(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2013 年 1 月 10 日 (10.01.2013)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2013/004076 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/40 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2012/000926

(22) 国际申请日: 2012 年 7 月 5 日 (05.07.2012)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201110186469.5 2011 年 7 月 5 日 (05.07.2011) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **赛诺菲(中国)投资有限公司上海分公司 (SANOFI (CHINA) INVESTMENT CO.,LTD.SHANGHAI BRANCH)** [CN/CN]; 中国上海市南京西路 1266 号恒隆广场 1 号办公楼 31 楼, Shanghai 200040 (CN)。 **上海交通大学 (SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY)** [CN/CN]; 中国上海市东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): **李大伟 (LI, Dawei)** [CN/CN]; 中国上海市闵行区景谷东路 99 弄 8 号楼 1504 室, Shanghai 200240 (CN)。 **武正华 (WU, Zhenghua)** [CN/CN]; 中国上海市闵行区东川路 800 号药学院 6 号楼 307 室, Shanghai 200240 (CN)。 **郭昊 (GUO, Hao)** [CN/CN]; 中国上海市闵行区东川路 800 号药学院 6 号楼 307 室, Shanghai 200240 (CN)。 **朱奇 (ZHU, Qi)** [CN/CN]; 中国上海市闵行区东川路 800 号药学院 6 号楼 307 室, Shanghai 200240 (CN)。 **马绍司 (MASHAUSI, Dhahiri S.)** [TZ/CN]; 中国上海市闵行区东川路 800 号药学院 6 号楼 307 室, Shanghai 200240 (CN)。

(74) 代理人: **北京市柳沈律师事务所 (LIU, SHEN & ASSOCIATES)**; 中国北京市朝阳区北辰东街 8 号汇宾大厦 A0601, Beijing 100101 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
— 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) **Title**: AGR2 BLOCKING ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) **发明名称** : AGR2 阻断抗体及其用途

(57) **Abstract**: Disclosed is an AGR2 blocking monoclonal antibody, and in particular, a humanized monoclonal antibody for blocking AGR2. Also disclosed is a pharmaceutical composition containing the antibody and a method for preparing the same, and a use of the antibody in blocking tumor growth and metastasis.

(57) **摘要**: 本发明公开了一种 AGR2 阻断性单克隆抗体，尤其是一种阻断 AGR2 的人源化单克隆抗体。本发明还公开了包含所述抗体的药物组合物及其制备方法，以及所述抗体用于阻断肿瘤生长和转移的用途。

WO 2013/004076 A1

AGR2阻断抗体及其用途

技术领域

本发明涉及一种遗传免疫及分子生物技术领域的单克隆抗体，具体涉及一种AGR2阻断抗体及其用途。

背景技术

Anterior gradient-2（AGR2）最早在雌激素受体表达的人乳腺癌细胞株中通过differential筛选发现(Kuang, W.W., et al., Nucleic Acids Res, 1998. 26(4): p. 1116-23.)，随后得到全长cDNA克隆，比较后发现与蟾蜍XA-2发育相关蛋白同源并命名为hAG-2（Thompson, D.A. and R.J. Weigel, *hAG-2,* Biochem Biophys Res Commun, 1998. 251(1): p. 111-6.)。AGR2与蛋白二硫化物异构酶（PDI）有较高的同源性(Persson, S., et al.. Mol Phylogenet Evol 2005 36(3): p.734-40.)，并且具有PDI活性(Park, S.W., et al., PNAS, 2009. 106(17): p. 6950-5.)。AGR2有PDI的活性位点“CXXS”，这与正常PDI的位点“CXXC”有所区别，通过其他PDI蛋白的研究表明“CXXS”活性位点具有重拍二硫键的功能，但缺失二硫键的合成功能。这也就意味着AGR2有扰乱正常细胞生长的功能，而缺失回复其功能的能力(Anelli, T., et al., EMBO J, 2002. 21(4): p. 835-44. Anelli, T., et al., EMBO J, 2003. 22(19): p. 5015-22.)。

AGR2是原发性和继发性肿瘤的标识蛋白，并且可在肿瘤患者循环系统中检出，并且与肿瘤的发生和转移密切相关。AGR2具有促进乳腺癌细胞转化和迁移的作用(Liu D, et al. Cancer Res, 2005, 65(9): 3796-3805.)。AGR2可以增加胰腺癌细胞的侵袭能力，从而促进肿瘤转移(Ramachandran V, et al. Cancer Res, 2008, 68(19): 7811-7818.)。AGR2在前列腺癌的转移中起到重要作用(Zhang Y, et al. Cancer Res, 2010,70(1): 240-248.)。直到2010年，Kathryn等提到了用AGR2多克隆抗体可抑制乳腺癌细胞的生长（Kathryn E Vanderlaag, et al. breast canser, 2010,12.)。

发明内容

本发明涉及如下技术方案:

一种特异性结合 AGR2 蛋白的抗体，该抗体能与鼠抗人 AGR2 蛋白单

克隆抗体 18A4 结合基本上相同的 AGR2 蛋白表位。

项 1 所述的抗体，该抗体是鼠抗人 AGR2 单克隆抗体 18A4 或其人源化形式或嵌合形式。

项 1 或 2 所述的抗体，所述表位位于 AGR2 蛋白二硫键异构酶活性结构域。

项 1-4 任一项所述的抗体，所述抗体结合的 AGR2 活性结构域为 CPHS；优选该抗体与 PLMIIHHLDE CPHSQALKKV FA（Seq ID No. 12）所示的必要结合区结合。

上述项任一所述的抗体，包含选自如下的至少一种序列：包含 Seq ID No. 8 所示的重链 CDR1 氨基酸序列，包含 Seq ID No. 9 所示的重链 CDR2 氨基酸序列，包含 Seq ID No.10 所示的重链 CDR3 氨基酸序列，包含 Seq ID No. 11 所示的轻链 CDR1 氨基酸序列，包含 Seq ID No. 12 所示的轻链 CDR2 氨基酸序列和包含 Seq ID No. 13 所示的轻链 CDR3 氨基酸序列。

项 5 所述抗体，其包含：如 DYNMD（Seq ID No.8）所示的重链 CDR1 氨基酸序列，如 DINPNYDTTSYNQKFQG（Seq ID No.9）所示的重链 CDR2 氨基酸序列，如 SM MGYGSPMDY（Seq ID No. 10）所示的重链 CDR3 氨基酸序列，如 RASKSVSTSGYSYMH （Seq ID No. 11）所示的轻链 CDR1 氨基酸序列，如 LASNLES（Seq ID No. 12）所示的轻链 CDR2 氨基酸序列和如 QHIRELPRT（Seq ID No. 13）所示的轻链 CDR3 氨基酸序列。

项 6 所述的抗体，其特征是，所述抗体的重链可变区氨基酸序列如 Seq ID No. 2 所示，所述抗体的轻链可变区氨基酸序列如 Seq ID No. 1 所示。

项 6 所述的抗体，其特征是，所述抗体的重链可变区氨基酸序列如 Seq ID No. 4 所示，所述抗体的轻链可变区氨基酸序列如 Seq ID No. 3 所示。

项 1-8 任一项所述的抗体，其为人源化抗体，优选人源化的完整 IgG1 抗体。

项 1-9 任一项所述的抗体，其为抗体片段，优选为 Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv 片段、线性抗体、单链抗体，更优选为 Fab 片段。

一种药物组合物，包含项 1-10 任一项所述的抗体和可药用载体。

一种分离的核酸，其编码项 1-10 任一项所述的抗体。

一种载体，包含项 12 所述的核酸。

一种宿主细胞，包含项 13 所述的载体。

生产人源化抗体的方法，包括培养项 14 所述的宿主细胞，以便表达所述核酸并产生所述抗体。

项 15 所述的方法，还包括从所述宿主细胞培养物中回收所述抗体。

使用项 1-10 任一项的抗体用于治疗与哺乳动物中的病理性血管生成相关的病症的方法，该方法包括给药所述哺乳动物所述抗体的步骤。

项 17 的方法，其中所述病症是癌症。

项 18 的方法，其中所述癌症选自乳腺癌，卵巢癌、骨肉瘤、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、非小细胞肺癌、肾癌、头颈癌、黑素瘤和多发性骨髓瘤。

项 19 的方法，其中所述治疗包含将第二治疗剂与所述抗体同时或顺序给药的步骤。

项20的方法，所述第二治疗剂选自：抗-血管生成剂、化疗剂和细胞毒剂。

项 1-10 任一项的抗体在制备用于治疗与哺乳动物中的病理性血管生成相关的病症的药物中的用途，优选所述病症是癌症，更优选所述癌症选自乳腺癌，卵巢癌、骨肉瘤、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、非小细胞肺癌、肾癌、头颈癌、黑素瘤和多发性骨髓瘤。

本发明还涉及项1-10任一项的抗体在检测患者组织、细胞样品中的AGR2表达的用途。

本发明还涉及项1-10任一项的抗体在制备检测患者组织、细胞样品中的AGR2表达的试剂、试剂盒或制品中的用途。

本发明涉及杂交瘤细胞株18A4。该杂交瘤细胞株于2009年1月19日保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为CCTCC－C200902，保藏地址为湖北省武汉市武昌珞珈山 武汉大学。

本发明通过上述方法制备得到的抗体与AGR2的结合可采用本领域常规技术，例如ELISA来测定。

所述的制备具体包括以下步骤：

步骤1：杂交瘤细胞培养液的收集。

步骤2：单克隆抗体的纯化。

本发明涉及上述方法制备得到的抗体，可用于阻断AGR2促进肿瘤生长和转移，具体为体外抑制乳腺癌肿瘤细胞的生长速率（相对于正常组织来说

为异常速率）和体外抑制肿瘤细胞转移，进一步为体外抑制乳腺癌肿瘤细胞T47D的生长、迁移和侵袭性转移；可体外抑制乳腺癌肿瘤细胞T47D的细胞周期。

所述的异常生长速率是指超过了正常体内稳态所需和超过了相同来源的正常组织生长速率的生长速率。

所述的抑制或阻断是指：活性效力的减低或消失。

所述的体外抑制乳腺癌肿瘤细胞的生长速率是指：体外肿瘤细胞数目增或减。肿瘤细胞生长的体外调控可通过本领域已知的方法来确定，例如实施例所示的MTT实验。

所述的体外抑制肿瘤细胞转移是指：体外肿瘤细胞迁移和侵袭性转移减缓。肿瘤细胞转移的体外调控可通过本领域已知的方法来确定，例如实施例中所述的肿瘤侵袭小室实验。

附图说明

图1为ELISA检测AGR2特异性。

图2为免疫印迹检测AGR2特异性。A 1.MCF7 细胞裂解液.2. 转染AGR2-pcDNA3的MB-231裂解液；3. 转染pcDNA3的MB-231裂解液；4. 转染AGR2-pcDNA3的293T裂解液；5. 转染pcDNA3的293T。B 单克隆抗体可与鼠AGR2交叉反应。

图3为免疫沉淀检测AGR2特异性

图4为免疫荧光检测AGR2特异性。

图5A和5B描绘了鼠单克隆抗体18A4的轻链可变区(V_L)(图5A)和重链可变区(V_H)(图5B)(分别为SEQ ID NO: 1和2)；人源化18A4Hu1型式的V_L和V_H结构域(分别为SEQ ID NO: 3和4)；及人V_L和V_H共有框架(hum κIII, 轻链κ亚型III; humI, 重链亚型I)(分别为SEQ ID NO: 5和6)的氨基酸序列对比。星号鉴定了人源化18A4Hu1与鼠单克隆抗体18A4之间或人源化18A4Hu1与人共有框架区之间的差异。为了比较，给互补决定区(CDR)加下划线。

图6A和6B描绘了鼠单克隆抗体18A4的轻链可变区(V_L)(图2A)和重链可变区(V_H)(图2B)(分别为SEQ ID NO: 1和2)；人源化18A4Hu1型式的V_L和V_H结构域(分别为SEQ ID NO: 3和4)；及人胚系V_L和V_H共有框架(hum κIII, 轻链κ亚型III; humI, 重链亚型I)(分别为SEQ ID NO: 5和6)以及以相关胚系VL和

VH为模板产生的上市药物的共有序列的氨基酸序列对比。“-”代表与18A4具有相同的氨基酸，“*”代表上市药物变化较大的氨基酸位点，暗示该位点的变化对抗体的亲和力和特异性有较大影响。

图7为完整抗体表达质粒的构建示意图，图中片段2包含有IRES组件，片段1包含启动子，终止子，PolyA尾，抗性基因等常规真核表达质粒所具有的相关组件。

图8为纯化抗体的SDS-PAGE电泳图，M代表标签，标识蛋白大小。1,2,5,6泳道为鼠源样品，3,4,7,8为人源样品，左图为非变性胶，右图为变性胶。染胶试剂为考马斯亮蓝染料。

图9为竞争性ELISA法测定抗体亲和力实验结果。

图10为人源化抗体变体的突变位点比对及潜在T细胞抗原表位数目的变化情况。红色标识为改变的氨基酸序列。

图11为人源化抗体变体的抗原结合曲线。

图12为western-blot法鉴定人源化抗体Agtuzumab种属特性。左图为SDS-PAGE染色结果，右图为以偶联HRP的抗人抗体为二抗的western-blot结果，泳道1,2,3分别为鼠18A4抗体，人IgG对照抗体和人源化抗体Agtuzumab。

