

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380109180.7

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 2 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 100369930C

[22] 申请日 2003.11.26

[21] 申请号 200380109180.7

[30] 优先权

[32] 2002.11.26 [33] US [31] 60/429,743

[86] 国际申请 PCT/US2003/038172 2003.11.26

[87] 国际公布 WO2004/056308 英 2004.7.8

[85] 进入国家阶段日期 2005.7.25

[73] 专利权人 PDL 生物制药股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 V·兰马克里斯南 D·鲍尔斯

D·E·约翰逊 U·杰弗里

[56] 参考文献

US4801687 1989.1.31

US4704366 1987.11.3

审查员 韩世炜

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 陶家蓉

权利要求书 3 页 说明书 60 页 附图 26 页

[54] 发明名称

调节血管生成的 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素的嵌合的和人源化的抗体

[57] 摘要

本发明提供了能特异性识别 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素的嵌合抗体和人源化抗体以及利用该抗体降低或抑制组织血管生成的方法。本发明还提供了确定抗体和含有抗体药物组合物的治疗可接受剂量的方法。

IIA1 V_H (SEQ ID NO: 1):
QVQLKESGPGLVAPSGSLSTCTISGRSLTDYGVHWVRQPGKLEWLVVTVSDGSSSTYNSALKSRMTI
KEDNBSQVFLDMSLQTDGAMTYCARHGTYYGMITTGDALDYWGQGTSLVTVSS

V_H 1.4 (SEQ ID NO: 2):
QVQLVESGPGLVQPGSLRISCAISGFSLTIDYGVHWVRQPGKLEWLVVTVSDGSSSTYNSALKSRMT
ISKDNSKSTVYLQMSLRAEDTAMFYCARHGTYYGMITTGDALDYWGQGTSLVTVSS

V_H 2.0 (SEQ ID NO: 3):
EVQLVESGGGLVQPGSLRISCAISGFSLTIDYGVHWVRQPGKLEWLVVTVSDGSSSTYNSALKSRMT
ISKDNSKSTVYLQMSLRAEDTAMFYCARHGTYYGMITTGDALDYWGQGTSLVTVSS

V_H 3.0 (SEQ ID NO: 4):
EVQLVESGGGLVQPGSLRISCAISGFSLTIDYGVHWVRQPGKLEWLVVTVSDGSSSTYNSALKSRMT
ISKDNSKSTVYLQMSLRAEDTAMFYCARHGTYYGMITTGDALDYWGQGTSLVTVSS

V_H 4.0 (SEQ ID NO: 5):
EVQLVESGGGLVQPGSLRISCAISGFSLTIDYGVHWVRQPGKLEWLVVTVSDGSSSTYNSALKSRMT
ISKDNSKSTVYLQMSLRAEDTAMFYCARHGTYYGMITTGDALDYWGQGTSLVTVSS

V_H 5.0 (SEQ ID NO: 6):
QVQLVESGGGLVQPGSLRISCAISGFSLTIDYGVHWVRQPGKLEWLVVTVSDGSSSTYNSALKSRMT
ISKDNSKSTVYLQMSLRAEDTAMFYCARHGTYYGMITTGDALDYWGQGTSLVTVSS

IIA1 V_L (SEQ ID NO: 7):
QVLTQSPDSASLTSGVSRVMTCTASSSVSSNYLHWYQKPKAPKLLWYISTNSLASGVPSRPSGSGSG
TSTSLTSSMEAEADATYYCHQYLSRPTFGQGTKEIKR

V_L 1.0 (SEQ ID NO: 8):
DIQLTQSPDSASLTSGVSRVMTCTASSSVSSNYLHWYQKPKAPKLLWYISTNSLASGVPSRPSGSGSG
TDYTLTSSMQEEDFATYYCHQYLSRPTFGQGTKEIKR

V_L 2.0 (SEQ ID NO: 9):
DIQLTQSPDSASLTSGVSRVMTCTASSSVSSNYLHWYQKPKAPKLLWYISTNSLASGVPSRPSGSGSG
TDYTLTSSMQEEDFATYYCHQYLSRPTFGQGTKEIKR

V_L 3.0 (SEQ ID NO: 10):
DIQLTQSPDSASLTSGVSRVMTCTASSSVSSNYLHWYQKPKAPKLLWYISTNSLASGVPSRPSGSGSG
TDYTLTSSMQEEDFATYYCHQYLSRPTFGQGTKEIKR

V_L 4.0 (SEQ ID NO: 11):
DIQLTQSPDSASLTSGVSRVMTCTASSSVSSNYLHWYQKPKAPKLLWYISTNSLASGVPSRPSGSGSG
TDYTLTSSMQEEDFATYYCHQYLSRPTFGQGTKEIKR

V_L 5.0 (SEQ ID NO: 12):
DIQLTQSPDSASLTSGVSRVMTCTASSSVSSNYLHWYQKPKAPKLLWYISTNSLASGVPSRPSGSGSG
TDYTLTSSMQEEDFATYYCHQYLSRPTFGQGTKEIKR

1. 一种嵌合的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体, 该抗体包含;
 - (a) 含有重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区含有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列, 所述轻链可变区含有 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列; 以及
 - (b) 含有第二来源的抗体的恒定区序列, 所述恒定区序列的第二来源是人 IgG。
2. 如权利要求 1 所述的抗体, 其特征在于, 所述恒定区序列的第二来源是人 IgG2 或人 IgG4。
3. 如权利要求 1 所述的抗体, 其特征在于, 所述恒定区序列的第二来源是人 IgG4。
4. 一种嵌合的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体, 该抗体;

含有重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区含有选自 SEQ ID NO:1、16 和 20 的氨基酸序列, 所述轻链可变区含有选自 SEQ ID NO:7、18 和 22 的氨基酸序列; 和

其中所述抗体抑制 VEGF 刺激的新生血管形成。
5. 如权利要求 4 所述的抗体, 其特征在于, 所述重链可变区含有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列, 所述轻链可变区含有 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列。
6. 如权利要求 4 所述的抗体, 其特征在于, 所述重链可变区含有 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列, 所述轻链可变区含有 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列。
7. 如权利要求 4 所述的抗体, 其特征在于, 所述重链可变区含有 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列, 所述轻链可变区含有 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列。
8. 一种抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体, 该抗体;

含有重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区含有选自 SEQ ID NO:25 和 28 的氨基酸序列, 所述轻链可变区含有 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列。
9. 如权利要求 8 所述的抗体, 其特征在于, 所述重链可变区含有 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列, 所述轻链可变区含有 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列。
10. 如权利要求 8 所述的抗体, 其特征在于, 所述重链可变区含有 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列, 所述轻链可变区含有 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列。
11. 一种人源化抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体, 该抗体;

含有重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区含有与 SEQ ID NO:1 的氨基

酸序列具有至少 75%相同性的氨基酸序列, 所述轻链可变区含有与 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列具有至少 75%相同性的氨基酸序列。

12. 如权利要求 11 所述的抗体, 其特征在于, 所述重链可变区含有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列, 所述轻链可变区含有 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列。

13. 如权利要求 11 所述的抗体, 其特征在于, 所述重链可变区含有 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列, 所述轻链可变区含有 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列。

14. 如权利要求 11 所述的抗体, 其特征在于, 所述重链可变区含有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列, 所述轻链可变区含有 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列。

15. 如权利要求 11 所述的抗体, 其特征在于, 所述重链可变区含有 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列, 所述轻链可变区含有 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列。

16. 如权利要求 11 所述的抗体, 其特征在于, 所述重链可变区含有 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列, 所述轻链可变区含有 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列。

17. 一种人源化抗- $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗体, 该抗体:

含有重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区含有 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列, 所述轻链可变区含有 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列。

18. 一种嵌合的、或人源化的抗- $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗体, 其特征在于, 所述抗体是多肽, 具有选自 SEQ ID NO:1-12、16、18、20、22、25-26、28、31-32 的氨基酸序列。

19. 一种药物组合物, 其中, 所述药物组合物含有权利要求 1-18 任一所述的抗- $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗体。

20. 权利要求 1-18 任一所述的抗体的用途, 其特征在于, 用于制备降低或抑制血管生成的药物。

21. 如权利要求 20 所述的用途, 其特征在于, 所述药物用于治疗与血管生成相关的眼病。

22. 如权利要求 21 所述的用途, 其特征在于, 所述眼病选自糖尿病性视网膜病变、黄斑变性、和眼组织血管化。

23. 权利要求 1-18 任一所述的抗体的用途, 其特征在于, 用于制备治疗生长因子相关的眼病的药物。

24. 如权利要求 23 所述的用途, 其特征在于, 所述眼病选自糖尿病性视网膜病变、黄斑变性、和眼组织血管化。

25. 如权利要求 24 所述的用途, 其特征在于, 所述生长因子是 VEGF。

26. 权利要求 1-18 任一所述的抗体的用途，其特征在于，用于制备治疗癌症的药物。

27. 如权利要求 25 所述的用途，其特征在于，所述癌症选自肺癌、乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌、胰腺癌、结肠癌和卵巢癌。

28. 权利要求 1-18 任一所述的抗体的用途，其特征在于，用于制备减少或抑制内皮细胞增殖的药物。

29. 权利要求 1-18 任一所述的抗体的用途，其特征在于，用于制备诱导增殖的内皮细胞死亡的药物。

30. 一种含有选自如下一组的一种或多种氨基酸序列的多肽：SEQ ID NOS: 1-12、16、18、20、22、25、26、28、31 和 32。

31. 编码权利要求 30 所述多肽的核酸。

32. 如权利要求 31 所述的核酸，其中，所述核酸选自：SEQ ID NO: 15、17、19、21、23、24、27、29 和 30。

33. 含有权利要求 31 或 32 所述的核酸的载体。

34. 含有权利要求 33 所述的载体的宿主细胞。

35. 一种纯化 pH 敏感型抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体的方法，该方法包括：

(a) 将权利要求 1-18 任一所述的抗体吸附到与底物结合的抗体亲和基质上；
以及

(b) 用 pH 约为 3.0-5.5 的洗脱液将抗体从与底物结合的抗体亲和基质上洗脱下来。

36. 如权利要求 35 所述的方法，该方法还包括步骤：

(c) 回收纯化的抗体。

37. 如权利要求 36 所述的方法，该方法还包括用碱性溶液中和含被洗脱抗体的洗脱液的步骤，其中所述中和溶液的 pH 约在 6.0 到 8.0 之间。

38. 如权利要求 35 所述的方法，其中，所述洗脱液的 pH 约为 3.3-5.5。

39. 如权利要求 35 所述的方法，其中，所述洗脱液的 pH 约为 3.5-5.5。

40. 如权利要求 35 所述的方法，其中，所述洗脱液的 pH 约为 3.5-4.2。

41. 如权利要求 35 所述的方法，其中，所述洗脱液的 pH 约为 4.2-5.5。

42. 如权利要求 35 所述的方法，其中，所述抗体亲和基质选择如下一组：多肽、多糖、脂肪酸、脂质、核酸适体、糖蛋白、脂蛋白、糖脂、多蛋白复合体、生物膜、病毒、蛋白 A、蛋白 G、凝集素和 Fc 受体。

调节血管生成的 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素的嵌合的和人源化的抗体

发明领域

本发明提供了能特异性识别 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素的嵌合的和人源化的抗体以及利用该抗体降低或抑制组织血管生成的方法。本发明还提供了确定抗体和含有抗体的药物组合物的治疗可接受剂量的方法。

发明背景

血管生成是一种新血管形成的过程。血管生成也被称为新生血管形成，它发生在正常的胚胎形成和发育过程中，完全发育的肌体在创伤愈合及胎盘发育时也会发生。另外，各种病理条件下也会产生血管生成，其中包括眼病如糖尿病型视网膜病和新生血管形成导致的黄斑变性；与组织炎症相关的疾病如类风湿性关节炎和炎性肠病；以及癌症，其中处于生长状态的肿瘤内血管形成可为肿瘤细胞提供氧和养分，通过新生的血管肿瘤细胞还可以转移到全身的其他部位。由于全球有数以百万计人受这些疾病的影响，因此人们付出了相当多的努力来研究参与血管生成的机制，以便于找到检测和抑制这种有害的血管生成的方法。

通过已知的一种或多种生长因子的刺激可以诱导血管生成，血管生成的发生还可能包括其他一些未知的因子。内皮细胞是覆盖在成熟血管内皮上的一层细胞，在正常情况下是不增殖的。但是，如果给予适当的刺激，内皮细胞会活化并且开始增殖，迁移到无血管的组织内形成新的血管。在某些情况下，前体细胞可被活化分化成内皮细胞，后者形成新血管。

血管被细胞外基质包裹。除了生长因子的刺激以外，血管生成还依赖于内皮细胞与细胞外基质之间的相互作用。生长因子活化内皮细胞、内皮细胞迁移到细胞外基质内以及内皮细胞与细胞外基质的相互作用依赖于内皮细胞所表达的细胞表面受。这些细胞表面受体，包括生长因子受体和整合素，可以和特定的分子发生特异性的相互作用。

在病理条件下，如老化相关的黄斑变性和糖尿病性视网膜病，视网膜获得氧的能力下降，因此导致组织缺氧，刺激血管生成生长因子如血管内皮细胞生长因子

(VEGF)分泌。这种分泌可诱导内皮细胞异常增生并迁移到眼组织内,导致眼组织血管化,诱导角膜瘢痕、视网膜脱落和脉络膜液体积聚,这些因素都可以不可逆地影响视力,导致失明。

血管生成还与炎症疾病的进展和恶化有关,其中包括干癣、类风湿关节炎、骨关节炎、炎性肠病如溃疡性结肠炎和节段性结肠炎。例如,在炎症性关节疾病中,淋巴细胞内流到关节周围的区域内,刺激关节滑膜内形成新的血管,这些新生的血管为白细胞的内流提供了通道,白细胞的内流促进了关节软骨和骨的损伤。炎性肠病中发生的新生血管形成在肠中所产生的效应是一样的。

毛细血管长入冠状动脉粥样硬化斑块内是与生长因子诱导的血管生成相关的一种病理情形。过量的血液流到新生血管形成的斑块内可导致含血斑块的破裂和出血,释出血凝块,最后导致冠状动脉血栓形成。

由于血管生成参与各种疾病的形成,如癌症、眼病和炎症疾病,因此人们试图找到特异性的方法来抑制血管生成,作为这些疾病的治疗方法。对于癌症患者来说,这种治疗方法与现有的治疗方法如化疗相比具有一些实质的优点,化疗方法不仅杀伤或损害肿瘤靶细胞,而且还会杀伤患者体内正常增殖的细胞,如血细胞、上皮细胞和肠腔内移行上皮细胞。化疗药物的这种非特异性杀伤作用会产生副作用,这种副作用至少是令人不舒服的,通常会导致无法接受的患病率或致死率。事实上,与癌症治疗相关的毒副作用通常会限制患者接受这种治疗。

发明概述

本发明提供了抗 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素的治疗性的嵌合的和人源化的抗体;提供了纯化这些抗体的方法以及使用这些抗体治疗包含不希望发生组织血管生成的症状的方法。

在一个实施方案中,本发明包括一种编码嵌合的或人源化的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体多肽的核酸,该多肽与选自如下一组的一种或多种氨基酸序列具有 65%、优选超过 75%、更优选超过 85%、90%、95%、97%或 99%的序列相同性: SEQ ID NOS: 1-12、16、18、20、22、25-26、28、31-32。更优选的是,核酸所编码的嵌合的或人源化的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体多肽含有选自如下一组的氨基酸序列 SEQ ID NOS: 2-6、8-12、16、18、20、22、25-26、28、31-32。这些核酸所编码的肽是单链抗体或 Fab,除了 Fab 或抗体外还含有被二硫键结合的几个肽。

本发明还包括与选自如下一组的一种或多种氨基酸序列具有 65%、优选超过

75%、更优选超过 85%、90%、95%、97%或 99%的序列相同性的多肽：SEQ ID NOS：1-12、16、18、20、22、25-26、28、31-32。更优选的是，核酸编码的多肽含有选自如下一组的一个或多个氨基酸序列：SEQ ID NOS：2-6、8-12、16、18、20、22、25-26、28、31-32。这些肽包括嵌合的、人的和人源化的抗体以及 Fab 片段。

在另一个实施方案中，本发明包括嵌合的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体。这些抗体包含第一来源的第一多肽和第二来源的第二多肽，其中的第一多肽与选自如下一组的氨基酸序列具有 65%、优选超过 75%、更优选超过 85%、90%、95%、97%或 99%的序列相同性：SEQ ID NOS：1、7、16、18、20、22，第二来源的第二多肽与第二来源的抗体的恒定区具有 65%、优选超过 75%、更优选超过 85%、90%、95%、97%或 99%的序列相同性，其中，第一多肽和第二多肽形成蛋白复合体与 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素发生免疫反应。在一个优选的实施方案中，恒定区的第二来源是人 IgG。在另一个优选的实施方案中，恒定区是人 IgG4。

在其他优选的实施方案中，嵌合抗体包含第一来源的第一多肽和第二来源的第二多肽，其中的第一多肽含有一种或多种选自如下一组的氨基酸序列：SEQ ID NOS：1、7、16、18、20、22，第二多肽含有第二来源的抗体的恒定区序列，第一多肽和第二多肽形成蛋白复合体与 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素发生免疫反应。

在一个最优选的实施方案中，本发明包括一种嵌合的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体，该抗体包含重链氨基酸序列 SEQ ID NO：25 和轻链氨基酸序列 SEQ ID NO：26。

在另一个实施方案中，本发明包括编码嵌合的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体重链可变区序列 SEQ ID NO：19 的核酸，以及编码嵌合的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体重链可变区序列 SEQ ID NO：21 的核酸。

在另一个实施方案中，本发明包括嵌合的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体的 Fab 片段，该片段包含重链氨基酸序列 SEQ ID NO：25 和轻链氨基酸序列 SEQ ID NO：26。在一个最优选的实施方案中，所述 Fab 片段包含重链氨基酸序列 SEQ ID NO：28 和轻链氨基酸序列 SEQ ID NO：26。

在另一个优选的实施方案中，本发明包括嵌合的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体来源的人源化抗体，该抗体包含重链氨基酸序列 SEQ ID NO：25 和轻链氨基酸序列 SEQ ID NO：26。在一个最优选的实施方案中，所述人源化抗体包含重链氨基酸序列 SEQ ID NO：28 和轻链氨基酸序列 SEQ ID NO：26。

在其他的实施方案中，本发明包括编码一种或多种选自如下一组的核酸的表达载体：SEQ ID NOS：15、17、19、21、23、24、27、29、30。在一个优选的实施方案

案中, 所述表达载体包含 SEQ ID NOS: 19 和 21。

在另一个实施方案中, 本发明包括被表达载体转化的细胞, 其中的表达载体包含一种或多种选自如下一组的核酸: SEQ ID NOS: 15、17、19、21、23、24、27、29、30。在一个优选实施方案中, 所述表达载体包含 SEQ ID NOS: 19 和 21。

在另一个实施方案中, 本发明包括含有本文所述嵌合的或人源化的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体的药物组合物。在某些实施方案中, 这些组合物可包含能促进治疗性成分的摄取或局域化、减轻炎症或提供局部症状缓解的药物。

在这个实施方案的一个方面, 所述药物组合物含有可直接用于损伤组织的局部乳膏。在另一方面, 所述药物组合物是可直接用于损伤眼内的滴眼液。再在另一个方面, 所述药物组合物是可以通过全身给药以治疗单眼或双眼组织损伤、或者抑制肿瘤组织内新生血管生成的注射剂。

在另一个实施方案中, 本发明包括控制损伤组织血管化的方法。这些方法包括将单次剂量或多次剂量的嵌合的或人源化的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体用到损伤组织, 其中, 对组织造成的损伤可能是物理损伤或化学损伤、或疾病的结果。

在另一个实施方案中, 本发明包括治疗性抗体的给药方法, 该方法包括: 提供一种包含治疗性抗体的药物, 其中的治疗性抗体含有重链可变区和轻链可变区, 该重链可变区含有选自如下一组的序列: SEQ ID NOS: 2-6、16、20, 轻链可变区独自选自如下一组: NOS: 8-12、18、22; 以及将治疗性抗体用到损伤组织内。在本发明的这个实施方案中, 损伤组织通过新生血管形成增加血液供应来对损伤作出反应, 而治疗性抗体可抑制这种新生血管形成。一方面, 该方法包括将治疗性抗体通过玻璃体内注射注射到双眼都受影响的患者的患病眼或损伤眼内; 或者通过玻璃体内注射注射到一只眼内以治疗双眼。

在其他的实施方案中, 本发明包括抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体的纯化方法。所述方法包括使抗体吸附到与底物结合的抗体亲和基质上, 利用 pH 约为 3.0 到 5.5 的洗脱液将抗体从与底物结合的抗体亲和基质上洗脱下来。该方法还包括回收纯化的抗体。可用这种方法进行纯化的抗体包括那些至少包含两个 CDR 区的抗体, 其中 CDR 区独立选自氨基酸序列 SEQ ID NOS: 1-12、16、18、20、22。优选的是所选择的 CDR 一个来自 V_L 链, 另一个来自 V_H 链。

在这种纯化方法的某些方面, 洗脱液的 pH 约为 3.3-5.5。在其它方面, 洗脱液的 pH 约为 3.5-5.5。再在其它方面, 洗脱液的 pH 约为 3.5-4.2。在进一步的方面中, 洗脱液的 pH 约为 4.2-5.5。

本发明的另一实施方案包括评价人源化抗- $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗体所调节的生理效应（如抗血管生成特性）的方法，其中的人源化抗体包括抗体及 Fab 片段。该方法包括提供能产生再生血管的活组织样本；在活组织内制造足以造成脉络膜新生血管形成的损伤；给予活组织单次或多次剂量的或人源化的抗- $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗体；以及监测给药后的活组织血管再生的情况。在优选的实施方案中，评价方法以眼组织作为活组织。在某些实施方案中使用眼的黄斑。评价方法所用的眼组织还可以是活的灵长类动物（如 cynomolgous monkey）的眼组织。

在另一个实施方案中，评价方法包括玻璃体内注射嵌合的或人源化的抗- $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗体。在本发明的一个方面，患者的两只眼睛都有损伤，将抗体注射到一只眼睛内就可以使抗体与两只眼内的损伤组织接触。

生理效应评价方法的另一方面包括使活组织与激光接触以产生损伤。这种激光的强度约为 300-700 毫瓦，照射时间不超过 0.1 秒，优选少于 0.05 秒，最优选约少于 0.01 秒。损伤直径应小于 200 μm ，优选小于 100 μm ，更优选在约 50 到 100 μm 之间，最优选的是直径约在 75 到 25 μm 之间。

该方法的某些方面包括监测步骤，包括在用单次或多次剂量的人源化抗- $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗体治疗损伤时定时拍照。另一方面，监测步骤还包括用检眼镜间接检查眼后房、生物显微镜检查眼的前段。在另外一方面，该方法包括一个监测步骤，包括静脉注射荧光素染料，然后通过荧光素血管造影术检查活组织。

嵌合的或人源化的抗- $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗体所调节的生理效应的评价方法也是本发明的一个方面，其中所述嵌合的或人源化的抗- $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗体含有重链可变区和轻链可变区，该重链可变区含有与选自如下一组的氨基酸序列具有 65%、优选超过 75%、更优选超过 85%、90%、95%、97%或 99%的序列相同性的序列：SEQ ID NOS: 1-6、16、20，轻链可变区单独选择并含有与选自如下一组的氨基酸序列具有 65%、优选超过 75%、更优选超过 85%、90%、95%、97%或 99%的序列相同性的序列：NOS: 8-12、18、22。最优选地，所述人源化的抗- $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗体含有重链可变区和轻链可变区，该重链可变区含有选自如下一组的序列：SEQ ID NOS: 1-6、16、20，轻链可变区独自选自如下一组：NOS: 8-12、18、22。

