(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102083861 B
(45)授权公告日 2016.04.13

(21)申请号 200880111128.8

(22)申请日 2008.08.11

(30)优先权数据
60/964496 2007.08.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2010.04.12

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2008/009619 2008.08.11

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2009/023185 EN 2009.02.19

(83)生物保藏信息
PTA-6214 2004.09.16
PTA-6211 2004.09.01

(73)专利权人 瓦斯基因治疗公司
地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 F·J·卡尔 P·吉尔 T·D·琼斯 S·W·基恩 V·克拉斯诺佩罗夫

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 李志东 付磊

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)

(56)对比文件

WO 2005090406 A2,2005.09.29, 权利要求1、5-10、13、52、53,说明书第3页倒数第1段、第4页第1、3段、第11页第2段、第25页IV 治疗性应用、第26页第3段、第30页的V药物组合物和施用模式.

Melissa M. Damschroder 等.Framework shuf E ing of antibodies to reduce immunogenicity and manipulate functional and biophysical properties.《Molecular Immunology》.2007,(第44期),3049-3060.

审查员 李濯冰

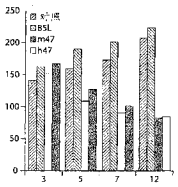
权利要求书1页 说明书45页
序列表27页 附图6页

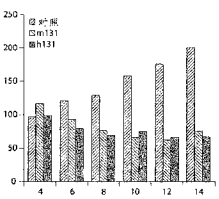
(54)发明名称

使用结合EphB4的人源化抗体的癌症治疗

(57)摘要

在某些实施方案中,本申请提供了结合EphB4蛋白的人源化抗体以及所述抗体用于治疗目的的用途。





CN 102083861 B

1. 结合 EphB4 的细胞外结构域的解除免疫的抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

(i) 所述重链可变区由选自 SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:14 的序列组成；所述轻链可变区由选自 SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:18 的序列组成；或

(ii) 所述重链可变区由选自 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 的序列组成；所述轻链可变区由选自 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 的序列组成。

2. 权利要求 1 的解除免疫的抗体或其抗原结合片段，其抑制培养的内皮细胞形成管。

3. 权利要求 1 或 2 的解除免疫的抗体或其抗原结合片段，其在体内抑制组织的血管化作用。

4. 任一前述权利要求的解除免疫的抗体或其抗原结合片段，其减少小鼠中人肿瘤异种移植物的生长。

5. 任一前述权利要求的解除免疫的抗体或其抗原结合片段，其缀合至细胞毒性剂。

6. 任一前述权利要求的解除免疫的抗体或其抗原结合片段，其包含重链恒定区。

7. 权利要求 6 的解除免疫的抗体或其抗原结合片段，其具有改变的效应子功能。

8. 包含任一前述权利要求的解除免疫的抗体或其抗原结合片段的药物组合物。

9. 权利要求 1 至 7 的任一项的解除免疫的抗体或其抗原结合片段，用作药剂。

10. 治疗有效量的权利要求 1 至 7 的任一项的解除免疫的抗体或其抗原结合片段在制备用于减少受试者中肿瘤生长速率的药物中的用途。

11. 权利要求 10 的用途，其中所述受试者是人受试者。

12. 治疗有效量的权利要求 1 至 7 的任一项的解除免疫的抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗患有癌症的受试者的药物中的用途。

13. 权利要求 12 的用途，其中所述受试者是人受试者。

14. 权利要求 12 的用途，其中所述受试者被诊断患有选自结肠癌、乳腺癌、间皮瘤、前列腺肿瘤、鳞状上皮细胞癌、卡波西肉瘤、卵巢癌和白血病的癌症。

15. 权利要求 12 的用途，其中全身性施用解除免疫的抗体或其抗原结合片段。

16. 权利要求 12 的用途，其中局部施用解除免疫的抗体或其抗原结合片段。

17. 治疗有效量的权利要求 1 至 7 的任一项的解除免疫的抗体或其抗原结合片段在制备用于抑制受试者中血管生成的药物中的用途。

18. 权利要求 17 的用途，其中所述受试者被诊断患有黄斑变性。

19. 权利要求 17 的用途，其中所述受试者是人受试者。

使用结合 EphB4 的人源化抗体的癌症治疗

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2007 年 8 月 13 日提交的美国临时申请号 60/964,496 的优先权的权益，其全部教导以其全文引用合并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 血管生成，新血管从预先存在的脉管系统的上皮发展，是宿主内实体瘤的生长、进展和转移中至关重要的过程。在生理学上正常的血管生成期间，血管内皮与其周围间质组分的自分泌、旁分泌和双重分泌 (amphicrine) 相互作用在空间和时间上受到紧密调节。此外，促血管生成 (proangiogenic) 和抑制血管生成 (angiostatic) 细胞因子和生长因子的水平和活性保持平衡。相反地，活跃的肿瘤生长所必需的病理性血管生成是持续和持久的，代表了正常血管生成系统的失调。实体瘤和造血组织肿瘤类型特别地与高水平的异常血管生成相关。

