-1 白血病细胞系也观察到了类似的结果,My9-6-DM1 可使携带人 THP-1 肿瘤异种移植物的鼠产生了长期治愈作用 (数据未显示)。

[0237] 这些结果与单独使用 My9-6 抗体治疗获得的结果形成了鲜明的对比。抗体单独对肿瘤细胞生长没有作用,即使在 50 mg/kg 的剂量下 (图 21C)。

[0238] My9-6-DM1 的活性可与已批准的抗 CD33 抗体加利车霉素偶联物卡奇霉素吉妥单抗相媲美。卡奇霉素吉妥单抗每 4 天用药 3 剂量。初步试验证明在无胸腺鼠已公布的 MTD (0.3 mg/kg) 下卡奇霉素吉妥单抗对 SCID 小鼠毒性太强 (数据未显示)。在本试验中在 100 和 $200\text{ }\mu\text{g/kg}$ 剂量下也观察到了明显的毒性 (图 21F)。卡奇霉素吉妥单抗显示在本模型中在最大耐受剂量下 ($100\text{ }\mu\text{g/kg}$) 仅有一般的肿瘤消退作用和生长延缓作用 (大约 25 天)。

[0239] 在一个单独的试验中,My9-6-DM1 的抗肿瘤活性可与未交联的母体药物,美登素的活性相媲美。携带 HL-60 肿瘤异种移植物的鼠每天治疗,持续 5 天,偶联物的剂量为 23 mg 抗体/kg 或 $350\text{ }\mu\text{g DM1/kg}$;未交联的药物剂量为 $350\text{ }\mu\text{g/kg}$;或未交联抗体剂量为 23 mg/kg 。单独用美登素治疗的 6 只小鼠中的 4 只在治疗后两天死亡,表明这种水平的药物毒性是

非常强的。但药物显示对剩余 3 只小鼠的肿瘤生长有明显的影响,生长延缓大约 10 天(图 22)。

[0240] My9-6 抗体单独对肿瘤生长没有影响,而 My9-6-DM1 偶联物可引起肿瘤的完全消退。偶联物治疗对小鼠体重的影响(降低 12%)稍高于以前的试验,可能反映了偶联物合成中的批间差异。在第 70 天开始观察到在 6 只偶联物治疗的小鼠中出现了肿瘤的再生长。这些动物接受了与首次治疗相同的第二次 My9-6-DM1 治疗。第二次治疗使“复发”肿瘤完全消退,没有观察到不良的毒性作用,这表明肿瘤的再生长不是因为偶联物抗性细胞的生长。

[0241] 在本异种移植物模型中 My9-6-DM1 的强效作用表明甚至对 HL-60 肿瘤偶联物也是有效的。在治疗开始前使肿瘤生长至 $> 400\text{mm}^3$ 的体积。另外,将 My9-6-DM1 的活性与标准的化疗药物进行比较。My9-6-DM1 可使 SCID 小鼠中的大肿瘤完全消退(图 23A & B)。另外,复发的肿瘤(6 只小鼠中的 2 只)对 My9-6-DM1 的第二次治疗是敏感的。用标准的化疗药物(Ara-C 和黄胆素)对肿瘤的生长作用很小。较高的药物剂量对小鼠的毒性是很大的(未显示)。

[0242] 4.8. My9-6-DM1 在 HL-60 细胞小鼠存活模型中的功效

[0243] My9-6-DM1 在肿瘤异种移植物模型中的作用是惊人的,而我们也感兴趣的是看到了偶联物在鼠存活模型中的活性,其中 HL-60 细胞被直接注入至鼠尾静脉中。在这个模型中,对照小鼠在注射细胞后 30 和 50 天之间死亡。在注射细胞后 11 天,开始用 My9-6-DM1 治疗的小鼠显示存活率大幅度增加,8 只小鼠中的 7 只 70 天仍存活(图 24A)。在本模型中单独使用美登素也显示对鼠存活有明显的影响,尽管 8 只小鼠中 2 只在开始治疗后不久死亡,表明有一定的药物毒性。本模型与皮下异种移植物模型相比美登素的相对作用表明 HL-60 肿瘤对这种环境中药物的作用更敏感。开始治疗后进一步的延缓作用证明了靶向和非靶向药物之间的显著差别。但即使在本模型中,标准的化疗没有产生明显的存活率提高(图 24B)。最高的组合剂量显示了非常明显的药物毒性。My9-6 抗体单独使用和卡奇霉素吉妥组单抗显示对存活率有一定的增加。

[0244] 保藏声明

[0245] 根据布达佩斯条约的条款,制备鼠 My9-6 抗体的杂交瘤保藏于 2002 年 11 月 7 日,保藏在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),1549 邮箱,弗吉尼亚州马纳萨斯,20108,并被指定保藏号为 PTA-4786。

[0246] 在本公开中,参考了某些专利和已印刷的出版物,其讲授的内容各自整体引入本文,以作参考。

[0247] 尽管本发明已经被详述,并以其特殊实施例作为参考。但对于本领域的普通技术人员来说很明显的是可对于进行各种变化和修改,并不违背其精神和范围。

序列表

<110> 伊谕诺金公司
 <120> 抗 -CD33 抗体和使用其治疗急性髓性白血病的方法
 <130> F174222
 <140> PCT/US2003/032737
 <141> 2003-11-05
 <150> US60/424,332
 <151> 2002-11-07
 <160> 94
 <170> PatentIn version3.2
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <400> 1
 Ser Tyr Tyr Ile His
 1 5
 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16).. (16)
 <223> " X" 可以是 K 或 Q
 <400> 2
 Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Xaa
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 <400>3
 Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val
 1 5
 <210> 4
 <211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 4

Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 5

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 6

His Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Thr

1 5

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 8

Asn Ile Met Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser

20 25 30

Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化 My9-6 抗体重链可变区

<400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Tle His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化 My9-6 抗体轻链可变区

<400> 10

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

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser
20 25 30

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

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

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

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

Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 11

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物 HindKL

<400> 11

tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tgggtgc

46

<210> 12

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>	
<223> PCR 引物 Bgl2IgG1	
<400> 12	
ggaagatcta tagacagatg ggggtgtcgt tttggc	36
<210> 13	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物 EcoPolydC	
<400> 13	
tatatctaga attccccccc cccccccccc	30
<210> 14	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物 Sac1MK	
<400> 14	
gggagctcga yattgtgmts acmcarwctm ca	32
<210> 15	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物 EcoR1MH1	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (18).. (18)	
<223> " n " 可以是任何核苷酸	
<400> 15	
cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc	32
<210> 16	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物 EcoR1MH2	
<220>	

<221>	misc_feature	
<222>	(18)..(18)	
<223>	" n " 可以是任何核苷酸	
<400>	16	
	cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg	35
<210>	17	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	简并引物 Leaddeg1	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(26)..(26)	
<223>	" n " 可以是任何核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(29)..(29)	
<223>	" n " 可以是任何核苷酸	
<400>	17	
	ttttgattct gctgtgggtg tccggnacnt gygg	34
<210>	18	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	简并引物 Leaddeg2	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(28)..(28)	
<223>	" n " 可以是任何核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(31)..(31)	
<223>	" n " 可以是任何核苷酸	
<400>	18	
	ttttgattc gctgctgctgc tgtgggtnws ngg	33
<210>	19	
<211>	39	

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	简并引物 Leaddeg3	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(31).. (31)	
<223>	" n" 可以是任何核苷酸	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(34).. (34)	
<223>	" n" 可以是任何核苷酸	
<400>	19	
	ttttgattc ccaggtgttca tgctgctgyt nytntgggt	39
<210>	20	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人源化作用引物 My96LCBsrG1	
<400>	20	
	tacaggtgt acactccgata ttgtgatcac ccagactcc	39
<210>	21	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人源化引物 My96LCOL1	
<400>	21	
	actggaaatc aaacgaactg tggctgcacc atctg	35
<210>	22	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人源化引物 My96LCOL2	
<400>	22	
	gccacagtt cgtttgatttc cagtttggtg cctcc	35
<210>	23	

<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人源化引物 My96HCBsrG1	
<400>	23	
tacaggtga cactcccagg ttaagctgca gcagtctgg		39
<210>	24	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人源化引物 My96HCOL1	
<400>	24	
ccaoggtcc cgtctcctca gcctccacc		29
<210>	25	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人源化引物 My96HCOL2	
<400>	25	
gaggctgag agacggtgac cgtgggtccc		29
<210>	26	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人源化引物 My9-6LCNMLS	
<400>	26	
caggtgtaca ctccaatatt atgctcaccc agagtccatc atc		43
<210>	27	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人源化引物 My9-6HCQP	
<400>	27	
caggtgtaca ctcccaggtt cagctgcagc agcctggggc tg		42