嵌合的或人源化的抗- $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗体所调节的生理效应的评价方法也是本发明的一个方面，其中所述嵌合的或人源化的抗- $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗体含有重链可变区和轻链可变区，该重链可变区含有选自如下一组的序列：SEQ ID NOS: 2-6、16、20，轻链可变区独自选自如下一组：NOS: 8-12、18、22。

附图简述

图 1 描述的是鼠抗 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体 (IIA1) 和 5 种鼠源的人源化抗体 (1.0-5.0) 重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L) 的氨基酸序列 (SEQ ID NOS: 1-12)。

图 2 描述的是氨基酸序列 (SEQ ID NOS: 1-12)，其中突出标记的部分代表 5 种人源化抗体序列相对于其鼠源抗体 (IIA1) 来说发生替代的氨基酸残基。

图 3 描述的是：(A) IIA1 V_H 的核酸序列 (SEQ ID NO: 13) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO: 46)；(B) IIA1 V_L 的核酸序列 (SEQ ID NO: 14) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO: 47)。

图 4 描述的是：(A) 抗体 200-4 V_H 的核酸序列 (SEQ ID NO: 15) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO: 16)；(B) 抗体 200-4 V_L 的核酸序列 (SEQ ID NO: 17) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO: 18)。

图 5 描述的是：(A) M200 V_H 的核酸序列 (SEQ ID NO: 19) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO: 20)；(B) M200 V_L 的核酸序列 (SEQ ID NO: 21) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO: 22)。

图 6 描述的是表达 M200 重链的质粒 p200-M-H 的结构。

图 7 描述的是表达 M200 轻链的质粒 p200-M-L 的结构。

图 8 描述的是表达 M200 重链和轻链的单一质粒 p200-M。

图 9 描述的是 M200 重链和轻链的完整 DNA 序列 (SEQ ID NOS: 23-24)。

图 10 描述的是 M200 重链和轻链的完整氨基酸序列 (SEQ ID NOS: 25-26)。

图 11 描述的是 F200 重链的完整 DNA 序列和完整氨基酸序列 (SEQ ID NOS: 27-28)。

图 12 描述的是 huM200 重链和轻链的完整 DNA 序列 (SEQ ID NOS: 29-30)。

图 13 描述的是 huM200 重链和轻链的完整氨基酸序列 (SEQ ID NOS: 31-32)。

图 14 描述的是 M200 作为潜在抑制剂对内皮细胞生长的抑制作用，包括抗-VEGF mAb、HuMV833 的抗增殖特性。

图 15 描述的结果显示 M200 可抑制 VEGF 诱导的细胞增殖，抗独特型单克隆抗体可抑制 M200 的活性。

图 16 描述的结果显示：(A) 通过膜联蛋白染色可观察到 M200 诱导的细胞死亡；(B) 通过流式细胞术定量检测膜联蛋白染色的细胞。

图 17 描述的结果显示 M200 可诱导处于增殖状态的 HUVEC 细胞死亡数量增加，而对衰老的 HUVEC 细胞死亡数量没有影响。

图 18 描述的是分析 F200 抑制血管生成的体外微管形成试验结果。

图 19 描述的是用 (A) 对照 (rituxan) 和 (B) M200 处理后第 20 天灵长类动

物眼内激光诱导损伤的荧光素造影术影像。

图 20 描述的是用 (A) 对照 (左眼) 和 (B) M200 (右眼) 处理后第 13 天灵长类动物左眼和右眼内激光诱导损伤的荧光素造影术影像。

图 21 描述的是用 (A) 对照 (左眼) 和 (B) M200 (右眼) 处理后第 20 天灵长类动物左眼和右眼内激光诱导损伤的荧光素造影术影像。

图 22 描述的是用 (A) 对照 (左眼) 和 (B) M200 (右眼) 处理后第 27 天灵长类动物左眼和右眼内激光诱导损伤的荧光素造影术影像。

图 23 描述的是用 (A) 对照 (左眼) 和 (B) F200 (右眼) 处理后第 13 天灵长类动物左眼和右眼内激光诱导损伤的荧光素造影术影像。

图 24 描述的是用 (A) 对照 (左眼) 和 (B) F200 (右眼) 处理后第 20 天灵长类动物左眼和右眼内激光诱导损伤的荧光素造影术影像。

图 25 描述的是用 (A) 对照 (左眼) 和 (B) F200 (右眼) 处理后第 27 天灵长类动物左眼和右眼内激光诱导损伤的荧光素造影术影像。

图 26 描述的是 ELISA 竞争结合试验的结果, 比较了鼠抗体 IIA1、嵌合抗体 M200 (200-4 EOS) 以及 M200 的两个人源化版本: huM200-G4 和 huM200-g2m3G 的结合活性。

发明详述

I. 定义

除非另外说明, 本文所用的所有科技术语的意义都与本发明所属技术领域的技术人员通常所理解的意义一致。下面的参考文献为技术人员提供了本发明所用的多个术语的通用定义: Singleton 等, 《微生物学和分子生物学词典》(*Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*) (第二版, 1994); 《剑桥科技词典》(*The Cambridge Dictionary of Science and Technology*) (Walker 编, 1988); 《遗传学词汇》(*The Glossary of Genetics*), 第 5 版, R. Rieger 等(编), Springer Verlag (1991); 以及 Hale & Marham, 《Harper Collins 生物学词典》(*The Harper Collins Dictionary of Biology*) (1991)。除非特殊说明, 本文所用的下列术语的意义与上述文献所描述的意义一致。

本文所用的术语“抗体”包括可与特定抗原发生免疫反应的免疫球蛋白分子, 即包括多克隆抗体, 也包括单克隆抗体。该术语还包括基因工程抗体如嵌合抗体(如人源化的鼠抗体)和异源共价抗体(如双特异性的抗体)。术语“抗体”还包括抗

体的抗原结合区,其中包括具有抗原结合功能的片段(如 Fab', F(ab')₂, Fab, Fv 和 rIgG)。参见《Pierce 目录和手册》,1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL)以及 Kuby, J., 《免疫学》(*Immunology*), 第3版, W.H. Freeman & Co., New York (1998)。该术语还指重组单链 Fv 片段(scFv)。术语“抗体”还包括二价的或双特异性的分子、双体、三体和四体。二价的和双特异性的分子描述于 Kostelny 等, (1992) *J Immunol* 148:1547, Pack 和 Pluckthun (1992) *Biochemistry* 31:1579, Hollinger 等, 1993, 同上, Gruber 等, (1994) *J Immunol*:5368, Zhu 等, (1997) *Protein Sci* 6:781, Hu 等, (1996) *Cancer Res.* 56:3055, Adams 等, 1993) *Cancer Res.* 53:4026 以及 McCartney 等, (1995) *Protein Eng.* 8:301。

能与特定抗原发生免疫反应的抗体可用重组方法制备,如筛选重组抗体噬菌体文库或类似的载体文库,见 Huse 等, *Science* 246:1275-1281 (1989); Ward 等, *Nature* 341:544-546 (1989); 以及 Vaughan 等, *Nature Biotech.* 14:309-314 (1996), 或者用抗原或编码抗原的 DNA 免疫动物。

一般来说,免疫球蛋白都含有重链和轻链。重链和轻链都有恒定区和可变区(区也被称为结构域)。轻链和重链可变区含有4个“骨架”区,被3个高变区隔开,高变区也被称为“互补决定区”或“CDR”。骨架区和 CDR 所包含的范围已有明确定义。不同轻链或重链的骨架区序列在同一物种内是相当保守的。抗体的骨架区,即轻链和重链的骨架区联合起来用于在三维空间上定位和排列 CDR。

CDR 主要负责结合抗原的表位。一条链上的 CDR 通常被分为 CDR1、CDR2 和 CDR3,从 N 端开始依次排列,通常也用链来定义特定 CDR 的定位。因此, V_H CDR3 是指定位在抗体重链的可变区上的 CDR,而 V_L CDR1 是指抗体轻链可变区来源的 CDR1。

“V_H”是指抗体免疫球蛋白重链的可变区,包括 Fv、scFv 或 Fab 的重链。“V_L”是指抗体免疫球蛋白轻链的可变区,包括 Fv、scFv、dsFv 或 Fab 的轻链。

术语“单链 Fv”或“scFv”是指传统双链抗体的重链可变区和轻链可变区结合形成一条链的抗体。一般来说,连接肽被插入到两条链中间以保证活性结合位点的正确折叠和形成

“嵌合抗体”是指(a)恒定区或其一部分被改变、替换或交换的免疫球蛋白分子,这样抗原结合位点(可变区)就与不同类的、功能和/或物种不同的、或者完全不同的分子,如酶、毒素、激素、生长因子、药物等的恒定区相连接,赋予嵌合抗体以新的特性;或者(b)可变区或其一部分被改变、替代或者与具有不同抗原特异性的可变区交换的免疫球蛋白分子。

“人源化抗体”是指含有极少的非人免疫球蛋白来源的序列的免疫球蛋白分子。人源化抗体包含人免疫球蛋白（受体抗体），其中受体的互补决定区（CDR）上的残基被具有所需特异性、亲和性和功能的非人物种如小鼠、大鼠或兔的 CDR（供体抗体）上的残基所取代。在某些情况下，人免疫球蛋白 Fv 骨架区上的残基被相应的非人动物免疫球蛋白的残基所取代。人源化抗体还包含即不存在于受体抗体上也不存在于供体 CDR 或骨架区序列上的残基。通常情况下，人源化抗体包含至少一个、通常是两个可变区的近乎全部序列，其中非人免疫球蛋白相应的 CDR 区的全部序列或近乎全部序列以及骨架区（FR）的全部序列或近乎全部序列是人免疫球蛋白共有序列的那些序列。人源化抗体还可以包含免疫球蛋白恒定区（Fc）的至少一部分序列，一般是人免疫球蛋白恒定区的序列（Jones 等, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann 等, *Nature* 332:323-329 (1988); 以及 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)）。人源化可采用 Winter 及其同事所描述的方法完成（Jones 等, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann 等, *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen 等, *Science* 239:1534-1536 (1988)），用人抗体的 CDR 或 CDR 序列来替代啮齿类动物的相应序列。因此，这种人源化抗体是嵌合抗体（美国专利 No. 4, 816, 567），其中完整的人源可变区中部分被非人物种的相应序列所替代。

“表位”或“抗原决定簇”是指抗体结合到抗原上的位点。表位可由发生三级折叠的蛋白质上的连续氨基酸或不连续氨基酸形成。连续氨基酸形成的表位用变性剂处理时通常可以保留，而通过三级折叠形成的表位在用变性剂处理时通常会消失。表位一般至少包括具有独特的空间构型的 3 个、更常见的是 5 个、或 8-10 个氨基酸。确定表位空间构型的方法包括 X 射线晶体衍射和二维核磁共振。见《分子生物学方法中的表位图谱指南》（*Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*），66 卷，Glenn E. Morris 编（1996）。

“pH 敏感型抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体”是指可特异性识别 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素的抗体，利用 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素作为配基在中性或碱性 pH 条件下进行免疫纯化时这种抗体可从溶液中沉淀出来。pH 敏感型抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体一般包含分别来自图 1 所描述的任何 V_H 或 V_L 序列的两个或多个 CDR 序列。

“血管生成”和“新生血管生成”是指新血管的形成，一般是对刺激、损伤或疾病作出的反应。为了说明本发明，术语“损伤”及其同类术语包括导致组织反应、包括血管生成的刺激、疾病或其他事件。血管生成还可能发生于肿瘤形成和转移过程中，以及高等动物的胚胎发育、生长和发育过程中。

术语“相同的”或百分“相同性”当用于比较两个或多个核酸序列或多肽序列时是指两个或多个序列或亚序列是一样的,或者其特定百分比的氨基酸残基或核苷酸是一样的(即,当比较和排列两个或多个序列以确定比较窗口或指定区域内的最大对应性时,特定区域上具有约60%的相同性,优选70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的相同性),相同性的确定可利用BLAST或BLAST 2.0序列比较算法,默认参数在下文描述,或者通过人工排列和肉眼检查(见NCBI网址<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>等)。这种序列就被认为是“基本相同的”。这个术语还指、或者还可用于定义检测序列的互补序列。这个术语还包括含有缺失和/或插入突变的序列、以及天然的多形性或等位基因突变株以及人工突变株。如下文所描述,好的算法可进行裂隙补偿等。存在相同性的一个区优选至少含有25个氨基酸或核苷酸,更优选的是50-100个氨基酸或核苷酸。

在进行序列比较时,一般以一个序列作为参照序列,需要检测的序列与之比较。利用序列比较算法进行序列比较时,将需要检测的序列与参照序列输入到计算机内,如果需要的话再设计匹配的亚序列,设定序列算法程序的参数。优选使用默认的程序参数,或者自定义参数。根据程序的参数,序列比较算法计算出检测序列相对于参照序列的序列百分相同性。

本文所用的术语“比较窗口”是指具有一定数目的连续位置的片段,一般约为20到600个,通常约为50到200个,更常见的是约100到150个,其中两个序列进行最佳排列以后将一个序列与参照序列上相同数目的连续位置进行比较。进行比较的序列排列方法是本领域所熟知的。序列比较时进行最佳排列可通过多种方法进行,如Smith & Waterman的局部同源性算法, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981); Needleman & Wunsch的同源性排列算法, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970); Pearson & Lipman的检索相似性的方法, *Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988); 以及这些算法的计算机程序化(Wisconsin Genetics 软件包内的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), 或者通过人工排列然后通过肉眼检查(见《现代分子生物手册》(*Current Protocols in Molecular Biology*))(Ausubel等编,1995增补))。

适于确定序列百分相同性和序列相似性的优选算法包括BLAST和BLAST 2.0算法,描述于Altschul等, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977)和Altschul等, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)中。利用本文所描述的参数,BLAST和BLAST 2.0

可用于确定本发明的核酸和蛋白的序列百分相同性。执行 BLAST 分析的软件可从国家生物技术信息中心免费下载 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。这个算法首先通过识别询问序列内长度为 W 的短字 (short word) 来确定高记分序列对 (HSP, high scoring sequence pair), 当与数据库序列内相同长度的字一起排列时它可匹配或满足某些正分值的阈记分 T 。 T 被称为相邻字记分阈 (Altschul 等, 同上)。这些起始的相邻目标字 (word hit) 作为种子开始检索以找到含有它们的较长的 HSP。目标字延每个序列向两个方向延伸直到累积排列记分增加为止。核苷酸序列的累积记分用参数 M (匹配残基对的奖励记分 (reward score); 总是 >0) 和 N (错配残基的罚分 (penalty score); 总是 <0) 计算。对于氨基酸序列来说, 记分矩阵 (scoring matrix) 用于计算累积记分。目标字 (word hit) 在每个方向上的延伸在下列情况下停止: 累积排列记分由于数值 X 从最大值开始下降时; 由于累积了一个或多个负记分残基排列而使累积记分达到 0 或 0 以下时; 或者到达序列末端时。BLAST 算法的参数 W 、 T 和 X 决定了排列的敏感性和速度。BLASTN 程序 (用于核酸序列) 所使用的默认参数字长 (W) 为 11, 期望值 (E) 为 10, $M=5$, $N=-4$, 比较两条链。对于氨基酸序列来说, BLASTP 程序的默认参数字长为 3, 期望值 (E) 为 10, BLOSUM62 记分矩阵 (见 Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)) 排列 (B) 为 50, 期望值 (E) 为 10, $M=5$, $N=-4$, 比较两条链。

BLAST 算法也可以进行两个序列之间相似性的统计分析 (见 Karlin 和 Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993))。BLAST 所提供的一种相似性算法是最小总和概率 (smallest sum probability) ($P(N)$), 它可以计算出两个核苷酸序列或氨基酸序列相匹配的可能性大小。例如, 如果检测核酸与参照核酸比较时所计算出的最小总和概率约小于 0.2、更优选的是约小于 0.01, 最优选的是约小于 0.001 时该核酸被认为与参照序列是相似的。对数值可以是较大的负数, 如 5、10、20、30、40、40、70、90、110、150、170 等。

两个核酸序列或多肽序列是基本相同的是指第一核酸编码的多肽可与抗第二核酸编码多肽的抗体发生交叉免疫反应, 如下文所描述。因此, 多肽通常与第二多肽基本相同, 如两个多肽仅仅通过保守替代才有所区别。两个核酸序列是基本相同的还指两个分子或其互补序列可在严格条件下彼此杂交, 如下文所描述。两个核酸序列基本相同的另外一个意思是两个序列可用相同的引物扩增。

术语“游离的”、“纯化的”或“生物纯”是指一种材料基本不含在天然状态下与其正常相伴随的成分。一般通过分析化学技术来确定纯度和均一性, 如聚丙烯

酰胺凝胶电泳或高压液相层析。制剂中作为主要成分存在的蛋白或核酸都是基本纯化的。从基因两侧的某些开放阅读框架中分离的游离核酸可编码蛋白质，而不是基因编码的蛋白质。术语“纯化的”在某些实施方案中是指核酸或蛋白在电泳凝胶中基本呈现一条带。这意味着核酸或蛋白至少具有 85% 的纯度，优选至少 95% 的纯度，最优选的是至少 99% 的纯度。“纯化”在某些实施方案中是指从要纯化的组合物中去除至少一种杂质。从这种意义上说，匀质的化合物，即纯度为 100% 的化合物是不需要纯化的。

术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在本文中可以互换，是指氨基酸残基的聚合物。这个术语可用于指一个或多个氨基酸残基是其相应的天然氨基酸的人工合成化学模拟物的氨基酸聚合物，也可用于指天然的氨基酸聚合物，那些含修饰残基的氨基酸聚合物以及非天然的氨基酸聚合物。

术语“氨基酸”是指天然的和合成的氨基酸，也指与天然氨基酸功能相似的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然氨基酸是指遗传密码子编码的氨基酸以及后来被修饰的那些氨基酸，如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然氨基酸一样的基本化学结构的化合物，如连接有羟基、羧基、氨基和 R 基的 α 碳原子，例如同型丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基磺(methionine methyl sulfonium)。这种类似物具有修饰 R 基团（如正亮氨酸）或经修饰的肽骨架，但是依然保留与天然氨基酸一样的基本化学结构。氨基酸模拟物是指化学结构与天然氨基酸不同但是功能与天然氨基酸相似的化合物。

在本文中，氨基酸可用大家所熟知的 IUPAC-IUB 生物活性命名委员会(Biochemical Nomenclature Commission)所推荐的三字母符号或单字母符号表示。而核苷酸可用大家都熟悉的单字母符号表示。

“保守修饰突变体”即可用于氨基酸序列，也可用于核酸序列。对于一个特定核酸序列来说，保守修饰突变体是指编码相同的或基本相同的氨基酸序列的那些核酸，或者其中的核酸不编码与天然连续序列基本相同或相关的氨基酸序列。由于遗传密码的简并性，可能有多种功能相同的核酸编码同种蛋白质。例如，密码子 GCA、GCC、GCG 和 GCU 都编码丙氨酸。因此，在编码丙氨酸的密码子位置上，该密码子可被用上述的其他密码子替代而不会改变其所编码的多肽。这种核酸突变被称为“沉默突变”，是一种保守的修饰突变。本文的每一种编码多肽的核酸序列也包括该核酸的沉默突变体。本领域的技术人员了解在某些情况下可以修饰核酸内的密码子（AUG 和 TGG 除外，因为 AUG 是编码蛋氨酸的唯一密码子，TGG 是编码色氨酸

的唯一密码子)以产生出一个功能相同的分子。相应的,编码多肽的核酸的沉默突变体只是用于描述与表达产物有关的序列而不是与实际探针序列有关的序列。

关于氨基酸序列,本领域的技术人员知道核酸、肽、多肽或蛋白上单个残基的替代、缺失或插入造成单个氨基或一小部分氨基酸的改变、添加或缺失也是一种保守的修饰突变体,其中的修饰导致了一种氨基酸被另一种化学特性相似的氨基酸所替代。产生功能相似的氨基酸保守替代的列表是本领域熟知的。这种保守的修饰突变体也包括在本发明的多形性突变体、种间同源物和等位基因之内,并且不排除本发明的多形性突变体、种间同源物和等位基因。典型的保守替代包括:1)丙氨酸(A),甘氨酸(G);2)天冬氨酸(D),谷氨酸(E);3)天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);4)精氨酸(R),赖氨酸(K);5)异亮氨酸(I),亮氨酸(L),蛋氨酸(M),缬氨酸(V);6)苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);7)丝氨酸(S),苏氨酸(T);以及8)半胱氨酸(C),蛋氨酸(M)(见 Creighton, *Proteins* (1984))。

“标记物”或“可检测基序”是可通过分光光度法、光化学法、生物化学法、免疫化学法、化学法以及其他物理方法检测的组合物。例如,可用的标记物包括荧光染料、电子致密试剂、酶(如 ELISA 中常用的酶)、生物素、洋地黄毒甙配基、肝素和蛋白或可用于检测的其他分子,如通过在肽内掺入放射性标记物,或者用于检测可与肽发生特异性反应的抗体。放射性同位素可以是 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 或 ^{125}I 。

在某些情况下,特别是用抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体时,放射性同位素可作为毒性基序加以使用,如下文所描述。标记物可插入到抗体内的任何位置。本领域已知的将抗体与标记物连接的任何方法都可以使用,包括下列文献所描述的方法: Hunter 等, *Nature*, 144:945 (1962); David 等, *Biochemistry*, 13:1014 (1974); Pain 等, *J. Immunol. Meth.*, 40:219 (1981); 以及 Nygren, J. *Histochem. and Cytochem.*, 30:407 (1982)。通过加入稳定放射性标记肽或抗体并避免其降解的物质可延长放射性标记肽或放射性标记抗体组合物的半衰期。任何能稳定放射性标记肽或抗体的物质及其混合物都可以使用,包括美国专利 No. 5,961,955 所描述的那些物质。

“抗体亲和基质”是指能优先结合抗体的任何材料。抗体亲和基质包括多肽、多糖、脂肪酸、脂质、核酸,包括适体,或这些物质的结合物(如糖蛋白、脂蛋白、糖脂)。在某些情况下,大分子如多蛋白复合物、生物膜或病毒可以作为抗体亲和基质材料。抗体亲和基质材料的其他例子有蛋白 A、蛋白 G、凝集素和 Fc 受体。

“蛋白 A”是指金黄色葡萄球菌产生的高度稳定的表面受体，能结合多种物种来源的免疫球蛋白，特别是 IgG 的 Fc 段(Boyle, M. D. P. 和 K. J. Reis. 细菌 Fc 受体, *Biotechnology* 5:697-703 (1987))。一个蛋白 A 分子至少可同时结合 2 分子的 IgG (Sjöquist, J., Meloun, B. 和 Hjelm, H., 《消化溶葡萄球菌素后从金黄色葡萄球菌中分离蛋白 A》(Protein A isolated from *Staphylococcus aureus* after digestion with lysostaphin), *Eur J Biochem* 29: 572 - 578 (1972))。

“蛋白 G”是指链球菌来源的与 IgG 具有高亲和力的细胞表面相关蛋白。它含有 3 个高度同源的 IgG 结合区(见 Lian 等, 1992. *Journal of Mol. Biol.* 228:1219-1234; Derrick 和 Wigley, 1994. *Journal of Mol. Biol.* 243:906-918)。