[0005] 通常认为，肿瘤的发展由连续并且相关的步骤组成，所述步骤导致具有攻击性生长潜能的自主克隆 (autonomous clone) 的产生。这些步骤包括持续生长和无限的自我更新。肿瘤中的细胞群体的特征通常在于生长信号的自足 (self-sufficiency)、降低的对生长抑制信号的敏感性以及对细胞凋亡的抗性。起始异常生长的遗传或细胞遗传事件通过阻止细胞凋亡来支持细胞维持在延长的“稳定”状态。

[0006] 发明概述

[0007] 本申请除其他以外提供了结合 EphB4 的细胞外结构域的抗体，例如其修饰抗体或抗原结合片段。修饰抗 EphB4 抗体或其抗原结合片段与它们的未修饰的亲本抗体相比较在给定的物种例如人中免疫原性更低。抗体和抗原结合片段用于治疗性治疗以影响 EphB4 功能，从而抑制血管生成和肿瘤生长。

[0008] 在一个实施方案中，本申请提供了结合 EphB4 的细胞外结构域的解除免疫的 (deimmunized) 抗体或其抗原结合片段，其包括重链可变区和轻链可变区，其中各可变区与结合 EphB4 的细胞外结构域的非人或亲 本抗体相比较，在构架区中具有 2 至 20 个氨基酸置换。

[0009] 在一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段具有一个或更多个来自结合 EphB4 的细胞外结构域的非人或亲本抗体的互补决定区 (CDR)。在一个实施方案中，互补决定区 (CDR) 中存在 1 至 5 个置换。

[0010] 在一个实施方案中，一个或更多个置换，与非人或亲本抗体相比较，减少了解除免疫的抗体或其抗原结合片段中的 T 细胞表位的数目。在一个实施方案中，一个或更多个置换，与非人或亲本抗体相比较，减少了解除免疫的抗体或其抗原结合片段中的 B 细胞表位的数目。在一个实施方案中，一个或更多个置换，与非人或亲本抗体相比较，在解除免疫的抗体或其抗原结合片段中导入了一个或更多个调节 T 细胞表位。

[0011] 在一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段的重链可变区，与结合 EphB4 的细胞外结构域的非人或亲本抗体相比较，具有 20 个或更少的氨基酸置换。在另一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段的重链可变区，与结合 EphB4 的细胞外

结构域的非人或亲本抗体相比较，具有 19 个或更少，18 个或更少，17 个或更少，16 个或更少，15 个或更少，14 个或更少，13 个或更少，12 个或更少，11 个或更少，10 个或更少，9 个或更少，8 个或更少，7 个或更少的氨基酸置换。在一个实施方案中，重链可变区，与非人或亲本抗体相比较，具有至少 2 个，至少 3 个，至少 4 个，至少 5 个，至少 6 个，至少 7 个，至少 8 个，至少 9 个，至少 10 个，至少 11 个，至少 12 个，至少 13 个氨基酸置换。

[0012] 在一个实施方案中，与结合 EphB4 的细胞外结构域的非人或亲本抗体相比较，解除免疫的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区具有 20 个或更少的氨基酸置换。在另一个实施方案中，与结合 EphB4 的细胞外结构的非人或亲本抗体相比较，解除免疫的抗体或其抗原结合片段的重链可变区具 19 个或更少、18 个或更少、17 个或更少、16 个或更少、15 个或更少、14 个或更少、13 个或更少、12 个或更少、11 个或更少、10 个或更少、9 个或更少、8 个或更少、7 个或更少的氨基酸置换。在一个实施方案中、与非人或亲本抗体相比较，轻链可变区具有至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个、至少 6 个、至少 7 个、至少 8 个、至少 9 个、至少 10 个、至少 11 个、至少 12 个、至少 13 个氨基酸置换。

[0013] 在一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段以与小鼠单克隆抗体 #131(ATCC 保藏号 PTA-6214) 相似或更大的结合亲和力结合 EphB4 的细胞外结构域。

[0014] 在一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段中的置换导致抗体或抗原结合片段的构架区和与所述构架区同源的人种系基因序列之间的序列同一性的增加。

[0015] 在一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段抑制培养的内皮细胞形成管。在另一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段在体内抑制组织的血管化作用 (vascularization)。在另一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段减少小鼠中人肿瘤异种移植物 (xenograft) 的生长。在另外的实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段抑制植入动物的角膜中的组织的血管化作用或植入动物的基质组织栓 (Matrigel tissue plug) 的血管化作用。在一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段促进细胞凋亡。