<210>	28	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人源化引物 MY96HCQ64-1	
<400>	28	
	agaagttcca aggcaaggcc ac	22
<210>	29	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人源化引物 MY96HCQ64-2	
<400>	29	
	cttgccttgg aacttctgat tg	22
<210>	30	
<211>	60	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人源化引物 MY96HCQ105	
<400>	30	
	cgatgggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgaccgtg gtcccttggc cccagacatc	60
<210>	31	
<211>	79	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人源化引物 MY96LCEVGPR	
<400>	31	
	aggtgtacac tccgagattg tgctcaccca gaggccagga tctctggctg tgtctccagg	60
	agaaagggtc actatgagc	79
<210>	32	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人源化引物 MY96LCR45	

<400> 32	
gcctggtacc aacagatacc agggcagtct cctagacttc tgatctac	48
<210> 33	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人源化引物 MY96LCP80-1	
<400> 33	
agcagtgttc aacc tgaaga cctggc	26
<210> 34	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人源化引物 MY96LCP80-2	
<400> 34	
gtcttcaggt tgaacactgc tgatgg	26
<210> 35	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人源化引物 MY96LCQ100	
<400> 35	
ttttaagctt cgtttgattt ccagtttggt gccttgaccg aacgtccg	48
<210> 36	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人源化引物 My961cNM	
<400> 36	
caggtgtaca ctccaatatt atgctcacc agag	34
<210> 37	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 人源化引物 MY96LCK45	
<400> 37	
gcctggtacc aacagatacc agggcagtct cctaaacttc tgatctac	48
<210> 38	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人源化引物 My96HCApa1	
<400>38	
cgatgggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgaccg	38
<210> 39	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人源化引物 huMy96LC0L1	
<400> 39	
actggaaatc aaacgtacgg tggctgcacc atctg	35
<210> 40	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人源化引物 huMy96LC0L2	
<400> 40	
gccaccgtac gtttgatttc cagtttggtg ccttg	35
<210> 41	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人源化引物 My96lcEM My96lcNV chMy96lcBsiW1	
<400> 41	
caggtgtaca ctccgagatt atgctcaccc agag	34
<210> 42	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>

<223> 人源化引物 My961cNV

<400> 42

caggtgtaca ctccaatatt gtgctcaccc agag

34

<210> 43

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化引物 chMy961cBsiW1

<400> 43

ttttcgtacg ttgtatttcc agtttggtgc c

31

<210> 44

<211> 23

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<221> (23)..(23)

<223> " X" 可以是任何氨基酸

<400> 44

Asn Ile Met Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly

1

5

10

15

Glu Lys Val Thr Met Ser Xaa

20

<210> 45

<211> 23

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 45

Asp Ile Val Ile Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly

1

5

10

15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys

20

<210> 46

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 简并引物 Sac1MK

<400> 46

gly Gly Gly Ala Gly Cys Thr Cys Gly Ala Tyr Ala Thr Thr Gly Thr

1 5 10 15

Gly Met Thr Ser Ala Cys Met Cys Ala Arg Trp Cys Thr Met Cys Ala

20 25 30

<210> 47

<211> 23

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 47

Asn Ile Met Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys

20

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 48

Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 49

<211> 12

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 49

Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser Ser Ser Gln Lys

1 5 10

<210> 50

<211> 12

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 50

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5 10

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 51

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu

1 5 10

<210> 52

<211> 19

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 52

Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10 15

Ala Lys Thr

<210> 53

<211> 20

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 53

Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val

1 5 10 15

Thr Val Ser Ser

20

<210> 54

<211> 19

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 54

Met Gly Glu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr

1 5 10 15

Val Ser Ser

<210> 55

<211> 339

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 55

aacattatgc tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtcact 60

atgagctgta agtcagtc aagtgttttt ttcatgtcaa gtcagaagaa ctacttggcc 120

tggtaccaac agataccagg gcagtcctct aaacttctga tctactgggc atccactagg 180

gaatctgggtg tccctgatcg cttcacagge agtggatctg ggacagattt tactcttacc 240

atcagcagtg tacaatctga agacctggca atttattact gtcatacaata cctctcctcg 300
cggacgttcg gtggaggcac caaactggaa atcaaacga 339

<210>56

<211>354

<212>DNA

<213> 小鼠

<400>56

caggtgcaac tgcagcagcc tggggctgag gtggtgaagc ctggggcctc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta cacatttacc agttactata tacactggat aaagcagaca 120
cctggacagg gcctggaatg ggttggagtt atttatccag gaaatgatga tatttcctac 180
aatcagaagt tcaaaggcaa ggccacattg actgcagaca aatcctccac cacagcctac 240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagaggtt 300
cgtctacggt acttcgatgt ctggggcgca gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354

<210>57

<211>17

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>57

Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 58

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His

1 5 10

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 59

Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser

1 5 10

<210> 60

<211> 99

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 60

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

<210> 61

<211> 96

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 61

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

<210>62

<211>114

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>62

Asn Ile Met Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser

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

Arg Ala

<210> 63

<211> 115

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 63

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

Lys Arg Ala

115

<210> 64

<211> 115

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 64

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly

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

<210> 65

<211> 115

<212> PRT

<213> 小鼠

<400>65

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

<210> 66

<211> 115

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 66

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

<210> 67

<211> 115

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 67

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

<210> 68

<211> 115

<212> PRT

<213> 小鼠

<400>68

```

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

```

115

<210> 69

<211> 113

<212> PRT

<213> 小鼠

<400>69

```

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

```

	100	105	110
Lys			
<210> 70			
<211> 114			
<212> PRT			
<213> 小鼠			
<400> 70			
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser			
	20	25	30
Ser Asn Ser Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
	35	40	45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val			
	50	55	60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
65	70	75	80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln			
	85	90	95
Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile			
	100	105	110

Lys Arg			
<210> 71			
<211> 113			
<212> PRT			
<213> 小鼠			
<400> 71			
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly			
1	5	10	15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser			
	20	25	30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
	35	40	45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val			
	50	55	60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
65	70	75	80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn			
	85	90	95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Pro
 100 105 110

Gly

<210> 72

<211> 109

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 72

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Ala Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 100 105

<210> 73

<211> 117

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 73

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser
 115

<210> 74

<211> 116

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 74

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser
 115

<210> 75

<211> 119

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 75

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys			
	85	90	95
Ala Arg Glu Lys Thr Thr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln			
100	105	110	
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser			

115

<210> 76

<211> 118

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 76

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

115

<210> 77

<211> 113

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 77

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser			
1	5	10	15
Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Thr			
20	25	30	
Tle His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly			
35	40	45	

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Val Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Arg Phe Lys
 50 55 60
 Asp Lys Ala Thr Leu Thr Arg Asp Arg Ser Ser Asn Thr Ala Asn Ile
 65 70 75 80
 His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Val
 85 90 95
 Arg Glu Gly Glu Val Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110

Ser

<210> 78
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1).. (1)
 <223> " X" 可以是任何氨基酸
 <400> 78

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

Ser

<210> 79
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 <400> 79
 Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser

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

115

<210> 80

<211> 114

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 80

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

Val Ser

<210> 81

<211> 116

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 81

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

<210> 82

<211> 119

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 82

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

<210> 83

<211> 123

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 83

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ala Gly Ser

1 5 10 15

Aer Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Aer Tyr

20 25 30

Gly Val Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

30 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Gly Lys Gly Tyr Leu Ser Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ala Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Phe Tyr Gly Gly Aer Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Phe Asp

100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

115 120

<210> 84

<211> 21

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapien)

<400> 84

Asn Met Thr Ser Ala Lys Pro Gly Gln Lys Gly Asp Ser Asp Ser Glu

1 5 10 15

Gly Lys Lys Arg Ala

20

<210> 85

<211> 21

<212> PRT

<213> 人

<400> 85

Asp Gln Thr Ser Val Arg Pro Gly Glu Lys Gly Ser Ser Asp Pro Glu

1 5 10 15

Gly Lys Lys Arg Thr

20

<210>86

<211> 20

<212> PRT

<213> 人

<400> 86

Asp Val Thr Ser Val Arg Pro Gly Lys Lys Gly Ser Ser Asp Pro Glu

1 5 10 15

Gly Lys Lys Arg

20

<210> 87

<211> 21

<212> PRT

<213> 人

<400> 87

Asp Gln Thr Ser Val Arg Pro Gly Lys Lys Gly Ser Ser Asp Pro Glu

1 5 10 15

Gln Lys Lys Arg Thr

20

<210> 88

<211> 20

<212> PRT

<213> 人

<400> 88

Glu Val Thr Gly Pro Arg Pro Gly Gln Arg Gly Asp Ser Asp Pro Glu

1 5 10 15

Gln Lys Lys Arg

20

<210> 89

<211> 20

<212> PRT

<213> 人

<400> 89

Asp Val Thr Leu Leu Pro Pro Gly Gln Arg Gly Asp Ala Asp Ala Glu

1 5 10 15

Gln Lys Lys Arg

20

<210> 90

<211> 24

<212> PRT

<213> 人

<400> 90

Gln Gln Ala Val Lys Pro Gly Lys Gly Thr Pro Gly Gln Gln Lys Lys

1 5 10 15

Gly Lys Ser Ser Ser Glu Ala Ser

20

<210> 91

<211> 24

<212> PRT

<213> 人

<400> 91

Gln Gln Ala Val Lys Pro Gly Lys Gly Thr Pro Gly Gln Gln Lys Gln

1 5 10 15

Gly Thr Pro Ser Ser Glu Lys Ser

20

<210> 92

<211> 24

<212> PRT

<213> 人

<400> 92

Gln Gln Ala Ala Lys Pro Gly Lys Gly Thr Pro Gly Gln Gln Lys Gln

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Ser Glu Gln Ser

20

<210> 93

<211> 24

<212> PRT

<213> 人

<400> 93

Gln Gln Ala Val Lys Pro Gly Lys Gly Thr Pro Gly Gln Gln Lys Gln

1 5 10 15

Gly Thr Ser Ser Ser Glu Gln Ser

20

<210> 94

<211> 23

<212> PRT

<213> 人

<400> 94

Gln Ala Val Lys Pro Gly Lys Gly Thr Pro Gly Gln Gln Lys Gln Gly

1 5 10 15

Lys Ser Ser Ser Glu Gln Ser

20

<210> 95

<211> 113

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 95

Asn Ile Met Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser

20 25 30

Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 96

<211> 118

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 96

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala	Arg	Glu	Val	Arg	Leu	Arg	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr
			100					105					110		
Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
			115												