术语“重组”用于指细胞、核酸、蛋白或载体时是指经过修饰的细胞、核酸、蛋白或载体，如导入外源核酸或蛋白、改变天然的核酸或蛋白、或者经过修饰的细胞来源的细胞。因此，重组细胞可表达其天然细胞(非重组的)内不存在的基因，或异常表达、低表达或根本不表达天然基因。本文的术语“重组核酸”是指在体外形成的核酸，通常是通过核酸的改造，如利用聚合酶和内切核酸酶，形成一种在自然界中不存在的形式。通过这种方法，可将不同的核酸连接起来。因此线性的游离核酸或在体外将原本不相关的 DNA 连接起来形成的表达载体都被认为是为了本发明的目的而进行的重组。应当理解的是重组核酸一旦形成并且被从新导入到宿主细胞或宿主生物体内，它可以非重组的方式的复制，即它所利用的是宿主细胞内的机制而不是体外的操作模式。但是，这种核酸一旦通过重组而产生出来，虽然随后的复制是非重组方式的，但还是被认为是为了本发明的目的而进行的重组。同样，“重组蛋白”是指利用重组技术制备的蛋白，如通过上述重组核酸的表达。

术语“异源的”用于指核酸时是指该核酸至少含有两个或多个亚序列，正常情况下这些序列之间的关系在自然界中是不存在的。例如，核酸一般通过重组技术制备，即将不相关基因来源的两个或多个序列重新排列以形成一种具有新的功能的核酸，如启动子来自一个基因，而编码区来自于另一个基因。同样，异源蛋白也是指两个或多个亚序列，正常情况下这些序列之间的关系在自然界中是不存在的(如融合蛋白)。

“启动子”定义为可引导核酸转录的一段核酸控制序列。如本文所描述，启动子包含转录起始位点附近的必需核酸序列，如 II 型聚合酶启动子、TATA 元件。启动子还可以包含远端增强子或抑制子元件，这些元件与转录起始位点之间的距离最远可达到数千个碱基对。“组成性的”启动子是指在正常的环境和发育条件下有活

性的启动子。“诱导型”启动子是指在环境调节或发育调节的情况下活化的启动子。术语“操控连接的”启动子是指核酸表达调控序列（如启动子、转录因子结合位点）和第二核酸序列之间具有功能上的相关性，其中表达调控序列指导第二序列相应的核酸序列的转录。

“表达载体”是通过重组方法制备的或合成的核酸构建体，其中含有一系列特异性的核酸元件使特定的核酸能够在宿主细胞内转录。表达载体可以是质粒、病毒的一部分或核酸片段。一般来说，表达载体包含与启动子操控连接的可被转录的核酸。

术语“特异性（或选择性）结合”到抗体上或可与蛋白或肽发生“特异性（或选择性）免疫反应”是指决定一群异源蛋白和其他生物分子内存在该蛋白的结合反应。因此，在设定的免疫分析条件下，特异性抗体与特定蛋白序列的结合活性至少是背景的两倍，通常情况下超过背景 10 倍到 100 倍。

在这种条件下与抗体的特异性结合要求所选择的抗体对特定蛋白来说有特异性。例如，抗特定蛋白、多形性突变体、等位基因、直向同源物、保守修饰的突变体或剪接突变体或其一部分的抗体可选择那些只与 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素发生特异性免疫反应而不与其他蛋白发生特异性免疫反应的多克隆抗体。有许多免疫分析方法可用于筛选能与特定蛋白发生特异性免疫反应的抗体。例如，固相 ELISA 免疫分析常被用于筛选能与蛋白发生特异性免疫反应的抗体（见 Harlow & Lane, 《抗体，实验室手册》(Antibodies, A Laboratory Manual) (1988) 所描述的用于确定特异性免疫反应的免疫分析方法和试验条件）。

组织培养物中的“癌细胞”、“转化细胞”或“转化子”是指细胞自发的或被诱导发生表型改变从而不再需要摄取新的基因材料。虽然通过转化病毒转染并插入新的基因组 DNA、或者通过摄取外源 DNA 来达到转化的目的，但是转化也可能自发地发生，或者与致癌物接触从而内源性的基因发生突变而产生转化细胞。转化与表型的改变相关，如细胞的永生性、生长调控异常、非形态学上的改变和/或产生恶性表型（见 Freshney, 《动物细胞培养基础技术手册》(Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique) (第三版, 1994)）。

II. 介绍

本发明提供了比现有的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体特性更优越的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素人源化抗体和嵌合抗体。本发明还提供了含有新型抗体的药物组合物以及治疗由于血管生成而恶化的疾病和组织损伤的改进方法。

本发明的人源化抗体和嵌合抗体具有较长的半衰期，用于人体时抗原性比现有的抗体更弱。这些改进的地方在表2中用图表的形式进行了说明，其中包括改变了鼠抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素(IIA1)抗体的骨架区和恒定区使之人源化。

人源化抗体用于人体治疗时至少有三个优点。第一，它可以更好地和人的免疫系统相互作用，如通过补体依赖的细胞毒作用(CDC)或抗体依赖的细胞毒作用(ADCC)更有效地破坏靶细胞。第二，人的免疫系统不会将这些抗体识别为外源蛋白。第三，其在人体血液循环中的半衰期与人体内的天然抗体一样，因此可以减少用药剂量和用药次数。

从结构上说，人源化抗体一般含有人源的恒定区和骨架区(FR)以及动物抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体来源的互补决定区(CDR)。

从结构上说，嵌合抗体一般含有动物抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体来源的可变区和人源的恒定区。

从功能上说，嵌合的和人源化的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体都可以特异性地识别 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素，阻断 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素与其抗体的结合。

本文提供了多种制备人源化的和嵌合的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体的方法。“人源化”抗体一般都是小鼠、大鼠、仓鼠、兔或其他物种的抗体来源的嵌合的或突变的单克隆抗体，含有人源的恒定区和/或可变区或其他特殊的改变。制备“人源化的”和“嵌合的”抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体的方法是本领域技术人员所熟知的，见于本文所引用的参考文献和专利的描述。

III. 制备重组的嵌合的和人源化的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体及其Fab片段

本发明的抗体可以通过用 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素或其来源的肽免疫动物使其产生抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体而制备。然后分离表达抗体的淋巴组织，纯化编码抗 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体重链和轻链的核酸。然后通过重组方法处理纯化出的核酸(利用本领域熟知的方法)制备出编码能特异性识别 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素的嵌合的、人源化的、单链、Fab或Fab₂抗体的核酸。

然后用重组方法产生的核酸制备抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体分泌细胞。这些细胞产生的单克隆抗体可抑制或阻断 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素与其受体的结合，结果导致敏感组织内血管生成的抑制。

A. 抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体产生细胞和抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体编码核酸的制备

为了制备重组的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素嵌合抗体和人源化抗体，首先需要分离编码非人源抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体的核酸。通常用 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素或其来源的抗原肽免疫

动物如小鼠，小鼠一般要免疫两次，每只小鼠腹腔注射约 50mg 抗体蛋白。从免疫小鼠体内分离血清，通过免疫组织学或免疫细胞学方法在表达这种多肽的宿主系统内检测其抗体活性，或者用表达的多肽通过 ELISA 来分析其抗体活性。如果使用免疫组织学方法，则利用生物素标记的抗鼠免疫球蛋白、然后再加入亲和素-过氧化物酶和发色过氧化物酶底物来鉴定本发明的抗体活性。这种试剂都可以购买到，如从 Zymed Corp., San Francisco, Calif. 血清中可检测到本发明的抗体活性的小鼠在 3 日后处死，取其脾用于融合和杂交瘤制备。这种杂交瘤的阳性上清液可用本领域技术人员熟知的方法鉴定，例如蛋白印迹杂交技术。

然后以杂交瘤 mRNA 或脾细胞 mRNA 为模板通过 PCR 扩增重链和轻链基因来分离编码目的抗体链的核酸[Huse 等, Science 246:1276 (1989)]。利用这种方法可从鼠单克隆抗体杂交瘤内分离出编码抗体和胞内抗体的核酸[Richardson J. H. 等, Proc Natl Acad Sci USA 92:3137-3141(1995); Biocca S. 等, Biochem and Biophys Res Comm, 197:422-427(1993); Mhashilkar, A. M. 等, EMBO J 14:1542-1551 (1995)]。这些杂交瘤是用于构建抗体的已知试剂的可靠来源，如果知道了其表位反应性和亲和性，则特别适用。从游离细胞内分离核酸的方法在下列文献中有进一步的描述：Clackson, T. 等, Nature 352:624-628 (1991) (脾)和 Portolano, S. 等, 同上; Barbas, C. F. 等, 同上; Marks, J. D. 等, 同上; Barbas, C. F. 等, Proc Natl Acad Sci USA 88:. 7978-7982 (1991) (人外周血淋巴细胞)。

B. 制备重组抗体

人源化的非人源（如鼠）抗体是免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段（如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或抗体的其他抗原结合序列）的嵌合分子，其所包含的非人源免疫球蛋白序列很少。人源化抗体包含人源免疫球蛋白，其中受体互补决定区(CDR)上的残基被具有所需特异性、亲和性和功能的非人物种（供体抗体）如小鼠、大鼠或兔抗体 CDR 的残基所取代。在某些情况下，人源免疫球蛋白上的 Fv 骨架区残基被相应的非人源抗体的残基所取代。人源化抗体还包含一些即不存在于受体抗体上也不存在于供体 CDR 或骨架区序列上的残基。一般来说，人源化抗体包含至少一个可变区、通常是两个可变区的几乎全部序列，其中 CDR 区的全部或大部分序列与非人源免疫球蛋白的相应序列相对应，FR 区的全部或大部分序列与人源免疫球蛋白共有序列的相应序列相对应。人源化抗体还可以包含至少一部分免疫球蛋白、通常是人源免疫球蛋白的恒定区 (Fc) [Jones 等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann 等, Nature, 332:323-329 (1988); 以及 Presta, Curr. Op. Struct.

Biol., 2:593-596 (1992)]。

制备人源化抗体的方法是本领域所熟知的,在其他地方有详细描述。见 Queen 等,美国专利 Nos: 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 6,180,370 (本文都已完整纳入作为参考)。本领域所熟知的许多方法都可用于将抗体人源化,其中包括 CDR-嫁接(EP 239,400; PCT 专利,公开号为 WO 91/09967; 美国专利 Nos. 5,225,539; 5,530,101 和 5,585,089), 表面修饰或表面重塑(EP 592,106; EP 519,596; Padlan, Mol. Immunol., 28:489-498 (1991); Studnicka 等, Prot. Eng. 7:805-814 (1994); Roguska 等, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973 (1994), 以及链替换(美国专利 No. 5,565,332), 这些都已完整纳入本文作为参考。

现在已经有许多方法可用于制备重组嵌合抗体。例如,可以通过蛋白之间的二硫键将抗体的不同区连接起来使之重排形成嵌合抗体(Konieczny 等, Haematologia, 14(1):95-99, 1981)。利用重组 DNA 技术可以构建鼠抗体轻链可变区和重链可变区编码 DNA 序列与人抗体轻链恒定区和重链恒定区编码 DNA 序列的融合基因。见 Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81(21): 6851-6855, 1984; Morrison, Science 229:1202-1207 (1985); Oi 等, BioTechniques 4:214-221 (1986); Gillies 等, J. Immunol. Methods 125:191-202 (1989); 美国专利 Nos. 5,807,715; 4,816,567 和 4,816,397, 本文已完整纳入作为参考。

编码鼠单克隆抗体抗原结合区或互补决定区(CDR)的 DNA 序列可利用分子技术嫁接到编码人源抗体重链和轻链骨架区的 DNA 序列上(Jones 等, Nature, 321(6069):522-525, 1986; Riechmann 等, Nature, 332(6162):323-327, 1988)。所表达的重组产物被称为“重塑”抗体或人源化抗体,包含人源抗体轻链或重链的骨架区和鼠单克隆抗体的抗原识别区 CDR。

制备人源化抗体的其他方法见美国专利 No. 5,639,641 的描述,本文已纳入作为参考。该方法通过表面重塑技术制备出人源化的啮齿类动物抗体,由于该抗体的可变区上存在人源的表面序列,因此疗效得以提高。在这个方法中:(1)排列一组抗体重链和轻链可变区的位置使一组重链和轻链可变区骨架表面位于暴露位置上,其中所有可变区的排列位置至少有 98%是相同的;(2)一组重链和轻链可变区骨架表面暴露氨基酸残基定义为啮齿类动物抗体(或其片段)来源的;(3)鉴定出与一组啮齿类表面暴露氨基酸残基相同性最高的一组重链和轻链可变区骨架表面暴露氨基酸残基;(4)用步骤(3)所鉴定出的一组重链和轻链可变区骨架表面暴露氨基酸残基替换步骤(2)所定义的一组重链和轻链可变区骨架表露氨基酸残基,除了啮

齿类动物抗体互补决定区任何残基的任何原子 5 Å 之内的那些氨基酸残基；以及(5)制备具有结合特异性的人源化啮齿类动物抗体。

一种制备人源化抗体的类似方法描述于美国专利 Nos. 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089 和 5,530,101 中，本文都已纳入作为参考。这些方法包括制备具有一个或多个供体免疫球蛋白互补决定区（CDR）和其他可能的氨基酸以及受体人源免疫球蛋白骨架区的人源化免疫球蛋白。一般来说，每一条人源化免疫球蛋白链除了含有 CDR 外还含有供体免疫球蛋白骨架的氨基酸，这种骨架能与 CDR 相互作用影响其结合的亲和力，根据分子模型的预测，这样的—个或多个氨基酸非常接近供体免疫球蛋白的 CDR 或者位于约 3 Å 之内。利用美国专利 Nos. 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089 和 5,530,101 所描述的任何一个定位标准、这些标准的组合或者这些标准的全部可以设计出重链和轻链。当连接成一个完整抗体后，人源化的免疫球蛋白在人体内基本上是无抗体性的，但是和原始抗原的亲合性与供体免疫球蛋白是一样的。

制备人源化抗体的其他方法见于美国专利 Nos. 5,565,332 和 5,733,743 的描述，本文都已纳入作为参考。这种方法将人源化抗体的概念与噬菌体文库结合起来，噬菌体文库在本文中也有详细描述。从一般意义上说，该方法利用了抗体的抗原抗体或抗体群的抗原结合位点序列。因此，对于单个啮齿类动物抗体来说含有抗体的抗原结合位点部分序列的序列可以与人源抗体的不同序列结合形成完整的抗原结合位点。

利用这种方法形成的抗原结合位点与利用 CDR 方法制备的抗原结合位点是不同的，后者只有原始啮齿类动物抗体的一部分序列可能以同样的方式与抗原接触。所选择的人源序列可能在序列上与含有原始结合位点的抗原不同，并且可能以其他方式与其接触。但是，由于部分原始序列与抗原结合、抗原及其抗原结合位点的形状所产生的限制可能使人源序列与抗原的相同区或表位产生新的接触。因而这种方法也被称为“表位印迹筛选”（EIS）。

从动物抗体开始经过一种处理可筛选出具有部分人源抗体序列的抗体。这种抗体与人源抗体具有足够的序列相同性，可直接或改变几个关键残基后用于治疗。所选抗体内啮齿类动物成分与人源抗体在序列上的差异可以通过位点特异性突变单个残基或通过整个环的 CDR 嫁接将那些不同的残基用人源序列的残基替换，从而使这种差异缩小到最小。但是，具有完整人源序列的抗体也可以制备。因而 EIS 为我们提供了一种制备部分人源抗体或完整人源抗体的方法，这种抗体可结合与动物—

样的表位或部分人源抗体。在 EIS 中, 一组抗体片段展示在丝状噬菌体表面, 通过筛选能与抗原结合的噬菌体可找到编码具有抗原结合活性的片段的基因。

可用于本发明人源化抗体的其他制备方法见于美国专利 Nos. 5, 750, 078; 5, 502, 167; 5, 705, 154; 5, 770, 403; 5, 698, 417; 5, 693, 493; 5, 558, 864; 4, 935, 496 和 4, 816, 567 的描述, 本文都已纳入作为参考。

制备单链抗体的技术(美国专利 No. 4, 946, 778)也适于制备 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素的单链人源化抗体。

C. 表达重组的嵌合抗体或人源化抗体

所得到的抗体可通过一种或多种含抗体编码核酸的载体来表达。

编码抗体重链和轻链的核酸片段最好位于一个转录单位内, 在 IRES 序列的控制之下翻译每个编码核酸。载体内含有如 WO 93/64701 所描述的化学连接物, 这种连接物携带靶向性基序(如细胞表面受体的配基)和核酸结合基序(如多聚赖氨酸)、病毒载体(如 DNA 或 RNA 病毒载体), PCT/US 95/02140 (WO 95/22618)所描述的融合蛋白, 这种融合蛋白内含有靶基序(如靶细胞特异性的抗体)和核酸结合基序(如鱼精蛋白)、质粒、噬菌体等。载体可以是染色体的、非染色体的或合成的。

优选的载体包含病毒载体、融合蛋白和化学连接物。逆转录病毒载体包括 moloney 鼠白血病病毒。DNA 病毒载体是优选的。这些载体包括痘病毒载体如正痘病毒或禽痘病毒(avipox)载体, 疱疹病毒载体如 I 型单纯疱疹病毒(HSV)载体[Geller, A. I. 等, J. Neurochem, 64:487 (1995); Lim, F. 等, 《DNA 克隆: 哺乳动物系统》(DNA Cloning: Mammalian Systems), D. Glover 编, (Oxford Univ. Press, Oxford, England) (1995); Geller, A. I. 等, Proc Natl. Acad. Sci.: U. S. A. 90:7603 (1993); Geller, A. I. 等, Proc Natl. Acad. Sci USA 87:1149 (1990)], 腺病毒载体[LeGal LaSalle 等, Science, 259:988 (1993); Davidson 等, Nat. Genet 3:219 (1993); Yang 等, J. Virol. 69:2004 (1995)]和腺伴随病毒载体[Kaplitt, M. G. 等, Nat. Genet. 8:148 (1994)]。

痘病毒载体可将基因导入到细胞浆内。禽痘病毒载体转导只能产生核酸的短期表达。将核酸导入到神经细胞内时优选腺病毒载体、腺伴随病毒载体和单纯疱疹病毒(HSV)载体。腺病毒转导所产生的表达(约 2 个月)比腺伴随病毒(约 4 个月)短, 后者所产生的表达又比 HSV 载体短。选择何种载体要根据靶细胞和所要治疗的疾病而定。载体导入可利用标准的方法进行, 如感染、转染、转导或转化。基因转移模式的例子包括裸 DNA、CaPO₄ 沉淀、DEAE 右旋糖酐、电穿孔、原生质融合、

lipofecton、细胞显微注射和病毒载体。

载体还可以靶向到任何目的靶细胞内，如胶质瘤细胞内。例如，立体定位 (stereotaxic) 注射可用于将载体（如腺病毒、HSV）转移到预期的部位。另外，利用微型真空泵输注系统如 SynchroMed Infusion System 通过脑室内 (icv) 输注可将颗粒输注到脑室内。一种根据胀流的原理设计出的方法被称为对流，也被证明可有效地将大分子转移到脑的大片区域内，可用于将载体转移到靶细胞部位 (Bobo 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2076-2080 (1994); Morrison 等, Am. J. Physiol. 266:292-305 (1994))。其他可用的方法包括导管、静脉注射、胃肠外给药、腹腔注射和皮下注射、以及口服或已知的其他给药方式。

D. 重组抗体的分离和鉴定

本文所用的术语“抗体”包括多克隆抗体、亲和纯化的多克隆抗体、单克隆抗体和抗原结合片段如 $F(ab')_2$ 和 Fab 蛋白水解片段。另外还包括完整的基因工程抗体或其片段，如嵌合抗体、Fv 片段、单链抗体等，以及合成的抗原结合肽和多肽。非人源抗体通过将非人源 CDR 嫁接到人源骨架区和恒定区上，或者通过插入完整的非人源可变区（还可以通过替换暴露的残基用人样的表面覆盖它们，产生一个“表面修饰”抗体）使之人源化。在某些情况下，人源化抗体的人源可变区骨架区内含保留一些非人源的残基以增加抗体的正确结合能力。抗体经人源化改造后其生物半衰期可以延长，给于人体后产生不良免疫反应的能力下降。可用于本文的制备或筛选抗体的其他方法包括使淋巴细胞与 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素蛋白或肽在体外接触，筛选噬菌体抗体展示文库或类似载体文库（例如，通过使用固定的或标记的 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素蛋白或肽）。

E. 亲和纯化

抗体库或血清的亲和纯化为本领域的从业人员提供了一种更统一的试剂。利用抗体亲和基质制备亲和层析柱来富集抗体- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体的方法是本领域所熟知的，并且已经有商品化的产品 (AntibodyShop, c/o Statens Serum Institut, Artillerivej 5, Bldg. P2, DK-2300 Copenhagen S)。简言之，将抗体亲和基质连接到亲和支持物上（如 CNBR Sepharose (R), Pharmacia Biotech）。然后使含有抗体的混合物通过亲和基质使抗体与基质结合。然后利用本领域熟知的方法使结合的抗体释放出来，得到浓缩的抗体库。富集的抗体库再进行进一步的免疫学分析，其中的一些分析试验在本文中用实施例的方式进行了描述。虽然用于分离本发明抗体的抗体亲和基质并不是被设计成可特异性识别本发明抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体的

基质,但是这并没有限制亲和基质在纯化抗体中的应用,因为抗体是以重组蛋白的形式表达的,在表达系统中其天然性质是单克隆的。

分离的抗体- $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗体可用上述的竞争结合免疫分析试验与第二种蛋白进行比较, α 如 $5\beta 1$ 整合素的突变体。为了进行比较,两种蛋白所分析的浓度范围都很宽,其量需要能将抗血清与固定的蛋白的结合抑制 50%。如果第二种蛋白抑制 50%结合所需要的量低于 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抑制 50%结合所需要的量的 10 倍,那么第二种蛋白就被认为能够与 $\alpha 5\beta 1$ 整合素的抗体进行特异性结合。

F. pH-敏感型抗体的纯化

本发明的某些抗体在中性或碱性 pH 条件下进行亲和纯化时具有易于沉淀的特性。为了解决这一问题,本发明的另外一个方面提供了一种纯化 pH 敏感型抗体的方法,这些抗体包括含有图 1-5、10、11 和 13 所示的氨基酸序列的抗体和含鼠可变区或与鼠可变区具有 80%以上的序列相同性的嵌合抗体、或者与图 1-5 所示的抗体 CDR 具有 80%以上的序列相同性的嵌合抗体。该方法一般包括利用层析柱如离子交换层析柱进行抗体的亲和层析,层析柱内含有结合的抗体亲和基质,随后在 pH 约为 3.0 到 5.5、优选 3.3 到 5.5、最优选 3.5 到 4.2 或 4.2 到 5.5 的条件下洗脱抗体。这个范围内较低的 pH 条件更适合小规模纯化,而约 4.2 或更高的 pH 更适于大规模操作。在这个范围内进行纯化所获得的产物不会凝集或很少凝集,最好是基本上不发生凝集。

亲和层析是本领域熟知的一种分离或纯化物质如抗体或其他生物活性大分子的方法。亲和层析一般先将含抗体的溶液通过一个层析柱,层析柱内含有的一种或多种能与固定在层析柱内的抗体特异性结合的配基。这种组合可通过配基亲和反应将抗体从溶液提取出来。结合完成以后可通过洗脱柱子来回收抗体。

因此本发明的这一方面包括利用结合到底物上的抗体亲和基质纯化抗- $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗体的方法,其中改进的地方包括利用 pH 约为 3.0-5.5 的洗脱液将抗体从结合到底物上的抗体亲和基质上洗脱下来。

更特殊的是,本发明的这一方面包括纯化抗- $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗体的方法,该方法包括:(a)使抗体吸附到结合到底物上的抗体亲和基质上;以及(b)利用 pH 约为 3.0-5.5 的洗脱液将抗体从结合到底物上的抗体亲和基质上洗脱下来。在某些实施方案中,该方法还包括步骤(c):回收纯化的抗体。