图13为western-blot法检测人源化抗体Agtuzumab抗原结合特异性。左图为SDS-PAGE染色结果，右图所用的一抗从做往右分别为转染对照空质粒的上清液，表达Agtuzumab的上清液，抗GST的阴性对照抗体上清液，鼠18A4抗体上清液，抗MBP抗体上清液，抗MBP抗体上清液，转染对照空质粒的上清液，表达Agtuzumab的上清液和抗GST的阴性对照抗体上清液。

图14为western-blot法检测人源化抗体Agtuzumab与细胞裂解液中抗原的结合特异性。左图为SDS-PAGE染色结果，右图泳道1,2,3,4样品分别为转染AGR2质粒的293T细胞，未转染AGR2质粒的293T细胞，MCF-7（有天然AGR2表达）细胞裂解液和纯化的AGR2-MBP。，一抗为人源化抗体Agtuzumab。26KDa的条带为β- actin的条带，用于标识裂解液中蛋白的相对量。

图15为免疫沉淀(IP)法检测人源化抗体Agtuzumab与MCF7细胞中天然AGR2的结合能力。泳道1,2,3分别为MCF7细胞裂解液，经偶联人IgG的protein G IP下来的蛋白和经偶联人源化抗体Agtuzumab的protein G IP下来的蛋白，一抗为抗AGR2的兔单抗，二抗为偶联HRP的兔多克隆抗体。

图16为根据AGR2潜在的抗原表位分析进行突变产生的AGR2-MBP突变体，红色GGG代表该位点被突变为三个甘氨酸。

图17为western-blot法分析鼠18A4和人源化抗体Agtuzumab与AGR2-MBP突变体的结合状况。泳道1至12分别为AGR2-MBP，AGR2-MBP突变体1~10，MBP。

图18为肿瘤侵袭小室实验检测抗体可体外抑制肝癌细胞HepG2侵袭性转移。

图19为MTT法检测抗体可体外乳腺癌细胞T47D、MCF7的生长与迁移。

图20为划痕实验检测抗体可体外乳腺癌细胞T47D的迁移。

图21为肿瘤侵袭小室实验检测抗体可体外抑制肝癌细胞HepG2侵袭性转移。

图22为流式细胞术检测抗体可体外抑制乳腺癌细胞MCF-7和T47D的细胞周期。图22 A. 在本发明抗体处理48h后，检测到乳腺癌细胞T47D细胞周期受到抑制，T47D细胞G1/G0期较对照上升了8.56%，同时S期和G2/M期分别下降了8.56%。图22 B. 在本发明抗体处理48h后，检测到乳腺癌细胞MCF-7细胞周期受到抑制， MCF-7细胞G1/G0期较对照上升了5.37%，同时S期和G2/M期分别下降了5.37%。

图23、24、25为Western blot检测确认抗体结合于AGR2活性位点结构域。

图26 A, B 动物肿瘤生长。C, D 实验组和对照组肿瘤大小比较。E 血管比较。

优选实施方案的详细描述

I. 定义

术语“AGR2”和“人前梯度蛋白2”在本文中可互换使用，指上文所述具有来自人的任何AGR2的全长天然氨基酸序列的分子家族及AGR2所属的PDI超家族，包括潜在形式及前体和成熟AGR2 (“潜在AGR2”)的结合(associated)或未结合(unassociated)复合物。本文所涉及的这类AGR2应理解为指目前鉴定以及将来鉴定形式中的任一种人AGR2种类，包括衍生自任何已知AGR2的序列且与该序列至少约75%，优选至少约80%，更优选至少约85%，仍更优选至少约90%，且甚至更优选至少约95%同源的多肽。术语“*AGR2*”指编码人AGR2的基因。优选的AGR2为天然序列人AGR2。

本文中术语“抗体”使用其最广泛的含义，具体覆盖完整单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体（如双特异性抗体）、和抗体片段，只要它们显示所需生物学活性。

“结合”目的抗原，如AGR2抗原的抗体指能够以足够亲和力结合抗原的抗体，以便该抗体可用作靶向表达该抗原的细胞的治疗剂。如果抗体是结合AGR2的抗体，那么它通常优先结合AGR2，而非AGR家族的其它成员，并且可以是不与这类家族的其它蛋白质，诸如BMP、激活蛋白等发生显著交叉反应的抗体。具有指定抗体，诸如命名为18A4的单克隆抗体的“生物学特性”的抗体指具有所述抗体的一种或多种生物学特性的抗体，它与其它抗体的区别在于它结合相同抗原(如AGR2)。例如，具有18A4的生物学特性的抗体可阻断AGR2的活化和/或结合与18A4所结合的相同AGR2胞外域表位。

术语“单克隆抗体”在用于本文时指由基本上同质的抗体群获得的抗体，即构成群体的各个抗体相同，除了可能的天然存在的突变外，它们通常以极少量存在。单克隆抗体是高度特异的，即针对单一抗原位点。另外，与包含针对不同决定簇（表位）的不同抗体的多克隆抗体制品不同，每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性以外，单克隆抗体的优越性体现在可以合成它们而不受其它抗体的污染。修饰语“单克隆”指示抗体由基本上同质的抗体群获得的特征，并不解释为需要通过任何特定方法来生产抗体。

除非另有说明，本申请“单克隆抗体18A4”指具有下文实施例中鼠18A4抗体的抗原结合残基或衍生自下文实施例中鼠18A4抗体的抗体。例如，单克隆抗体18A4可以是鼠单克隆抗体18A4或其变体，诸如具有鼠单克隆抗体18A4的抗原结合氨基酸残基的人源化抗体18A4。下文实施例2中提供了人源化18A4抗体的实例。

“表位18A4”为AGR2胞外域中单克隆抗体18A4所结合的区域。为了筛选结合18A4表位的抗体，可进行常规交叉阻断试验，诸如Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow和David Lane(1988)中所述。

本文中的单克隆抗体明确包括“嵌合”抗体，其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗

体中的相应序列相同或同源，以及这类抗体的片段，只要它们显示所需生物学活性。

“完整”抗体为包含抗原结合可变区以及轻链恒定区(C_L)和重链恒定区C_H1、C_H2和C_H3的抗体。恒定区可以为天然序列恒定区(例如人天然序列恒定区)或其氨基酸序列变体。优选的是，完整抗体具有一种或多种效应器功能。

“抗体片段”包含完整抗体的一部分，优选包含其抗原结合或可变区。抗体片段的例子包括Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv片段、线性抗体、单链抗体。

“Fv”片段是包含完整的抗原识别和结合位点的抗体片段。此区域由一个重链的和一个轻链的可变区紧密连接的二聚体组成，该连接(如在 scFv 中)可以是共价的。在此构型中，每个可变区的三个 CDR 相互作用来限定 V_H-V_L 二聚体表面上的抗原结合位点。

“Fab”片段包括轻链的可变区和恒定区以及重链的可变区和第一恒定区(CH1)。$F(ab')_2$ 抗体片段包含一对 Fab 片段，其通常在它们的羧基末端附近通过它们之间的铰链半胱氨酸来共价连接。抗体片段的其它化学偶联法也是本领域已知的。

“单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 VH 和 VL 结构域，其中这些结构域存在于单条多肽链中。通常，Fv 多肽还包含 VH 和 VL 结构域之间的多肽接头，该接头使 scFv 形成结合抗原的理想结构。

术语“线性抗体”包含成对的串联 Fd 节段(V_H-C_H1-V_H-C_H1)，它与互补轻链多肽一起形成成对的抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的或单特异性的。

本文所用的术语“抗体可变区”指抗体分子的轻链和重链的部分，其包括互补决定区(CDRs: 即 CDR1, CDR2 和 CDR3)和框架区(FRs)的氨基酸序列。V_H 指重链的可变区。V_L 指轻链的可变区。根据本发明所用方法，CDRs 和 FRs 指定的氨基酸位点可以通过 Kabat 等（Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中描述的编号系统）来限定。

本文所用的术语“互补决定区”(CDRs: 即 CDR1, CDR2 和 CDR3)指抗体可变区的氨基酸残基，其存在对于抗原结合是必需的。每个可变区通常具有鉴定为 CDR1，CDR2 和 CDR3 的三个 CDR 区。每个互补决定区可包含来自 Kabat 所限定的“互补决定区”的氨基酸残基(即大约为轻链可变区中的残基

24-34(L1)，50-56(L2)和 89-97(L3)以及重链可变区中的 31-35(H1)，50-65(H2)和 95-102(H3)。

“框架区”(后文是 FR)是 CDR 残基之外的那些可变区残基。每个可变区通常具有鉴定为 FR1, FR2, FR3 和 FR4 的四个 FR。如果所述 CDR 根据 Kabat 来限定，轻链 FR 残基大致位于残基 1-23(LCFR1)，35-49(LCFR2)，57-88(LCFR3)，和 98-107(LCFR4)，并且重链 FR 残基大致位于重链残基的残基 1-30 (HCFR1)，36-49 (HCFR2)，66-94 (HCFR3)，和 103-113 (HCFR4)。如果所述 CDR 包含来自高变环的氨基酸残基，轻链 FR 残基大致位于轻链中的残基 1-25(LCFR1)，33-49 (LCFR2)，53-90 (LCFR3)，和 97-107 (LCFR4)，且重链 FR 残基大致位于重链残基的残基 1-25(HCFR1)，33-52(HCFR2)，56-95(HCFR3)，和 102-113(HCFR4)。有些情况下，当 CDR 包含来自根据 Kabat 限定的 CDR 和高变环的那些氨基酸时，FR 残基会相应调节。例如，当 CDRH1 包括氨基酸 H26-H35 时，重链 FR1 残基在位点 1-25 且 FR2 残基在位点 36-49。

“T细胞抗原表位”（ T cell epitope）用于本文是指单克隆抗体本身作为蛋白质抗原时可被MHC分子结合和提呈，并被T细胞抗原受体所识别的可能肽段。单克隆治疗抗体所含的这些肽段会增加患者对治疗抗体的免疫反应。这些肽段数量越多，引起免疫反应的几率越高。

非人（如啮齿类）抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在极大程度上，人源化抗体指人免疫球蛋白（受体抗体）中的高变区残基用具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种（供体抗体）诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中，将人免疫球蛋白的构架区（FR）残基用相应的非人残基替换。而且，人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有发现的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。通常，人源化抗体将包含基本上不少于至少一个、通常两个下述可变区，其中所有或基本上所有的高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环，且所有或基本上所有的FR是人免疫球蛋白序列的FR。任选的是，人源化抗体还将包含至少部分的免疫球蛋白恒定区（Fc），通常是人免疫球蛋白的恒定区。

“抗-血管生成剂”或“血管生成抑制物”指直接或间接抑制血管生成、脉管生成、或不理想的血管渗透性的小分子量物质、多核苷酸、多肽、分离的蛋

白质、重组蛋白质、抗体、或其偶联物或融合蛋白质。应理解抗-血管生成剂包括那些结合和阻断血管生成因子或其受体的血管生成活性的制剂。文献*Oncogene*, 22:6549-6556 (2003)中表2列出了已知的抗血管生成因子。文献Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003) 中的表1列出了临床试验中使用的抗-血管生成剂。

术语"异常血管生成"造成疾病状态恶化或导致患病状态的、过度的、不当的或失控血管生成，所述疾病状态例如癌症，尤其是有血管生成的实体瘤和转移瘤。

本文所用术语"细胞毒剂"是指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语意在包括放射性同位素，化疗剂和毒素。

"化疗剂"是在癌症治疗中使用的化学化合物，也称为抗肿瘤药物。抗肿瘤药一般根据药物化学结构和来源不同，分为：烷化剂、抗代谢药、抗肿瘤抗生素、蒽环环类抗生素、抗肿瘤植物药、激素。根据药物作用的周期或时相特异性不同，可将肿瘤化疗药分为：(1)细胞周期非特异性药物(cell cycle nonspecific agents , CCNSA) 烷化剂、抗肿瘤抗生素及铂类配合物等；(2) 细胞周期特异性药物(cell cycle specificagents， CCSA) 抗代谢药物，长春类药物等。

II. 人源化抗AGR2抗体的生产

本领域已经描述了用于将非人抗体人源化的方法。优选的是，人源化抗体具有从非人来源引入的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称为"输入"残基，它们通常取自"输入"可变区。人源化可本质上遵循Winter及其同事的方法进行(Jones等, Nature, 321: 522-525(1986); Riechmann等, Nature, 332: 323-327(1988); Verhoeyen等, Science, 239: 1534-1536 (1988))，通过用高变区序列替换人抗体的相应序列。因此，这类"人源化"抗体是嵌合抗体（美国专利4,816,567），其中基本上少于整个人可变区用来自非人物种的相应序列替换。在实践中，人源化抗体通常是其中一些高变区残基和可能的一些FR残基用来自啮齿类抗体中类似位点的残基替换的人抗体。

用于制备人源化抗体的人可变区的选择，包括轻链和重链，对于降低抗原性非常重要。根据所谓的"最适(best-fit)"方法，用啮齿类抗体可变区序列对已知的人可变区序列的整个文库进行筛选。然后选择与啮齿类最接近的人

序列作为人源化抗体的人框架区(FR)(Sims等, J. Immunol., 151: 2296(1993); Chothia等, J. Mol. Biol., 196: 901(1987))。另一种方法使用由特定轻链或重链亚群的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架区。同一框架可用于几种不同的人源化抗体(Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta等, J. Immunol., 151: 2623(1993))。