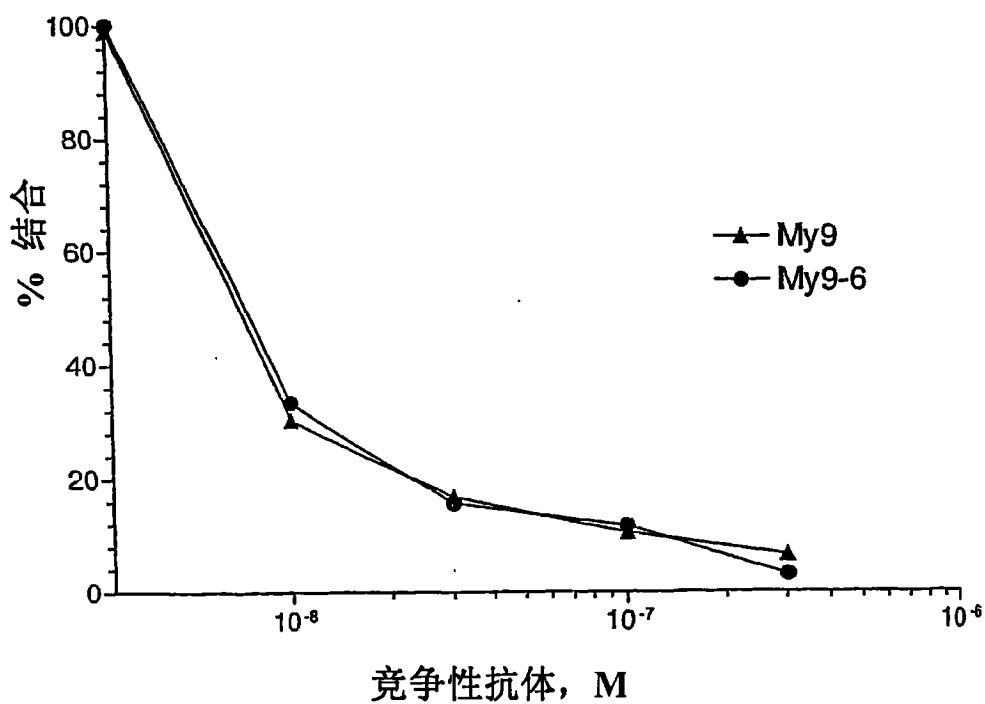


图 1

My9-6 轻链信号序列简并引物

名称	序列	SEQ ID NO:
Leaddeg1	TTTTGATTCTGCTGTGGGTGTCCGGNACNTGYGG	17
Leaddeg2	TTTTGATTCTGCTGTGCTGTGCGTNNWSNGG	18
Leaddeg3	TTTTGATTCCCAGGTGTTTCATGCTGCTGYTNYTNTGGGT	19

混和碱基: S = G+C, Y = C+T, W = A+T, N = A+T+G+C.

图 2

用来表面预测的 127 个 Brookhaven 数据库结构文件									
2rcs	3hfl	3hfm	1aif	1a3r	1bbj	43c9	4fab	6fab	7fab
2gfb	2h1p	2hfl	1a6t	1axt	1bog	2hrp	2jel	2mcp	2pcp
1yuh	2bfv	2cgr	8fab	1ae6	1bvl	2dbl	2f19	2fb4	2fbj
1sm3	1tet	1vfa	glb2	1a4j	1cly	1vge	1yec	1yed	1yee
1nsn	1opg	1osp	1aj7	1ayl	1clz	1plg	1psk	1rmf	1sbs
1ncd	1nfd	1ngp	1acy	1afv	1cbv	1nld	1nma	1nmb	1nqb
1mcp	1mfb	1mim	15c8	1a5f	1axs	1mLb	1mpa	1nbv	1ncb
1jrh	1kb5	1kel	1ap2	1b2w	1adq	1kip	1kir	1lve	1marn
1igi	1lgm	1igt	1ad0	1baf	1cfv	1lgy	1ikf	1jel	1jhl
1gpo	1hil	1hyx	1a0q	1bjm	1clo	1iai	1ibg	1igc	1igf
1fpt	1frg	1fvc	1aqk	1bln	1d5b	1gaf	1ggi	1ghf	1gig
1fai	1fbi	1fdl	1ad9	1bbd	1f58	1fgv	1fig	1flr	1for
	1dbl	1dfb	1a3l	1bfo	1eap	1dsf	1dvf		

图 3

图 4

引物	序列	SEQ ID NO:
My96LCBsrg1	TACAGGTGTACACTCCGATATTGTGATCACCAGACTCC	20
My96LCOL1	ACTGGAAATCAAAACGAAC'TGTGGCTGCACCAATCTG	21
My96LCOL2	GCCACAGTTCGTTTGATTTCCAGTTTGGTGCCCTCC	22
My96HCBsrg1	TACAGGTGTACACTCCAGGTTAAAGCTGCAGCAGTCTGG	23
My96HCOL1	CCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACC	24
My96HCOL2	GAGGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC	25
My9-6LCNMLS	CAGGTGTACACTCCAATATTATGCTCACCCAGAGTCCAATC	26
My9-6HCQP	CAGGTGTACACTCCAGGTTTCAAGTGCAGCAGCCTGGGCTG	27
MY96HCQ64-1	AGAAGTTCCAAGGCAAGGCCAC	28
MY96HCQ64-2	CTTGCCCTTGGAAC'TTCTGATTG	29
MY96HCQ105	CGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGCCTTGGCCCCAGACATC	30
MY96LCEVGP	AGGTGTACACTCCGAGATTGTGCTCACCCAGAGTCCAGGATCTCTGGCTGTCTCCAGGAGAAAGGTCACTATGAGC	31
MY96LCR45	GCCTGGTACCAACAGATACCAGGGCAGTCTCCTAGACTTCTGATCTAC	32
MY96LCP80-1	AGCAGTGTTCACCTGAAGACCTGGC	33
MY96LCP80-2	GTCTTCAGGTTGAACACTGCTGATGG	34
MY96LCQ100	TTTAAAGCTTCGTTTGATTTCCAGTTTGGTGGCTTGACCCGAAAGTCCG	35
My96lcNM	CAGGTGTACACTCCAATATTATGCTCACCCAGAG	36
MY96LCK45	GCCTGGTACCAACAGATACCAGGGCAGTCTCCTAAACTTCTGATCTAC	37
My96HCApa1	CGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACCG	38
huMy96LCOL1	ACTGGAAATCAAAACGTACGGTGGTGCACCATCTG	39
huMy96LCOL2	GCCACCGTACGTTTGATTTCCAGTTTGGTGCCCTTG	40
My96lcEM	CAGGTGTACACTCCGAGATTATGCTCACCCAGAG	41
My96lcNV	CAGGTGTACACTCCAATATTGCTCACCCAGAG	42
chMy96lcBsiW1	TTTTCGTACGTTTGATTTCCAGTTTGGTGCC	43