但是,当抗体需要进一步纯化或处理时,在这点上就不一定需要特殊的回收步骤了。

纯化过程包括将抗体吸附到与底物结合的抗体亲和基质上。各种形式的抗体亲和基质都可以使用。只要抗体亲和基质具有结合需要纯化的抗体的能力。例如，天然来源的抗体亲和基质、利用重组 DNA 技术制备的抗体亲和基质、修饰形式的抗体亲和基质、保留与纯化抗体的结合能力的上述基质的片段都可以使用。可用作抗体亲和基质的常用材料包括多肽、多糖、脂肪酸、脂质、核酸适体、糖蛋白、脂蛋白、糖脂、多蛋白复合体、生物膜、病毒、蛋白 A、蛋白 G、凝集素和 Fc 受体等。

通过普通的相互作用（如非特异性的、离子键的、疏水的/亲水的相互作用）、特异性的相互作用（如抗原-抗体相互作用）或配基与固相物之间的共价键抗体亲和基质可以附加到固相物或支持物上。另外，可以将中间化合物或垫片连接到固相物上，然后抗体亲和基质通过与垫片连接而固定到固相物上。垫片本身可以是与游离抗体亲和基质有特异性亲和作用的配基（即第二配基）。

抗体亲和基质可以连接到各种底物或支持物上。一般来说，离子交换或偶联树脂（如 CNBr 活化的）可用于此目的。抗体还可以通过其他方法吸附到与底物结合的抗体亲和基质上。优选的是层析柱方法，其中的抗体利用适当的缓冲液吸附到层析柱上。常用的缓冲液和操作条件都是本领域熟知的。

利用常规的方法可以将抗体从与底物结合的抗体亲和基质上洗脱下来，如利用缓冲液将抗体从层析柱上洗脱下来。为了使沉淀达到最少，pH 敏感型抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体优选含 0.1 M 甘氨酸、pH 为 3.5 的缓冲液洗脱。为了使降解和/或变性降到最低，缓冲液的温度最好保持在 10°C 以下，优选 4°C 或 4°C 以下。基于同样的理由，抗体暴露于酸性 pH 环境下的时间也应该缩到最短。这可以通过在抗体洗脱液中加入预定量的碱性溶液来达到。这种碱性溶液优选缓冲液，更优选的是易挥发的碱性缓冲液、最优选的是氨水。

从与底物结合的抗体亲和基质上洗脱抗体的过程可通过本领域熟知的各种方法进行。例如，如果使用层析柱，则收集层析柱洗脱的组分，根据组分的吸光度来判断是否存在蛋白。如果纯化特异性已知的抗体，则可以通过免疫分析技术如放免分析（RIA）或酶联免疫分析（EIA）来测定从层析柱收集的组分内是否含有抗体。

本发明的纯化过程可在任何方便的温度下进行，只要这种温度不会造成被纯化抗体的实质降解或对抗体亲和基质与底物的结合造成决定性的影响。优选的温度是室温。如果需要，可以利用本领域熟知的各种方法来回收抗体亲和基质层析柱上洗脱下来的抗体。

亲和力检测

亲和力检测可使本领域的技术人员鉴定出能够特异性地识别 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素的一个或多个表位的抗体。如果发生下列情况则认为抗体的结合是特异性的：1) 其结合活性达到阈值水平，和/或 2) 抗体不与相关的多肽分子发生明显的交叉反应。首先，如果本文的抗体与 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素多肽、肽或表位的结合亲和力(K_a)达到 10^6 mol^{-1} 或更高、优选 10^7 mol^{-1} 或更高、更优选 10^8 mol^{-1} 或更高、最优选 10^9 mol^{-1} 或更高，则抗体的结合是特异性的。本领域的技术人员通过 Scatchard 分析(Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-72, 1949)或利用 BIAcore 通过表面等离子共振很容易地确定抗体的结合亲和力。

第二，抗体如果不与相关多肽发生明显的交叉反应则可以认为抗体的结合是特异性的。如果通过标准的蛋白印迹杂交分析(Ausubel 等，同上)只检测到 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素多肽而检测不到已知的相关多肽，则认为抗体不与相关的多肽分子发生明显的交叉反应。已知的相关多肽的例子有直向同源物、整合素蛋白家族成员同一物种来源的蛋白、图 1 所示的多肽、突变的 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素多肽等。另外，可以用抗体“筛选”已知的相关多肽以分离出一组可与 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素特异性结合的多肽。例如，将人 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素多肽的抗体吸附到粘附于可溶性基质的相关多肽上；人 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素多肽特异性的抗体在合适的缓冲条件下流过基质。这种筛选可以分离出与相关多肽无交叉反应性的多克隆和单克隆抗体(《抗体：实验室手册》(Antibodies: A Laboratory Manual), Harlow 和 Lane(编), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; 《现代免疫学操作手册》(Current Protocols in Immunology), Cooligan 等(编), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995)。特异性抗体的筛选和分离方法是本领域熟知的(见《基础免疫学》(Fundamental Immunology), Paul 编), Raven Press, 1993; Getzoff 等, Adv. in Immunol. 43: 1-98, 1988; 《单克隆抗体：原理与实践》(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Goding, J. W. (编), Academic Press Ltd., 1996, Benjamin 等, Ann. Rev. Immunol. 2: 67-101, 1984)。这种分析方法的典型例子包括：并行免疫电泳、放射性免疫分析、放射性免疫沉淀、酶联免疫吸附分析(ELISA)、点杂交或蛋白印迹分析、抑制性或竞争性分析以及夹心分析。免疫学方法和免疫分析方法的综述见《基础和临床免疫学》(Basic and Clinical Immunology), (Stites & Terr 编, 第 7 版, 1991)。

IV. 血管生成调节效应的检测方法

本发明提供了人源化抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体所产生的生理调节效应的评价方

法。作为一个阈值问题，这些方法可用于筛选含本发明抗体的组合物以确定安全有效的治疗剂量。在治疗过程中，这些方法中的某些方法适用于监测疾病的进展情况，以及调整给药剂量以达到最佳的临床疗效。

这些方法包括提供一种适于分析或治疗的活组织，即组织发生损伤时，包括无限增殖化时发生了不良的脉络膜新生血管形成事件，如果加以抑制或阻止将会改善患者的预后和/或有助于损伤组织的修复。适于治疗或研究的典型组织包括肿瘤和眼组织，特别是眼的黄斑变性。术语“肿瘤”在本文中的含义包括很广，是指任何新的病理性的组织增生。对于本发明来说，血管生成是肿瘤特征的一部分。肿瘤可能是良性的，如血管瘤、胶质瘤、畸胎瘤等，也可能是恶性的，如腺癌、肉瘤、胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤等。术语“肿瘤”一般用于指良性或恶性的肿瘤，而术语“癌”一般用于指恶性肿瘤，可以是转移癌，也可以是非转移癌。可用本发明的方法诊断的恶性肿瘤包括癌如肺癌、乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌、胰腺癌、结肠癌和卵巢癌，肉瘤如骨肉瘤和卡波西肉瘤，只要这种肿瘤至少有部分特征是与 $\alpha 5 \beta 1$ 表达相关的导致新生血管形成的血管生成。用于研究时，可通过本领域技术人员熟知的方法从易于获得的资源中将这些组织分离出来。

当利用活组织检测本发明抗体的治疗效果时，首先必须造成组织的损伤促进脉络膜新生血管形成。可通过任何适宜的方式造成组织的损伤，包括机械的、化学的或生物的方式。机械损伤的例子有切割、穿刺或钳夹。化学方式包括给予组织某种药物使其坏死、调亡或使其丢失细胞与细胞之间的接触。生物方式包括用感染因子如病毒、细菌或朊病毒处理。造成损伤的优选方法是利用激光。任何能导致组织损伤的激光都可以应用， CO_2 气体激光是一种优选的类型，最优选的类型是带有 IRIS Medical® 便携式裂隙灯转接器的 OcuLight GL (532 nm) 激光凝固器。其他能提供约 300 到 700 毫瓦激光的激光源也可以使用，激光所导致的损伤直径一般小于 200 μm ，优选小于 100 μm ，更优选的是直径在 50 到 100 μm 之间，最优选的是直径在约 75 到 25 μm 之间。一般来说，激光照射组织的时间在 1 秒以内，通常小于 0.5 秒，更优选的是小于 0.1 秒，最优选的是小于 0.05 秒。

本文所用的抗体是嵌合的或人源化的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体。这个抗体包含一个与选自如下一组的氨基酸序列具有 65%、优选超过 75%、更优选超过 85%、90%、95%、97% 或 99% 序列相同性的重链可变区：SEQ ID NOS.：1-6、16 和 20 和一个独立选择的与选自如下一组的氨基酸序列具有 65%、优选超过 75%、更优选超过 85%、

90%、95%、97%或99%序列相同性的轻链可变区：SEQ ID NOS. : 7-12、18 和 22。最优选的嵌合的或人源化的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体包含一个具有选自如下一组的序列的重链可变区 SEQ ID NOS. : 2-6、16、20、25、28 和 31 以及一个具有选自如下一组的序列的轻链可变区：SEQ ID NOS. : 8-12、18、22、26 和 32。

本发明的抗体可通过不同的途径给药，如静脉注射、口服或直接用于需治疗的区域，如直接注射到恶性肿瘤内；滴到发生病理改变的眼内；或者注射到关节滑膜内。

具体到单个个体，所需要的治疗性抗体的剂量要根据给药是为了诊断的目的还是治疗的目的而定。确定用于诊断或治疗的药物有效剂量的方法是本领域所熟知的，其中包括 I、II、III 期临床试验。利用本发明的方法

可以确定有效剂量，例如，确定给予受试个体的剂量，记录疾病的进展情况，作为评价新生血管形成抑制功能的指标。

给予患者的药物总剂量的可以是单次剂量，以丸药的形式或在一段相对较短的时间内输入到患者体内，或者利用分步给药方案在一段相对较长的时期内将多次剂量的药物给予患者。如上所述，本领域的技术人员应该知道使有效量的药物到达 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素表达相关的血管生成区所需要的药物的浓度要根据多种因素来确定，其中包括患者的年龄、一般健康状况、给药途径、给药次数以及药物的性质。根据这些因素，本领域的技术人员可以调整剂量以达到有效地干扰 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素与其配基相结合从而降低或抑制血管生成的目的。

监测疾病的临床进展是本发明的另外一个方面。可通过本领域熟知的适宜方法进行监测。优选的方法包括显微镜、核磁共振和 X 光。对于眼组织来说，可以通过间接检眼镜检查眼后房，生物显微镜检查眼前半段。一种优选的检查脉络膜新生血管形成范围的方法是静脉注射荧光染料，然后通过荧光素血管造影术检查活组织。

一种优选的筛选能有效抑制或预防新生血管形成的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体的方法造成动物视网膜的损伤，将抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体用到损伤部位，然后与对照组比较观察损伤组织内新生血管形成的情况。这种方法将在下面的实施例 6 中详细讨论。这些试验得出了令人惊奇的结果，发现将抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体用到一只眼睛内可以治疗双眼的损伤。说明损伤组织内新形成的血管是“易漏的”，在一只眼睛内滴入抗体就会进入血液系统，进而到达另一只眼睛内。不论用完整抗体或是 Fab 片段治疗都能得到这个结果。这些结果说明这是一种通过全身给予、如静脉注射给予本发明的治疗性抗- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素抗体来治疗眼损伤的新型方法。

V. 治疗性用途

本发明的另一个实施方案包括含本文所描述的治疗性抗体的药物组合物。这些组合物包含能增强治疗性成分摄取或局域化、降低炎症反应或提供药物在局部释放的因子。

可降低或抑制与 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素表达相关的血管生成的本发明的抗体或含抗体的药物组合物可用于治疗至少有部分特征是血管生成的任何病理状态。本领域的技术人员应该知道各种给药途径,其中包括口服给药或通过胃肠外途径给药,如静脉注射、肌肉注射、皮下注射、眼窝内给药、囊内给药、滑膜内给药、腹腔注射、池内给药、或者用皮肤贴或通过透真皮离子等渗作用经皮肤被动吸收或促进吸收。另外,抗体还可以通过注射、插管给药,使用栓剂、口服制剂或局部用制剂,后者的吸收是被动的,如直接使用含抗体或活性成分的软膏或粉末,粉末可通过鼻内喷雾或吸入给药。抗体还可以通过局部喷雾的方式给药,如果需要,在这种情况下组合物中的某一成分可以是适宜的推进剂。如果需要的话,药物组合物可以掺入到脂质体、微球或其他聚合基质中(Gregoriadis 《脂质体技术》(Liposome Technology),卷1 (CRC Press, Boca Raton, Fla. 1984), 本文已纳入作为参考)。脂质体是有磷脂或其他脂质组成的,是一种无毒的生理的可代谢的载体,其制备和使用方式都相当简单。

与 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素表达相关的血管生成可发生在局部,如糖尿病性视网膜病变患者的视网膜,也可能发生在全身,如类风湿关节炎或恶性转移瘤患者。由于发生血管生成的区域可能是局部,也可能是全身,因此本领域的技术人员应该根据这个因素来选自特定的给药途径和给药方法来使用本发明的治疗性抗体,这个因素至少也是需要考虑的因素之一。

例如,糖尿病性视网膜病变患者体内与 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素表达相关的血管生成区域局限在视网膜,这时药物就可以制备成便于滴眼的药物组合物制剂,可以直接滴到眼内。而对于转移瘤患者来说,含药物的药物组合物就应该制备成可静脉注射、口服或通过其他途径使药物分布到全身的制剂。因此,本发明的抗体可通过不同的途径给药,例如静脉注射、口服、或直接用到需治疗的部位,如直接注射到恶性肿瘤内;滴到产生病理改变的眼内;或者注射到关节滑膜内。

治疗性抗体应以有效量给药,这个有效量是指足以干扰 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素与其在体内的配基进行特异性结合的量。一般来说,药物拮抗剂的给药剂量约为每公斤体重 0.0001-100 mg,但是可以根据具体情况加以调整。根据上述临床有效性试验

的结果,技术人员应该能够确定不同疾病的有效剂量范围。当药物是局部使用时给药量可以作出相应的调整。

本发明抗体的优选给药方法是通过注射给药,真皮内注射、静脉注射或直接注射到受损关节或组织内。例如,视网膜组织发生损伤时,本发明的治疗性抗体可以通过玻璃体内注射进入到受损眼内。本发明一个令人惊奇的结果是治疗一只眼睛可在双眼内产生有益的临床效果(假定双眼都受损)。新形成的血管好像是“易漏的”,用到第一只眼睛内的抗体可以进入血流然后到达第二只眼睛内。当以这种方式治疗眼病时,剂量优选低于 $5\mu\text{M}$,更优选的是在 0.5 到 $2\mu\text{M}$ 之间,最优选的是在 0.1 到 $1.0\mu\text{M}$ 之间。如上所示,治疗可采取多剂量的形式,在一段时间内用于一个区域。多剂量给药方案中每次的剂量可以是相同的,也可以单独确定和使用。这个结果也说明治疗与新生血管形成相关的损伤还可以采用其他方法全身给予有效量的治疗性抗体(如通过静脉注射),其中损伤组织内发生的新生血管形成被抑制或被阻止

本说明书所引用的所用文献和专利申请都已纳入本文作为参考,这就如同已将各个出版物或专利申请单独列入本文作为参考一样。

虽然前面已经以说明和举例的方式详细地描述了本发明以便于清楚地理解本发明,但是本领域的技术人员根据本发明的指导原则,在不偏离所附权利要求的精神和范围的情况下,可以对本发明作出某些改变和修改。

实施例

从上面所描述的内容来看本发明的应用范围很宽。因此,下面的实施例是为了说明的目的而提供的,并不意味着以任何方式对本发明作出限制。本领域的技术人员很容易认识到许多非标准的参数加以改变以后也能产生基本相似的结果。

实施例 1 - 从鼠 IIA1 抗- $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗体开始构建 M200 嵌合抗体

本实施例描述了嵌合抗体 M200 的构建过程。

IIA1 以及 200-4 VH 和 VL 区的起始 DNA 序列

从 IIA1 杂交瘤 cDNA 中克隆出鼠抗人 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗体 IIA1 (Pharminogen, San Diego CA) 的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)序列,测序后作为 200-4 抗体起始构建物的一部分。图 3 显示的是 IIA1 V_H (SEQ ID NO: 13)和 V_L (SEQ ID NO: 14)区的 cDNA 序列。在构建 IIA1 来源的 200-4 鼠/人嵌合 IgG4 抗体的过程中,将沉默的 XhoI 限制性酶切位点(CTCGAG)(SEQ ID NO: 33)引入到 IIA1 V_H 和 V_L 的骨架 4 区。

含有这些沉默 XhoI 位点的 200-4 V_H (SEQ ID NO: 15) 和 V_L (SEQ ID NO: 17) DNA 序列见于表达构建体 DEF38 IIA1/人 G4 嵌合体和 NEF5 IIA1/K 嵌合体内, 如图 4 所示。这些 200-4 V_H 和 V_L 序列用作随后的所有重组 DNA 操作的起始序列。

M200 V_H 和 V_L 小外显子的设计

表达质粒 DEF38 IIA1/人 G4 嵌合体和 NEF5 IIA1/K 嵌合体内的 200-4 V_H 和 V_L 区是通过沉默的 XhoI 位点直接连接到其临近的恒定区上, 中间没有内含子。为了使这些可变区与基因组 DNA 来源的抗体表达载体相容, 需要设计能在可变区 3' 端再产生功能性供体剪接位点的“小外显子”。通过序列比较发现 IIA1 的 V_H 和 V_L 区分别利用了鼠的 JH4 和 JK1 区段; 因此小外显子被设计成可在 V_H 和 V_L 区的最后一个氨基酸之后再添加一个天然鼠 JH4 和 JK1 供体剪接位点。另外, XhoI 位点被去除, 恢复了原始 IIA1 杂交瘤中所见的骨架 4 序列。小外显子两侧的限制性酶切位点如下: V_H 小外显子的 5' 和 3' XbaI 位点 (TCTAGA) (SEQ ID NO: 34), V_L 小外显子的 5' MluI (ACGCGT) (SEQ ID NO: 35) 和 3' XbaI (TCTAGA) (SEQ ID NO: 34)。

重组的抗体可变区内偶尔也会含有不需要的其他 mRNA 剪接位点, 这些剪接位点会造成产生其他形式的剪接 mRNA。从理论上讲, 这种位点存在于鼠的可变区内, 但是只有在异源表达细胞内和/或存在嵌合恒定区来源的新受体位点时才会活化。利用密码子的简并性去掉潜在的多余剪接位点但是维持编码氨基酸序列不改变就可以去掉这些不需要的多余剪接位点。为了检测 M200 V_H 和 V_L 小外显子内任何又活性的多余剪接位点, 要用丹麦技术大学生物序列分析中心的剪接位点预测程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) 分析开始设计的序列。已经确定了两个 200-M 小外显子内的正确供体剪接位点; 但是, 也在 CDR3 的 V_H 小外显子和 CDR1 的 V_L 小外显子上检测出了潜在的其他供体剪接位点。为了消除这些剪接位点被使用的可能性, 在小外显子内加入单碱基对的沉默突变。在设计 V_H 时, 在缬氨酸 29 上将沉默密码子 GGT 突变成 GGA; 在设计 V_L 时, 在甘氨酸 100 (Kabat 编号法) 上将沉默密码子 GTA 突变成 GTC。这两种沉默突变都可以消除 V 基因上潜在的次级剪接供体信号。

图 5 显示的是最后设计出的 M200 V_H 和 V_L 小外显子 (SEQ ID NOS: 19, 21), 包含两侧的限制性酶切位点, 鼠的供体剪接位点, 200-4 XhoI 位点和潜在的其他供体剪接位点被去除。

M200 V_H 小外显子和质粒 p200-M-H 的构建

图 5A 所示的 M200 V_H 的小外显子是以 200-4 表达质粒 DEF38 IIA1/人 G4 嵌合

体为起始序列通过 PCR 诱变技术而构建的。简言之，利用引物#110 (5' - TTTTCTAGACCACCATGGCTGTCCTGGGGCTGCTT-3') (SEQ ID NO: 36)和#104 (5' - TTTTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTGACTGAGGT-3') (SEQ ID NO: 37) 从 DEF38 IIA1/人 G4 嵌合体中扩增 200-4 V_H 区，引物#110 与 200-4 V_H 信号序列的 5' 端互补，携带 Kozak 序列和一个 XbaI 位点，引物#104 与 200-4 V_H 的 3' 端互补，携带一个 XbaI 位点。将 469 bp 的 PCR 片段克隆到 pCR4Blunt-TOPO 载体 (Invitrogen) 内，通过 DNA 测序确定形成了质粒 p200M-VH-2.1。然后对这个中间质粒进行二次 PCR 诱变以去除 CDR3 上潜在的异常剪接位点，并在 V_H 编码区的 3' 末端加上一个鼠 JH4 供体剪接位点。两个互补的引物#111 (5' - TGGAATTACTACGGAATGACTACGACGGG - 3') (SEQ ID NO: 38)和#112 (5' - CCCCCTCGTAGTCATTCCGTAGTAAGTTCCA - 3') (SEQ ID NO: 39) 用于将 M200 V_H CDR3 上甘氨酸 100 (Kabat 编号方法) 的密码子由 GGT 突变成 GGA。引物#110 和#112 用于通过 PCR 反应扩增 M200 VH 小外显子 5' 端的一个 395bp 的片段，利用引物#111 和#113 (5' - TTTTCTAGAGGCCATTCTTACCTGAGGAGACGGTGACTGAGGT - 3') (SEQ ID NO: 40) 进行的 PCR 反应可扩增出 VH 小外显子 3' 端的一个 101bp 的片段。用 1.5% 的低熔点琼脂糖凝胶电泳纯化两个 PCR 产物，混合后进行最后一步 PCR 反应，所用引物为#110 和#113。纯化出最后一步 PCR 反应所得到的 465 bp 的产物，用 XbaI 消化后克隆到用 XbaI 和虾碱性磷酸酶处理的载体 pHuHCg4.D 内。最后所得到的质粒 p200-M-H (图 6) 经过 DNA 测序以保证两个 XbaI 位点之间的 200-M V_H 小外显子序列的正确性以及 XbaI-XbaI 插入片段方向的正确性。

M200 V_L 小外显子和质粒 p200-M-L 的构建

图 5B 所示的 M200 V_L 的小外显子是以 200-4 表达质粒 NEF5 IIA1/K 为起始序列通过 PCR 诱变技术而构建的。利用引物#101 (5' - TTTACGCGTCCACCATGGATTTTCAGGTGCAGATT-3') (SEQ ID NO: 41)和#102 (5' - TTTTCTAGATTAGGAAAGTGCACCTTACGTTTGATTTCAGCTTGGTGCC-3') (SEQ ID NO: 42) 从质粒 NEF5 IIA1/K 中扩增 200-4 V_L 区，引物#101 与信号序列的 5' 端互补，携带 Kozak 序列和一个 MluI 位点，引物#102 与 200-4 V_L 的 3' 端互补，携带一个 XbaI 位点。将 432 bp 的 PCR 片段克隆到 pCR4Blunt-TOPO 载体 (Invitrogen) 内，通过 DNA 测序确定形成了质粒 p200M-VL-3.3。然后对这个中间质粒进行二次 PCR 诱变以去除 CDR1 上潜在的异常剪接位点，并在 V_L 编码区的 3' 末端加上一个鼠 JK1 供体剪接位点。两个互补的引物#114 (5' - TGCCAGTTCAAGTGTGAGTTCCAATTACTTG - 3')