[0016] 在一些实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段的效应子功能被改变。在另一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段的效应子功能得到增强。在另一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段的效应子功能被减弱。在一些实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段包含重链恒定区。在一些实施方案中，除去 Fc 区域中的 N- 糖基化。在一些实施方案中，Fc 区域在 N- 糖基化识别序列中包含突变，从而抗体或多肽的 Fc 区域未被 N- 糖基化。在一些实施方案中，将 Fc 区域 PEG 化。在一些实施方案中，重链恒定区是包含下列残基的人重链 IgG2a 恒定区 :位点 330 和 331 上的丝氨酸。在一些实施方案中，重链恒定区是包含下列突变的人重链 IgG4 :位点 233 上的脯氨酸、位点 234 上的缬氨酸和位点 235 上的丙氨酸。这些氨基酸位点基于 Kabat 编号。

[0017] 在一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段抑制 EphB4 的二聚化或多聚化。在一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段抑制肝配蛋白 B2 刺激的 EphB4 的自磷酸化作用。在一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段刺激 EphB4 激酶的活性。

[0018] 在一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段结合 EphB4 的第一纤连蛋白样结构域。在一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段结合 EphB4 的第二纤

连蛋白样结构域。

[0019] 在一个实施方案中，将解除免疫的抗体或其抗原结合片段缀合至细胞毒性剂。在一个实施方案中，细胞毒性剂选自放射性试剂、植物、真菌或细菌来源的分子例如皂草素、生物蛋白质、长春碱、4- 去乙酰长春花碱、长春新碱、异长春碱和长春地辛 (vindesine)。在某些实施方案中，将抗体或其抗原结合片段通过稳定的连接体缀合至细胞毒性剂，其在癌细胞内释放细胞毒素剂。

[0020] 在一个实施方案中，与结合细胞外结构域的非人或亲本抗体相比较，抗体或抗原结合片段的可变区具有 2 至 20 个氨基酸置换，其中所述非人或亲本抗体还在解除免疫的抗体或其抗原结合片段中提供一个或更多个 CDR。在另外的实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中与结合 EphB4 的细胞外结构域的非人或亲本抗体相比较，各可变区具有 2 至 20 个氨基酸置换，并且解除免疫的抗体或其抗原结合片段具有一个或更多个来自所述非人或亲本抗体的互补决定区 (CDR)。在另外的实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段在人受试者中比所述非人或亲本抗体的免疫原性更低。

[0021] 在一个实施方案中，非人或亲本抗体是小鼠单克隆 #47 或小鼠单克隆 #131 ;ATCC 保藏指定编号分别为 _____ 和 PTA-6214。在另外的实施方案中，重链可变区中的一个或更多个置换在选自位点 5、12、40、66、75 和 83(根据 Kabat 编号系统) 的氨基酸位点上发生。在另外的实施方案中，重链可变区中的一个或更多个置换选自位点 5 上的缬氨酸、位点 12 上的赖氨酸、位点 40 上的丙氨酸、位点 66 上的精氨酸、位点 75 上的苏氨酸和位点 83 上的精氨酸，所述位点根据 Kabat 编号系统。在另外的实施方案中，轻链可变区中的一个或更多个置换在选自根据 Kabat 编号系统的位点 45、74 和 100 的氨基酸位点上发生。在另一个实施方案中，轻链可变区中一个或更多个置换选自根据 Kabat 编号系统的位点 45 上的赖氨酸、位点 74 上的苏氨酸和位点 100 上的谷氨酰胺。

[0022] 在一个实施方案中，重链可变区包含 a) 选自 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :13 的氨基酸 1 至 30 的 FR1，b) 选自 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :10 的 SEQ ID NO :13 的氨基酸 36 至 49 的 FR2 ;c) 选自 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12 和 SEQ ID NO :14 的氨基酸 67 至 98 的 FR3 ; 和 d) 选自 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :10 氨基酸 113 至 123 的 FR4。

[0023] 在一个实施方案中，轻链可变区包含 a) 选自 SEQ ID NO :6、SEQ IDNO :15 和 SEQ ID NO :16 的氨基酸 1 至 23 的 FR1，b) 选自 SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :15 和 SEQ ID NO :18 的氨基酸 35 至 49 的 FR2 ;c) 选自 SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :15 和 SEQ ID NO :17 的氨基酸 57 至 88 的 FR3 ; 和 d) 选自 SEQID NO :6 和 SEQ ID NO :15 的氨基酸 98-107 的 FR4。

[0024] 在一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段的重链可变区包含含有 SEQ ID NO :19 的 CDR1、含有 SEQ ID NO :20 的 CDR2 和含有 SEQ ID NO :21 的 CDR3 ; 并且其中轻链包含含有 SEQ ID NO :22 的 CDR1、含有 SEQ ID NO :23 的 CDR2 和含有 SEQ ID NO :24 的 CDR3。在另外的实施方案，解除免疫的抗体或其抗原结合片段在人受试者中比小鼠单克隆抗体 #47 的免疫原性更低。在另外的实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段以为