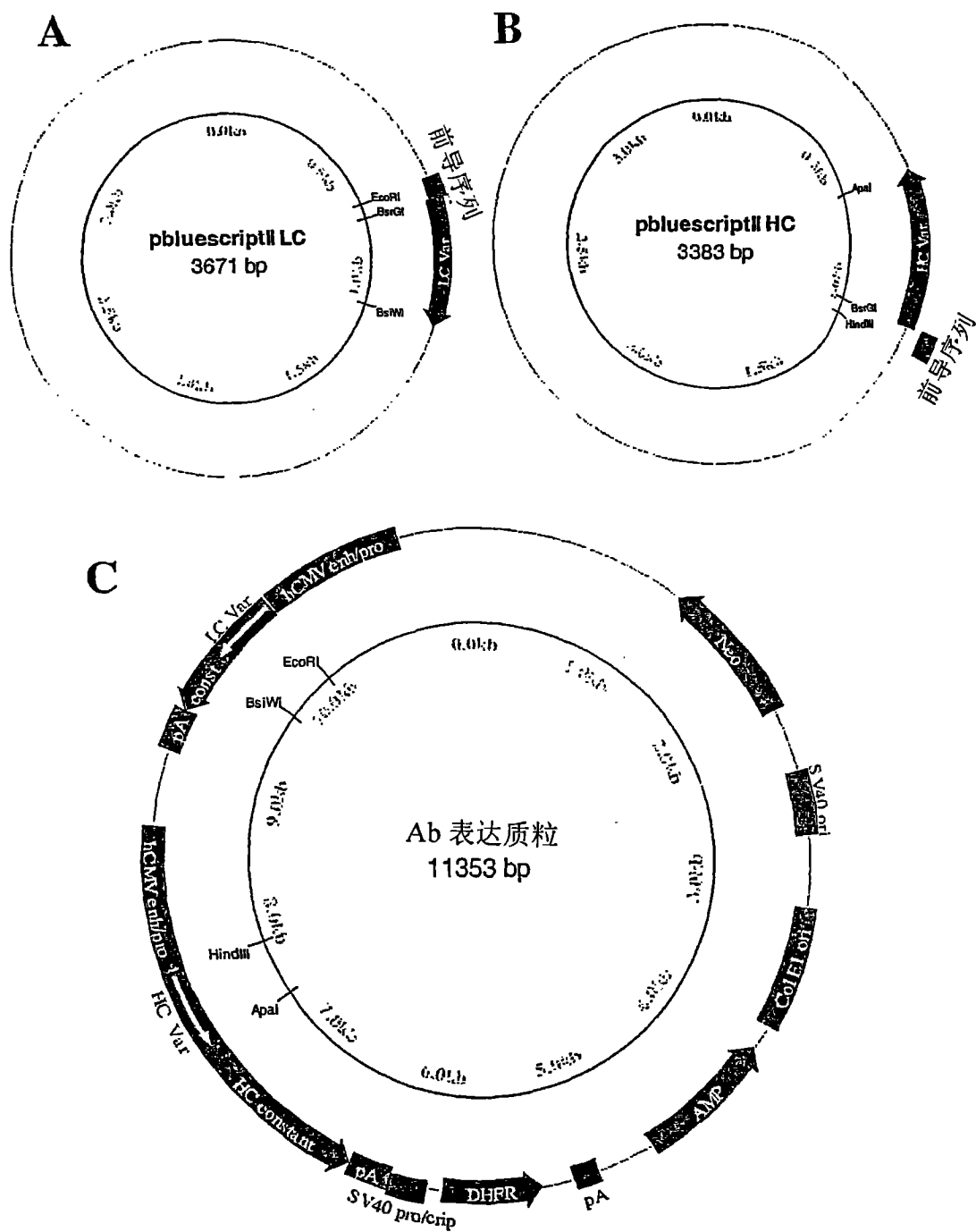


图 5

图 6A

muMy9-6 轻链氨基端肽序列										SEQ ID NO:														
Edman 测序	Kabat#	5					10			15	20	23	44											
		N	I	M	L	T	Q	S	P	S	S	L	A	V	S	A	G	E	K	V	T	M	(S)	X
Deg cDNA		D	I	V	I	T	Q	T	P	S	S	L	A	V	S	A	G	E	K	V	T	M	S	C
Sac1MK 引物	E L D I V X T Q X X GG GAG CTC GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA												46											
信号肽 Deg cDNA		N	I	M	L	T	Q	S	P	S	S	L	A	V	S	A	G	E	K	V	T	M	S	C
													47											

图 6B

muMy9-6 轻链 CDR 肽片段的 MS-MS 序列分析										SEQ ID NO:
CDR1	K S S Q S V F F S S S Q K N Y L A									48
1319 Da	S S Q S V F F S S S Q K									49
CDR2	K L L T Y W A S T R E S									50
1122 Da	K L L I Y W A S T R E									51

图 7

muMy9-6 重链内部/CDR3 肽序列		SEQ ID NO:
1788 Da 序列	(R) Y F D V W G A G T T V T V S S A K (T)	52
cDNA 克隆 2 (匹配)	<u>E V R L R Y F D V</u> CDR3 W G A G T T V T V S S	53
cDNA 克隆 I (不匹配)	<u>M G E D A - M D Y</u> CDR3 W G Q G T S V T V S S	54

轻链 (连续编号) (SEQ ID NO:55) :

1 aacattatgctgacacagtcgccatcatctctggctgtgtctgca
1 N I M L T Q S P S S L A V S A

46 ggagaaaaggtcactatgagctgtaagtccagtcaaagtgtttt
16 G E K V T M S C K S S Q S V F
CDR1

91 ttcagttcaagtcagaagaactacttggcctggtaccaacagata
31 F S S S Q K N Y L A W Y Q Q I
CDR1

136 ccagggcagtcctcctaaacttctgatctactgggcattccactagg
46 P G Q S P K L L I Y W A S T R
CDR2

181 gaatctgggtgtccctgatcgcttcacaggcagtggtatctgggaca
61 E S G V P D R F T G S G S G T

226 gattttactcttaccatcagcagtggtacaatctgaagacctggca
76 D F T L T I S S V Q S E D L A

271 atttattactgtcatcaatacctctcctcgcggacgttcggtgga
91 I Y Y C H Q Y L S S R T F G G
CDR3

316 ggcaccaaactggaaatcaaacga
106 G T K L E I K R

图 8A

重链 (连续编号) (SEQ ID NO:56) :

1 caggtgcaactgcagcagcctggggctgaggtggtgaagcctggg
1 Q V Q L Q Q P G A E V V K P G

46 gcctcagtgaagatgtcctgcaaggcttctggctacacatttacc
16 A S V K M S C K A S G Y T F T

91 agttactatatacactggataaagcagacacctggacagggcctg
31 S Y Y I H W I K Q T P G Q G L
CDR1

136 gaatgggttgaggttatttatccaggaaatgatgatatttcctac
46 E W V G V I Y P G N D D I S Y
CDR2

181 aatcagaagttcaaaggcaaggccacattgactgcagacaaatcc
61 N O K F K G K A T L T A D K S
CDR2

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

271 tctgcggtctattactgtgcaagagaggttcgtctacgggtacttc
91 S A V Y Y C A R E V R L R Y F
CDR3

316 gatgtctggggcgcagggaccacgggtcacggtctcctca
106 D V W G A G T T V T V S S

图 8B

鼠 My9-6 CDR

<u>轻链</u>	<u>SEQ ID NO:</u>
CDR1: K S S Q S V F F S S S Q K N Y L A	4
CDR2: W A S T R E S	5
CDR3: H Q Y L S S R T	6

重链

CDR1: S Y Y I H	1
CDR2: V I Y P G N D D I S Y N Q K F K G	57
CDR3: E V R L R Y F D V	3

AbM 重链

CDR1: G Y T F T S Y Y I H	58
CDR2: V I Y P G N D D I S	59
CDR3: E V R L R Y F D V	3

图 9

胚系序列比较

<u>轻链</u>		50
8-27*	NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSP	
muMy9-6	...L.....FF..S.....I.....	
		99
8-27	KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCHQYLS	
muMy9-6	S.....I.....	
<u>重链</u>		50
V102*	-VQLQQPGAELVKPGASVKVSCASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGR	
muMy9-6	Q.....V.....M.....YI..I..T.....V.V	
		98
V102	IHPSDSDTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA-	
muMy9-6	.Y.GND.IS.....A....T.....R	