制备人源化抗体重要的是，抗体在人源化后能保持对抗原的高亲和力以及其它有利的生物学特性。下文的实施例描述了结合AGR2的例示性人源化抗AGR2抗体的生产。

本文的人源化抗体包含掺入人重链可变区的非人高变区残基，且在选自第57、58、60、65、67、68和/或70位上包含框架区(FR)取代，其中使用了Kabat等(Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)描述的编号系统描述的可变区编号。在一个实施方案中，所述人源化抗体包含在选自第57、58、60、65、67、68和70位置上的两个或多个位置上的FR取代；而在其它实施方案中，所述人源化抗体包含在选自第57、58、60、65、67、68和70位置上的三个或四个位置上的FR取代。在优选的实施方案中，所述人源化抗体包含第65、67、68和70位置上的、或第67、68和70位置上的、或第68和70位置上的FR取代。在另外的优选在实施方案中，所述人源化抗体包含第57、58和60位置上的、或第57和60位置上的FR取代。本发明的人源化抗体优选存在较少而非较多框架取代以便将免疫原性降至最低，但功效也是一个很重要的考虑因素。实际取代的氨基酸优选为那些保守以便不改变免疫原性或功效的氨基酸。57位上的天冬酰胺(N)优选改变为丝氨酸（S），58位上的亮氨酸（L）优选改变为精氨酸（R），60位上的丝氨酸（S）优选改变成苏氨酸（T），65位上赖氨酸（K）优选改变成谷氨酰胺（Q），67位上赖氨酸（K）优选改变成精氨酸（R），68位上丙氨酸（A）优选改变成缬氨酸（V），而70位上亮氨酸优选改变成蛋氨酸（M）。

本文关注的例示性人源化抗体包含重链可变区互补决定残基DYNMD（SEQ ID NO: 8）；DINPNYDTTS YNQKFKG或DINPNYDTTS YNQKFQG（SEQ ID NO: 9）；和/或SMMGYGSPMD Y（SEQ ID NO: 10），任选包含这些CDR残基的氨基酸修饰，例如其中这些修饰基本上维持或改善抗体的亲和力。例如，所关注的抗体变体可以在上述重链可变区CDR序列中带有约1－5

个氨基酸、约1－4个氨基酸、约1－3个氨基酸、约1－2个氨基酸取代。可以通过例如亲和力成熟来制备这类抗体变体。优选的是，所述人源化抗体重链可变区包含互补决定残基DYNMD （SEQ ID NO: 8）; DINPNYDTTS YNQKFKG 或 DINPNYDTTS YNQKFQG （SEQ ID NO: 9）和SMMGYGSPMD Y（SEQ ID NO: 10）中的两种、最优选所有三种CDR序列。最优选的人源化抗体包含SEQ ID NO:4的重链可变区氨基酸序列。

本发明的人源化抗体可包含轻链可变区互补决定残基RASKSVSTSG YSYMH (SEQ ID NO: 11); LASNLES (SEQ ID NO: 12); 和/或QHIRELPRT (SEQ ID NO: 13)。在优选的实施方案中，在上述段落中的那些重链可变区CDR残基以外还包括该处描述的轻链可变区互补决定残基。这类人源化抗体任选包含上述轻链CDR残基的氨基酸修饰，例如其中这些修饰基本上维持或改善抗体的亲和力。例如，所关注的抗体变体可以在上述轻链可变区CDR序列中带有约1－5个氨基酸、约1－4个氨基酸、约1－3个氨基酸、约1－2个氨基酸取代。可以通过亲和力成熟来制备这类抗体变体。优选的是，本发明的人源化抗体的轻链可变区包含互补决定残基RASKSVSTSG YSYMH (SEQ ID NO: 11); LASNLES (SEQ ID NO: 12)和QHIRELPRT (SEQ ID NO: 13)中的两种、最优选所有三种CDR序列。最优选的人源化抗体包含SEQ ID NO: 3所示的轻链可变区氨基酸序列。

本申请还关注结合AGR2的亲和力成熟抗体。亲本抗体可以是人抗体或人源化抗体，例如分别包含轻链和/或重链可变区序列SEQ ID NO: 3和4的抗体(即型式(version)5)。亲和力成熟抗体优选以优于鼠抗AGR2单克隆抗体18A4或其变体5的亲和力结合AGR2(例如根据使用AGR2胞外域(ECD)的ELISA的评估，亲和力提高了例如约2倍或约4倍－约100倍或约1000倍)。

本发明涵盖结合AGR2的人源化抗体或其亲和力成熟抗体的多种形式。例如，人源化抗体或亲和力成熟抗体可以为抗体片段，诸如Fab，任选偶联一种或多种胞毒剂以便生成免疫偶联物。或者，人源化抗体或亲和力成熟抗体可以为完整抗体，诸如完整IgG1抗体。

III. 载体、宿主细胞和重组方法

本发明还提供了编码人源化抗AGR2抗体的分离的核酸、包含所述核酸的载体和宿主细胞以及用于生产所述抗体的重组技术。

为了重组生产抗体，分离编码它的核酸，并将其插入可复制载体，用于进一步克隆（DNA扩增）或表达。可以使用常规流程容易的分离编码单克隆抗体的DNA并测序（如使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异结合的寡核苷酸探针）。可以获得许多载体。载体构件通常包括但不限于下列一种或多种：信号序列、复制起点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

(i) 信号序列构件

不仅可以直接重组生产本发明的抗 AGR2 抗体，而且可以作为与异源多肽的融合多肽，所述异源多肽优选在成熟蛋白质或多肽的 N-末端处带有特异性切割位点的信号序列或其它多肽。优选受到宿主细胞识别并加工（即受到信号肽酶切割）的异源信号序列。例如，为了酵母分泌，可以用例如酵母转化酶前导序列、α-因子前导序列。在哺乳动物细胞表达中，可以利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列，例如单纯疱疹 gD 信号。

将这类前体区的 DNA 连接到编码抗 AGR2 抗体的 DNA 的读码框中。

(ii) 复制起点构件

表达和克隆两种载体都含有能够使载体在一种或多种选择的宿主细胞中复制的核酸序列。一般来说，在克隆载体中，这种序列为能够使载体不依赖于宿主染色体DNA复制的序列，包括复制起点或自主复制序列。众所周知多种细菌、酵母和病毒的这类序列。

(iii) 选择基因构件

表达和克隆载体可以含有选择基因，也称为选择标记。典型的选择基因编码如下蛋白质：(a)赋予抗生素或其它毒素抗性，如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素；(b)补足营养缺陷；或(c)提供不能由复合培养基获得的关键营养物，例如编码芽孢杆菌 D-丙氨酸消旋酶的基因。

(iv) 启动子构件

表达和克隆载体通常含有受到宿主生物体识别的启动子，且与编码抗 AGR2 抗体的核酸可操作连接。

(v) 增强子元件构件

常常通过在载体中插入增强子序列来提高高等真核细胞对编码本发明抗 AGR2 抗体的 DNA 的转录。已知来自哺乳动物基因的许多增强子序列。然而，通常使用来自真核细胞病毒的增强子。

(vi) 转录终止构件

用于真核宿主细胞的表达载体还将含有终止转录和稳定 mRNA 所必需的序列。这类序列通常可以由真核或病毒 DNA 或 cDNA 非翻译区的 5'端和偶尔的 3'端获得。这些区域含有在编码抗 AGR2 抗体的 mRNA 的非翻译部分中转录成聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。

(vii) 宿主细胞的选择和转化

适于克隆或表达本文载体中的DNA的宿主细胞是上文描述的原核生物、酵母或高等真核细胞。适于此目的的原核生物包括真细菌，诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体。除了原核生物以外，真核微生物，诸如丝状真菌或酵母也是编码抗AGR2抗体的载体的合适克隆或表达宿主。

适用于表达糖基化抗AGR2抗体的宿主细胞衍生自多细胞生物体。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。诸如草地夜蛾*Spodoptera frugiperda*等宿主。

然而，脊椎动物细胞是人们最感兴趣的，而且培养（组织培养）中脊椎动物细胞的繁殖已经成为常规流程。有用哺乳动物宿主细胞系的实例是用SV40转化的猴肾CV1系、人胚肾系、幼仓鼠肾细胞、CHO细胞、DG44细胞、DP12细胞系等。

为了生产抗 AGR2 抗体，用上文所述表达或克隆载体转化宿主细胞，并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当改动的常规营养培养基中进行培养。

(viii) 宿主细胞的培养和抗 AGR2 抗体的纯化

可以在多种可商购的培养基，例如 RPMI-1640（Sigma）、Dulbecco 氏改良的 Eagle 氏培养基（DMEM，Sigma）中培养用于生产本发明抗 AGR2 抗体的宿主细胞。而且还可以根据需要向这些培养基中添加激素和/或其它生长因子、盐、缓冲剂、抗生素、痕量元素和葡萄糖等本领域技术人员知道的必需补充物。培养条件诸如温度、pH 等可根据所选择的宿主细胞做适当调整，这对本领域普通技术人员而言是容易做到的。

在使用重组技术时，可以在细胞内或在周质空间中生成抗体，或者直接分泌到培养基中。如果在细胞内生成抗体，那么作为第一步，通过例如离心或超滤清除宿主细胞或裂解片段的微粒碎片。如果将抗体分泌到培养基中，那么通常首先使用商品化蛋白质浓缩滤器浓缩来自这类表达系统的上清液。

在任何上述步骤中，可以包括蛋白酶抑制剂来抑制蛋白水解，而且可以包括抗生素来防止外来污染物的生长。

可以使用例如羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析（优选的纯化技术是亲和层析）来纯化由细胞制备的抗体组合物。蛋白 A 作为亲和配体的适宜性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白 Fc 结构域的种类和同种型。根据待回收的抗体，也可使用其它蛋白质纯化技术诸如反相 HPLC、阴离子或阳离子交换层析、SDS-PAGE 和硫酸铵沉淀等等。

IV. 药用制剂

制备依照本发明使用的抗体的治疗用制剂，即将具有所需纯化程度的抗体与任选的制药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合，以冻干制剂或水溶液的形式贮存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的，这对本领域技术人员而言是显而易见的。

本文中的制剂还可包含所治疗具体适应症所需的超过一种活性化合物，优选那些活性互补且彼此没有不利影响的化合物。所述活性化合物例如，可以是化疗剂、细胞毒剂和/或抗血管发生剂等。

V. 制品和试剂盒

在本发明的另一个实施方案中，提供了装有可用于治疗本发明所述病症的抗体或其药物组合物的制品和试剂盒。该产品包含一种容器及贴在容器上或单独放在所述产品包装中的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶子、小管、注射器等。所述容器可以用各种材料诸如玻璃或塑料制成。该容器装有有效治疗本发明所述病症的药物组合物。所述标签或包装插页表明该组合物用于治疗所述疾患，诸如癌症，例如乳腺癌(例如转移性乳腺癌)、前列腺癌、肺癌(例如非小细胞肺癌)、结肠直肠癌等。

此外，所述产品可以包括：(a) 其中装有组合物的第一容器，其中所述组合物包含本文的单克隆抗体，优选人源化的单克隆抗体；和(b) 其中装有组合物的第二容器，其中所述组合物包含人源化抗体以外的治疗剂。本发明该实施方案的产品还可包括表明所述第一和第二组合物可联合用于治疗诸如癌症的包装插页。或者/另外，所述产品还可包括第二(或第三)容器，其中装有制药学可接受的缓冲剂，诸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水。

它还可包括商业和使用者观点来看所需的其它物质。

VI. 使用抗AGR2单克隆抗体的治疗

本发明关注的是抗 AGR2 抗体可用于治疗肿瘤，例如乳腺癌，胰腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌，非小细胞肺癌，肾癌，肝癌，头颈癌，黑素瘤，卵巢癌和多发性骨髓瘤等等。

可以将其它治疗方案与抗AGR2抗体的施用联合。联合施药包括使用分开的制剂或单一药物制剂的共同施药，和按照任一次序依次施药，其中优选存在一段时间所有两种(或多种)活性剂同时发挥其生物学活性。

在一个优选的实施方案中，用两种不同的抗AGR2抗体治疗患者。在另一实施方案中，将一种或多种抗AGR2抗体的施用与针对另一种肿瘤相关抗原的抗体的施用联合。在另一实施方案中，AGR2抗体可以与起抑制血管发生作用的抗血管发生剂联合。

在一个实施方案中，本发明的治疗包括联合施用抗 AGR2 抗体(一种或多种)与一种或多种哺乳动物免疫功能调节剂，诸如细胞因子，以及化疗剂或生长抑制剂，包括共同施用不同化疗剂的混合物。优选的化疗剂包括紫杉烷类(诸如紫杉醇和多西他赛)和/或蒽环类抗生素。可以按照制造商的说明或如本领域技术人员根据经验的决定使用这类化疗剂的制剂和给药方案。

任何上述与本发明抗体联合施用的药物的合适剂量可以是其常规治疗情况下所使用的剂量，也可以因与本发明抗AGR2抗体的联合适用而使其使用的剂量降低。

本发明抗体的合适剂量可根据疾病的类型和严重程度从约1μg/kg－15mg/kg适当调整，可以通过例如一次或多次分开的方式施药，还可以连续输注。典型的日剂量可以在约1μg/kg－100mg/kg，这取决于治疗的目的、先前的疗法、患者的临床病史和对抗体的反应以及主治医师的判断。