小鼠单克隆抗体 #47 对 EphB4 的细胞外结构域的结合的结合亲和力的至少 80％、至少 90％或至少 100％的结合亲和力结合 EphB4 的细胞外结构域。

[0025] 在另外的实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段抑制 EphB4 与肝配蛋白 B2 的细胞外部分的结合。在另外的实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段抑制 EphB4 的二聚化或多聚化。在另外的实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段抑制肝配蛋白 B2 刺激的 EphB4 的自磷酸化作用。在另外的实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段刺激 EphB4 激酶的活性。在另外的实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段结合 EphB4 的第一纤连蛋白样结构域。在另外的实施方案中，其结合 EphB4 的第二纤连蛋白样结构域。

[0026] 在另外的实施方案中，将解除免疫的抗体或其抗原结合片段缀合至细胞毒性剂。在另外的实施方案中，细胞毒素剂选自放射性试剂、植物、真菌或细菌来源的分子例如皂草素、生物蛋白质、长春碱、4- 去乙酰长春花碱、长春新碱、异长春碱和长春地辛 (vindesine)。在某些实施方案中，将抗体或其抗原结合片段通过稳定的连接体缀合至细胞毒性剂，所述连接体在癌细胞内释放细胞毒性剂。

[0027] 在另外的实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段抑制培养的内皮细胞形成管。在另外的实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段在体内抑制组织的血管化作用。在另一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段减少小鼠中人肿瘤异种移植物的生长。在另外的实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段抑制植入动物的角膜中的组织的血管化作用或植入动物的基质组织栓的血管化作用。在另外的实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段促进细胞凋亡。

[0028] 在一些实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段的效应子功能被改变。在另一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段效应子功能得到增强。在另一个实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段效应子功能被减弱。在一些实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段包含重链恒定区。在一些实施方案中，除去 Fc 区域中的 N- 糖基化。

[0029] 在另外的实施方案中，抗体或其抗原结合片段的重链可变区包含 a) 选自 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :4 的氨基酸 1 至 30 的 FR1，b) 选自 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :5 的氨基酸 36 至 49 的 FR2 ；c) 选自 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3，SEQ IDNO :4 和 SEQ ID NO :5 的氨基酸 67 至 98 的 FR3 ；和 d) 由选自 SEQ IDNO :1 的氨基酸 113-123 组成的 FR4 ；并且轻链可变区包含 a) 由 SEQ IDNO :6 的氨基酸 1 至 23 组成的 FR1，b) 选自 SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :9 的氨基酸 35 至 49 的 FR2 ；c) 选自 SEQ ID NO :6、SEQ IDNO :7 和 SEQ ID NO :8 的氨基酸 57-88 的 FR3 ；和 d) 由 SEQ ID NO :6 的氨基酸 98 至 107 组成的 FR4。

[0030] 在另外的实施方案中，抗体或抗原结合片段的重链可变区包括选自 ：a)SEQ ID NO :1、b)SEQ ID NO :2、c)SEQ ID NO :3、d)SEQ ID NO :4 和 e)SEQ ID NO :5 的氨基酸序列。

[0031] 在另外的实施方案中，抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含选自 ：a)SEQ ID NO :6、b)SEQ ID NO :7、c)SEQ ID NO :8 和 d)SEQ ID NO :9 的氨基酸序列。

[0032] 在另外的实施方案中，抗体或抗原结合片段的重链可变区包含选自 ：a)SEQ ID NO :1、b)SEQ ID NO :2、c)SEQ ID NO、3，d)SEQ ID NO :4 和 e)SEQ ID NO :5 的氨基酸序列 ；

并且抗体或抗原结合片段的轻链可变 区包含选自 :a)SEQ ID NO :6、b)SEQ ID NO :7、c)SEQ ID NO :8 和 d)SEQ ID NO :9 的氨基酸序列。

[0033] 在另外的实施方案中,抗体或抗原结合片段的重链可变区包含 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列,并且轻链可变区包含选自 :a)SEQ ID NO :7 和 b)SEQ ID NO :8 的氨基酸序列。

[0034] 在另外的实施方案中,重链可变区包含SEQ ID NO :4的氨基酸序列,并且轻链可变区包含选自 :a)SEQ ID NO :7 和 b)SEQ ID NO :8 的氨基酸序列。

[0035] 在另外的实施方案中,重链可变区包含SEQ ID NO :3的氨基酸序列,并且轻链可变区包含 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列。

[0036] 在一个实施方案中,抗体或抗原结合片段的重链可变区包含含有SEQ ID NO :25的 CDR1、含有 SEQ ID NO :26 的 CDR2 以及含有 SEQ IDNO :27 的 CDR3 ;并且轻链可变区包含含有 SEQ ID NO :28 的 CDR1,含有 SEQ ID NO :29 的 CDR2,和含有 SEQ ID NO :30 的 CDR3。在另外的实施方案中,解除免疫的抗体或其抗原结合片段在人受试者中比小鼠单克隆抗体 #131 的免疫原性更低。