* SEQ ID NO:60

SEQ ID NO:61

连续残基编号

图 10

与结构最具同源序列的 10 个轻链

	1					50
My96	NIMLTQSPSS	LAVSAGEKVT	MSCKSSQSVF	FSSSQKNYLA	WYQQIPGQSP	
1sbs	DIVMSQSPSS	LAVSVGEKVT	MTCKSSQSLL	YSSNQMNyla	WYQQKPGQSP	
1hil	DIVMTQSPSS	LTVTAGEKVT	MSCTSSQSLF	NSGKQKNYLT	WYQQKPGQPP	
1a5f	DIVMTQSPSS	LTVTTGEKVT	MTCKSSQSLL	NSGAQKNYLT	WYQQKPGQSP	
1a3r	DIVMTQSPSS	LTVTTGEKVT	MTCKSSQSLL	NSRTQKNYLT	WYQQKPGQSP	
1frg	DIVMTQSPSS	LTVTAGEKVT	MSCKSSQSLF	NSGKRKNFLT	WYHQKPGQPP	
1mcp	DIVMTQSPSS	LSVSAGERVT	MSCKSSQSLL	NSGNQKNFLA	WYQQKPGQPP	
43c9	DVVMTQTPSS	LAMSVGQKVT	MSCKSSQSLL	NISNQKNYLA	WYQQKPGQSP	
1lve	DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSVL	YSSNSKNYLA	WYQQKPGQPP	
1ap2	DIVMTQSPSS	LTVTAGEKVT	MSCKSSQSLL	NSGNQKNYLT	WYQQKPGQPP	
1ncb	DIVMTQSPKF	MSTSVGDRVT	ITCKASQDVS	T.....AVV	WYQQKPGQSP	
						100
My96	KLLIYWASTR	ESGVPDRFTG	SGSGTDFTLT	ISSVQSEDLA	IYYCHQYLSS	
1sbs	KLLIYWASTR	ESGVPDRFTG	SGSGTDFTLT	ISSVEAEDLA	VYYCQQYHSY	
1hil	KVLIYWASTR	ESGVPDRFTG	SGSGTDFTLT	ISSVQAEDLA	VYYCQNDYSN	
1a5f	KLLIYWASTR	ESGVPDRFTG	SGSGTDFTLS	ISGVQAEDLA	VYYCQNNYNY	
1a3r	KLLIYWASTR	ESGVPDRFTG	SGSGTDFTLS	ISGVQAEDLA	VYYCQNNYNY	
1frg	KLLIYWASTR	ESGVPDRFSG	SGSGTDFTLT	ITSVQAEDLA	IYYCQNDYSH	
1mcp	KLLIYGASTR	ESGVPDRFTG	SGSGTDFTLT	ISSVQAEDLA	VYYCQNDHSY	
43c9	KLLVYFASTR	ESGVPDRFIG	SGSGTDFTLT	ISSVQAEDQA	DYFCQQHYRA	
1lve	KLLIYWASTR	ESGVPDRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQAEDVA	VYYCQQYYST	
1ap2	KLLIYWASTR	ESGVPDRFTG	SGSGTDFTLT	ISSVQAEDLA	VYYCQNDYSY	
1ncb	KLLIYWASTR	HIGVPDRFAG	SGSGTDYTLT	ISSVQAEDLA	LYYCQQHYSP	
						115
My96	.RTFGGGTKL	EIKRA	(SEQ ID NO:62)			
1sbs	PFTFGSGTKL	EIKRA	(SEQ ID NO:63)			
1hil	PLTFGGGTKL	ELKRA	(SEQ ID NO:64)			
1a5f	PLTFGAGTKL	ELKRA	(SEQ ID NO:65)			
1a3r	PLTFGAGTKL	ELKRA	(SEQ ID NO:66)			
1frg	PLTFGAGTKL	ELKRA	(SEQ ID NO:67)			
1mcp	PLTFGAGTKL	EIKRA	(SEQ ID NO:68)			
43c9	PRTFGGGTKL	EIK	(SEQ ID NO:69)			
1lve	PYSFGQGTKL	EIKR	(SEQ ID NO:70)			
1ap2	PLTFGAGTKL	EPG	(SEQ ID NO:71)			
1ncb	PWTFGGGTKL	EIKRA	(SEQ ID NO:72)			

残基编号连续

图 11A

与结构最具同源序列的 10 个重链

	1				50
My96	QVQLQQPGAE	VVKPGASVKM	SCKASGYTFT	SYIIHWIKQT	PGQGLEWVGV
1plg	QIQLOQSGPE	LVRPGASVKI	SCKASGYTFT	DYIIHWVKQR	PGEGLEWIGW
1ae6	QIQLOQSGPE	LVKPGASVKI	SCKASGYTFT	DYYINWMKQK	PGQGLEWIGW
1for	QGQLQQSGAE	LVRPGSSVKI	SCKASGYAFS	SFWVNWVKQR	PGQGLEWIGQ
1igy	.VKLQESGAE	LARPGASVKM	SCKASGYTFT	TYTIHWIKQR	PGQGLEWIGY
1bbj	XVQLQQSDAE	LVKPGASVKI	SCKASGYTFT	DHAIHWAKQK	PEQGLEWIGY
1nqb	.VQLQQSGAE	LVKPGASVKL	SCKASGYTFT	SYWMHWVKQR	PGRGLEWIGR
1mim	..QLQQSGTV	LARPGASVKM	SCKASGYSFT	RYWMHWIKQR	PGQGLEWIGA
1a6t	EVQLQQSGPD	LVKPGASVKI	SCKASGYSFS	TYWMHWVKQS	HGKSLEWIGR
1d5b	QVQLQQSGAE	LMKPGASVKI	SCKATGYTFS	SFWIEWVKQR	PGHGLEWIGE
1fai	QVQLQQSGAE	LVRAGSSVKM	SCKASGYTFT	SYGVNWVKQR	PGQGLEWIGY
					100
My96	IYPGNDDISY	NQKFKGKATL	TADKSSTTAY	MQLSSLTSED	SAVYYCAREV
1plg	IYPGSGNTKY	NEKFKGKATL	TVDTSSSTAY	MQLSSLTSED	SAVYFCARGG
1ae6	IDPGSGNTKY	NEKFKGKATL	TVDTSSSTAY	MQLSSLTSED	TAVYFCAREK
1for	IYPGDGDNKY	NGKFKGKATL	TADKSSTTAY	MQLYSLTSED	SAVYFCARSG
1igy	INPSSVYTNV	NQRFKDKATL	TRDRSSNTAN	IHLSSLTSD	SAVYYCVREG
1bbj	ISPGNDDIKY	NEKFKGKATL	TADKSSSTAY	MQLNSLTSED	SAVYFCKRSY
1nqb	IDPNSGGTKY	NEKFKSKATL	TVDKPSSTAY	MQLSSLTSED	SAVYYCARYD
1mim	IYPGNSDTSY	NQKFEGKAKL	TAVTSASTAY	MELSSLTHED	SAVYYCSRDI
1a6t	VDPDNGGTSF	NQKFKGKAIL	TVDKSSSTAY	MELGSLTSED	SAVYYCARRD
1d5b	ILPGSGGTHY	NEKFKGKATF	TADKSSNTAY	MQLSSLTSED	SAVYYCARGH
1fai	INPGKGYLSY	NEKFKGKTTL	TVDRSSSTAY	MQLRSLTSED	AAVYFCARSF
			124		
My96	RLRY.....	FDVWGAGTTV	TVSS	(SEQ ID NO:73)	
1plg	K.....FA	MDYWGQGTSV	TVSS	(SEQ ID NO:74)	
1ae6	TTY, ...YA	MDYWGQGTSV	TVSS	(SEQ ID NO:75)	
1for	NYPY....A	MDYWGQGTSV	TVSS	(SEQ ID NO:76)	
1igy	E	VPYWGQGTTV	TVSS	(SEQ ID NO:77)	
1bbj	YGHW.....	...GQGTTL	TVSS	(SEQ ID NO:78)	
1nqb	YYGS....SY	FDYWGQGTTV	TVSS	(SEQ ID NO:79)	
1mim	GYFY.....	.DFWGQGTTL	TVSS	(SEQ ID NO:80)	
1a6t	DY.....Y	FDFWGQGTSL	TVSS	(SEQ ID NO:81)	
1d5b	SYIFY....D	GDYWGQGTSV	TVSS	(SEQ ID NO:82)	
1fai	YGGSDLAVYY	FDSWGQGTTL	TVSS	(SEQ ID NO:83)	