(SEQ ID NO: 43)和#115(5' - CAAGTAATTGGAAGTGAAGTGAAGTGGCA - 3') (SEQ ID NO: 44)用于将 V_L CDR1 上缬氨酸 29 (Kabat 编号方法) 的密码子由 GTC 突变成 GTA。引物#110 和#112 用于通过 PCR 反应扩增 M200 V_H 小外显子 5' 端的一个 395bp 的片段, 利用引物#114 和#116(5' -TTTCTAGACTTTGGATTCTACTTACGTTTGATTTCAGCTTGGTGCC-3') (SEQ ID NO: 45)进行的 PCR 反应可扩增出 V_L 小外显子 3' 端的一个 280bp 的片段。用 1.5%的低熔点琼脂糖凝胶电泳纯化两个 PCR 产物, 混合后进行最后一步 PCR 反应, 所用引物为#101 和#116。纯化出最后一步 PCR 反应所得到的 431 bp 的产物, 用 MluI 和 XbaI 消化后克隆到用 MluI 和 XbaI 消化的轻链表达载体 pHuCkappa. rgpt. dE 内。最后所得到的质粒 p200-M-L (图 7)经过 DNA 测序以保证 MluI 和 XbaI 位点之间的 V_L 小外显子序列的正确性。

利用质粒 p200-M-H 和 p200-M-L 构建出最终的表达质粒 p200-M

为了构建表达 M200 的单一质粒, 用 EcoRI 消化 p200-M-H 和 p200-M-L, 将携带来自 p200-M-H 的完整 IgG4 重链基因的 EcoRI 片段连接到 EcoRI-线性化的 p200-M-L 上形成质粒 p200-M (图 8)。利用 Endotoxin-Free Plasmid Maxi-prep Kit (Qiagen) 从 2.5 升大肠杆菌培养物中大规模制备无内毒素的质粒 p200-M。通过限制性内切酶 BamHI、XbaI 和 FspI 的限制性酶切图谱来确证质粒结构的正确性。通过 DNA 测序确定 M200 V_H、V_L、C_H 和 C_L 4 完整编码区的正确性。M200 重链 (SEQ ID NO: 23) 和 M200 轻链 (SEQ ID NO: 24) 的全长 DNA 序列显示在图 9 中。M200 重链 (SEQ ID NO: 25) 和 M200 轻链 (SEQ ID NO: 26) 相应的氨基酸序列显示在图 10 中。

实施例 2 - 从 M200 中制备 Fab 片段 F200

本实施例描述了制备 Fab 片段 F200 的过程。

通过酶消化方法从 M200 IgG 起始材料中制备 Fab 片段。起始 IgG 缓冲交换到含 20 mM 磷酸钠、20 mM N-乙酰半胱氨酸、pH 7.0 的溶液中。加入可溶性的木瓜蛋白酶, 混合物在 37°C 旋转震荡 4 小时。混合物消化以后通过一个蛋白 A 层析柱以去除 Fc 片段和未消化的 IgG。加入 10 mM 的连四硫酸钠, 在室温下孵育 20 分钟。最后将得到的溶液缓冲交换到含 20 mM 磷酸钠、100 mM 氯化钠、pH 7.4 的溶液中得到 F200 溶液。

由于是 Fab 片段, 因此 F200 轻链的 DNA 序列和氨基酸序列与 M200 轻链是一样的。F200 的完整重链 DNA 序列 (SEQ ID NO: 27) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO: 28) 显示在图 11 中。

实施例 3 - M200 在体外对内皮细胞增殖的抑制作用

本实施例描述了 M200 抗体对内皮细胞增殖活性的影响。M200 是一种高特异性的、具有阻断功能的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素单克隆抗体。

HUVEC 接种到 96 空板内，接种密度为每空 5000 个细胞，培养基中含有如图 14 所示浓度的不同抗体 (M100、M200、抗 VEGF 抗体或对照 IgG)。培养板先用 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纤连蛋白或 0.1% 多聚 L 赖氨酸 (PLL) 预处理，并用 2% 热变性 BSA 封闭。细胞用含约 2 ng/ml VEGF、bFGF 或二者的无血清限定培养基培养。接种 4 天后通过四唑盐 MTT (3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基-溴化四唑++) 分析测定细胞总的存活率 (见 Wasserman & Twentyman, “利用比色微量滴定法 (MTT) 确定鼠固体瘤细胞的放射敏感性” (Use of a colorimetric microtiter (MTT) assay in determining the radiosensitivity of cells from murine solid tumors), Int J Radiat Oncol Biol Phys. 15(3):699-702 (1988); Romijn, JC, Verkoelen, CF, Schroeder, FH, “MTT 分析在体外培养的人前列腺癌细胞系上的应用: 确定试验条件、评价激素刺激的生长效应和药物诱导的细胞抑制和细胞毒效应” (Application of the MTT assay to human prostate cancer cell lines in vitro: establishment of test conditions and assessment of hormone-stimulated growth and drug-induced cytostatic and cytotoxic effects), Prostate 12(1): 99-110 (1988))。数据减去背景数值并与无抗体的对照进行比较。每个数据采自 3 个复孔，所显示的数据代表 3 个独立的试验。

如图 14 所示, M200 可以剂量依赖的方式抑制 HUVEC 在 PLL 和纤连蛋白 (0.40 nM; 最大抑制 80%) 条件下的生长, 而对照 IgG 无此效应。另外, M100 (鼠抗体, M200 来源于此抗体) 也表现出了一样的细胞生长抑制能力。

重要的是, 如图 14 所示, 在各种试验条件下 (0.40 nM; 最大抑制 80%), 高亲和性的功能阻断型抗-VEGF 单克隆抗体 HuMV833 ($K_D = 5.84 \times 10^{-11}$ nM) 所产生的 HUVEC 生长抑制效应不显著。用 M200 和 HuMV833 一起处理细胞并不能增加抑制效应。

根据图 15A 所显示的数据, 较高浓度的 VEGF (50 ng/ml) 包括在如上所述的纤连蛋白上的 HUVEC 增殖试验中。如图 15A 所示, VEGF 所刺激的纤连蛋白上的 HUVEC 增殖被 M200 所抑制的程度与 HuMV833 一样。因此, M200 介导的细胞抑制效应是很明显的, 甚至可以达到生长刺激因子 VEGF (50 ng/ml) 的水平。

抗 M200 独特型区的两个高亲和性抗体可阻断 M200 与 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素的结合。利用这两种抗独特型 mAbs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 进行如上所述的 HUVEC 增殖试验, 评价其对

M200 依赖的 HUVEC 生长抑制作用的影响。两个 mAb 都能降低 M200 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 对 HUVEC 增殖的抑制作用。如图 15B 所示, M200 的抑制活性被 M200 的抗独特型 mAb 完全反转。

总之, 这些结果说明 M200 抑制 HUVEC 增殖的作用机制与抗 VEGF 抗体 HuMV833 的作用机制有某些重叠, 但是也有不一样的对方。

实施例 4—M200 对内皮细胞存活能力的影响

本实施例描述了 M200 抗体对内皮细胞存活能力的影响。

抗特定整合素的抗体在体外和体内都能诱导细胞死亡。最近, 根据膜联蛋白 V 染色、级联酶 3 裂解和 DNA 片段化的结果发现, 功能阻断型 $\alpha 5 \beta 1$ mAb 可促进培养的人内皮细胞的调亡。

同样, 利用膜联蛋白 V 染色分析暴露于 M200 或 HuMV833 的 HUVEC 细胞的生长情况。生长在无血清培养基(含 VEGF 和 bFGF, 除了标注出来的地方以外)中的 HUVEC 在存在 M200 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、HuMV833 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 或癌基因抑活剂(5 μM 阳性对照)的情况下生长。用膜联蛋白 V-alexa488 (绿色)和 Hoechst 33258 (蓝色)染色任何在荧光显微镜下观察细胞的死亡情况(荧光显微镜照片见图 16A)。作为平行试验, 接种后 16 小时通过流式细胞术分析细胞的死亡情况(图 16B)。

如 16A 和 16B 所示, 用 M200 处理的细胞被膜联蛋白 V 染色的数量明显增多, 而用 HuMV833 处理的细胞没有出现这种情况。因此, M200 与 HuMV833 不同, 它可以促进内皮细胞的死亡。

另外, 还比较了 M200 对衰老的增殖能力弱的细胞的效应。HUVEC 接种后分别在含血清和生长因子的培养基中生长(中间一排)、生长到融合(左边一排)或者在对数生长期过后去掉血清和生长因子(右边一排)。不同调节下生长的细胞都分成亮组, 一组不进行处理、一组用 M200 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)或癌基因抑活剂(5 μM)处理 16 小时, 然后用膜联蛋白 V-alexa488 染色。

如图 17 所示, M200 可诱导分裂的 HUVEC 细胞死亡, 而对由于接触抑制或无生长因子刺激而衰老的 HUVEC 没有这种效应。这些结果说明 M200 可特异性地促进增殖的内皮细胞死亡。

实施例 5 - F200 在体外的微管形成抑制效应

本实施例描述了微管形成试验以证明 F200 在体外的血管生成抑制效应。HUVEC 单细胞悬液与人血清和生长因子混合物一起混合到纤维蛋白凝块内(用纤维蛋白原

和 α -凝血酶制备) (图 18A 所示的试验所用的培养基添加了 0.01 mg/ml rTGF- α 和 0.1mg/ml VEGF 和 HGF; 图 18B 所示的试验所用的培养基只添加了 0.1mg/ml VEGF; 图 18C 所示的试验所用的培养基只添加了 0.1mg/ml HGF)。将如图所示浓度的检测抗体加到培养基内。96 小时以后, 单个的 HUVEC 开始迁移, 与其他细胞和基质接触, 形成细胞束, 最终形成三维管状结构。6 天后用 4%甲醛固定、Alexa488~鬼笔环肽染色来分析微管形成的情况。从图 18 所示的图和平均荧光强度数据中可以看出, F200 的存在可以显著抑制微管的形成。在生长因子 VEGF、HGF 以及这些因子与 rTGF α 的混合物存在的情况下也可以观察到微管形成的抑制。

实施例 6 - M200 和 F200 在体内可抑制灵长类动物眼内的 CNV

本实施例描述了 M200 和 F200 Fab 对灵长类动物眼内黄斑受激光刺激后血管形成的影响。报道过研究脉络膜新生血管形成动物模型的背景文献包括: S. Ryan, “椭圆型黄斑变性后视网膜下新血管形成试验模型的建立”(The Development of an Experimental Model of Subretinal Neovascularization in Disciform Macular Degeneration), *Transactions of the American Ophthalmological Society* 77: 707-745 (1979); S. J. Ryan, “视网膜下新血管形成: 试验模型的自然发展史”(Subretinal Neovascularization: Natural History of an Experimental Model), *Archives of Ophthalmology* 100: 1804-1809 (1982); M. J. Tolentino 等, “在实验性脉络膜新生血管形成模型中利用荧光素化的抗血管内皮细胞生长因子抗体和右旋糖酐进行血管造影术”(Angiography of Fluoresceinated Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Antibody and Dextran in Experimental Choroidal Neovascularization), *Archives of Ophthalmology* 118: 78-84 (2000)。

A. 试验设计

将 8 只猴子分成下表所示的处理组, 按照进行处理。

组别	N	处理(左眼)	处理(右眼)
1	2	未处理	缓冲液(50 μ l)
2	2	M200 (1 μ M; 50 μ L)	M200 (1 μ M; 50 μ L)
3	2	F200 (1 μ M; 50 μ L)	F200 (1 μ M; 50 μ L)
4	1	对照(Rituxan 1 μ M; 50 μ L)	M200(1 μ M; 50 μ L)
5	1	对照(Rituxan 1 μ M; 50 μ L)	F200 (1 μ M; 50 μ L)

M200 和 F200 溶于载体缓冲液中给药。以 Rituxan 为对照。在第 1 天, 按照下面所描述的方法用激光照射每只动物的双眼黄斑诱导脉络膜新生血管形成(CNV)。所有动物都按照表中所示的剂量分别用 M200、F200 或对照处理, 每周一次, 连续 4 周。给药的第一天定为天数 1。利用标准的方法观察动物的临床表现、体重和其他指标的变化。在 28 天时处死所有动物。

B. 激光诱导脉络膜新生血管形成 (CNV)

在进行激光照射和给药前使动物禁食过夜。动物用盐酸氯胺酮(肌肉注射, 到起效后)镇静, 然后静脉注射氯胺酮和安定(到起效后), 然后进行激光照射和给药处理。

激光照射双眼黄斑可诱导出脉络膜新生血管形成(CNV)。按照标准的 9 点网格模式用激光器[带有 IRIS Medical®便携式裂隙灯转接器的 OcuLight GL(532 nm)激光凝固器]照射黄斑造成损伤。右眼的激光点可反射到左眼的部位。激光器设置的大约参数如下: 光点大小: 50-100 μm ; 激光器的功率: 300-700 毫瓦; 照射时间: 0.1 秒。在进行激光照射时记录每只动物所照射的参数。利用带数字 CCD 照相机的 TRC-50EX Retina 照相机和/或 SL-4Ed 裂隙灯拍照。

给药剂量

每只眼的玻璃体内都注射免疫球蛋白(试验组)或对照品。在第一天进行激光照射后立即注射药物。在给药前眼内滴散瞳药(1%托吡卡胺)。用稀释的抗菌素溶液(5%聚烯吡酮碘溶液或类似溶液)漂洗眼睛, 然后用 0.9%无菌盐水(或类似溶液)将抗菌素洗掉, 眼内滴两滴局部麻醉剂(丙美卡因或等效物)。在操作过程中插入眼睑扩张器以使眼睑处于张开状态, 使眼球回缩。注射器针头穿过巩膜和平坦部, 向后离缘约 4mm。针头直接向后穿过晶状体进到玻璃体中间。将试验品缓慢注射到玻璃体内。在针头退出前用镊子夹住针头周围的结膜。在针头退出期间或退出后较短的一段时间内要用镊子固定注结膜。然后取下眼睑扩张器。在给药后立即用间接检眼镜检查眼睛观察任何明显的给药后出现的问题。在给药及给药后一天立即用局部用抗生素(Tobrex®或等效药物)处理每只眼睛。动物完全清醒后放回笼内。

根据下表所列的给药方案每周给一次药:

组别	动物数(M/F)	试验品(左眼)	剂量	试验品(右眼)	剂量	给药体积(L/眼)
1	1/1	无	NA	缓冲液	0	50
2	1/1	M200	300g	M200	300g	50
3	1/1	F200	100g	F200	100g	50
4	1/0	对照	100g	M200	300g	50
5	1/0	对照	100g	F200	100g	50

表中所示的每只眼睛所给的药物量是按克计算的。假设一只眼睛的平均体积是2ml, 则每只眼睛的剂量约为 150 μ g/ml M200 和约 50 μ g/ml F200。两种情况下, M200 或 F200 的克分子浓度都是 1 μ M。

D. 监测血管生成的抑制情况

间接检眼镜用于检查后房, 生物显微镜用于检查眼前半段。利用标准方法给眼睛评分 (Robert B. Hackett 和 T.O. McDonald. 1996, 《皮肤毒理学》(Dermatotoxicology), 第 5 版, F.B. Marzulli 和 H.I. Maibach 编, Hemisphere Publishing Corp., Washington, D.C)。

在损伤形成前、损伤后 5、12、19 和 26 天以及开始治疗时进行荧光素血管造影术。给予动物氯胺酮和安定 (约 10 mg/kg 氯胺酮和 0.5 mg/kg 安定, 静脉注射) 使其保持安静。眼睑扩张器使眼睑回缩。在给予荧光素染料前, 将动物置于眼科椅上, 在拍照时使其维持头位。用眼底照相机 (TRC-50EX Retina 照相机) 拍照。用 TOPCON IMAGENet™ 系统捕获图像。通过头侧静脉或隐静脉注射荧光素染料 (10% 荧光素钠, 约 0.1 mL/kg)。注射染料后在几个时间点拍下彩色照片和黑白照片, 包括动脉相、早期动静脉相和几个晚期动静脉相以监测由于 CNV 损伤而导致的荧光素漏出情况。将未修饰的图像转移到磁盘上以便于储存和运输。

另外, 也可以给眼睛拍照 (TRC-50EX Retina 照相机和/或 SL-4ED 裂隙灯, 带有数码 CCD 照相机)。在拍照前可给予动物盐酸氯胺酮使其镇静, 滴几滴散瞳溶液 (一般用 1% 的托吡卡胺) 到眼睛内以便于检查。

E. 结果

通过分析这几组的荧光素血管造影术图像清楚地表明在 13 天和 20 天时存在 CNV。对照组知道 28 天时还存在 CNV (如 1、4 组 (左眼) 和 5 组 (左眼))。而用 M200 和 F200 治疗的眼睛 CNV 明显减轻 (如 2、3、4 组 (右眼) 和 5 组 (左眼))。

如图 19 所示, 20 天时 M200 治疗的眼睛与对照组相比 CNV 症状已经很少了。

图 22-25 显示的是 13、20 和 27 天时 M200 和 F200 对每只猴子右眼内 CNV 的影响和对照品对同一只猴子左眼内 CNV 的影响。与未治疗的眼睛相比, 用 M200 或 F200 治疗的眼睛内 CNV 明显减轻。而 F200 治疗的眼睛内 CNV 减轻的程度更明显。但是据估计这种明显的差异是由于 M200 通过血流进入到未治疗左眼内而造成的。即用 M200 治疗右眼也可以抑制左眼内的 CNV, 结果造成了两眼之间的差异不明显。与此相反的是, M200 未漏到未治疗眼内时同一动物的两眼之间的 CNV 抑制效应的差异就比较明显。

实施例 7 - M200、F200 和人源化突变体的结合亲和力

A. 通过表面胞质基团共振技术进行动力学分析

利用 BIAcore 3000 和 2000 (BIAcore, Sweden) 分析 AAB1/B2Fc 与 IIA1、M200 或 F200 的亲和力。用标准的胺偶联试剂盒(BIAcore)将 IIA1、M200 或 F200 固定在 Pioneer F1 芯片上。24℃、50ul/min 的流速测定表面胞质基团共振。在 180 秒内注射 AAB1/B2Fc (结合相)。在随后的 3 小时内监测解离的情况。利用 BIAevaluation 程序计算在 5 种浓度(320nM、160nM、80nM、40nM、20nM)下所得到的数据得到结合动力学参数。利用双参照去除参照表面和缓冲液对照所产生的反应。同时分析系列浓度感应谱的结合相和解离相就可以得到 K_D 。M200 的 K_D 是 0.367 ± 0.132 nM, F200 的 K_D 是 0.332 ± 0.065 nM。

B. 竞争性 ELISA 试验确定 HuM200 的亲和力

通过 ELISA 竞争结合试验确定 HuM200 相对于 IIA1 和 M200 的结合亲和力。

96 孔 ELISA 板(Nunc-Immuno MaxiSorp plate, NalgeNunc, Naperville, IL)的每个孔中加入 100 μ l 含 1.0 μ g/ml 可溶性重组人 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素-Fc 融合蛋白的 0.2 M 碳酸钠-重碳酸钠缓冲液(pH 9.4) 4℃过夜进行包被。用洗涤缓冲液(含 0.1% Tween 20 的 PBS)洗涤后, 用 200 μ l Superblock Blocking Buffer (Pierce)封闭 30 分钟, 然后再用洗涤缓冲液洗涤。将溶于 ELISA 缓冲液(含 1% BSA 和 0.1% Tween 20 的 PBS)中的生物素标记的鼠 IIA1 (0.1 μ g/test)和竞争性抗体(双复孔, 竞争性抗体 3 倍系列稀释, 起始浓度为 5 mg/ml)的混合物加到 ELISA 板内, 每孔的总体积为 100 μ l。ELISA 板在室温下孵育 1 小时, 然后用洗涤缓冲液洗涤。每孔中加入 100 μ l ELISA 缓冲液, 其中含有 1/1,000 稀释的 HRP 连接的链亲和素(Pierce, Rockford, IL)。在室温下孵育 30 分钟后用洗涤缓冲液洗涤, 加入 100 μ l TMB 底物。

用 VERSAmax 微量平板阅读器 (Molecular Devices, Menlo Park, CA) 测量 450nm 处的吸光度值。反应中竞争性抗体的终浓度对 450nm 处的吸光度值作图。

HuM200 含有图 13 所示的重链和轻链氨基酸序列 (SEQ ID NOS: 31 和 32)。HuM200 (也被称为 HuM200-G4) 包含 IgG4 的恒定区。M200 的第二种人源化版本 HuM200-g2m3G 包含与 HuM200 一样的可变区, 但是却包含 IgG2 的恒定区。

如图 26 所示, 两个版本的人源化 M200 抗体 HuM200-G4 和 HuM200-g2m3G 都具有与 M200 基本相同的结合亲和力曲线。另外, HuM200-G4 和 HuM200-g2m3G 的 IC_{50} 值分别为 131.8 $\mu\text{g/ml}$ 和 102.8 $\mu\text{g/ml}$ 。这些数值与 M200 的 IC_{50} 值 (106.3 $\mu\text{g/ml}$) 差不多, 但是稍微高于 IIA1 的 IC_{50} 值 (79.1 $\mu\text{g/ml}$)。

序列表

<110> 蛋白质设计实验室股份有限公司(Protein Design Labs, Inc.)
 V. 兰马克里斯南(Ramakrishnan, Vanitha)
 D. 鲍尔斯(Powers, David)
 D. E. 约翰逊(Johnson, Dale E)
 U. 杰弗里(Jeffrey, Ursula)
 V. 伯汉斯卡(Bhaskar, Vinay)

<120> 调节血管生成的 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素的嵌合的和人源化的抗体

<130> 05882.0178.00PC00

<140> PCT/US2003/038172

<141> 2003-11-26

<150> 60/429,743

<151> 2002-11-26

<150> 60/508,149

<151> 2003-09-30

<160> 45

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 124

<212> PRT

<213> 小鼠(mus muscalus)

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 124

<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人源化抗体

<400> 2

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

<210> 3
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人源化抗体

<400> 3

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

<210> 4

<211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人源化抗体

<400> 4

```

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

```

<210> 5
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人源化抗体

<400> 5

```

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

```

<210> 6

<211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人源化抗体

<400> 6

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

<210> 7
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (mus muscalus)

<400> 7

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

<210> 8
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>

<223> 人源化抗体

<400> 8

```

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

```

<210> 9

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人源化抗体

<400> 9

```

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

```

<210> 10

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人源化抗体

<400> 10

```

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

```

```

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

```

<210> 11
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人源化抗体

```

<400> 11
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Asn
           20           25           30
Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp
           35           40           45
Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
           50           55           60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65           70           75           80
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Arg Ser Pro
           85           90           95
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
           100           105

```

<210> 12
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人源化抗体

```

<400> 12
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Asn
           20           25           30
Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp

```

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

<210> 13
 <211> 429
 <212> DNA
 <213> 小鼠 (mus muscalus)

<400> 13

atggctgtcc tggggctgct tctctgcctg gtgactttcc caagctgtgt cctgtcccag	60
gtgcagctga aggagtcagg acctggcctg gtggcgccct cacagagcct gtccatcaca	120
tgcaccatct cagggttctc attaacggac tatggtgttc actgggttcg ccagcctcca	180
ggaaagggtc tggagtggct ggtagtgtt tggagtgtg gaagctcaac ctataattca	240
gctctcaaat ccagaatgac catcaggaag gacaactcca agagccaagt tttcttaata	300
atgaacagtc tccaaactga tgactcagcc atgtactact gtgccagaca tggaacttac	360
tacggtatga ctacgacggg ggatgctttg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc	420
gtctcctca	429

<210> 14
 <211> 390
 <212> DNA
 <213> 小鼠 (mus muscalus)