[0037] 在另外的实施方案中,解除免疫的抗体或其抗原结合片段以为小鼠单克隆抗体 #131 对 EphB4 的细胞外结构域的结合的结合亲和力的至少 80%、至少 90%或至少 100%的结合亲和力结合 EphB4 的细胞外结构域。

[0038] 在另外的实施方案中,解除免疫的抗体或其抗原结合片段抑制 EphB4 与肝配蛋白 B2 的细胞外部分的结合。在另外的实施方案中,解除免疫的抗体或其抗原结合片段抑制 EphB4 的二聚化或多聚化。在另外的实施方案中,解除免疫的抗体或其抗原结合片段抑制肝配蛋白 B2 刺激的 EphB4 的自磷酸化作用。在另外的实施方案中,解除免疫的抗体或其抗原结合片段刺激 EphB4 激酶的活性。在另外的实施方案中,解除免疫的抗体或其抗原结合片段结合 EphB4 的第一纤连蛋白样结构域。在另外的实施方案中,解除免疫的抗体或其抗原结合片段结合 EphB4 的第二纤连蛋白样结构域。

[0039] 在另外的实施方案中,将解除免疫的抗体或其抗原结合片段缀合至细胞毒性剂。在另外的实施方案中,细胞毒性剂选自放射放射线的化合物、植物、真菌或细菌来源的分子例如皂草素、生物蛋白质、长春碱、4- 去乙酰长春花碱、长春新碱、异长春碱和长春地辛。在某些实施方案 中,将抗体或其抗原结合片段通过稳定的连接体缀合至细胞毒素剂,所述连接体在癌细胞内释放细胞毒性剂。

[0040] 在另外的实施方案中,抗体或抗原结合片段抑制培养的内皮细胞形成管。在另外的实施方案中,解除免疫的抗体或其抗原结合片段在体内抑制组织的血管化作用。在另外的实施方案中,解除免疫的抗体或其抗原结合片段减少小鼠中人肿瘤异种移植物的生长。在另外的实施方案中,解除免疫的抗体或其抗原结合片段抑制植入动物的角膜中的组织的血管化作用或植入动物的基质组织栓的血管化作用。在另外的实施方案中,解除免疫的抗体或其抗原结合片段促进细胞凋亡。

[0041] 在一些实施方案中,解除免疫的抗体或其抗原结合片段的效应子功能被改变。在另一个实施方案中,解除免疫的抗体或其抗原结合片段的效应子功能得到增强。在另一个实施方案中,解除免疫的抗体或其抗原结合片段的效应子功能被减弱。在一些实施方案中,解除免疫的抗体或抗原结合片段包含重链恒定区。在一些实施方案中,除去 Fc 区域中的 N- 糖基化。

[0042] 在另外的实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段的重链可变区包含 a) 选自 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :13 的氨基酸 1 至 30 的 FR1，b) 选自 SEQ ID NO :10 和 SEQ ID NO :13 的氨基酸 36 至 49 的 FR2，c) 选自 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12 和 SEQ ID NO :14 的氨基酸 67 至 98 的 FR3 ；和 d) 选自 SEQ ID NO :10 的氨基酸 113 至 123 的 FR4 ；并且其中轻链可变区包含 a) 选自 SEQ ID NO :15 和 SEQ ID NO :16 的氨基酸 1 至 23 的 FR1，b) 选自 SEQ ID NO :15 和 SEQID NO :18 的氨基酸 35 至 49 的 FR2 ；c) 选自 SEQ ID NO :15 和 SEQ IDNO :17 的氨基酸 57 至 88 的 FR3 ；和 d) 由 SEQ ID NO :15 的氨基酸 98 至 107 组成的 FR4。

[0043] 在另外的实施方案中，重链可变区包含选自 ：a)SEQ ID NO :10、b)SEQ ID NO :11、c)SEQ ID NO :12、d)SEQ ID NO :13 和 e)SEQ IDNO :14 的氨基酸序列。

[0044] 在另外的实施方案中，轻链可变区包含选自 ：a)SEQ ID NO :15、b)SEQ ID NO :16、c)SEQ ID NO :17 和 d)SEQ ID NO :18 的氨基酸序列。

[0045] 在另外的实施方案中，重链可变区包含 SEQ ID NO :13 的氨基酸序列，并且轻链可变区包含选自 ：a)SEQ ID NO :17 和 b)SEQ ID NO :18 的 氨基酸序列。

[0046] 在另外的实施方案中，重链可变区包含 SEQ ID NO :14 的氨基酸序列，并且轻链可变区包含选自 ：a)SEQ ID NO :17 和 b)SEQ ID NO :18 的氨基酸序列。在另外的实施方案中，重链可变区包含 SEQ ID NO :14 的氨基酸序列，并且轻链可变区包含 SEQ ID NO :18 的氨基酸序列。