残基编号连续

图 11B

muMy9-6 轻链相对可及性

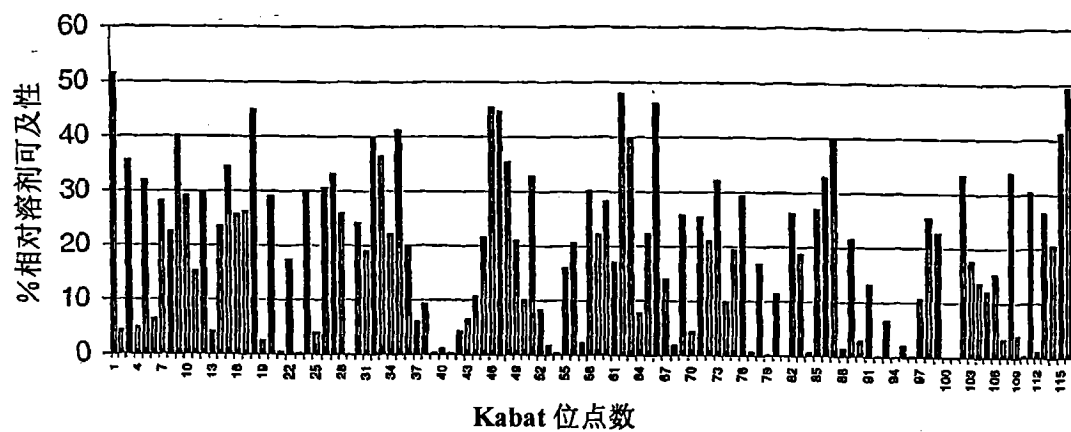


图 12A

muMy9-6 重链相对可及性

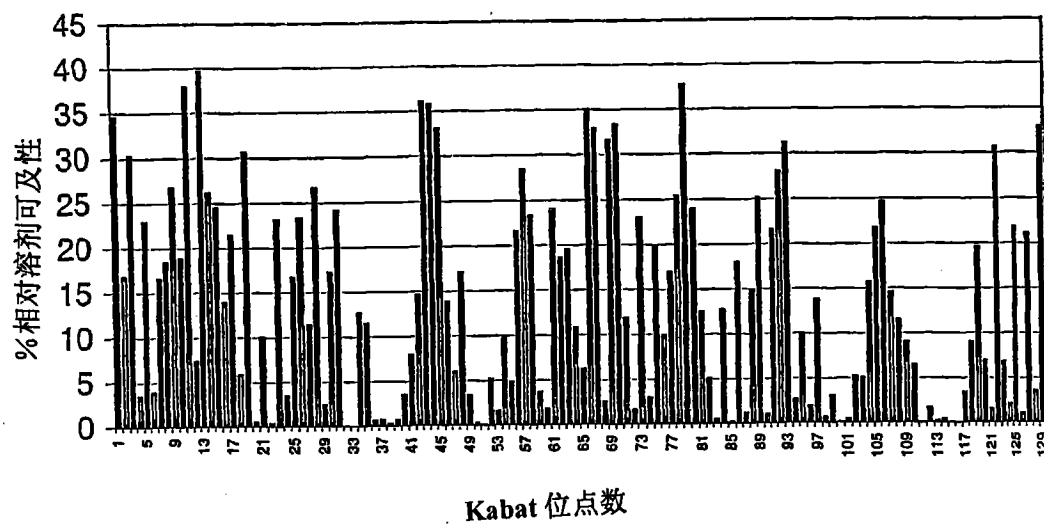


图 12B

muMy9-6 轻链表面残基						
Kabat 位点 #	平均 可及性	> 30% Ave acc	25%-35% 平均可及性	相同 侧向		muMy9-6 表面
1	51.46	1				N1
3	35.42	3				M3
5	31.82	5	5	NA		T5
7	28.04		7	26.17		
9	40.08	9				S9
10	29.04		10	27.76		
12	29.63		12	22.32	other A's	
15	34.39	15	15	18.20	33.36	A15
16	25.61		16	NA		
17	26.21		17	25.11		
18	44.83	18				K18
20	28.91		20	29.11		
40	45.25	40				P40
41	44.52	41				G41
42	35.34	42				Q42
45	32.68	45	45	32.58		K45
57	39.81	57				G57
60	46.07	60				D60
63	25.60		63	26.87		
65	25.28		65	24.07		
67	32.05	67	67		Ilve left out	S67
70	29.16		70	29.28	30.13	D70
76	26.02		76	24.29		
79	26.83		79	NA		
80	32.78	80	80	NA		S80
81	39.95	81				E81
100	33.79	100	100	34.05		G100
103	30.30	103	103	30.30		K103
105	26.42		105	26.96		
107	41.06	107				K107
108	49.29	108				R108
109	41.85	109				A109

图 13A

muMy9-6 重链表面残基					
Kabat 位点 #	平均可及性	> 30% Ave 平均可及性	25%-35% 平均可及性	相同侧向	muMy9-6 表面
1	40.08	1			Q1
3	38.62	3			Q3
5	28.06		5	NA	
9	35.98	9			A9
11	48.07	11			V11
13	49.75	13			K13
14	32.39	14	14	32.20	P14
15	30.69	15	15	31.84	G15
17	26.01		17	26.67	
19	37.64	19			K19
23	29.92		23	30.11	K23
26	29.48		26	31.43	G26
28	33.67	28	28	35.59	T28
41	44.46	41			P41
42	46.28	42			G42
43	42.00	43			Q43
52B	25.21		52B	25.21	
53	28.84		53	28.84	
56	29.08		56	29.08	
61	43.12	61			Q61
62	44.46	62			K62
64	38.56	64			K64
65	41.85	65			G65
68	28.38		68	28.30	
70	25.14		70	28.21	
73	32.97	73	73	35.71	K73
74	47.68	74			S74
75	26.67		75	27.22	
82B	32.62	82B	82B	30.58	S82B
83	26.03		83	26.52	
84	35.34	84			S84
85	37.78	85			E85
105	36.29	105			A105
108	25.74		108	28.73	
110	26.94		110	23.38	
112	41.61	112			S112

图 13B

图 14
CDR 残基 5A
内的 My9-6 表面残基

轻链	重链
N1	Q1
M3	T28
T5	K64
K45	K73
G57	
D60	
S67	
D70	

图 15

顶端 5 个最同源的人抗体表面				
抗体	轻链	SEQ ID NO:	重链	SEQ ID NO:
muMy9-6	N M T S A K P G Q K G D S D S E G K K R A	84	Q Q A V K P G K G T P G Q Q K K G K S S E A S	90
21H9	D Q T S V R P G E K G S S D P E G K K R T	85	Q Q A V K P G K G T P G Q Q K K G T P S S E K S	91
EL-14	D V T S V R P G K K G S S D P E G K K R -	86	Q Q A A K P G K G T P G Q Q K Q G G S S E Q S	92
CLL-412	D Q T S V R P G K K G S S D P E Q K K R T	87	Q Q A V K P G K G T P G Q Q K Q G T S S S E Q S	93
LC3bPB	E V T G P R P G Q R G D S D P E Q K K R -	88	- Q A V K P G K G T P G Q Q K Q G K S S E Q S	94
CLL1.69	D V T L L P P G Q R G D A D A E Q K K R -	89	Q Q A V K P G K G T P G Q Q K Q G K S S E Q S	95

人源化 My9-6 轻链形式

Kabat #	10	20	27b	34	44
muMy9-6	<u>NIMLTQSPSS</u>	<u>LAVSAGEKVT</u>	<u>MSCKSSQSVF</u>	<u>FSSSQKNYLA</u>	<u>WYQQIPGQSP</u>
huMy9-6 V1.0	<u>EIVLTQSPGS</u>	<u>LAVSPGERVT</u>	<u>MSCKSSQSVF</u>	<u>FSSSQKNYLA</u>	<u>WYQQIPGQSP</u>
huMy9-6 V1.1	N.M.....				
huMy9-6 V1.2	N.M.....				
huMy9-6 V1.3	E.V.....				
huMy9-6 V1.4	N.M.....				
huMy9-6 V1.5	N.M.....				
huMy9-6 V1.6	E.V.....				
huMy9-6 V1.7	E.V.....				
huMy9-6 V1.8	E.M.....				
huMy9-6 V1.9	E.M.....				
huMy9-6 V1.10	E.M.....				
huMy9-6 V1.11	E.M.....				
huMy9-6 V1.12	N.V.....				
huMy9-6 V1.13	N.V.....				
huMy9-6 V1.14	N.V.....				
huMy9-6 V1.15	N.V.....				

Kabat #	54	64	74	84	94
muMy9-6	<u>KLIIYWASTR</u>	<u>ESGVPDRFTG</u>	<u>SGSGTDFTLT</u>	<u>ISSVQSEDLA</u>	<u>IYYCHQYLSS</u>
huMy9-6 V1.0	<u>RLIIYWASTR</u>	<u>ESGVPDRFTG</u>	<u>SGSGTDFTLT</u>	<u>ISSVQPEDLA</u>	<u>IYYCHQYLSS</u>
huMy9-6 V1.1	K.....				
huMy9-6 V1.2	K.....				
huMy9-6 V1.3	R.....				
huMy9-6 V1.4	R.....				
huMy9-6 V1.5	R.....				
huMy9-6 V1.6	K.....				
huMy9-6 V1.7	K.....				
huMy9-6 V1.8	R.....				
huMy9-6 V1.9	R.....				
huMy9-6 V1.10	K.....				
huMy9-6 V1.11	K.....				
huMy9-6 V1.12	R.....				
huMy9-6 V1.13	R.....				
huMy9-6 V1.14	K.....				
huMy9-6 V1.15	K.....				