VII. 抗AGR2单克隆抗体的检测用途

本发明的抗体(例如人源化抗AGR2抗体)还具有非治疗性应用。例如抗AGR2单克隆抗体还可以用于检测AGR2蛋白质在具体细胞、组织或血清中的表达。

就诊断应用而言，一般可用检测部分，例如放射性同位素、荧光标记物、

或酶-底物标记物对抗体进行标记。本领域技术人员了解实现这一目的的各种技术。例如，可以将抗体与生物素偶联，或者，将抗体与小分子半抗原(例如地高辛)偶联。

本发明的抗体可以用于任何已知测定方法，诸如竞争性结合测定、直接和间接夹心式测定、和免疫沉淀测定法。

为便利起见，可以在试剂盒中提供本发明的抗体，即预定量的试剂与用于进行诊断试验的说明书的包装组合。如果用酶标记抗体，那么试剂盒将包括酶所需的底物和辅因子(例如提供可检测发色团或荧光团的底物前体)。此外，可以包括其它添加剂，诸如稳定剂、缓冲剂(例如封闭缓冲剂或裂解缓冲剂)等。各种试剂的相对量可以广泛改变以便提供实质性优化试验灵敏度的试剂在溶液中的浓度。具体而言，可以将这些试剂作为干粉提供，通常为冻干的，它们包括在溶解时提供具有合适浓度的试剂溶液的赋形剂。

实施例

实施例1：单克隆抗体18A4的生产和鉴定

A. 杂交瘤细胞培养液的收集

用RPMI-1640培养液（含10%牛血清，1%抗生素）连续培养细胞3天，使细胞量保持80%并确保细胞在对数生长期，用PBS洗涤，换为不含血清的RPMI-1640培养液培养48小时后收集上清。

B. 单克隆抗体的纯化

采用Protein-G免疫亲和层析法按照Pierce Protein G Agarose (20399)说明书纯化抗体。简要步骤如下：从4℃冰箱取出柱材料及所有的试剂，在室温放置，使其温度达到室温；温和混匀柱材料，取2ml 50%柱材料混悬液装入柱子，注意不要有气泡；加入5ml 结合缓冲液平衡柱子；样品先通过0.45μm滤膜过滤的方法去除杂质，然后用结合缓冲液：样品的比例为1:9稀释样品，使样品的盐浓度及pH值符合结合要求；将稀释的样品上柱，上样总量在最大结合能力（5 mg mouse IgG/ml柱材料）的80% 以下可做到最大结合，否则流出液中会含有抗体，使用5ml洗脱缓冲液洗脱所需的抗体，1ml/管收集，收集前在管中加入100μl 1M磷酸或Tris中和液，考马斯亮蓝G-250法测定各管蛋白浓度。混合蛋白浓度高的样品，使用PBS（磷酸盐缓冲液）进行透析改

变溶液体系，使用12ml洗脱缓冲液再生柱子。

实施例2：单克隆抗体效价检测

ELISA 检测抗体效价步骤如下：包被酶表板100 μl/孔（抗原浓度3ug/ml，若免疫原为融合蛋白，标签蛋白也需包被），4 ℃过夜或37 ℃孵育2 h，倒去液体、倒扣平板、拍干。封闭：加200 μl/孔封闭液，4 ℃过夜或37 ℃ 2 h，倒去液体、倒扣平板、拍干。加待测样品100 μl/孔（稀释倍数：10^2、10^3、10^4、10^5、10^6。阳性、阴性对照稀释1000倍，100 μl/孔），37 ℃孵育半小时或4 ℃过夜，倒去液体、倒扣平板、拍干。洗涤缓冲液洗涤3×3min，拍干。加二抗：二抗用封闭缓冲液稀释1：10000，100 μl/孔，37 ℃ 20 min，洗涤缓冲液洗涤3×3min，拍干。显色：加底物100 μl/孔 ，显色至充分变暗。 终止：加终止液100μl，然后读取该板在450nm处的吸光度。该板拍照记录，见图1，表明该抗体的效价达到10^6以上。

实施例3：单克隆抗体的特异性

A. 免疫印迹检测：

细胞裂解前用1 × PBS洗涤2次，加10ml PBS，将细胞刮下。1000rpm，离心5min，弃上清。加入细胞5倍体积的NP40裂解液（加蛋白酶抑制剂），混匀，裂解20min；肿瘤组织用5倍体积的NP40裂解液（加蛋白酶抑制剂），混匀，裂解20min。15000rpm，4℃，离心1min，收取上清，蛋白定量（以上裂解操作都是在冰上完成）。5×PAGE 蛋白加载缓冲液(protein loading buffer)（加β - 巯基乙醇） 悬浮沉淀，95℃加热5min。用15 % SDS-PAGE 琼脂糖凝胶分离蛋白，恒压80 V，电泳2 h，使蛋白分开。将蛋白电转移至硝酸纤维素膜上，400 mA，45min，用5 % 牛血清白蛋白室温封闭1 h。一抗室温杂交2 h，1 ×PBST 洗3×10 min。一抗稀释倍数：兔源AGR2抗体 1:10000，β-actin 1:2000。二抗室温杂交1 h，1 × PBST 洗3×10 min。曝光显影扫描结果。

结果表明：单克隆抗体可检测到T47D、转染AGR2-pcDNA3的293T细胞中的AGR2的表达，而转染pcDNA3的293T细胞检测不到AGR2的表达。见图2。

B. 免疫沉淀

样品准备：将0.2 ml protein G (50% slurry Protein G Agarose from Pierce)

加入盛有10 ml PBS的离心管中，混匀，RT，30 min。1500 rpm，离心2 min，去上清 10 ml。加入含抗体(图3所示抗体，同型IgG作为对照抗体)培养基10 ml，混匀。摇床，RT >2hr或4℃过夜。 离心去上清。用10ml PBS洗两次。将与抗体结合的蛋白G珠（Protein G beads） 转入1.5 ml离心管。加PBS 至0.2 ml. 4℃备用。收集T47D、MCF7细胞上清（24小时）20ml，分为两管，每管10ml。一管用结合有本发明抗体抗体的蛋白G做免疫沉淀，去除AGR2，一管用结合有对照抗体的蛋白G作为对照。RT >2hr或4℃过夜，离心，收集上清再重复一次免疫沉淀。用PBS 1ml 洗4次。5×PAGE蛋白加载缓冲液(加β-巯基乙醇) 悬浮沉淀，95℃，5min。免疫印迹检测效果。

结果表明：单克隆抗体可通过免疫沉淀检测到T47D、MCF7上清中的AGR2，见图3。

C. 免疫荧光检测:

将圆形盖玻片放入24孔板中，PBS润洗一次。再用相应的培养基浸润，吸干培养基。将T47D、MCF7细胞胰酶消化转入到24孔板。细胞贴壁后，吸掉培养液，PBS洗涤1次。4 %甲醛室温固定10-20分钟，PBS洗涤1次。0.5% TritonX-100，0.3%羊血清室温40分钟。加一抗，4 ℃，过夜，PBS 洗涤3×5min。加荧光二抗，室温，30 min，PBS洗涤3×5min。 DAPI 染色2-5min，PBS洗涤2×5min。封片观察用荧光显微镜观察。

结果表明：单克隆抗体可检测到乳腺癌细胞 T47D、MCF7细胞内的原位AGR2的表达，见图4。

实施例4：人源化18A4抗体的制备

首先将鼠单克隆抗体18A4的可变区克隆到能够产生小鼠/人嵌合抗体的载体中。使用STRAGENE™ RNA提取试剂盒，按照制造商的方案从杂交瘤细胞中分离总RNA。通过RT-PCR扩增可变区，凝胶纯化，并如先前所述插入基于pUC119，含有人κ恒定区和人CH1结构域的质粒的衍生物。将所得质粒转化到大肠杆菌菌株DH5α中以获得质粒。抽提质粒并对其进行测序，获得鼠18A4单克隆抗体重链和轻链的可变区序列（SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2）。

对获得的18A4抗体序列进行比对分析，以同源性最高的人抗体胚系基因IGHV1-46*03和IGKV3-20*02为模板，基于对18A4三维结构的模拟分析和

以IGHV1-46*03和IGKV3-20*02为模板的上市抗体药物序列的分析，获得理论抗体序列18A4Hu1的重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列，序列比对结果如图5和图6。根据理论序列应用重叠PCR方式合成抗体V区，并通过重叠PCR的方法将合成的人源化抗体重链可变区和人源化抗体轻链可变区连接入基于pGmax的含有人IgG1重链恒定区和人轻链Kappa恒定区的抗体表达质粒中，完整抗体表达质粒构建见图7(序列为SEQ ID NO: 7)。

构建成功的18A4Hu1抗体表达质粒转染293T细胞进行真核表达，具体来说，将2mg/ml的PEI与表达质粒以3:1（w: w）比例混合后作为转染液转染293T细胞，6小时后换成含10%血清的DMEM培养基培养12小时，再更换为无血清培养基，培养4天，收取上清，从而获得抗体。

对获得的抗体上清进行分离纯化，具体来说，通过蛋白 A 对上清液进行亲和层析，对分离的含抗体的洗脱液进行透析，从而获得纯抗体18A4Hu1，用A280吸光法或考马斯亮蓝法测定纯化抗体浓度。对纯化的抗体进行SDS-PAGE电泳分析，进一步确定其纯度（见图8）。

对产生的人源化抗体18A4Hu1进行亲和力分析，并与鼠18A4抗体进行比较，具体来说，用3ng/ul浓度的抗原AGR2进行包板（96孔酶标板），每孔100ul，用封闭液封闭。将浓度为0.1ng/ul浓度的抗体与不同浓度的抗原等体积混合并37度孵育过夜，抗原浓度从1000nM起倍比稀释。将100ul孵育后的混合液分别加入不同的酶标孔中，37度孵育1小时，洗涤酶标板后加入抗人或抗鼠的HRP标记的二抗，37度孵育1小时，加入显色液A和B各80ul，37度显色30min，加50ul终止液终止，OD450处测吸光值，绘制亲和力曲线图并计算抗体亲和力。鼠抗体18A4和人源化抗体18A4Hu1的亲和力曲线如图9。

通过对人源化抗体18A4Hu进行T细胞抗原表位分析，对个别氨基酸进行人源化替代，产生多种人源化变体（变体信息如图10），并对人源化变体的抗原结合能进行比较，从而选出抗原表位更少而亲和力更高的人源化抗体，例如称为Agtuzumab的抗体，见图11所示。

对产生的人源化抗体Agtuzumab进行特性鉴定。通过用抗人二抗对Agtuzumab的种属特性进行分析，确认Agtuzumab为人源化抗体(如图12) 。通过western-blot分析Agtuzumab的抗原特异性，确认其可以和表达纯化的AGR2-MBP蛋白特异性结合(如图13)，确认其可以与表达AGR2的细胞MCF7裂解液中的AGR2结合（如图14），确认其可以和天然状态下的AGR2结合并

能够通过免疫沉淀（IP）的方法检测到MCF7上清中的天然分泌型AGR2（如图15）。

对AGR2进行抗原表位分析并对潜在的多个抗原表位氨基酸位点分别进行突变（突变信息如图16），用AGR2突变体作为抗原，18A4和Agtuzumab作为一抗，通过western-blot进行抗原表位分析，图17显示18A4和人源化抗体Agtuzumab具有一致的抗原表位。

通过竞争性ELISA法测定和比较Agtuzumab的亲和力状况，图9显示Agtuzumab的亲和力与鼠18A4亲和力相近，且略高于18A4Hu1，具有更高的亲和力和更低的潜在抗原性。

通过肿瘤转移实验，证明人源化抗体Agtuzumab同18A4一样，具有抑制HepG2转移的生物学功能，见图18

实施例5：体外抑制肿瘤细胞生长的实验

MTT法检测方法如下：MCF-7、T47D细胞株用相应的细胞培养液传代培养至对数生长期(至少传两代，每代生长至80%汇合)，经胰酶-EDTA液消化，调整细胞终浓度为5×10^3—5×10^4 /ml，接种于96孔板中，每孔200μl。查看每孔细胞是否均匀分布。待细胞贴壁后，每种细胞分别加入不含抗体 、含有20μg/ml本发明抗体和20μg/ml 对照抗体IgG的培养基。48h后，每孔加入浓度为5mg/ml的MTT溶液20μl。 继续温孵4 h后，弃去96孔板上各孔中原有液体，每孔再加入DMSO 150μl以溶解formazan沉淀。室温下放置0.5 h后，在脱色摇床上振荡10分钟，用酶标仪在490 nm波长下测定各孔的吸光值。

结果表明：单克隆抗体在体外抑制了T47D细胞和MCF-7细胞的生长。见图19：本发明抗体及对照抗体IgG浓度均为20μg/ml。

实施例6：体外抑制肿瘤细胞迁移的实验

划痕实验步骤如下：将乳腺癌细胞T47D、卵巢癌细胞SKOV3，骨肉瘤细胞U2OS，小鼠成纤维细胞3T3铺入6孔板（细胞70%汇合），待其长满后用窄的细胞刮板划掉中间的细胞，用1 × PBS洗两次，洗掉刮下的细胞。照相，并做好记号。加入含有20μg/ml本发明抗体或20μg/ml对照抗体IgG的培养基。开始计时，分别在24、48小时拍照（注意要找到相应记号，拍摄同一区域）。