[0047] 在一个实施方案中，以与亲本或非人抗体相同或更大的亲和力结合 EphB4 的细胞外结构域的解除免疫的抗体或抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区。解除免疫的抗体或抗原结合片段具有一个或更多个下列特征 ：a) 各可变区整个来源于一个或更多个人抗体 ；b) 各可变区，与亲本或非人抗体相比较，具有减少的 T 细胞表位数目 ；和 c) 各可变区，与亲本或非人抗体相比较，具有减少的 B 细胞表位数目。在一个实施方案中，各可变区是来自一个或更多个人抗体的区段的组合物。在一个实施方案中，人抗体区段在长度上为 2 至 35 个氨基酸。在一个实施方案中，人抗体区段不包含完整的 CDR 或单个的构架区。在另外的实施方案中，一个或更多个下列残基存在于重链可变区中 ：位点 5 上的缬氨酸、位点 12 上的赖氨酸、位点 40 上的丙氨酸、位点 66 上的精氨酸、位点 75 上的苏氨酸以及位点 83 上的精氨酸，所述位点根据 Kabat 编号系统。在另外的实施方案中，一个或更多个下列残基存在于轻链可变区中 ：位点 45 上的赖氨酸、位点 74 上的苏氨酸和位点 100 上的谷氨酰胺，所述位点根据 Kabat 编号系统。

[0048] 在另外的实施方案中，重链可变区包含含有 SEQ ID NO :25 的 CDR1、含有 SEQ ID NO :26 的 CDR2 和含有 SEQ ID NO :27 的 CDR3 ；并且轻链可变区包含含有 SEQ ID NO :28 的 CDR1、含有 SEQ ID NO :29 的 CDR2 和含有 SEQ ID NO :30 的 CDR3。在另外的实施方案中，重链可变区包含 a) 选自 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :13 的氨基酸 1 至 30 的 FR1，b) 选自 SEQ ID NO :10 和 SEQ ID NO :13 的氨基酸 36 至 49 的 FR2 ；c) 选自 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12 和 SEQ ID NO :14 的氨基酸 67 至 98 的 FR3 ；和 d) 由 SEQ ID NO :10 的氨基酸 113 至 123 组成的 FR4 ；并且轻链可变区包含 a) 选自 SEQ ID NO :15 和 SEQ ID NO :16 的氨基酸 1 至 23 的 FR1，b) 选自 SEQ ID NO :15 和 SEQID NO :18 的氨基酸 35 至 49 的 FR2 ；c) 选自 SEQ ID NO :15 和 SEQ IDNO :17 的氨基酸 57 至 88 的 FR3 ；和

d) 由 SEQ ID NO :15 的氨基酸 98 至 107 组成的 FR4。

[0049] 在另一个实施方案中，重链可变区包含含有 SEQ ID NO :19 的 CDR1、含有 SEQ ID NO :20 的 CDR2 和含有 SEQ ID NO :21 的 CDR3 ；并且其中轻链包含含有 SEQ ID NO :22 的 CDR1、含有 SEQ ID NO :23 的 CDR2 和含有 SEQ ID NO :24 的 CDR3。在另外的实施方案中，重链可变区包含 a) 选自 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :4 的氨基酸 1 至 30 的 FR 1，b) 选自 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :5 的氨基酸 36 至 49 的 FR2 ；c) 选自 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4 和 SEQ ID NO :5 的氨基酸 67 至 98 的 FR3 ；和 d) 由 SEQ ID NO :1 的氨基酸 113 至 123 组成的 FR4 ；并且轻链可变区包含 a) 由 SEQ ID NO :6 的氨基酸 1 至 23 组成的 FR 1，b) 选自 SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :9 的氨基酸 35 至 49 的 FR2 ；c) 选自 SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :8 的氨基酸 57 至 88 的 FR3 ；和 d) 由 SEQ ID NO :6 的氨基酸 98 至 107 组成的 FR4。

[0050] 在一个实施方案中，结合 EphB4 的细胞外结构域的解除免疫的抗体或其抗原结合片段具有比从具有 ATCC 保藏号 PTA-614 的杂交瘤获得的 #131 抗体的免疫原性更低并且以与获自杂交瘤的抗体相同的或更大的亲和力结合所述结构域。在另外的实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段的重链可变区包含含有 SEQ ID NO :25 的 CDR1、含有 SEQ ID NO :26 的 CDR2 和含有 SEQ ID NO :27 的 CDR3 ；并且轻链可变区包含含有 SEQ ID NO :28 的 CDR 1、含有 SEQ ID NO :29 的 CDR2 以及含有 SEQ ID NO :30 的 CDR3。在另外的实施方案中，重链可变区包含 a) 选自 SEQ ID NO :1 0、SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :13 的氨基酸 1 至 30 的 FR1，b) 选自 SEQ ID NO :10 和 SEQ ID NO :13 的氨基酸 36 至 49 的 FR2 ；c) 选自 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12 和 SEQ ID NO :14 的氨基酸 67 至 98 的 FR3 ；和 d) 由 SEQ ID NO :10 的氨基酸 113 至 123 组成的 FR4 ；并且轻链可变区包含 a) 选自 SEQ ID NO :15 和 SEQ ID NO :16 的氨基酸 1 至 23 的 FR 1，b) 选自 SEQ ID NO :15 和 SEQ ID NO :18 的氨基酸 35 至 49 的 FR2 ；c) 由选自 SEQ ID NO :15 和 SEQ ID NO :17 的氨基酸 57 至 88 组成的 FR3 ；和 d) 由 SEQ ID NO :15 的氨基酸 98 至 107 组成的 FR4。