<400> 14

atggattttc aggtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtcc	60
agaggacaaa ttgttctcac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctct aggggaacgg	120
gtcaccatga cctgcactgc cagttcaagt gtaagttcca attacttga ctggtaccag	180
cagaagccag gatccgcccc caatctcttg atttatagca catccaacct ggcttctgga	240
gtcccagctc gtttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcagc	300
atggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccaccagt atcttcgttc cccaccgacg	360
ttcggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa	390

<210> 15
 <211> 429
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 嵌合抗体

<400> 15

atggctgtcc tggggctgct tctctgcctg gtgactttcc caagctgtgt cctgtcccag	60
gtgcagctga aggagtcagg acctggcctg gtggcgccct cacagagcct gtccatcaca	120
tgcaccatct cagggttctc attaacggac tatggtgttc actgggttcg ccagcctcca	180
ggaaagggtc tggagtggct ggtagtgtt tggagtgtg gaagctcaac ctataattca	240

```

gtctctcaaat ccagaatgac catcaggaag gacaactcca agagccaagt tttcttaata 300
atgaacagtc tccaaactga tgactcagcc atgtactact gtgccagaca tggaacttac 360
tacggatatga ctacgacggg ggatgcttgg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 420
gtctcgagc 429

```

<210> 16
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 嵌合抗体

<400> 16
 Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Leu Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
 20 25 30
 Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45
 Thr Asp Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Leu Val Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Asn Ser
 65 70 75 80
 Ala Leu Lys Ser Arg Met Thr Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
 85 90 95
 Val Phe Leu Ile Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Ser Ala Met Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg His Gly Thr Tyr Tyr Gly Met Thr Thr Thr Gly Asp
 115 120 125
 Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 17
 <211> 390
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 嵌合抗体

<400> 17
 atggattttc aggtgcagat tttcagcttc ctgctaata gtcctcagt cataatgtcc 60
 agaggacaaa ttgttctcac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctct aggggaacgg 120
 gtcacatga cctgcaactgc cagtccaagt gtaagtcca attacttgca ctggtaccag 180
 cagaagccag gatccgcccc caatctctgg attatagca catccaacct ggcttctgga 240
 gtcccagctc gtttcagtggt cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcagc 300
 atggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccaccagt atcttcgttc cccaccgacg 360
 ttcggtggag gcaccaagct cgagatcaaa 390

<210> 18
 <211> 130

<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 嵌合抗体

<400> 18

```

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

```

<210> 19
<211> 459
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

<223> 嵌合抗体

<400> 19

```

tctagaccac catggctgtc ctggggctgc ttctctgcct ggtgactttc ccaagctgtg      60
tcctgtccca ggtgcagctg aaggagtcag gacctggcct ggtggcgccc tcacagagcc      120
tgtccatcac atgcaccatc tcagggttct cattaaccga ctatggtgtt cactgggttc      180
gccagcctcc aggaaagggt ctggagtggc tggtagtgat ttggagtgat ggaagctcaa      240
cctataattc agctctcaaa tccagaatga ccatcaggaa ggacaactcc aagagccaag      300
tttcttaaat aatgaacagt ctccaaactg atgactcagc catgtactac tgtgccagac      360
atggaactta ctacggaatg actacgacgg gggatgcttt ggactactgg ggtcaaggaa      420
cctcagtcac cgtctcctca ggtaagaatg gcctctaga                                459

```

<210> 20
<211> 143
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 嵌合抗体

<400> 20

```

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

```

<210> 21

<211> 425

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 嵌合抗体

<400> 21

```

acgcgtccac catggatttt caggtgcaga ttttcagctt cctgctaata agtgcctcag      60
tcataatgtc cagaggacaa attgttctca ccagtcctcc agcaatcatg tctgcatctc      120
taggggaacg ggtcaccatg acctgcactg ccagttcaag tgtcagttcc aattacttgc      180
actggtacca gcagaagcca ggatccgccc ccaatctctg gatttatagc acatccaacc      240
tggcttcttg agtccagct cgtttcagtg gcagtgggtc tgggacctct tactctctca      300
caatcagcag catggaggct gaagatgctg ccacttatta ctgccaccag tatcttcgtt      360
ccccaccgac gttcgggtga ggcaccaagc tggaaatcaa acgtaagtag aatccaaagt      420
ctaga                                             425

```

<210> 22

<211> 130

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 嵌合抗体

<400> 22

```

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

```

35	40	45
Ser Ser Val Ser Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly		
50	55	60
Ser Ala Pro Asn Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly		
65	70	75
Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu		
85	90	95
Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His		
100	105	110
Gln Tyr Leu Arg Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu		
115	120	125
Ile Lys		
130		

<210> 23
 <211> 1353
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 嵌合抗体

<400> 23

cagggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc	60
acatgcacca tctcagggtt ctcattaacc gactatgggtg ttcactgggt tcgccagcct	120
ccaggaaagg gtctggagtg gctggttagtg atttggagtg atggaagctc aacctataat	180
tcagctctca aatccagaat gaccatcagg aaggacaact ccaagagcca agttttctta	240
ataatgaaca gtctccaaac tgatgactca gccatgtact actgtgccag acatggaact	300
tactacggaa tgactacgac gggggatgct ttggactact ggggtcaagg aacctcagtc	360
accgtctcct cagcttccac caagggccca tccgtcttcc ccctggcgcc ctgctccagg	420
agcacctccg agagcacagc cgccctgggc tgccctgggtc aggactactt cccgaaccg	480
gtgacgggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc	540
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtgggtga ccgtgccctc cagcagcttg	600
ggcacgaaga cctacacctg caacgtatag cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag	660
agagttgagt ccaaatatgg tccccatgc ccatcatgcc cagcacctga gtctctgggg	720
ggaccatcag tcttctgtt cccccaaaa cccaaggaca ctctcatgat ctcccgacc	780
cctgaggtca cgtgcgtggt ggtggacgtg agccaggaag accccgaggt ccagttcaac	840
tggtacgtgg atggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagttc	900
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtctc accgtctgc accaggactg gctgaacggc	960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa ggcctcccg cctccatcga gaaaaccatc	1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagagcca cagggtgtaca ccctgcccc atcccaggag	1080
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgccctgggtc aaggcttcta cccagcgac	1140
atgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaggc taaccgtgga caagagcagg	1260
tggcaggagg ggaatgtctt ctcatgtctc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac	1320
acacagaaga gcctctccct gtctctgggt aaa	1353

<210> 24
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>

<223> 嵌合抗体

<400> 24

```

caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctctagggga acgggtcacc    60
atgacctgca ctgccagttc aagtgttaagt tccaattact tgcactggta ccagcagaag    120
ccaggatccg cccccaatct ctggatttat agcacatcca acctggcttc tggagtccca    180
gtctgtttca gtggcagtggt gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagcatggag    240
gctgaagatg ctgccactta ttactgccac cagtatcttc gttccccacc gacgttcggt    300
ggaggcacca agctggaaat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg    360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc    420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc    480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg    540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag    600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt                    645

```

<210> 25

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 嵌合抗体

<400> 25

```

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

```

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

<210> 26
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 嵌合抗体

<400> 26
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ala Pro Asn Leu Trp
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80
 Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Arg Ser Pro

	85		90		95
Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala					
	100		105		110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser					
	115		120		125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu					
	130		135		140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser					
145		150		155	160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu					
	165		170		175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val					
	180		185		190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys					
	195		200		205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
	210		215		

<210> 27
 <211> 696
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 嵌合抗体

<400> 27
 caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc 60
 acatgcacca tctcagggtt ctcattaacc gactatggtg ttcactgggt tcgccagcct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg gctggtagtg atttgagtg atggaagctc aacctataat 180
 tcagctctca aatccagaat gaccatcagg aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240
 ataatgaaca gtctccaaac tgatgactca gccatgtact actgtgccag acatggaact 300
 tactacggaa tgactacgac gggggatgct ttggactact ggggtcaagg aacctcagtc 360
 accgtctcct cagcttcac caagggccca tccgtcttc ccctggcgcc ctgctccagg 420
 agcacctccg agagcacagc cgcctgggc tgcttggtca aggactactt ccccgaccg 480
 gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccttg accagcgcg tgacacactt cccggtgtc 540
 ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600
 ggcacgaaga cctacacctg caacgtagat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660
 agagttgagt ccaaatatgg tccccatgc ccatca 696

<210> 28
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 嵌合抗体

<400> 28
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr

<210>	29
<211>	1353
<212>	DNA
<213>	人工的

〈223〉 嵌合抗体

gaggtgcagc	tggtggagtc	aggaggaggc	ctggtgcagc	cgggaggaag	cctgagactg	60
tcatgcgccg	cctcaggggt	ctcattaacc	gactatgggt	ttacttgggt	tcgccaggcc	120
ccaggaaagg	gtctggagtg	gctggtggtg	atttggagtg	atggaagctc	aacctataat	180
tcagctctca	aatccagaat	gaccatctca	aaggacaacg	ccaagaacac	cgtgtactta	240
cagatgaaca	gtctcagagc	tgaggacacc	gccgtgtact	actgtgccag	acatggaact	300
tactacggaa	tgactacgac	gggggatgct	ttggactact	gggggtcaagg	aaccctggtc	360
accgtctcct	cagcttcac	caagggccca	tccgtcttcc	ccctggcgcc	ctgtccagg	420
agcacctccg	agagcacagc	cgccctgggc	tgcttgggtc	aggactactt	ccccgaaccg	480
gtgacgggtg	cgtggaactc	aggcgccctg	accagcggcg	tgcacacctt	cccggtgttc	540
ctacagtcct	caggactcta	ctccctcagc	agcgtggtga	ccgtgccctc	cagcagcttg	600
ggcacgaaga	cctacacctg	caacgtagat	cacaagccca	gcaacaccaa	ggtggacaag	660
agagttgagt	ccaaatatgg	tccccatgc	ccatcatgcc	cagcacctga	gttctctggg	720
ggaccatcag	tcttctgtt	ccccccaaa	cccaaggaca	ctctcatgat	ctccggacc	780
cctgaggtca	cgtgcgtgg	ggtggacgtg	agccaggaag	accccaggt	ccagttcaac	840
tggtacgtgg	atggcgtgga	ggtgcataat	gccaaagacaa	agccgcggga	ggagcagttc	900

```

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaacggc 960
aaggagtaca agtgeaaggt ctccaacaaa ggcttcccgt cctccatcga gaaaaccatc 1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagagcca caggtgtaca ccctgcccc atcccaggag 1080
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtca aaggcttcta cccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag cgggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaggc taaccgtgga caagacagg 1260
tggcaggagg ggaatgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320
acacagaaga gcctctccct gtctctgggt aaa 1353

```

<210> 30
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 嵌合抗体

```

<400> 30
gaaattgttc tcaccagtc tccagcaacc ctctctctct ctccggggga acgggctacc 60
ctctcctgca ctgccagttc aagtgtcagt tccaattact tgcactggta ccagcagaag 120
ccaggacagg cccccgtct cctcattht agcacatcca acctggcttc tggagtccca 180
gctcgtttca gtggcagtggt gtctgggacc tcttacaccc tcacaatcag cagcctcgag 240
ccagaagatt tcgccgtcta ttactgccac cagtatcttc gtccccacc gacgttcggt 300
ggaggcacca aggtcgaaat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagacct acagcctcag cagcacctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

```

<210> 31
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 嵌合抗体

```

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

```

	100		105		110										
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
	115		120		125										
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu
	130		135		140										
Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
145			150		155										160
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
	165		170		175										
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
	180		185		190										
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn
	195		200		205										
Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser
210			215		220										
Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly
225			230		235										240
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
	245		250		255										
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln
	260		265		270										
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
	275		280		285										
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr
290			295		300										
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
305			310		315										320
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile
	325		330		335										
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
	340		345		350										
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
	355		360		365										
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
	370		375		380										
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
385			390		395										400
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val
	405		410		415										
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
	420		425		430										
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
	435		440		445										
Leu	Gly	Lys													
	450														

<210> 32

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

〈223〉 嵌合抗体

<400> 32

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

<210> 33

<211> 6

<212> DNA

〈213〉 人工的

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 寡核苷酸

<400> 33

ctcgag

6

<210> 34

<211> 6

<212> DNA

〈213〉 人工的

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 寡核苷酸

<400> 34

tctaga	6
<210> 35	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 35	
acgcgt	6
<210> 36	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 36	
ttttctagac caccatggct gtctggggc tgctt	35
<210> 37	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 37	
ttttctagag gttgtgagga ctcacctgag gagacggtga ctgaggt	47
<210> 38	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 38	
tggaacttac tacggaatga ctacgacggg g	31
<210> 39	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	

<223> 寡核苷酸

<400> 39

ccccgtcgtgta gtcattccgt agtaagttcc a

31

<210> 40

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 40

ttttctagag gccattctta cctgaggaga cggtgactga ggt

43

<210> 41

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 41

tttacgcgtc caccatggat tttcaggtgc agatt

35

<210> 42

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 42

ttttctagat taggaaagtg cacttacgtt tgatttccag cttggtgcc

49

<210> 43

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 43

tgccagttca agtgtcagtt ccaattactt g

31

<210> 44

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 44

caagtaattg gaactgacac ttgaactggc a

31

<210> 45

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 45

ttttctagac ttggattct acttacgttt gatttccagc ttggtgcc

48

<210> 46

<211> 143

<212> PRT

<213> 小鼠(mus muscalus)

<400> 46

```

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

```

<210> 47

<211> 130

<212> PRT

<213> 小鼠(mus muscalus)

<400> 47

```

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

```

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30
 Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser
 35 40 45
 Ser Ser Val Ser Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 50 55 60
 Ser Ala Pro Asn Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
 65 70 75 80
 Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 85 90 95
 Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His
 100 105 110
 Gln Tyr Leu Arg Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 115 120 125
 Ile Lys
 130

IIA1 V_H (SEQ ID NO: 1):

QVQLKESGPGLVAPSQSLSTTCTISGFSLT DYGVHWVRQPPGKGLEWL VVIWSDGSSTYN SALKSRMTI
ISKDNSKSQVFLIMNSLQTDD SAMYYCARHGTY YGMTTGDALDYWGQGTSLTVSS

V_H 1.0 (SEQ ID NO: 2):

QVQLVESGPGLVQPGGSLRISCAISGFSLT DYGVHWVRQAPGKGLEWL VVIWSDGSSTYN SALKSRMT
ISKDNSKSTVYLQMNSLRAEDT AMYYCARHGTY YGMTTGDALDYWGQGTSLTVSS

V_H 2.0 (SEQ ID NO: 3):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRISCAISGFSLT DYGVHWVRQAPGKGLEWL VVIWSDGSSTYN SALKSRMT
ISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDT AVYYCARHGTY YGMTTGDALDYWGQGTSLTVSS

V_H 3.0 (SEQ ID NO: 4):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT DYGVHWVRQAPGKGLEWVSVI WSDGSSTYN SALKSRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARHGTY YGMTTGDALDYWGQGTSLTVSS

V_H 4.0 (SEQ ID NO: 5):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFSLT DYGVHWVRQAPGKGLEWL VVIWSDGSSTYN SALKSRM
TISKDNSKSTVYLQMNSLRAEDT AVYYCARHGTY YGMTTGDALDYWGQGTSLTVSS

V_H 5.0 (SEQ ID NO: 6):

QVQLVESGGGLVQPGGSLRISCAISGFSLT DYGVHWVRQAPGKGLEWL VVIWSDGSSTYN SALKSRMT
ISKDNSKSTVYLQMNSLRAEDT AMYYCARHGTY YGMTTGDALDYWGQGTSLTVSS

IIA1 V_L (SEQ ID NO: 7):

QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSS NYLHWYQQKPGSAPNLWIYSTSN LASGVPARFSGSGSG
TSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYLRSPPTFGG GTKLEIKR

V_L 1.0 (SEQ ID NO: 8):

DIQLTQSPSSMSASLGDRVTMTCTASSSVSS NYLHWYQQKPGKAPNLWIYSTSN LASGVPSRFS GSGSG
TDYTLTISSMQPEDFATYYCHQYLRSPPTFGQ GTKLEIKR

V_L 2.0 (SEQ ID NO: 9):

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTMTCTASSSVSS NYLHWYQQKPGKAPKLWIYSTSN LASGVPSRFS GSGSG
TDYTLTISSMQPEDFATYYCHQYLRSPPTFGQ GTKLEIKR

V_L 3.0 (SEQ ID NO: 10):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCTASSSVSS NYLHWYQQKPGKAPKLLIYSTSN LASGVPSRFS GSGSGT
DFTLTISSLQPEDFATYYCHQYLRSPPTFGQ GTKVEIKR

V_L 4.0 (SEQ ID NO: 11):

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCTASSSVSS NYLHWYQQKPGKAPKLWIYSTSN LASGVPSRFS GSGSGT
DYTLTISSLQPEDFATYYCHQYLRSPPTFGQ GTKVEIKR

V_L 5.0 (SEQ ID NO: 12):

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTMTCTASSSVSS NYLHWYQQKPGKAPKLWIYSTSN LASGVPSRFS GSGSG
TDYTLTISSLQPEDFATYYCHQYLRSPPTFGQ GTKVEIKR

图

1

IIA1 V _H	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
V _H 1.0	QVQLKESGPGLVAPSGQSLISITCTIS	GFSLIDYGVH	HVRQPPGKGLNVLV	VIVSDGSSTYNSALKS	RMTIRKDNKSKSVYILQWNSLRAREDAVYICAR	HGTYIGMTITGDALDY	WGQGTIVTVSS
V _H 2.0	QVQLVESOPGLVDPGQSLRIICAIIS	GFSLIDYGVH	HVRQPPGKGLNVLV	VIVSDGSSTYNSALKS	RMTIRKDNKSKSVYILQWNSLRAREDAVYICAR	HGTYIGMTITGDALDY	WGQGTIVTVSS
V _H 3.0	EVQLVESGGGLVDPGQSLRIICAIIS	GFSLIDYGVH	HVRQPPGKGLNVLV	VIVSDGSSTYNSALKS	RPTIIRKDNKSKNTILQWNSLRAREDAVYICAR	HGTYIGMTITGDALDY	WGQGTIVTVSS
V _H 4.0	EVQLVESGGGLVDPGQSLRIICAIIS	GFSLIDYGVH	HVRQPPGKGLNVLV	VIVSDGSSTYNSALKS	RMTIIRKDNKSKSVYILQWNSLRAREDAVYICAR	HGTYIGMTITGDALDY	WGQGTIVTVSS
V _H 5.0	QVQLVESGGGLVDPGQSLRIICAIIS	GFSLIDYGVH	HVRQPPGKGLNVLV	VIVSDGSSTYNSALKS	RMTIIRKDNKSKSVYILQWNSLRAREDAVYICAR	HGTYIGMTITGDALDY	WGQGTIVTVSS
IIA1 V _L	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
V _L 1.0	QIVLTQSPAIMSASISLGERVTMTC	TASSSVSSNYLH	WTQOKPGSAFNLMIY	STSNLAS	GVPFRPSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYC	HOYLRSPTT	FGQGTIKLEIKR
V _L 2.0	DIQLTQSPFSSIASISLGERVTMTC	TASSSVSSNYLH	WTQOKPGSAFNLMIY	STSNLAS	GVPFRPSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYC	HOYLRSPTT	FGQGTIKLEIKR
V _L 3.0	DIQLTQSPFSSIASISLGERVTMTC	TASSSVSSNYLH	WTQOKPGSAFNLMIY	STSNLAS	GVPFRPSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYC	HOYLRSPTT	FGQGTIKLEIKR
V _L 4.0	DIQLTQSPFSSIASISLGERVTMTC	TASSSVSSNYLH	WTQOKPGSAFNLMIY	STSNLAS	GVPFRPSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYC	HOYLRSPTT	FGQGTIKLEIKR
V _L 5.0	DIQLTQSPFSSIASISLGERVTMTC	TASSSVSSNYLH	WTQOKPGSAFNLMIY	STSNLAS	GVPFRPSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYC	HOYLRSPTT	FGQGTIKLEIKR

2



A. IIA1 V_H 序列

[NA, SEQ ID NO: 13; AA, SEQ ID NO: 46]

```

1   ATGGCTGTCCTGGGGCTGCTTCTCTGCCTGGTGACTTTCCCAAGCTGTGTCCTGTCCCAG
    M A V L G L L L C L V T F P S C V L S Q
61  GTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACA
    V Q L K E S G P G L V A P S Q S L S I T
121 TGCACCATCTCAGGGTTCTCATTAACCGACTATGGTGTTCACTGGGTTCGCCAGCCTCCA
    C T I S G F S L T D Y G V H W V R Q P P
181 GGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGTAGTGATTGGAGTGATGGAAGCTCAACCTATAATTCA
    G K G L E W L V V I W S D G S S T Y N S
241 GCTCTCAAATCCAGAATGACCATCAGGAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTCTTAATA
    A L K S R M T I R K D N S K S Q V F L I
301 ATGAACAGTCTCCAACTGATGACTCAGCCATGTACTACTGTGCCAGACATGGAACCTTAC
    M N S L Q T D D S A M Y Y C A R H G T Y
361 TACGGTATGACTACGACGGGGGATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACC
    Y G M T T T G D A L D Y W G Q G T S V T
421 GTCTCCTCA
    V S S

```

B. IIA1 V_L 序列

[NA, SEQ ID NO: 14; AA, SEQ ID NO: 47]

```

1   ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATGTCC
    M D F Q V Q I F S F L L I S A S V I M S
61  AGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAACGG
    R G Q I V L T Q S P A I M S A S L G E R
121 GTCACCATGACCTGCACTGCCAGTTCAAGTGTAAGTTCCAATTACTTGCACTGGTACCAG
    V T M T C T A S S S V S S N Y L H W Y Q
181 CAGAAGCCAGGATCCGCCCCCAATCTCTGGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGA
    Q K P G S A P N L W I Y S T S N L A S G
241 GTCCCAGCTCGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTACAATCAGCAGC
    V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S
301 ATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAGTATCTTCGTTCCCCACCGACG
    M E A E D A A T Y Y C H Q Y L R S P P T
361 TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
    F G G G T K L E I K

```

图 3

A. 抗体 200-4 V_H 序列

[NA, SEQ ID NO: 15; AA, SEQ ID NO: 16]

```

1  ATGGCTGTCCTGGGGCTGCTTCTCTGCCTGGTGACTTTCCCAAGCTGTGTCTGTCCCAG
   M A V L G L L L C L V T F P S C V L S Q
61  GTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACA
   V Q L K E S G P G L V A P S Q S L S I T
121 TGCACCATCTCAGGGTTCTCATTAACCGACTATGGTGTTCACTGGGTTCCGCCAGCCTCCA
   C T I S G F S L T D Y G V H W V R Q P P
181 GGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGTAGTGATTTGGAGTGATGGAAGCTCAACCTATAATTCA
   G K G L E W L V V I W S D G S S T Y N S
241 GCTCTCAAATCCAGAATGACCATCAGGAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAATA
   A L K S R M T I R K D N S K S Q V F L I
301 ATGAACAGTCTCCAACTGATGACTCAGCCATGTACTACTGTGCCAGACATGGAACCTTAC
   M N S L Q T D D S A M Y Y C A R H G T Y
361 TACGGTATGACTACGACGGGGGATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACC
   Y G M T T T G D A L D Y W G Q G T S V T
421 GTCTCGAGC
   V S S