Kabat #	108
muMy9-6	<u>RTFGGGTKLE</u> IKR (SEQ ID NO:8)
huMy9-6 V1.0	<u>RTFGQGTKLE</u> IKR (SEQ ID NO:10)
huMy9-6 V1.1	
huMy9-6 V1.2	
huMy9-6 V1.3	
huMy9-6 V1.4	
huMy9-6 V1.5	
huMy9-6 V1.6	
huMy9-6 V1.7	
huMy9-6 V1.8	
huMy9-6 V1.9	
huMy9-6 V1.10	
huMy9-6 V1.11	
huMy9-6 V1.12	
huMy9-6 V1.13	
huMy9-6 V1.14	
huMy9-6 V1.15	

图 16A

人源化 My9-6 重链形式

Kabat #	10	20	30	40	50
muMy9-6	QVQLQQPGAE	VVKPGASVKM	SCKASGYTFT	SYIHWIKQT	PGQGLEWVG
huMy9-6 V1.0	QVQLQQPGAE	VVKPGASVKM	SCKASGYTFT	SYIHWIKQT	PGQGLEWVG
huMy9-6 V1.1					
huMy9-6 V1.2					
huMy9-6 V1.3					
huMy9-6 V1.4					
huMy9-6 V1.5					
huMy9-6 V1.6					
huMy9-6 V1.7					
huMy9-6 V1.8					
huMy9-6 V1.9					
huMy9-6 V1.10					
huMy9-6 V1.11					
huMy9-6 V1.12					
huMy9-6 V1.13					
huMy9-6 V1.14					
huMy9-6 V1.15					

Kabat #	59	69	79	86	96
muMy9-6	IYPGNDDISY	NQKFKGKATL	TADKSSTTAY	MQLSSLTSED	SAVYYCAREV
huMy9-6 V1.0	IYPGNDDISY	NQKFGKATL	TADKSSTTAY	MQLSSLTSED	SAVYYCAREV
huMy9-6 V1.1		..K.....			
huMy9-6 V1.2		..Q.....			
huMy9-6 V1.3		..K.....			
huMy9-6 V1.4		..Q.....			
huMy9-6 V1.5		..K.....			
huMy9-6 V1.6		..Q.....			
huMy9-6 V1.7		..K.....			
huMy9-6 V1.8		..Q.....			
huMy9-6 V1.9		..K.....			
huMy9-6 V1.10		..Q.....			
huMy9-6 V1.11		..K.....			
huMy9-6 V1.12		..Q.....			
huMy9-6 V1.13		..K.....			
huMy9-6 V1.14		..Q.....			
huMy9-6 V1.15		..K.....			

Kabat #	105	112	
muMy9-6	RLRYFDVWGA	GTTVTVSS	(SEQ ID NO:7)
huMy9-6 V1.0	RLRYFDVWGQ	GTTVTVSS	(SEQ ID NO:9)
huMy9-6 V1.1			
huMy9-6 V1.2			
huMy9-6 V1.3			
huMy9-6 V1.4			
huMy9-6 V1.5			
huMy9-6 V1.6			
huMy9-6 V1.7			
huMy9-6 V1.8			
huMy9-6 V1.9			
huMy9-6 V1.10			
huMy9-6 V1.11			
huMy9-6 V1.12			
huMy9-6 V1.13			
huMy9-6 V1.14			
huMy9-6 V1.15			

图 16B

My9-6 K _D 值			
	膜上直接结合测定	膜上竞争结合测定	细胞上直接结合测定
	pM	pM	nM
鼠	51.34±8.74	173.64±39.29	1.10±0.13
V1.0	66.53±17.83	209.00±52.37	1.02±0.04
V1.1	83.57±13.82	279.50±152.03*	1.07±0.11*
V1.3	63.95±0.64*	203.05±153.83*	1.16±0.39*
V1.6	56.10±15.13*	216.50±70.00*	0.97±0.08*