结果表明：单克隆抗体可体外抑制T47D、SKOV3，3T3细胞的迁移。

见图20：本发明抗体及对照抗体IgG浓度均为20μg/ml。

实施例7：体外抑制肿瘤细胞转移的实验

肿瘤转移小室实验分为6组，1：对照，2：MBP (25ug/ml)，3：AGR2-MBP融合蛋白(25ug/ml)4：AGR2-MBP(25ug/ml)+IgG(25ug/ml)，5：AGR2-MBP(25ug/ml)+18A4(25ug/ml)，6：18A4(25ug/ml)。

肿瘤转移小室内培养基都是RPMI-1640培养基+1%FBS。

实验中先加好外孔培养基，胰酶消化HepG2、SKOV3细胞，计数，离心去除上清。将细胞浓度用含1%FBS 的RPMI-1640培养基调整为5×10^5个/ml。每个小室内加入200μl，放于细胞培养箱中培养（5%CO2，37℃），开始计时。分别在24小时和48小时将小室取出，刮去内室的细胞，将小室置甲醇溶液室温固定15分钟。结晶紫染色液染色5分钟。乙醇脱色15分钟，放入PBS中，拍照，统计穿膜细胞数。

结果表明：本发明抗体可体外抑制肝癌细胞HepG2，SKOV3的转移。见图21。

实施例8：体外抑制肿瘤细胞周期的实验

流式细胞仪检测细胞周期步骤如下：T47D细胞株用相应的细胞培养液传代培养至对数生长期(至少传两代，每代生长至80%汇合)，经胰酶-EDTA液消化，铺入6孔板中。待细胞贴壁后换成含有20μg/ml 本发明抗体或20μg/ml对照抗体IgG 的培养基。分别在加入抗体后的0、6、12、24、48小时，用1 × Trypsin 消化细胞，加10 ml 培养基将细胞吹散至单个细胞，并收集至15 ml离心管，200×g离心5 min 收集细胞。弃上清，用5 ml 1 × PBS 洗两次。弃上清后，用1 ml 预冷的1 × PBS彻底悬浮细胞，将其滴加入含有9ml 70%预冷的乙醇中，混匀，冰上孵育1 h。200×g离心5 min 收集细胞，弃上清，加15 ml 1 × PBS在冰上洗细胞3-4 h。200×g离心5 min 收集细胞，弃上清，加500 μl PI染色缓冲溶液，转移至1.5 ml 离心管中。将管子用铝箔纸包裹，37 ℃ 孵育30 min。上机检测细胞周期。

结果表明：单克隆抗体可以通过增加细胞周期的G1/G0期、减少S和G2/M期体外抑制乳腺癌细胞T47D、MCF7的生长（图22）。

实施例9：单克隆抗体的可变区序列确定

确定了阻断性单克隆抗体的抗原结合位点的基因序列。方法如下：从杂交瘤细胞中提取RNA，按照Marks等人的方法通过PCR扩增VL和VH，确定基因序列（Marks, J. D.等人，J. Mol. Biol., 222: 589-597, 1991）。实验所用引物为：轻链5'-GAGCGGATAACAATTTCACA

CAGGA-3'，重链5'-CCACAATCCCTGGGCACAA-3'，两者都是反向测序。

实施例10：单克隆抗体对应抗原表位的序列确定

确定了单克隆抗体对应抗原AGR2的抗原表位的氨基酸序列（见图23）。方法如下：从MCF7细胞中提取RNA，用PCR方法得到AGR2的mRNA，反转录得到cDNA，构建pcDNA3-AGR2-His真核表达质粒，然后对AGR2进行缺失突变，突变使用的上游引物：5'-GTTGCTTGTCTTGGATTTATATAGA-3'，下游引物：5'-GCTGAAAATAAAGAAATCCA

GAAAT-3'。该突变使抗原表位PLMIIHHLDECPHSQALKKVFA缺失。western blot检测阻断性单克隆抗体不再与突变后的AGR2蛋白结合，从而确定了该抗体结合的AGR2抗原表位氨基酸序列。接着对AGR2进行点突变，突变使用的上游引物5'-ATGAATAATCATCAAGGGTTTGTTGC-3'，下游引物5'-CACTTGGATGAGTGCCCACA

CA-3'，将其中PDI活性位点"CXXS"的"C"突变成"S"，单克隆和抗体对这个突变蛋白的结合明显减弱。确定该单克隆抗体可特异性结合抗原表位"PLMIIHHLDECPHSQALKKVFA"，且可能对PDI活性进行抑制。见图24, 25。

实施例11：抗体动物体内实验

用6周龄的雌性BALB/c裸鼠（180–220 g），将处于对数生长期的SKOV3细胞悬浮于PBS中，注射至小鼠皮下（2×106/只）。将注射细胞后的小鼠随机分为两组(每组8只)：PBS组，18A4组。在注射细胞后4天开始腹腔用药，用药量：18A4为8mg/kg[1, 2]，等体积的PBS为对照。每周2次，注射药物的同时量肿瘤的大小。药物处理14周后，结束实验。参考Herceptin和Avastin的文献[3-5]公式：(L×W2)/2计算肿瘤的体积。

结果表明，单克隆抗体可在体内抑制肿瘤的生长。见图26。

参考文献:

1. van der Bij, G.J., et al., Experimentally induced liver metastases from colorectal cancer can be prevented by mononuclear phagocyte-mediated monoclonal antibody therapy. J Hepatol. 53(4): p. 677-85.
2. Bhuvaneswari, R., et al., Targeting EGFR with photodynamic therapy in combination with Erbitux enhances in vivo bladder tumor response. Mol Cancer, 2009. 8: p. 94.
3. Khalili, P., et al., Effect of Herceptin on the development and progression of skeletal metastases in a xenograft model of human breast cancer. Oncogene, 2005. 24(44): p. 6657-66.
4. Jerome, L., et al., Recombinant human insulin-like growth factor binding protein 3 inhibits growth of human epidermal growth factor receptor-2-overexpressing breast tumors and potentiates herceptin activity in vivo. Cancer Res, 2006. 66(14): p. 7245-52.
5. Guan, H., et al., Herceptin down-regulates HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression and enhances taxol-induced cytotoxicity of human Ewing's sarcoma cells in vitro and in vivo. Clin Cancer Res, 2005. 11(5): p. 2008-17.

权 利 要 求 书

1、 一种特异性结合 AGR2 蛋白的抗体，该抗体能与鼠抗人 AGR2 蛋白单克隆抗体 18A4 结合基本上相同的 AGR2 蛋白表位。

2、 权利要求 1 所述的抗体，该抗体是鼠抗人 AGR2 单克隆抗体 18A4 或其人源化形式或嵌合形式。

3、 权利要求 1 或 2 所述的抗体，所述表位位于 AGR2 蛋白二硫键异构酶活性结构域。

4、 权利要求 1-4 任一项所述的抗体，所述抗体结合的抗原表位如 Seq ID No. 12 所示。

5、 上述权利要求任一项所述的抗体，包含选自如下的至少一种序列：包含 Seq ID No. 8 所示的重链 CDR1 氨基酸序列，包含 Seq ID No. 9 所示的重链 CDR2 氨基酸序列，包含 Seq ID No.10 所示的重链 CDR3 氨基酸序列，包含 Seq ID No. 11 所示的轻链 CDR1 氨基酸序列，包含 Seq ID No. 12 所示的轻链 CDR2 氨基酸序列和包含 Seq ID No. 13 所示的轻链 CDR3 氨基酸序列。

6、 权利要求 5 所述抗体，其包含：如 DYNMD（Seq ID No.8）所示的重链 CDR1 氨基酸序列，如 DINPNYDTTSYNQKFQG （Seq ID No.9）所示的重链 CDR2 氨基酸序列，如 SM MGYGSPMDY（Seq ID No. 10）所示的重链 CDR3 氨基酸序列，如 RASKSVSTSGYSYMH（Seq ID No. 11）所示的轻链 CDR1 氨基酸序列，如 LASNLES（Seq ID No. 12）所示的轻链 CDR2 氨基酸序列和如 QHIRELPRT（Seq ID No. 13）所示的轻链 CDR3 氨基酸序列。

7、 权利要求 6 所述的抗体，其特征是，所述抗体的重链可变区氨基酸序列如 Seq ID No. 2 所示，所述抗体的轻链可变区氨基酸序列如 Seq ID No. 1 所示，

8、 权利要求 6 所述的抗体，其特征是，所述抗体的重链可变区氨基酸序列如 Seq ID No. 4 所示，所述抗体的轻链可变区氨基酸序列如 Seq ID No. 3 所示，

9、 权利要求 1-8 任一项所述的抗体，其为人源化抗体，优选人源化的完整 IgG1 抗体。

10、权利要求 1-9 任一项所述的抗体，其为抗体片段，优选为 Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv 片段、线性抗体、单链抗体，更优选为 Fab 片段。

11、一种药物组合物，包含权利要求 1-10 任一项所述的抗体和可药用载体。

12、一种分离的核酸，其编码权利要求 1-10 任一项所述的抗体。

13、一种载体，包含权利要求 12 所述的核酸。

14、一种宿主细胞，包含权利要求 13 所述的载体。

15、生产人源化抗体的方法，包括培养权利要求 14 所述的宿主细胞，以便表达所述核酸并产生所述抗体。

16、权利要求 15 所述的方法，还包括从所述宿主细胞培养物中回收所述抗体。

17、使用权利要求 1-10 任一项的抗体用于治疗与哺乳动物中的病理性血管生成相关的病症的方法，该方法包括给药所述哺乳动物所述抗体的步骤。

18、权利要求 17 的方法，其中所述病症是癌症。

19、权利要求 18 的方法，其中所述癌症选自乳腺癌，卵巢癌、骨肉瘤、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、非小细胞肺癌、肾癌、头颈癌、黑素瘤和多发性骨髓瘤。

20、权利要求 19 的方法，其中所述治疗包含将第二治疗剂与所述抗体同时或顺序给药的步骤。

21、权利要求 20 的方法，所述第二治疗剂选自：抗-血管生成剂、化疗剂和细胞毒剂。

图 1 ELISA 检测 AGR2 特异性

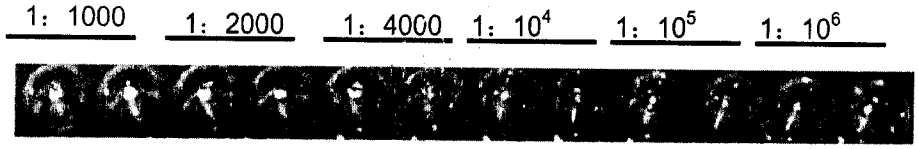


图 2 免疫印迹检测 AGR2 特异性

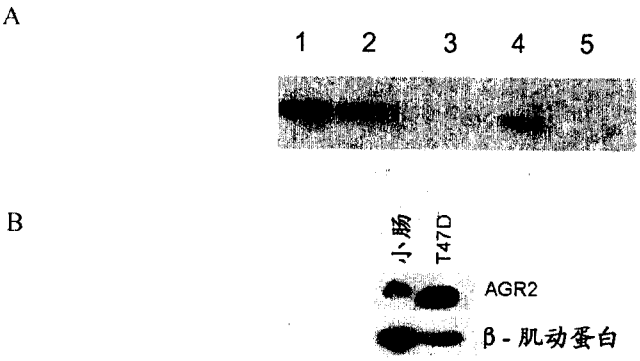


图 3 免疫沉淀检测 AGR2 特异性

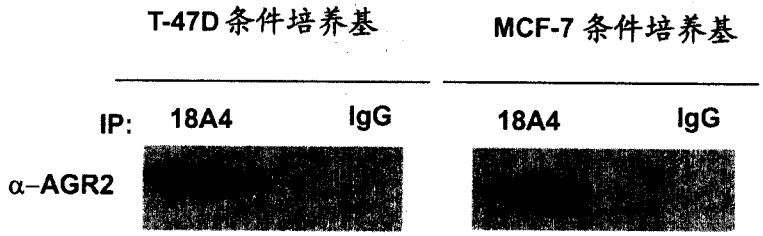


图 4 免疫荧光检测 AGR2 特异性

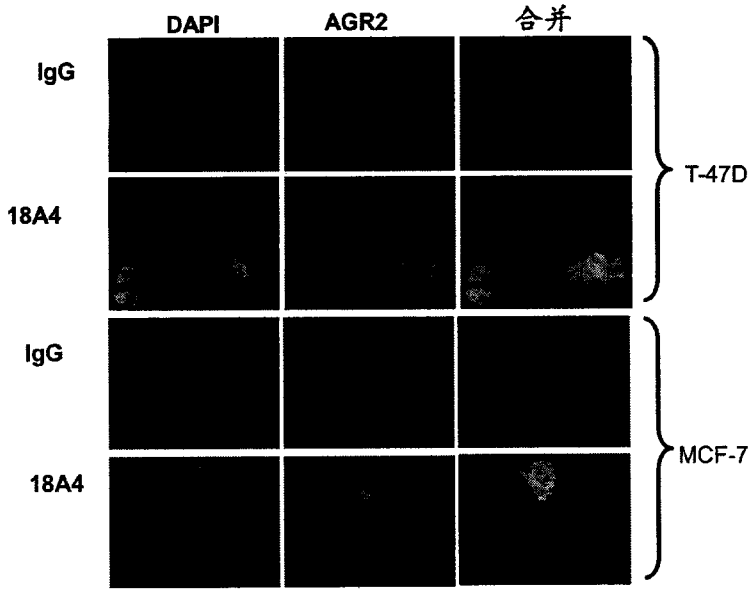


图 5A 鼠单克隆抗体 18A4 和 18A4HU1 的轻链可变区序列比较

```
18A4HU1/VL   EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQAPRLLIYLASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHIRELPRTFGGGTKLEIK
humκ III     EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSS---YLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ------WTFGGGTKLEIK
18A4/VL      DIVLTQSPASLTVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQRKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEGEDAATYYCQHIRELPRTFGGGTKLEIK
             *       * ** * *  *    *  *    **  *   * *   * **** *           * *** *  * *        *
```