[0051] 在一个实施方案中，结合 EphB4 的细胞外结构域的解除免疫的抗体或其抗原结合片段具有低于获自具有 ATCC 保藏号 _____ 的杂交瘤的 #47 抗体的免疫原性并且以与获自杂交瘤的抗体相同或更大的亲和力结合所述结构域。在另外的实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段的重链可变区包含含有 SEQ ID NO :19 的 CDR1、含有 SEQ ID NO :20 的 CDR2 和含有 SEQ ID NO :21 的 CDR3 ；并且轻链包含含有 SEQ IDNO :22 的 CDR1、含有 SEQ ID NO :23 的 CDR2 和含有 SEQ ID NO :24 的 CDR3。在另外的实施方案中，重链可变区包含 a) 选自 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :4 的氨基酸 1 至 30 的 FR1，b) 选自 SEQ IDNO :1、SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :5 的氨基酸 36 至 49 的 FR2 ；c) 选自 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4 和 SEQ ID NO :5 的氨基酸 67 至 98 的 FR3 ；和 d) 由 SEQ ID NO :1 的氨基酸 113 至 123 组成的 FR4 ；并且轻链可变区包含 a) 由 SEQ ID NO :6 的氨基酸 1 至 23 组成的 FR1，b) 选自 SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :9 的氨基酸 35 至 49 的 FR2 ；c) 选自 SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :8 的氨基酸 57 至 88 的 FR3 ；和 d) 由 SEQ ID NO :6 的氨基酸 98 至 107 组成的 FR4。

[0052] 在一个实施方案中，结合 EphB4 的细胞外结构域的解除免疫的抗体或抗原结合片段具有重链可变区，所述重链可变区具有下列 ：位点 5 上的缬氨酸、位点 12 上的赖氨酸、位

点 40 上的丙氨酸、位点 66 上的精氨酸、位点 75 上的苏氨酸和位点 83 上的精氨酸中的一个或更多个，所述位点根据根据 Kabat 编号系统。在另外的实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段具有轻链可变区，所述轻链可变区具有下列 :位点 45 上的赖氨酸、位点 74 上的苏氨酸以及位点 100 上的谷氨酰胺中的一个或更多个，所述位点根据 Kabat 编号系统。

[0053] 在一个实施方案中，提供了降低受试者中肿瘤的生长速度的方法。在另外的实施方案中，方法包括对受试者施用治疗有效量的本文中公开的解除免疫的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方案中，受试者是人受试者。在一个实施方案中，肿瘤包括与可供比较的组织的非癌性细胞相比较，表达更高 EphB 水平的细胞。

[0054] 在一个实施方案中，申请提供了促进细胞凋亡，从而治疗患有癌症的受试者的方法。在另外的实施方案中，方法包括对受试者施用治疗有效量的本文中公开的解除免疫的抗体或其抗原结合片段的方法。在一个实施方案中，受试者是人受试者。在一个实施方案中，癌症包括与可供 比较的组织的非癌性细胞相比，以更高的水平表达 EphB4 的癌细胞。癌症可以是转移癌。在另外的实施方案中，癌症选自结肠癌、乳腺癌、间皮癌、前列腺癌、鳞状上皮细胞癌 (squamous cell carcinoma)、卡波西肉瘤 (Kaposi sarcoma)、卵巢癌和白血病。在一个实施方案中，癌症是血管生成依赖性癌症或不依赖于血管生成的癌症。在一个实施方案中，可将抗体或抗原结合片段与一种或更多种额外的抗癌化学治疗剂共施用，所述化学治疗剂以累加或协同的方式与抗体或抗原结合片段一起抑制癌细胞。

[0055] 在某些实施方案中，本公开内容提供了用于治疗患有癌症的受试者的方法，包括 : (a) 鉴定受试者中具有多种表达 EphB4 和 / 或肝配蛋白 B2 的癌细胞的肿瘤 ;和 (b) 对受试者施用结合 EphB4 蛋白的细胞外结构域的抗体或抗原结合片段。