图 17

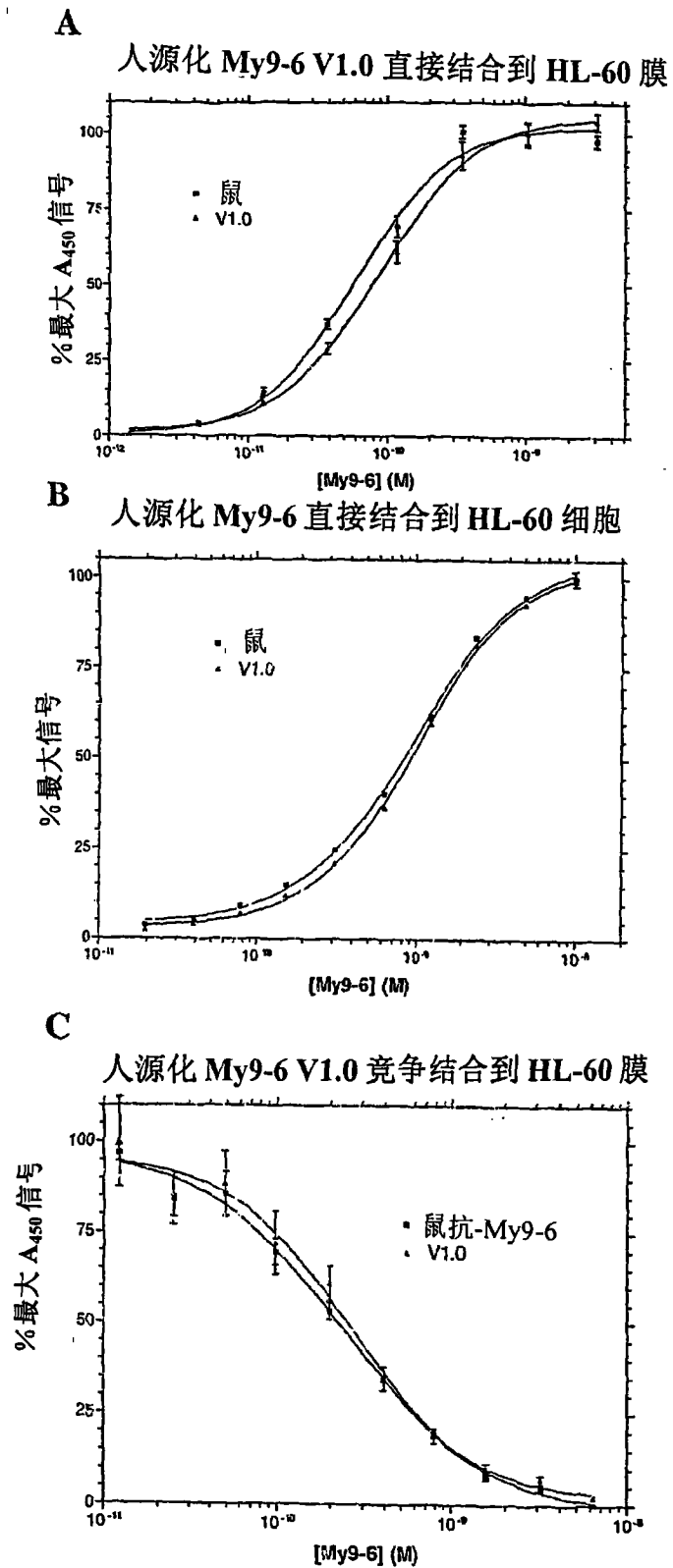


图 18

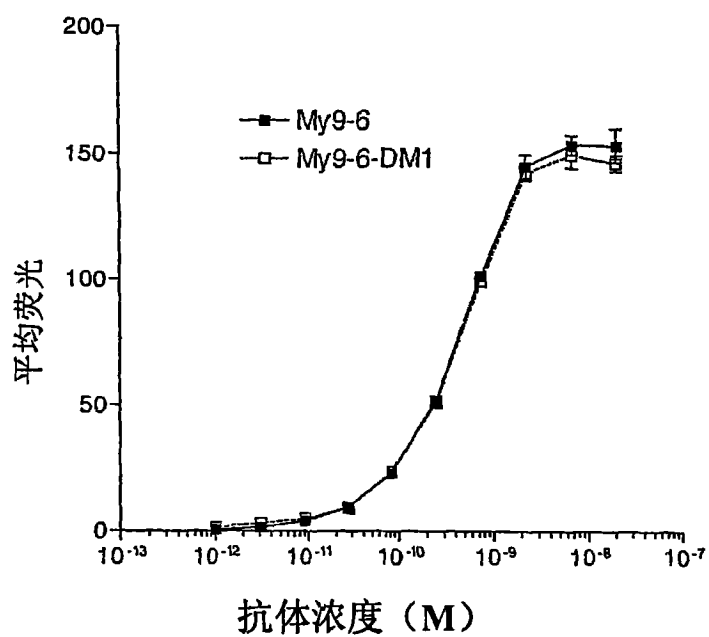


图 19

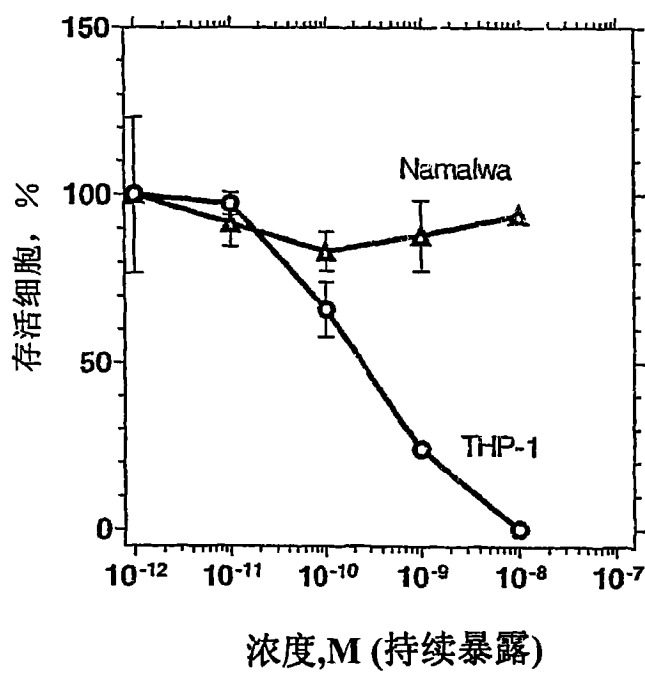


图 20

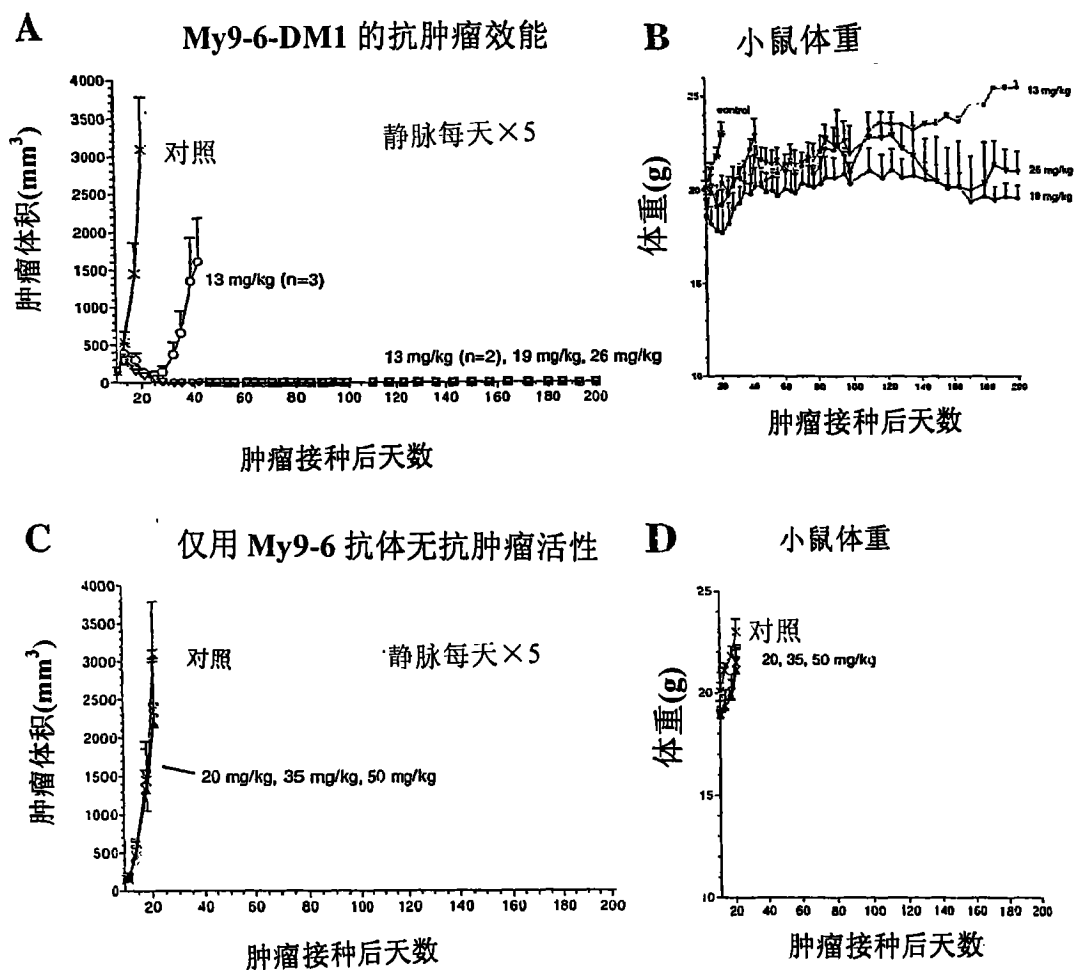


图 21

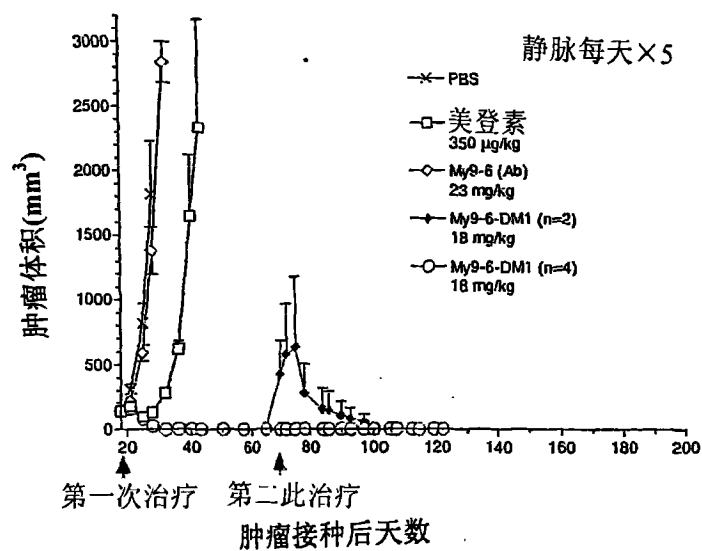
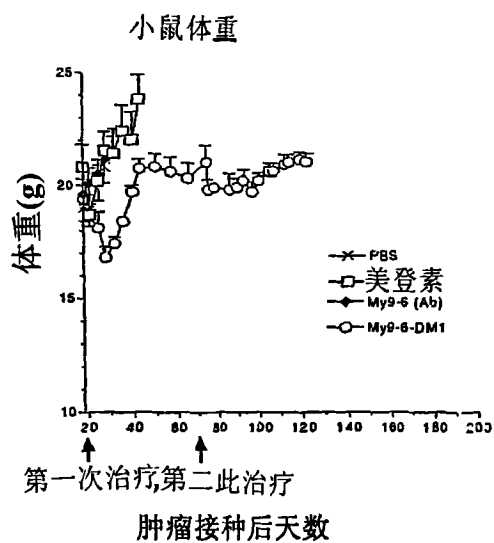
A**B**

图 22

大肿瘤模型

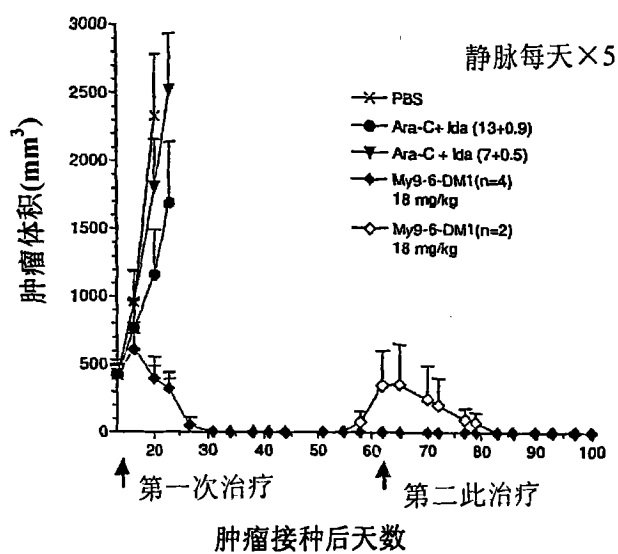


图 23A

小鼠体重

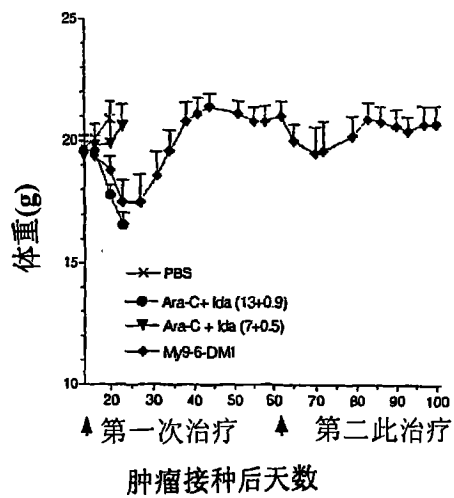


图 23B

图 24B

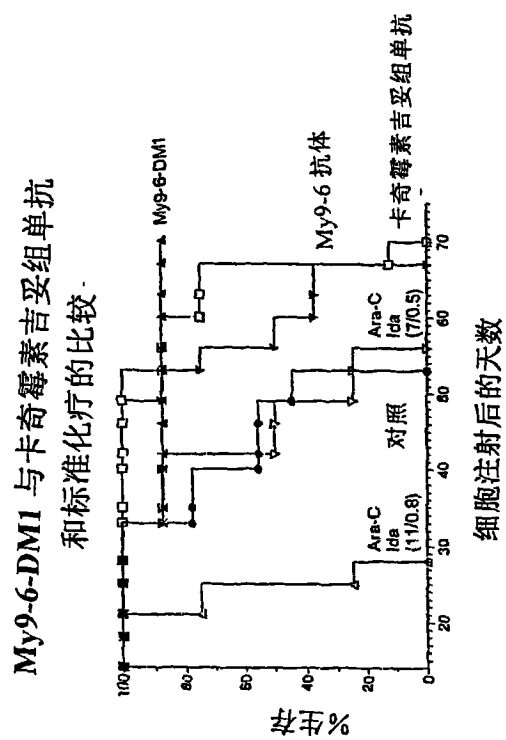


图 24A