```

B. 抗体 200-4 V_L 序列

[NA, SEQ ID NO: 17; AA, SEQ ID NO: 18]

```

1  ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATGTCC
   M D F Q V Q I F S F L L I S A S V I M S
61  AGAGGACAAATTGTTCTCAGCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAACGG
   R G Q I V L T Q S P A I M S A S L G E R
121 GTCAACCATGACCTGCACTGCCAGTTCAAGTGTAAGTTCCAATTACTTGCACTGGTACCAG
   V T M T C T A S S S V S S N Y L H W Y Q
181 CAGAAGCCAGGATCCGCCCCAATCTCTGGATTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGA
   Q K P G S A P N L W I Y S T S N L A S G
241 GTCCCAGCTCGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGC
   V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S
301 ATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAAGTATCTTCGTTCCCCACCGACG
   M E A E D A A T Y Y C H Q Y L R S P P T
361 TTCGGTGGAGGCACCAAGCTCGAGATCAAA
   F G G G T K L E I K

```

图

4

A. M200 V_H 序列

[NA, SEQ ID NO: 19; AA, SEQ ID NO: 20]

```

1  TCTAGACCACCATGGCTGTCCTGGGGCTGCTTCTCTGCCTGGTGACTTTCCCAAGCTGTG
    M A V L G L L L C L V T F P S C
61  TCCTGTCCCAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCC
    V L S Q V Q L K E S G P G L V A P S Q S
121 TGTCCATCACATGCACCATCTCAGGGTTCTCATTAAACCGACTATGGTGTTCCTGGGTTTC
    L S I T C T I S G F S L T D Y G V H W V
181 GCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGTAGTGATTGGAGTGATGGAAGCTCAA
    R Q P P G K G L E W L V V I W S D G S S
241 CCTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGAATGACCATCAGGAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAG
    T Y N S A L K S R M T I R K D N S K S Q
301 TTTTCTTAATAATGAACAGTCTCCAACTGATGACTCAGCCATGTACTACTGTGCCAGAC
    V F L I M N S L Q T D D S A M Y Y C A R
361 ATGGAACCTTACTACGGATGACTACGACGGGGGATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAA
    H G T Y Y G M T T T G D A L D Y W G Q G
421 CCTCAGTCACCGTCTCCTCAG^GTAAGAATGGCCTCTAGA
    T S V T V S S

```

B. M200 V_L 序列

[NA, SEQ ID NO: 21; AA, SEQ ID NO: 22]

```

1  ACGCGTCCACCATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAG
    M D F Q V Q I F S F L L I S A S
61  TCATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTC
    V I M S R G Q I V L T Q S P A I M S A S
121 TAGGGGAACGGGTCACCATGACCTGCACTGCCAGTTCAGTGTCAGTTCCAATTACTTGC
    L G E R V T M T C T A S S S V S S N Y L
181 ACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCGCCCCCAATCTCTGGATTATAGCACATCCAACC
    H W Y Q Q K P G S A P N L W I Y S T S N
241 TGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCA
    L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L
301 CAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAGTATCTTCGTT
    T I S S M E A E D A A T Y Y C H Q Y L R
361 CCCCACCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC^GTAAGTAGAATCCAAAGT
    S P P T F G G G T K L E I K
421 CTAGA

```

图

5

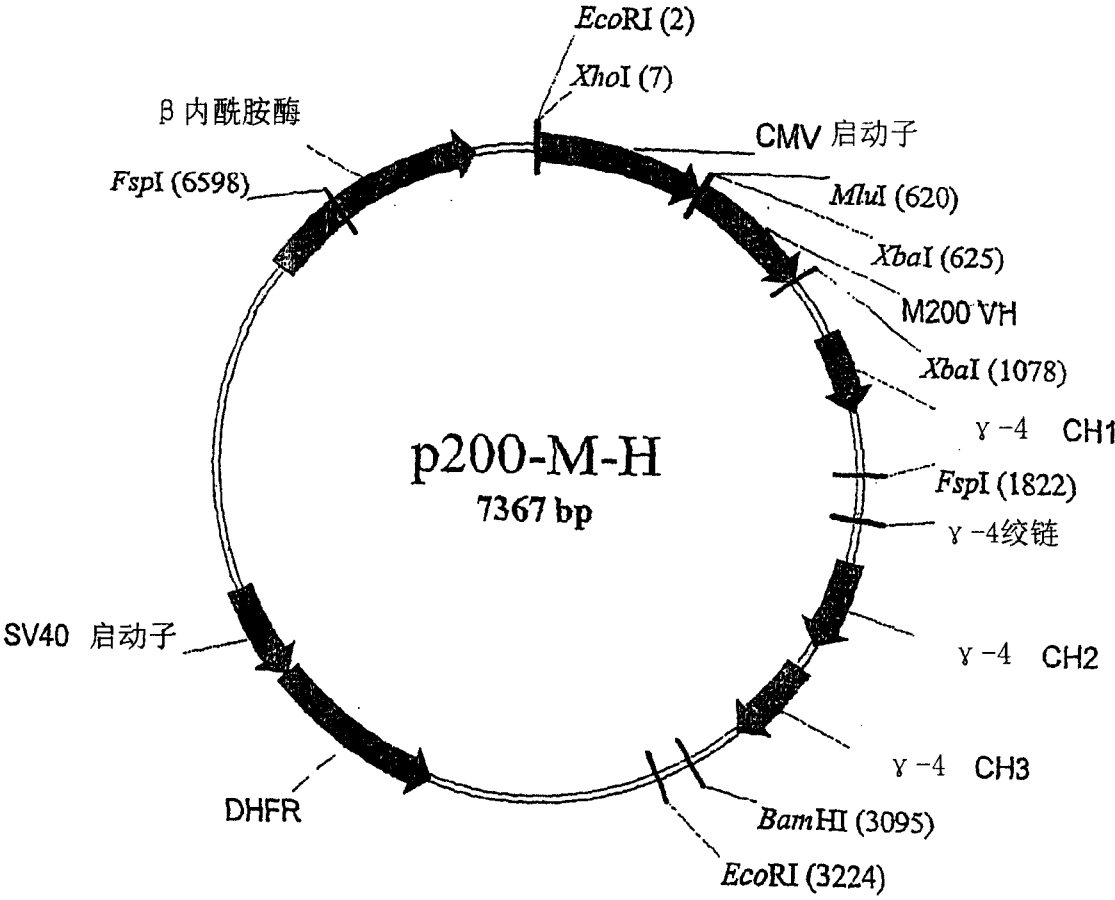


图 6

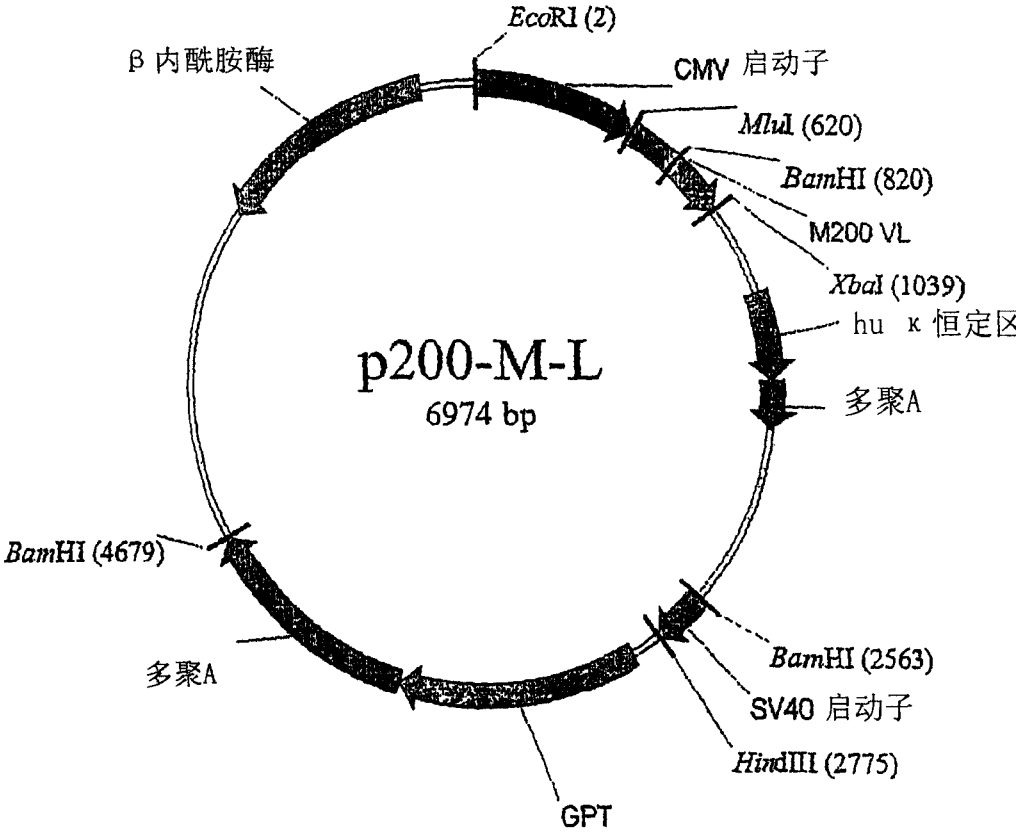


图 7

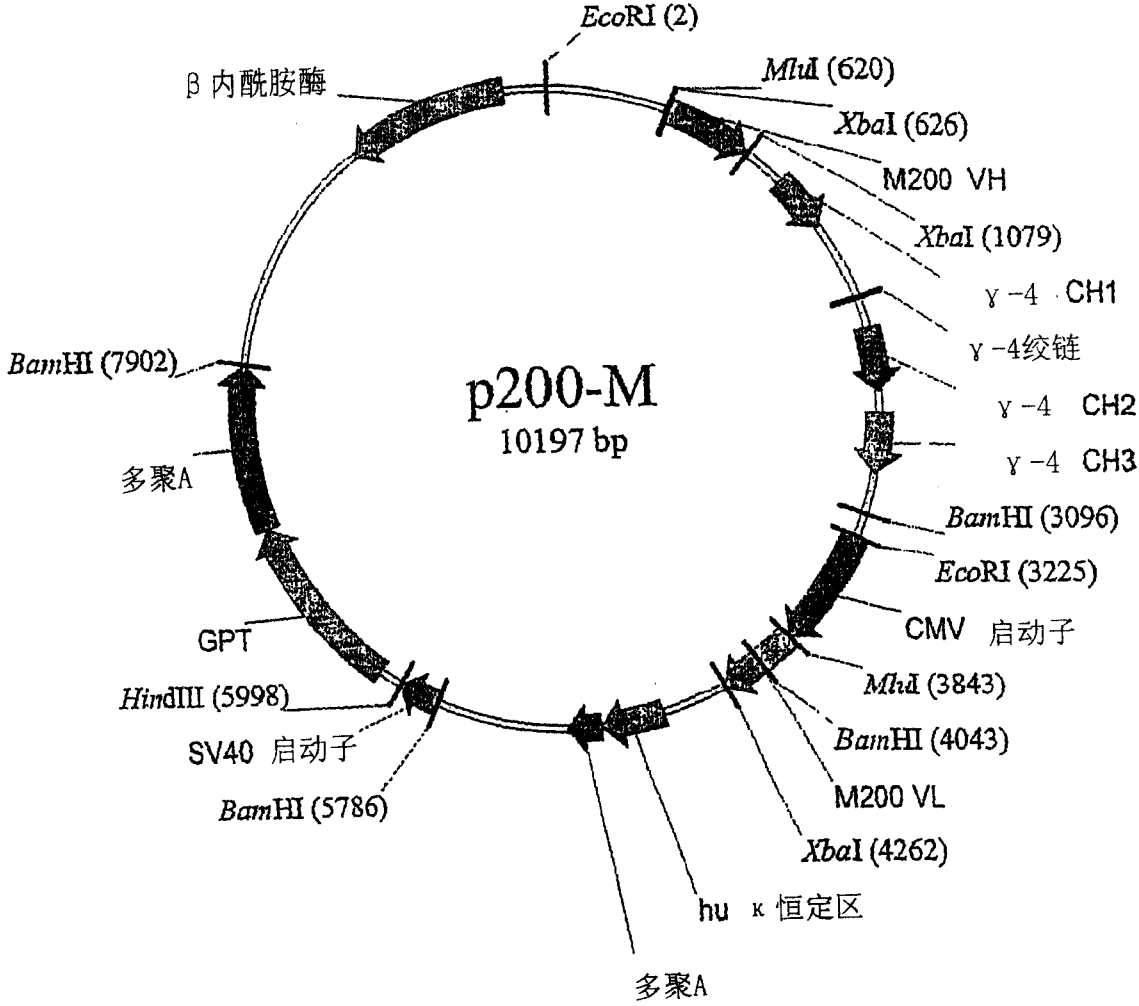


图 8

M200 重链的完整DNA序列(SEQ ID NO: 23)

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCC
ATCACATGCACCATCTCAGGGTTCTCATTAACCGACTATGGTGTTCACTGGGTTTCGC
CAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGTAGTGATTTGGAGTGATGGAAGCTCA
ACCTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGAATGACCATCAGGAAGGACAACTCCAAGAGC
CAAGTTTTCTTAATAATGAACAGTCTCCAACTGATGACTCAGCCATGTACTACTGT
GCCAGACATGGAACCTTACTACGGAATGACTACGACGGGGGATGCTTTGGACTACTGG
GGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTC
CCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTG
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACC
AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTA
GATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCC
CCATGCCCATCATGCCCAGCACCTGAGTTCTTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTC
CCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTG
GTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTAC
CGTGTGGTCAGCGTCTTCAACCGTCTTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTAC
AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCCTCCCGTCTTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCT
CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCCTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA

M200 轻链的完整DNA序列(SEQ ID NO: 24)

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAACGGGT
ACCATGACCTGCACTGCCAGTTCAAGTGTAAGTTCCAATTACTTGCACTGGTACCAG
CAGAAGCCAGGATCCGCCCCCAATCTCTGGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCT
GGAGTCCAGCTCGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATC
AGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAGTATCTTCGTTCC
CCACCGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA
TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTT
GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT
AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC
TTCAACAGGGGAGAGTGT

M200 重链的完整氨基酸序列
(SEQ ID NO: 25)

QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTISGFSLTDYGVHWVRQPPGKGLEWLVVIWSDGSS
TYSALKSRMTIRKDNSKSQVFLIMNSLQTDD SAMYYCARHGTYYG MTTTGDALDYW
GQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNV DHKPSNTKVDKR VESKYGP
PCPSCPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SK
AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTP
PVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

M200 轻链的完整氨基酸序列
(SEQ ID NO: 26)

QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSNYLHWYQQKPGSAPNLWIYSTSNLASGVP
ARFSGSGSGTSYSLTIS MEAEDAATYYCHQYLRSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图 10

F200 重链的完整DNA序列
(SEQ ID NO: 27)

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCC
ATCACATGCACCATCTCAGGGTTCTCATTAAACCGACTATGGTGTTCACTGGGTTCGC
CAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGTAGTGATTTGGAGTGATGGAAGCTCA
ACCTATAATTGAGCTCTCAAATCCAGAATGACCATCAGGAAGGACAACCTCCAAGAGC
CAAGTTTTCTTAATAATGAACAGTCTCCAAACTGATGACTCAGCCATGTACTACTGT
GCCAGACATGGAACTTACTACGGAATGACTACGACGGGGGATGCTTTGGACTACTGG
GGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCTTCACCAAGGGCCCATCCGTCTTC
CCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTG
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACC
AGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTA
GATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCC
CCATGCCCATCA

F200重链的完整氨基酸序列
(SEQ ID NO: 28)

QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTISGFSLTDYGVHWVRQPPGKGLEWLVVIWSDGSS
TYSALKSRMTIRKDNSKSQVFLIMNSLQTDSDAMY YCARHGTY YGMTT TGDALDYW
GQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP
PCPS

图 11

huM200 重链的完整DNA序列(SEQ ID NO: 29)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGGAGGCCTGGTGCAGCCCGAGGAAGCCTGAGA
CTGTCATGCGCCGCTCAGGGTTCTCATTAAACCGACTATGGTGTTCACTGGGTTTCGC
CAGGCCCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGTGGTGATTTGGAGTGATGGAAGCTCA
ACCTATAATTTCAGCTCTCAAATCCAGAATGACCATCTCAAAGGACAACGCCAAGAAC
ACCGTGTAATTACAGATGAACAGTCTCAGAGCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGT
GCCAGACATGGAACCTTACTACGGAATGACTACGACGGGGGATGCTTTGGACTACTGG
GGTCAAGGAACCTGGTCAACGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTC
CCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTG
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACC
AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTA
GATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCC
CCATGCCCATCATGCCAGCACCTGAGTTCTTGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTC
CCCCCAAACCCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTG
GTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTAC
CGTGTGGTTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTAC
AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCAGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCT
CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCCTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA

huM200 轻链的完整DNA序列(SEQ ID NO: 30)

GAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAACCTCTCTCTCTCTCCGGGGGAACGGGCT
ACCTCTCTCTGCACTGCCAGTTCAAGTGTGAGTTCCAATTACTTGCACTGGTACCAG
CAGAAGCCAGGACAGGCCCCCGTCTCTCATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCT
GGAGTCCCAGCTCGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACACCCTCACAAATC
AGCAGCCTCGAGCCAGAAGATTTGCGCGTCTATTACTGCCACCAGTATCTTCGTTCC
CCACCGACGTTGGGTGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAACGAACCTGTGGCTGCACCA
TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTT
GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT
AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
AAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC
TTCAACAGGGGAGAGTGT

图 12

huM200 重链的完整氨基酸序列
(SEQ ID NO: 31)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT DYGVHWVRQAPGKGLEWLVVIWSDGSS
TYSALKSRMTISKDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGTYYGMTT TGDALDYW
GQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP
PCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLVHQLDNLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT P
PVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

huM200 轻链的完整氨基酸序列
(SEQ ID NO: 32)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSVSSNYLHWYQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGVP
ARFSGSGSGTSYTLTISLLEPEDFAVYYCHQYLRSPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图 13

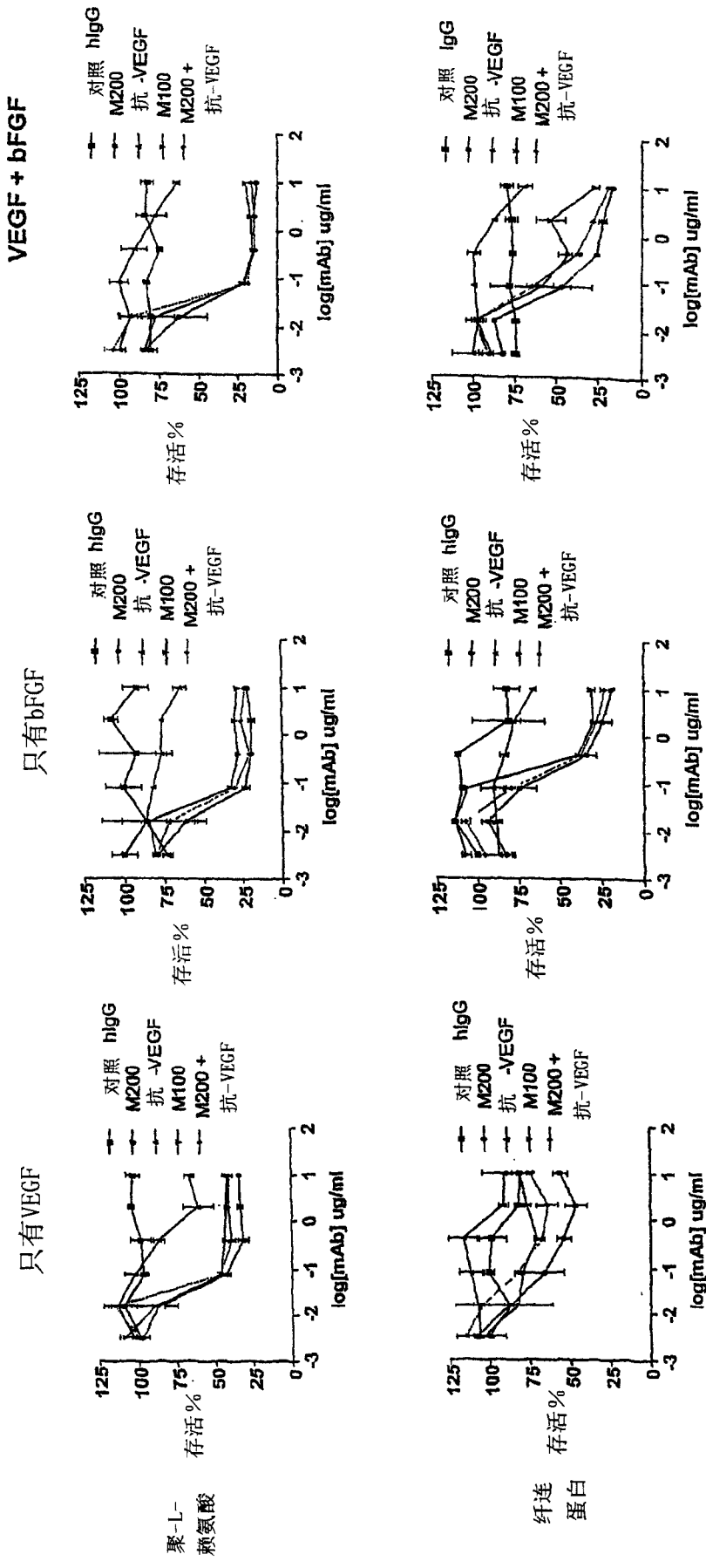


图 14

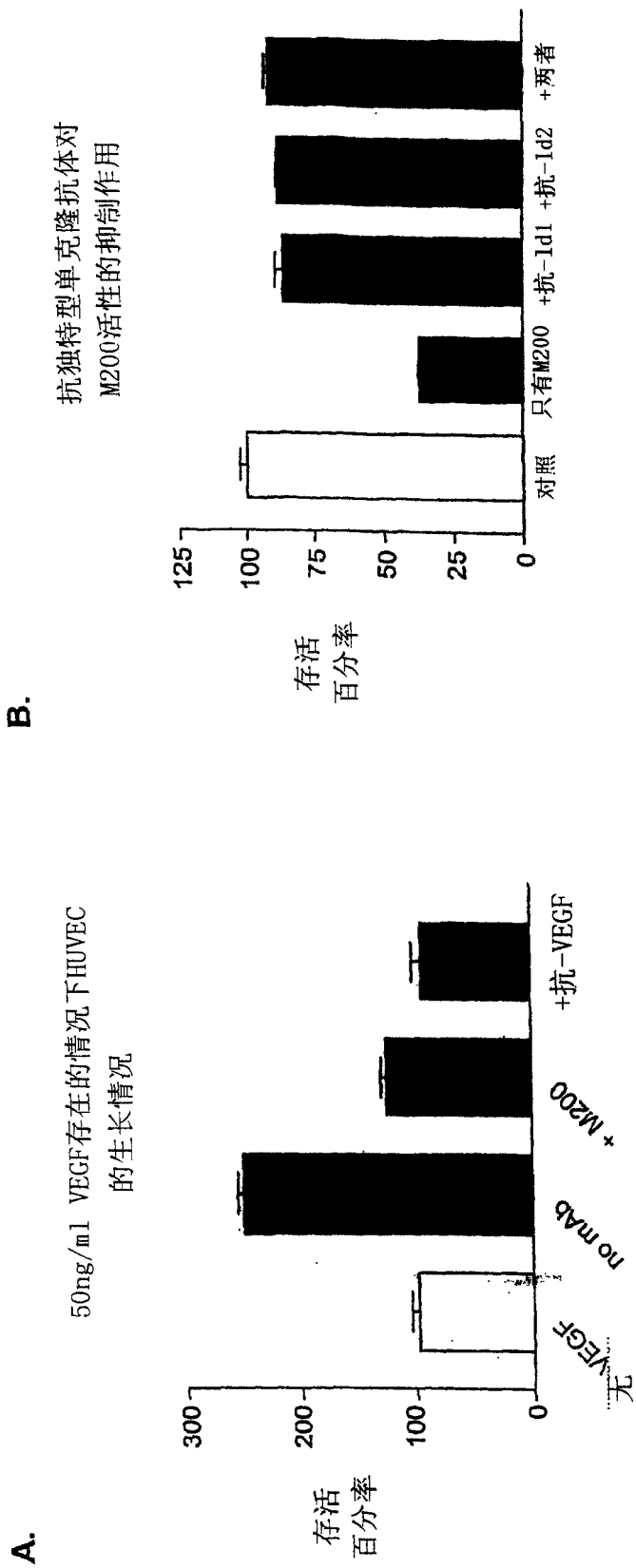
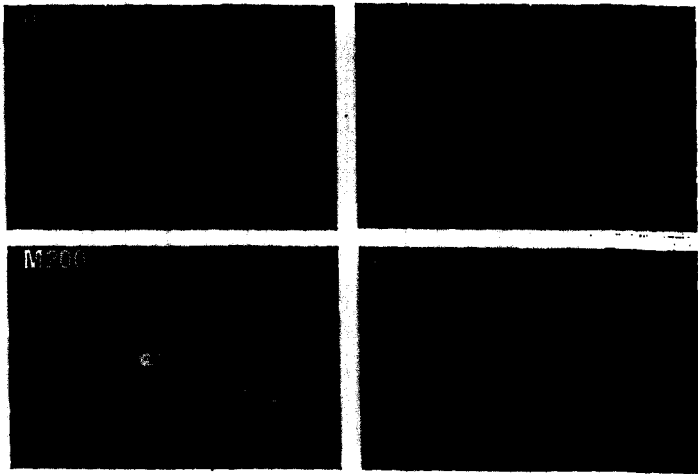


图 15

A.