图 5B 鼠单克隆抗体 18A4 和 18A4HU1 的重链可变区序列比较

```
18A4HU1/VH   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQAPGQGLEWIGDINPNYDTTSYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSMMGYGSPMDYWGQGTLVTVSS
humI         QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR----Y---FDYWGQGTLVTVSS
18A4/VH      EVQLQQFGAELVKPGASVKISCKASAYTFTDYNMDWVKQSHGKSLEWIGDINPNYDTTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDTAVYYCARSMMGYGSPMDYWGQGTSVTVSS
             * * *  **      *   *  * * * * ** **  * *  ****  *  * ** * * * *  * *              *     *
```

图 6A 鼠单克隆抗体 18A4 轻链可变区 (V_L) 与人源化 18A4HU1 型式的 V_L 的结构比较

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
	10 20	30	40 50	60
18A4/L	DIVLTQSPASLTVSLGQRATISC	RASKSVSTSGYSYMH	WYQRKPGQPPKLLIY	LASNLES
IGKV3-20*02	E--------T-SL-P-E---L--	---Q---S-***-LA	---Q----A-R----	GASSRAT
IGKV3(共有序列)	E--------*T-SL-P-E---L--	**********	---Q----A-R---*	*******
18A4Hu1/L	E--------T-SL-P-E---L--	----------	---Q----A-R----	-------

	FR3	CDR3	FR4
	70 80 90	100	110
18A4/L	GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEGEDAATYYC	QHIRELPRT	FGGGTKLEIK
IGKV3-20*02	-I----------T-SRL-P--F-----	-******W-	--Q---V---
IGKV3(共有序列)	-I-*---------T-SRL-P--F-----	*********	---*---*---
18A4Hu1/L	-I----------T-SRL-P--F-----	---------	----------

图 6B 鼠单克隆抗体 18A4 重链可变区 (V_H) 与人源化 18A4HU1 型式的 V_H 的结构比较

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
	10 20 30		40	50 60
18A4/H	EVQLQQFGAELVKPGASVKISCKASAYTFT	DYNMD	WVKQSHGKSLEWIG	DINPNYDTTSYNQKFKG
IGHV1-46*03	Q---V-S---VK-------V-----G----	S-Y-H	--R-AP-QG---M-	I---SGGS---A---Q-
IGHV1(共有序列)	Q---V-S---VK---*---V-----G----	*****	--R-AP-QG-----	**********
18A4Hu1/H	Q---V-S---VK-------V-----G----	-----	--R-AP-QG-----	----------

	FR3	CDR3	FR4
	70 80 90	100	110 120
18A4/H	KATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDTAVYYCAR	SMMGYGSPMDY	WGQGTSVTVSS
IGHV1-46*03	RV-M-R-T-T---V----S---R----------	****Y***FDY	-----L-----
IGHV1(共有序列)	**-*-*-*-T*-*----S---R----------	**********	-----L-----
18A4Hu1/H	---------T-------S---R----------	----------	-----L-----

图 7 完整抗体表达质粒的构建示意图

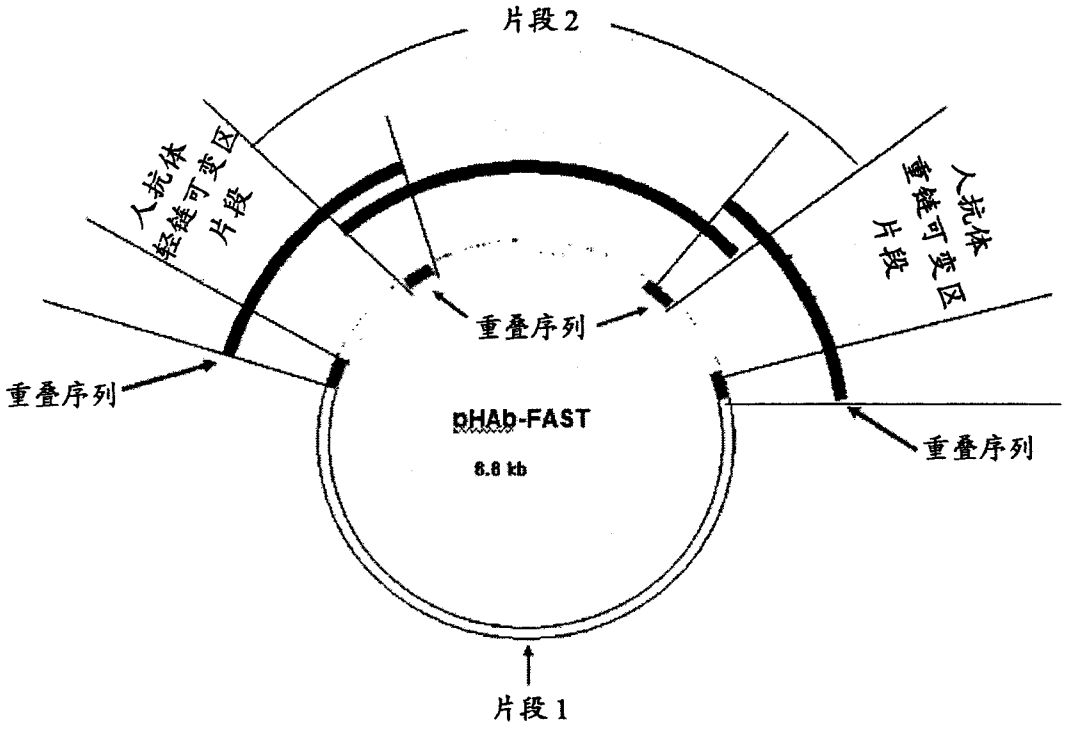


图 8 纯化抗体的 SDS-PAGE 电泳图

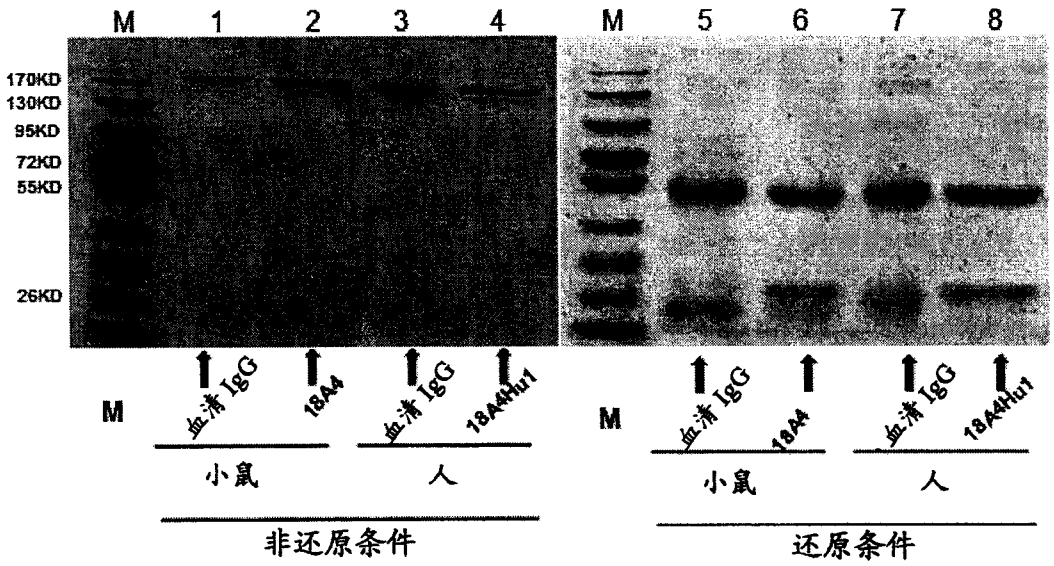


图 9 竞争性 ELISA 法测定抗体亲和力实验结果

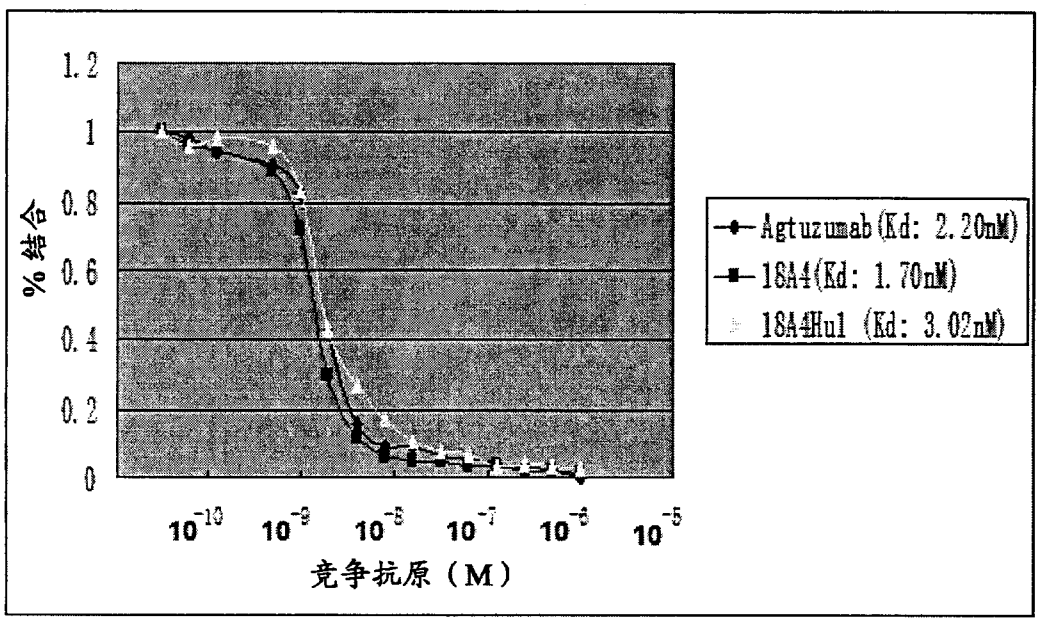


图 10 人源化抗体变体的突变位点比对及潜在 T 细胞抗原表位数目的变化情况

重链突变

名称	突变	HCDR2 和 HFR2 T 细胞表位	总 T 细胞表位
18A4	YNQKFKGKATLTV	5+11	60
18A4Hu1	YNQKFKGKATLTV	5+11	44
18A4Hu2	YNQKFKGKVTMTV	2+6	36
18A4Hu3	YNQKFKGRVTMTV	2+5	35
Agtuzumab	YNQKFQGRVTMTV	0+5	33

轻链突变

名称	突变	LFR2 和 LCDR2 T 细胞表位	总 T 细胞表位
18A4	LLIYLASNLES	5+3+14	41
18A4Hu1	LLIYLASNLES	5+3+14	26
18A4Hu4	LLIYLASSLET	5+2+1	12
18A4Hu5	LLIYLASSRET	2+2+1	9