免疫荧光分析膜联蛋白V阳性细胞的视图



B.

流式细胞术定量检测膜联蛋白V阳性细胞数

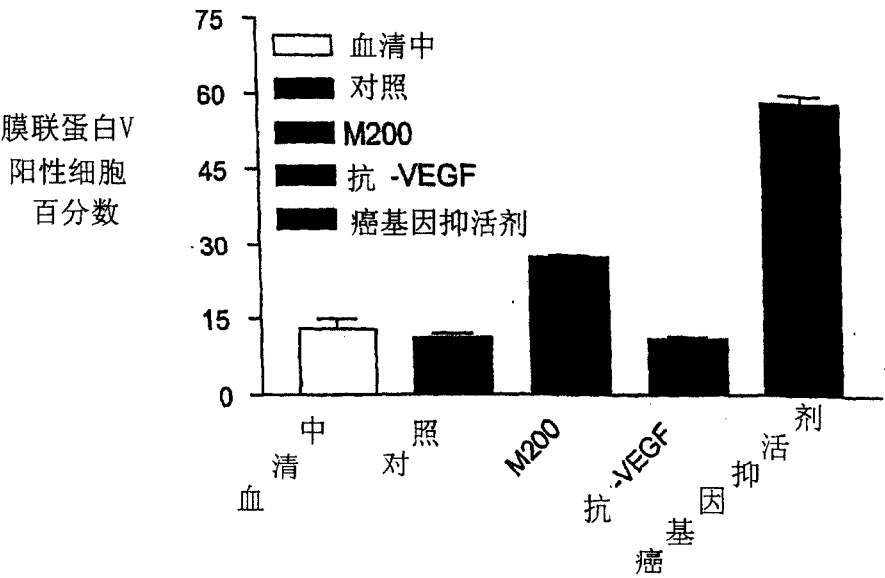


图 16

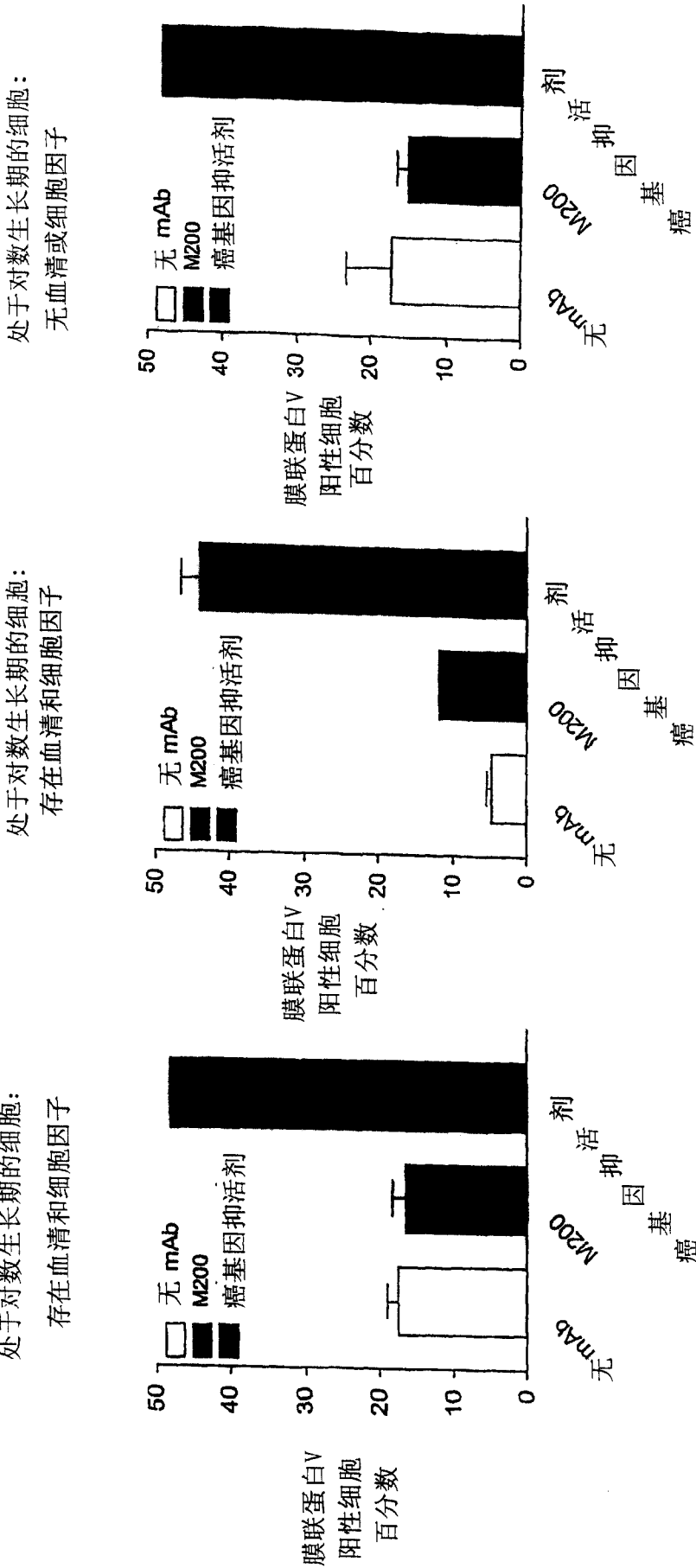


图 17

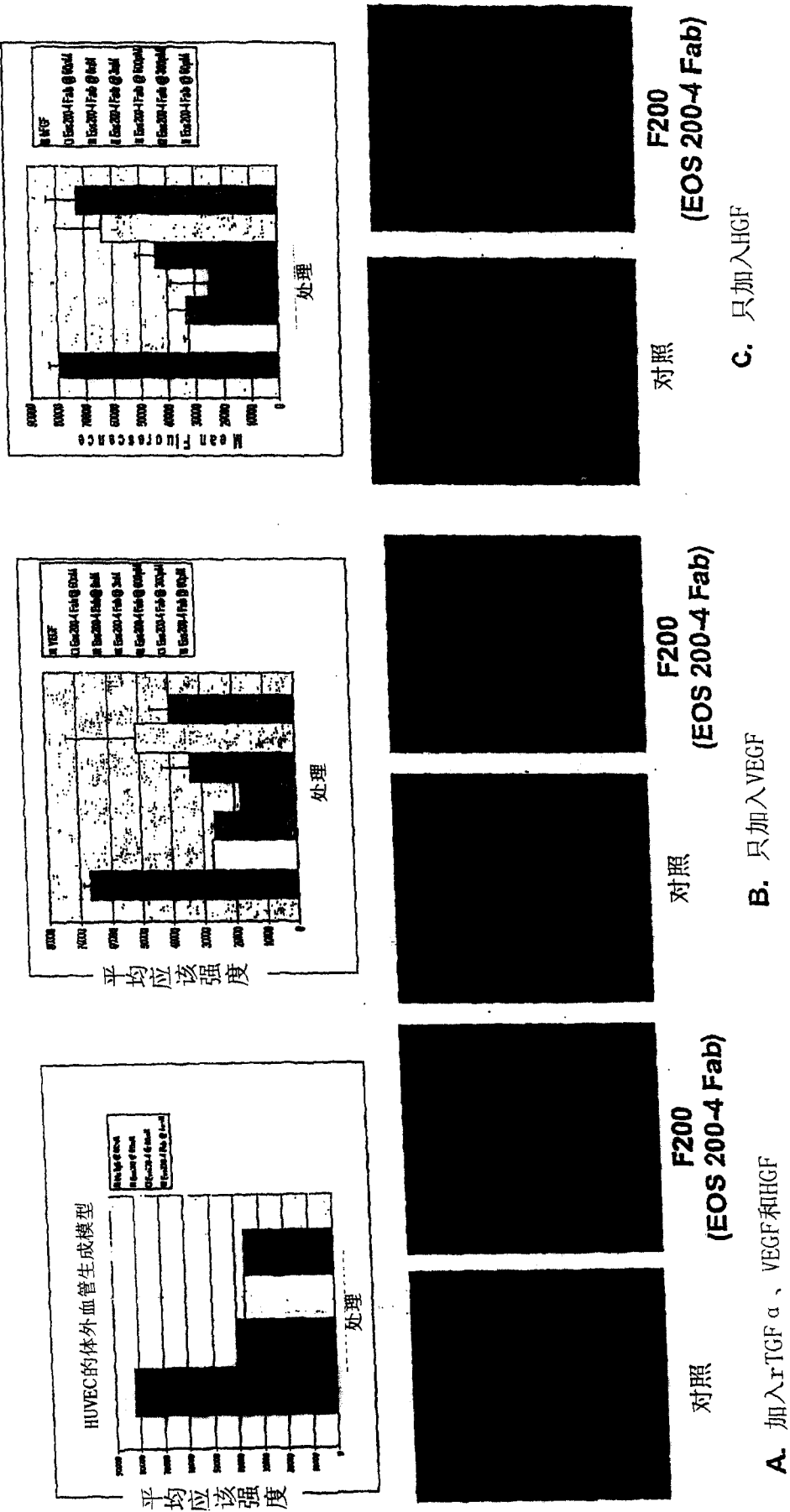
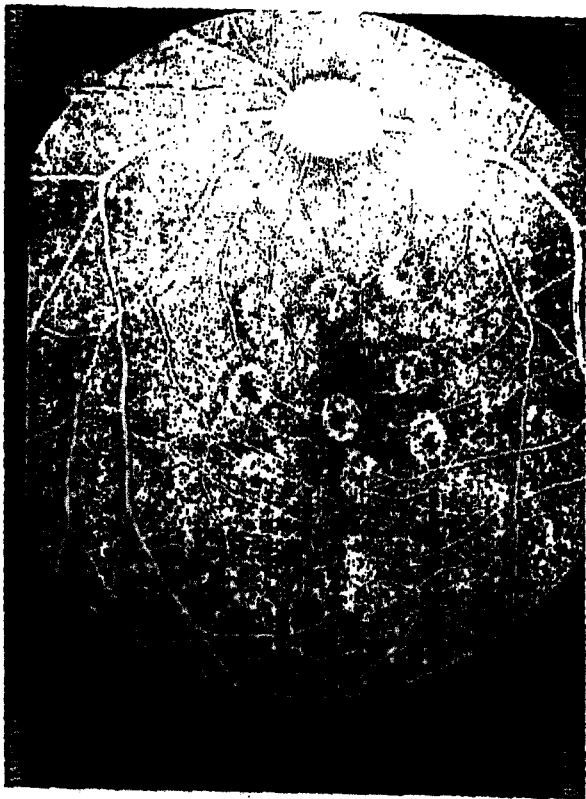
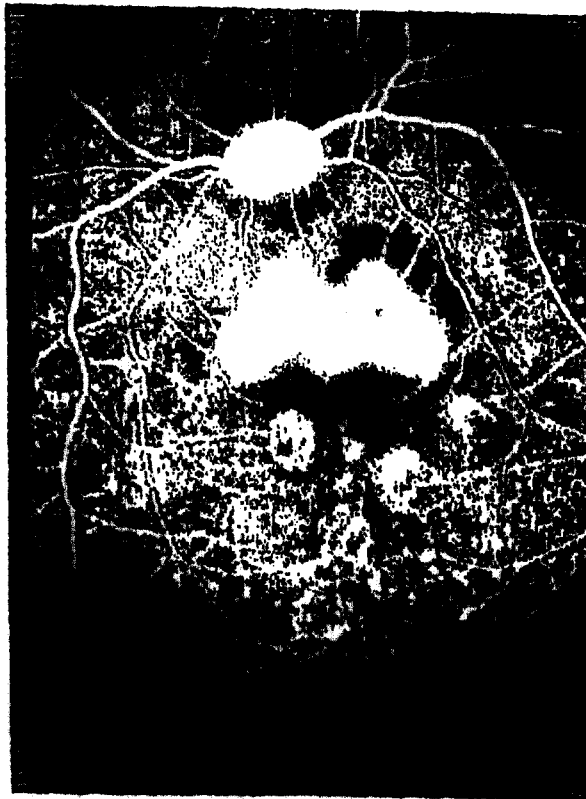


图 18



B. M200 处理
第20天



A. 对照 (rituxan)
第20天

图 19



B. M200 (右眼)

第13天



A. 对照 (左眼)

第13天

图 20



B. M200 (右眼)
第20天

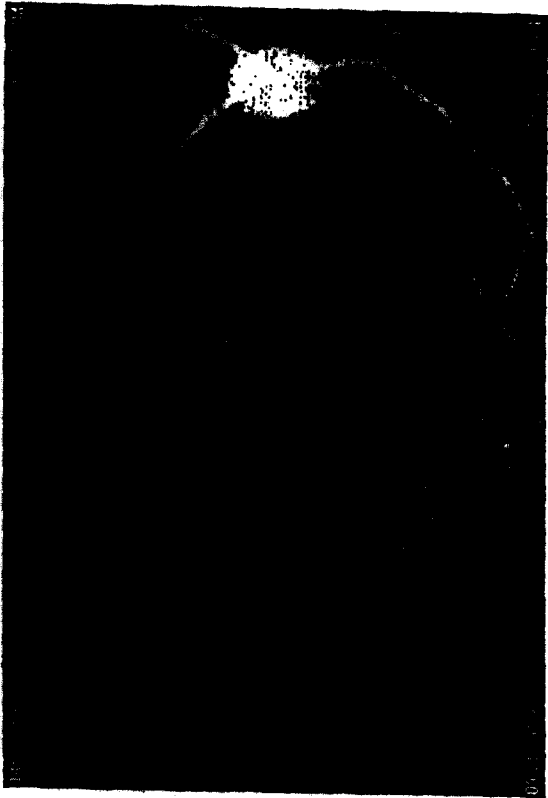


A. 对照 (左眼)
第20天

图 21



A. 对照 (左眼)
第27天



B. M200 (右眼)
第27天

图

22



B. F200 (右眼)

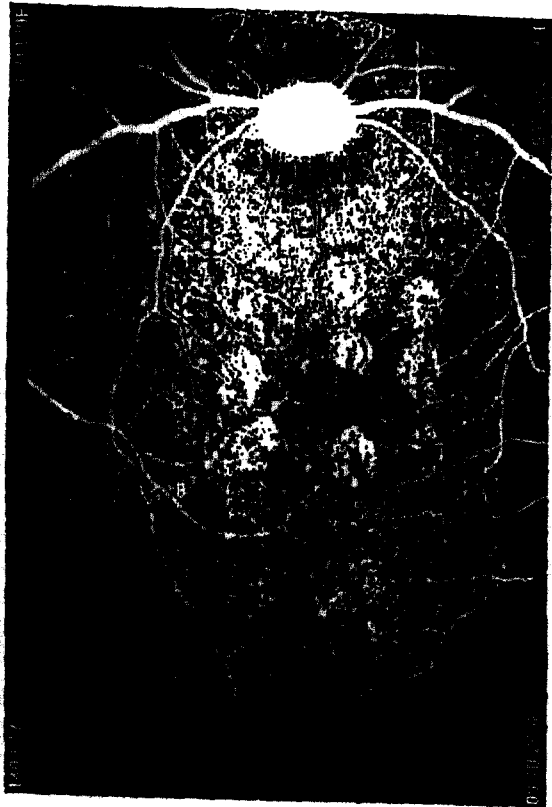
第13天



A. 对照 (左眼)

第13天

图 23



B. F200 (右眼)

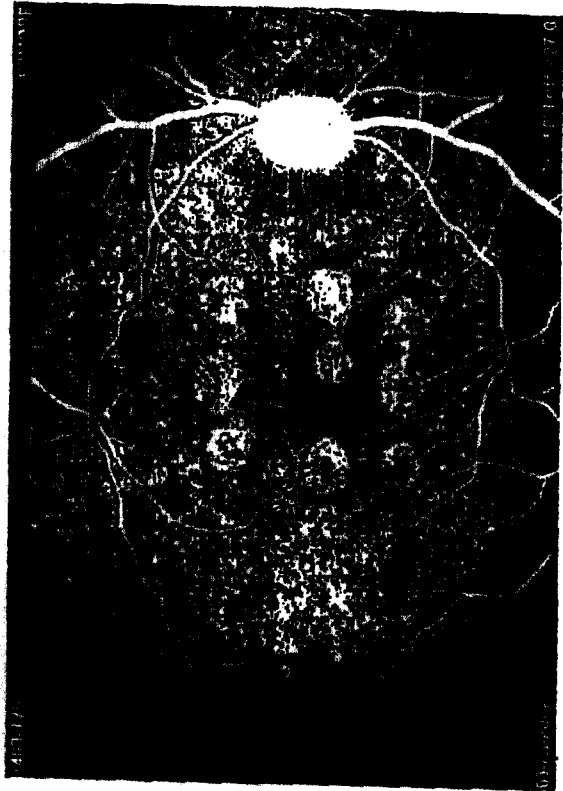
第20天



A. 对照 (左眼)

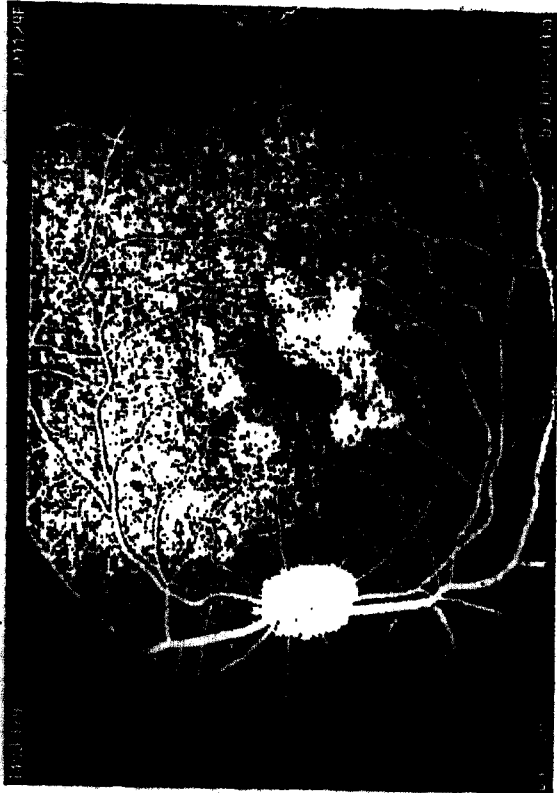
第20天

图 24



B. F200 (右眼)

第27天



A. 对照 (左眼)

第27天

图 25

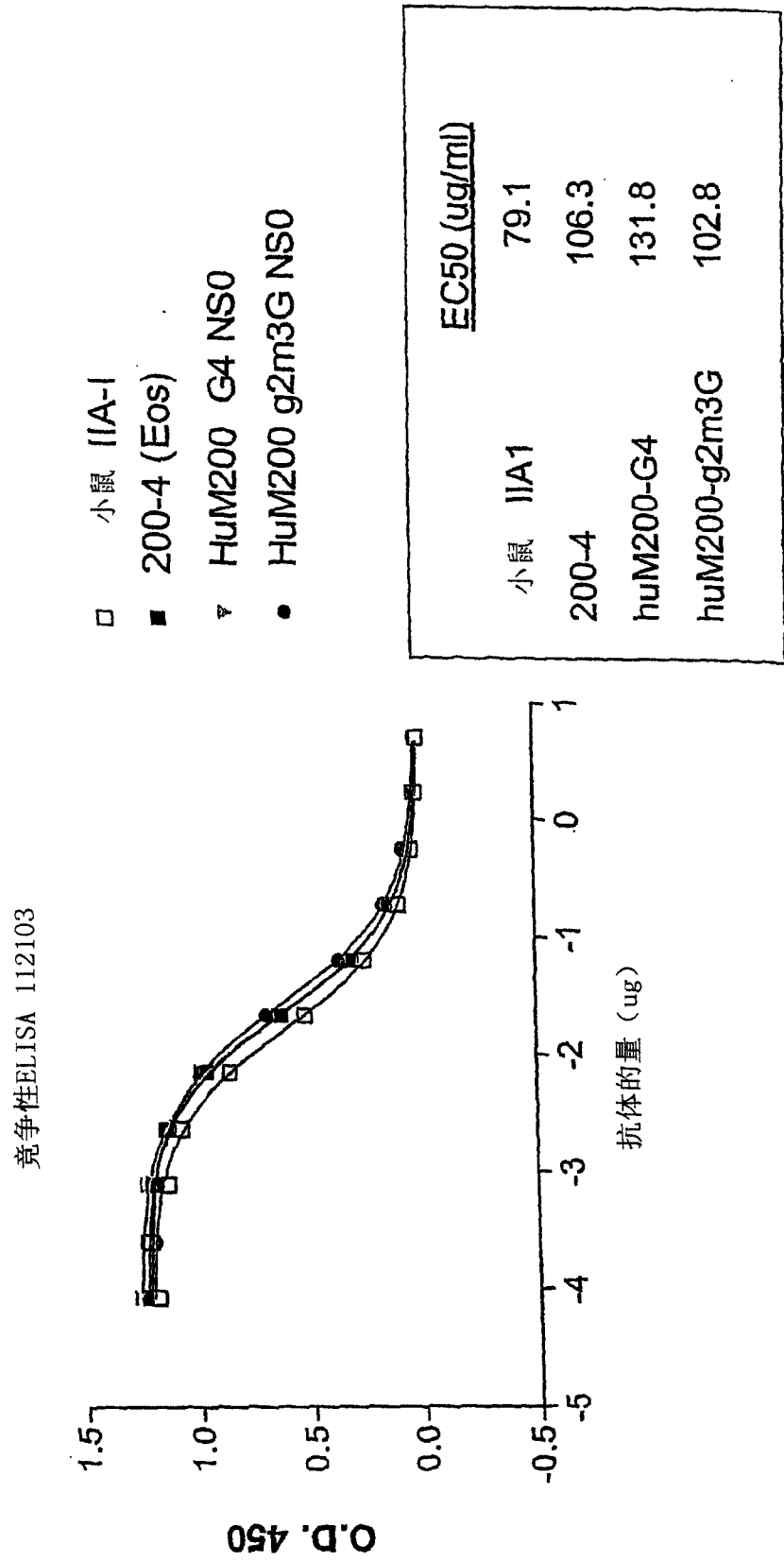


图 26