图 11 人源化抗体变体的抗原结合曲线

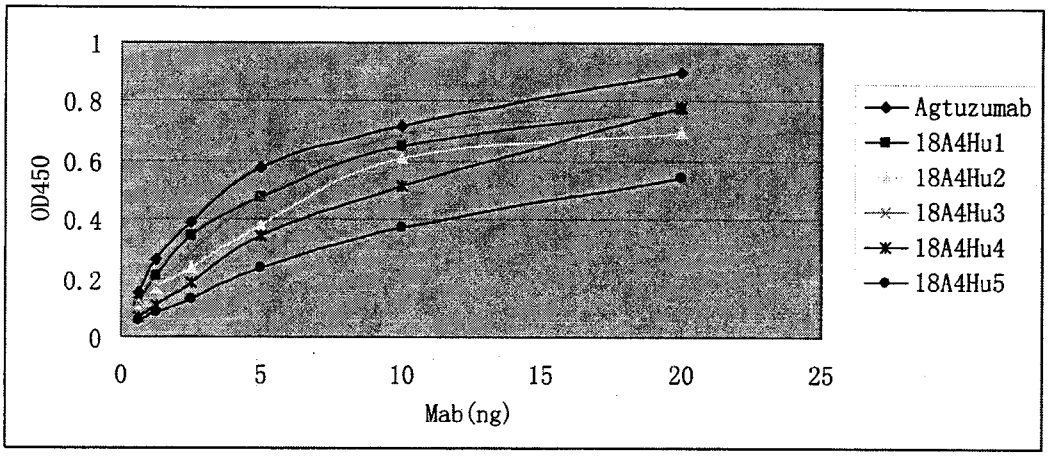


图 12 western-blot 法鉴定人源化抗体 Agtuzumab 种属特性

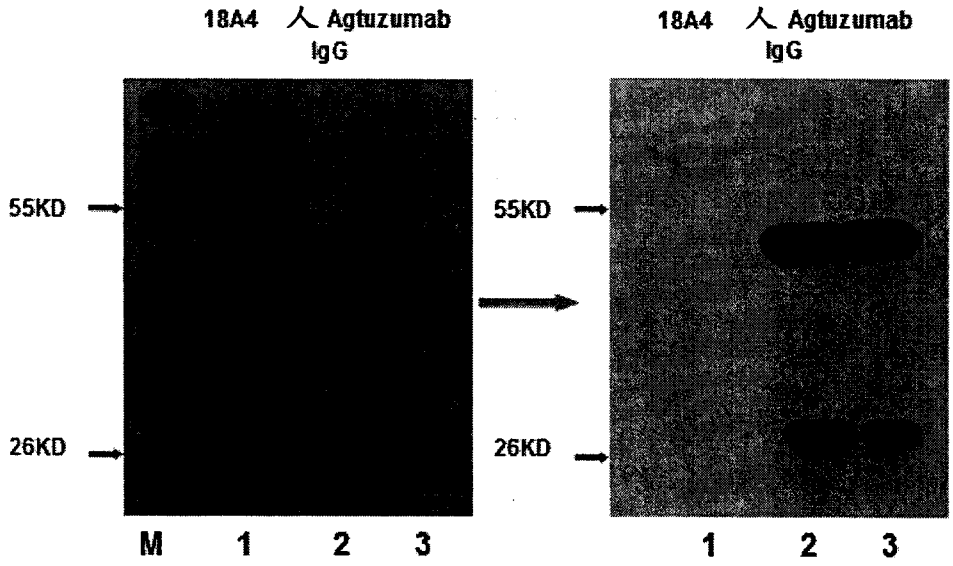


图 13 western-blot 法检测人源化抗体 Agtuzumab 抗原结合特异性

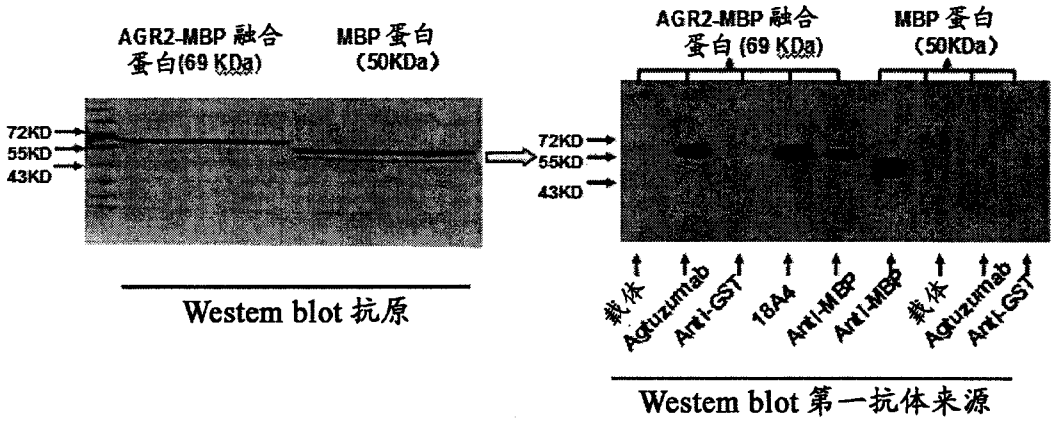


图 14 western-blot 法检测人源化抗体 Agtuzumab 与细胞裂解液中抗原的结合特异性

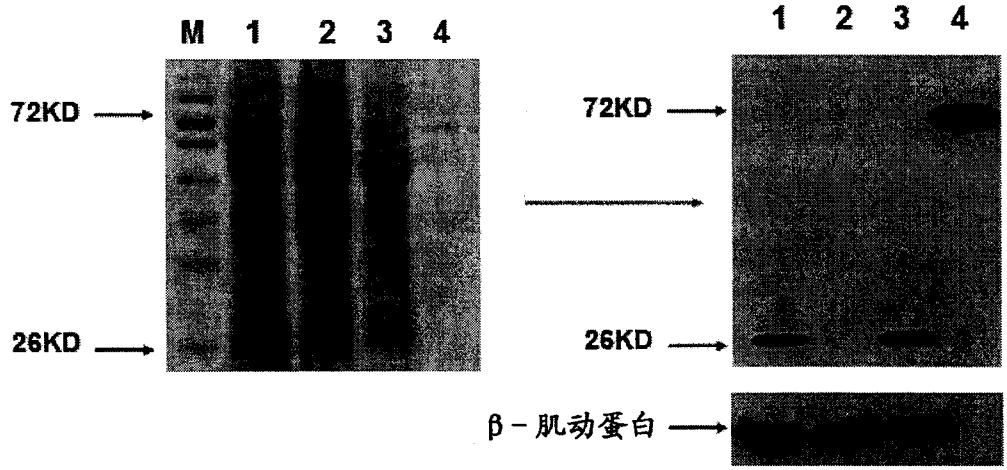


图 15 免疫沉淀 (IP) 法检测人源化抗体 Agtuzumab 与 MCF7 细胞中天然 AGR2 的结合能力

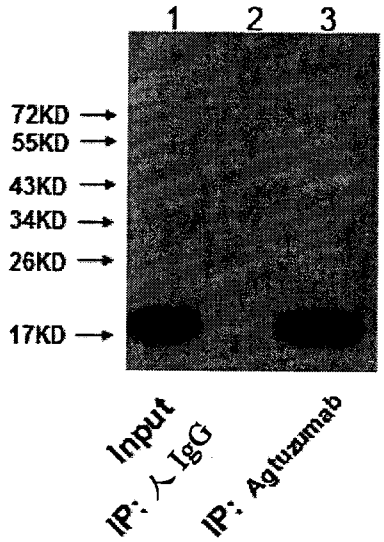
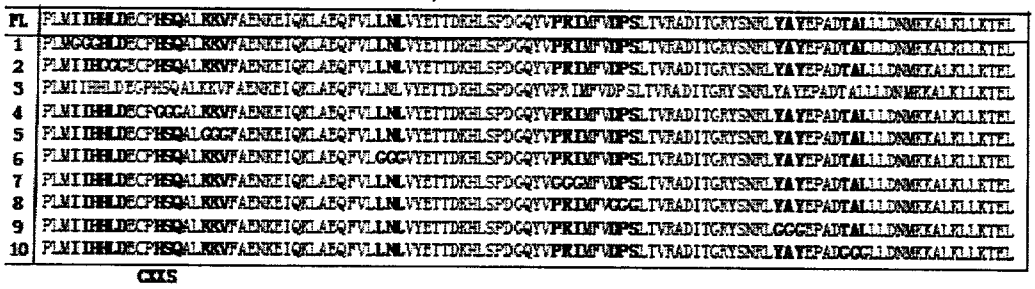


图 16 根据 AGR2 潜在的抗原表位分析进行突变产生的 AGR2-MBP 突变体 AGR2, 从 P71 至 L175



(PDI 活性位点)

图 17 western-blot 法分析鼠 18A4 和人源化抗体 Agtuzumab 与 AGR2-MBP 突变体的结合

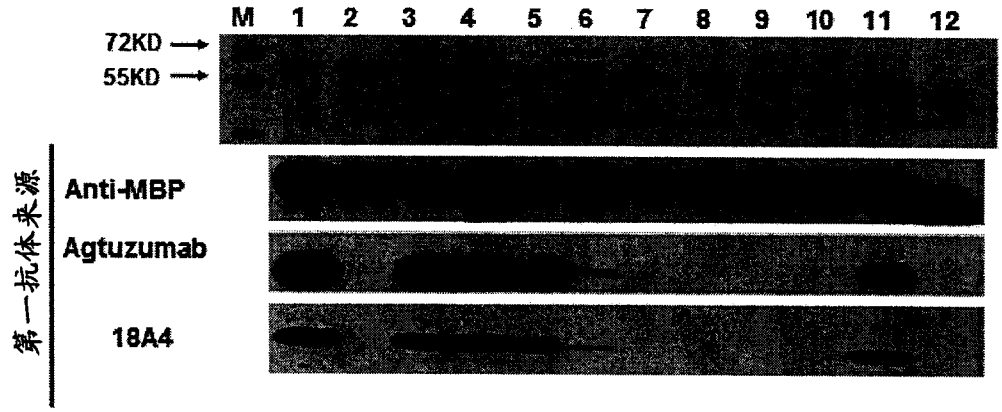
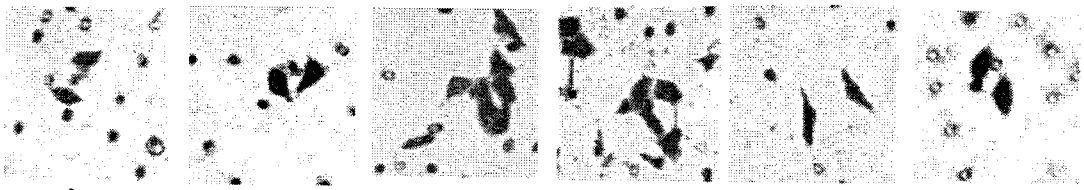


图 18 肿瘤侵袭小室实验检测抗体可体外抑制肝癌细胞 HepG2 侵袭性转移



HepG2 的 transwell 试验

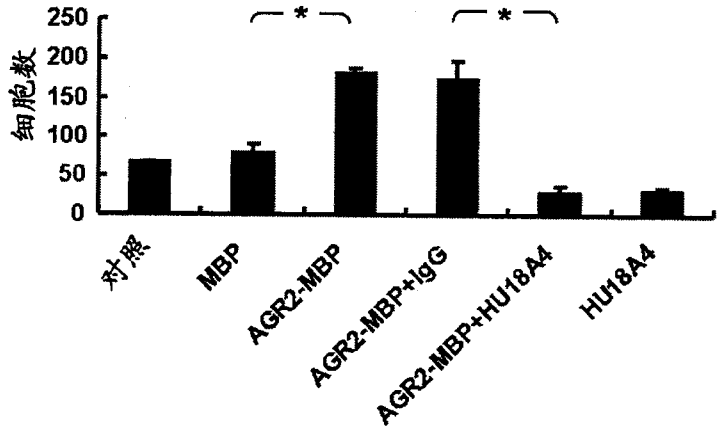


图 19 MTT 法检测抗体可体外乳腺癌细胞 T47D、MCF7 的生长与迁移

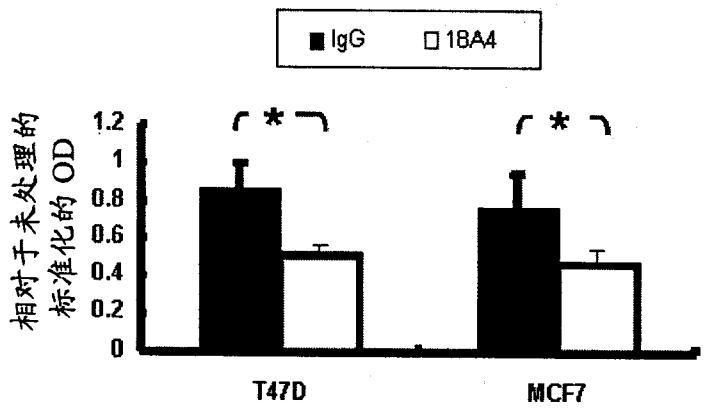
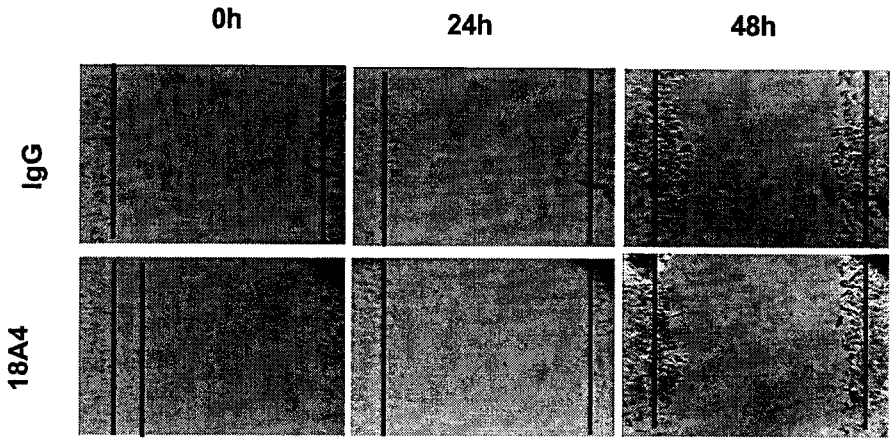


图 20 划痕实验检测抗体可体外乳腺癌细胞 T47D 的迁移



T47D 细胞划痕实验

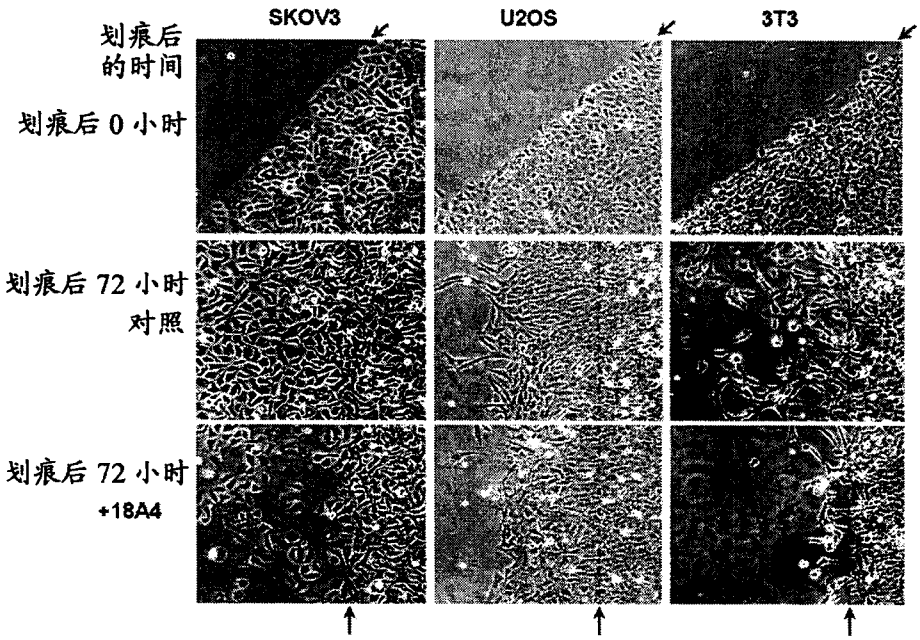
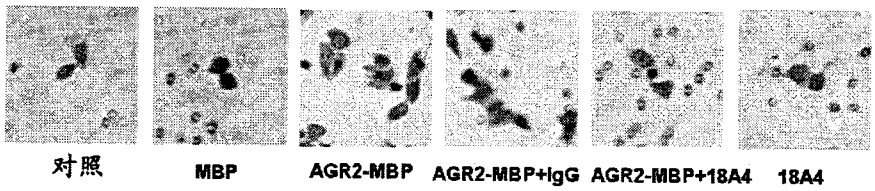
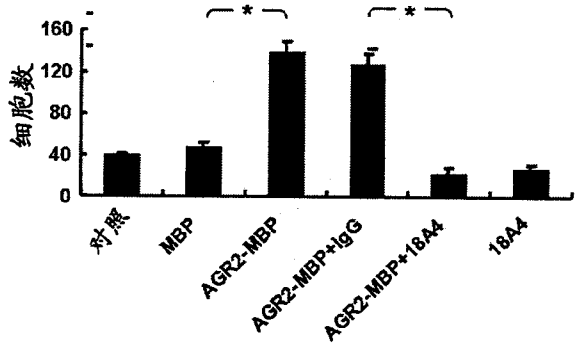
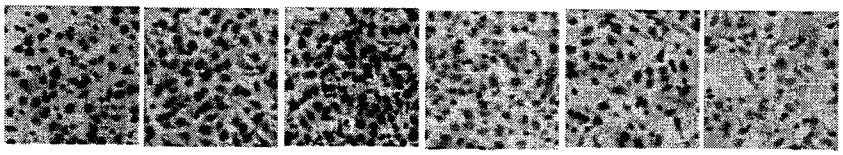


图 21 肿瘤侵袭小室实验检测抗体可体外抑制肝癌细胞 HepG2 侵袭性转移

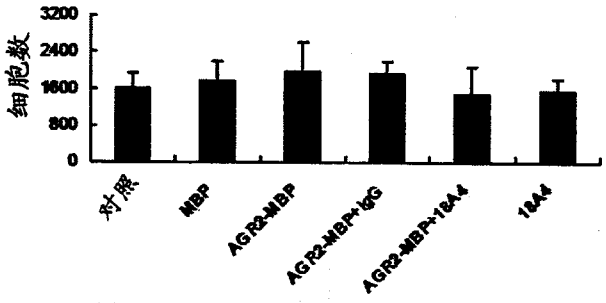


HepG2 的 transwell 试验





SKOV3 的 transwell 试验 (48h)



AGR2(25ug/ml)，IgG(25ug/ml)，18A4(25ug/ml)

图 22 流式细胞术检测抗体可体外抑制乳腺癌细胞 MCF-7 和 T47D 的细胞周期

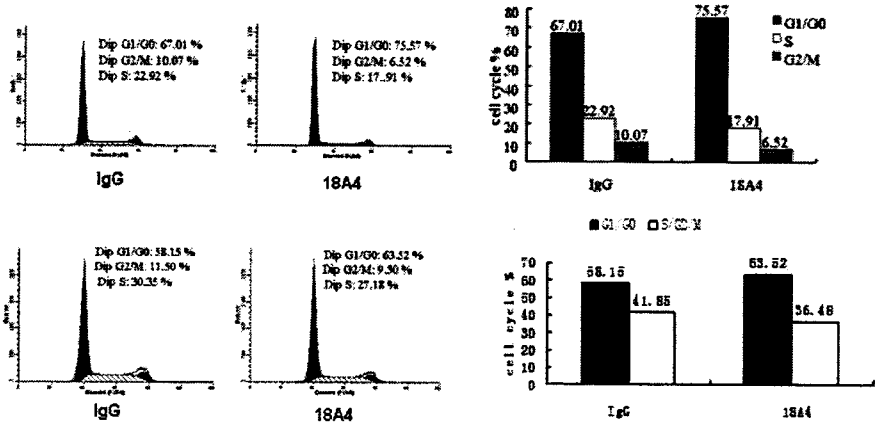


图 23 Western blot 检测确认抗体结合于 AGR2 活性位点结构域

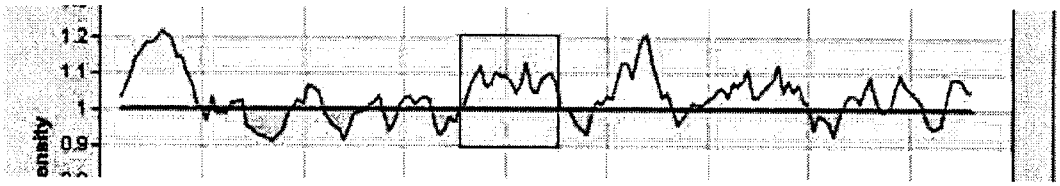


图 24 Western blot 检测确认抗体结合于 AGR2 活性位点结构域

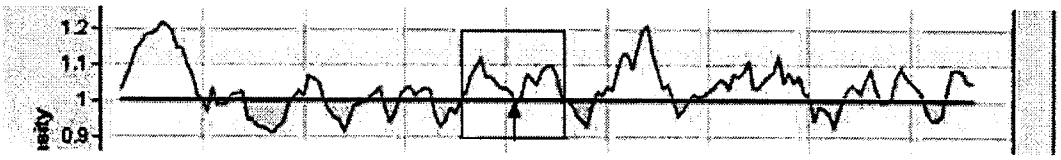


图 25 Western blot 检测确认抗体结合于 AGR2 活性位点结构域

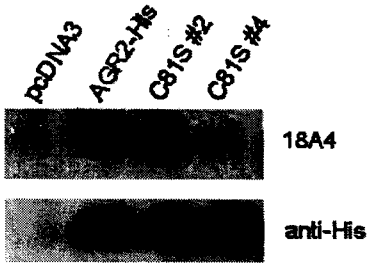
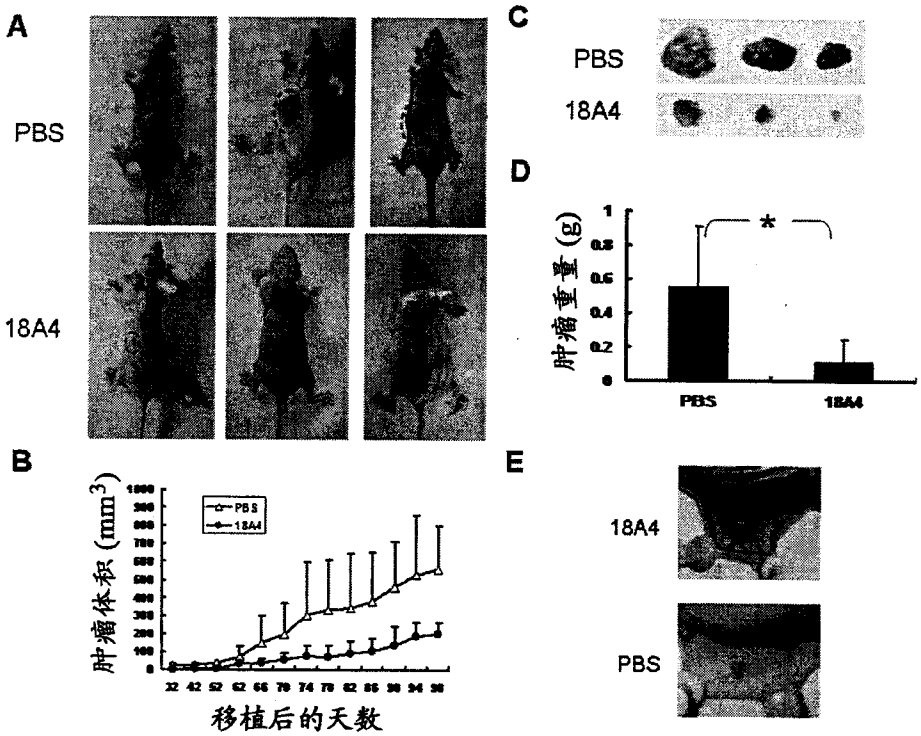


图 26 动物肿瘤生长比较



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/000926

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 17-21
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Rule 39.1(iv) PCT- Method for treatment of the human or animal body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/000926

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K; C12P; C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRSABS; CNKI; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ELSEVIER; CA and search terms: AGR2, hAG-2, antibody, monoclonal antibody, humanized antibody, chimeric antibody, 18A4, disulfide isomerase, cancer, tumor, epitope etc. Retrieving System for Biological Sequence of Chinese Patent; Genbank; EMBL; STN and searched sequences: SEQ ID NOs:1-14 etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101519649A (UNIV SHANGHAI JIAOTONG) 02 Sep. 2009 (02.09.2009) see the abstract and claim 1	1-16
X	WU, Z. H. et al. Preparation,characterization and potential application of monoclonal antibody against AGR2, Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, vol.26, no.1, Jan.2010, pages 49-51 see the abstract and page 51, left column, lines 11-15	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 Sep. 2012 (10.09.2012)	18 Oct. 2012 (18.10.2012)
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451	Authorized officer HE, Rui Telephone No. (86-10)62411106

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/000926

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 20100031190A (UNIV SUNGKYUNKWAN FOUND) 22 Mar.2010 (22.03.2010) see the abstract	1-16
P,X	CN 102268089A (UNIV SHANGHAI JIAOTONG) 07 Dec.2011 (07.12.2011) see the whole document	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/000926

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN101519649A	02.09.2009	CN101519649B	03.11.2010
KR20100031190A	22.03.2010	KR100983386B1	20.09.2010
CN102268089A	07.12.2011	none	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/000926

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/40 (2006.01)i

C12N 15/13 (2006.01)i

C12N 15/63 (2006.01)i

C12N 5/10 (2006.01)i

C12P 21/08 (2006.01)i

A61K 39/395 (2006.01)i

A61P 35/00 (2006.01)i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/000926

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC：C07K；C12P；C12N；A61K；A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CPRSABS；CNKI；CNTXT 和检索词：AGR2，hAG-2，抗体，单克隆抗体，人源化，嵌合，18A4，二硫键异构酶，表位，肿瘤等；

DWPI；SIPOABS；EPTXT；USTXT；WOTXT；JPTXT；ELSEVIER；CA 和检索词：AGR2，hAG-2，antibody，monoclonal antibody，humanized antibody，chimeric antibody，18A4，cancer，tumor，epitope 等；

中国专利生物序列检索系统；Genbank；EMBL；STN 和检索的序列：SEQ ID NOs:1-14 等。

C. 相关文件

类　型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 101519649A（上海交通大学） 02.9 月 2009（02.09.2009） 参见摘要和权利要求 1	1-16
X	武正华等，抗 AGR2 单克隆抗体的制备、鉴定及初步应用，细胞与分子免疫学杂志，第 26 卷，第 1 期，2010 年 1 月，第 49-51 页 参见摘要和第 51 页左栏第 11-15 行	1-16

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。　　☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
10.9 月 2012（10.09.2012）	**18.10 月 2012 (18.10.2012)**
ISA/CN 的名称和邮寄地址： 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号：　(86-10)62019451	受权官员 何睿 电话号码：(86-10) **62411106**

C(续). 相关文件

类　型	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	KR 20100031190A（UNIV SUNGKYUNKWAN FOUND）22.3月2010（22.03.2010） 参见摘要	1-16
P,X	CN 102268089A（上海交通大学）07.12月2011（07.12.2011） 参见全文	1-16

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/000926

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第 1 页第 2 项)

根据条约第 17 条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求：17-21

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

PCT 细则 39.1（iv）——处置人体或者动物体的治疗方法。

2. ☐ 权利要求：

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，

具体地说：

3. ☐ 权利要求：

因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第III栏　缺乏发明单一性的意见(续第 1 页第 3 项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说，是权利要求：

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明： ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/000926

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101519649A	02.09.2009	CN101519649B	03.11.2010
KR20100031190A	22.03.2010	KR100983386B1	20.09.2010
CN102268089A	07.12.2011	无	

续：

A. 主题的分类

C07K 16/40 (2006.01)i

C12N 15/13 (2006.01)i

C12N 15/63 (2006.01)i

C12N 5/10 (2006.01)i

C12P 21/08 (2006.01)i

A61K 39/395 (2006.01)i

A61P 35/00 (2006.01)i