[0056] 在一个实施方案中，提供了抑制受试者中血管生成的方法。在另外的实施方案中，方法包括对有此需要的受试者施用有效量的本文中公开的抗体。在一个实施方案中，受试者是人受试者。在另外的实施方案中，受试者被诊断为黄斑变性。

[0057] 在一个实施方案中，方法可包括将细胞与足以抑制血管生成的量的解除免疫的抗体或抗原结合片段接触。

[0058] 在某些方面，本公开内容提供了用于治疗患有血管生成相关疾病的受试者的方法，其包括对受试者施用结合 EphB4 蛋白的细胞外结构域的解除免疫的抗体或抗原结合片段。可用药学上可接受的载体配制抗体或抗原结合片段。血管生成相关疾病或不期望的血管生成相关过程可选自血管生成依赖性癌症、良性肿瘤、炎性病症 (inflammatory disorder)、慢性关节风湿病和银屑病、眼部新生血管性疾病 (ocular angiogenicdisease)、Osler-Webber 综合征、心肌血管新生 (myocardial angiogenesis)、斑块新生血管形成 (plaque neovascularization)、毛细血管扩张、血友病关节 (hemophiliac joint)、血管纤维瘤、创伤肉芽形成 (woundgranulation)、创伤愈合、毛细血管扩张银屑病硬皮症 (telangiectasiapsoriasis scleroderma)、脓性肉芽肿、冠状动脉侧枝 (cororany collateral)、肢端缺血血管再生 (ischemic limb angiogenesis)、发红、关节炎、糖尿病新生血管化 (diabetic neovascularization)、骨折、血管生成和造血作用。可将抗体或抗原结合片段与至少一种额外的血管生成抑制剂共施 用，所述血管生成抑制剂以累加或协同的方式与抗体或抗原结合片段一起抑制血管生成。

[0059] 在治疗方法的另外的实施方案中，全身性施用解除免疫的抗体或其抗原结合片

段。在另外的实施方案中，局部施用解除免疫的抗体或其抗原结合片段。

[0060] 在一个实施方案中，提供了包含本文中公开的解除免疫的抗体或其抗原结合片段的药物组合物。在另外的实施方案中，组合物还可包含任何药学上可接受的载体或赋形剂。

[0061] 在一个实施方案中，提供了本文中公开的解除免疫的抗体或其抗原结合片段在制造用于治疗癌症的药剂中的用途。在另外的实施方案中，癌症选自结肠癌、乳腺癌、间皮癌、前列腺癌、鳞状上皮细胞癌、卡波西肉瘤、卵巢癌和白血病。在另外的实施方案中，提供了本文中公开的人源化抗体或其抗原结合片段在制造用于抑制血管生成的药剂中的用途。

[0062] 在一个实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段可抑制 EphB4 的活性。可设计抗体使之抑制肝配蛋白 B2 与 EphB4 之间的相互作用。拮抗剂抗体通常影响 Eph 和 / 或肝配蛋白的信号转导。例如，抗体可抑制 EphB4 的成簇 (clustering) 或磷酸化。在一个实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段还可增加 EphB4 的活性。激动剂抗体例如可上调 EphB4 的信号转导。

[0063] 在某些方面，公开内容提供了抑制细胞中通过肝配蛋白 B2/EphB4 途径的信号转导。方法可包括将细胞与有效量的结合 EphB4 蛋白的细胞外结构域并且抑制 EphB4 的活性的抗体或抗原结合片段接触。

[0064] 在某些实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段可以是多克隆抗体、单克隆抗体或抗体片段、重组抗体、双价抗体 (diabody)、嵌合的或嵌合型抗体或抗体片段、人源化抗体或抗体片段、完全人抗体或抗体片段、CDR 移植抗体或抗体片段、单链抗体、Fv、Fd、Fab、Fab' 或 $F(ab')_2$ 以及合成或半合成抗体。

[0065] 在某些实施方案中，解除免疫的抗体或抗体片段以对于 EphB4 蛋白的细胞外结构域至少大约 $1x10^{-3}M$、至少大约 $1x10^{-4}M$、至少大约 $1x10^{-5}M$、至少大约 $1x10^{-6}M$、至少大约 $1x10^{-7}M$、至少大约 $1x10^{-8}M$、至少大约 $1x10^{-9}M$、至少大约 $1x10^{-10}M$、至少大约 $1x10^{-11}M$ 或至少大约 $1x10^{-12}M$ 的解离常数 (K_D) 结合 EphB4 蛋白的细胞外结构域。

[0066] 在某些方面，可将本文中公开的解除免疫的抗体或抗体片段与额外的功能性部分例如赋予期望的药物代谢动力学特性的标记物或部分共价连接 (或与其稳定缔合)。示例性标记物包括适合于通过选自 : 荧光检测方法、正电子发射断层扫描术 (positron emission tomographydetection method) 和核磁共振检测法的方法检测的标记物。标记物可以例如选自 : 荧光标记物、放射性标记物和具有独特的核磁共振特征的标记物。可将部分例如聚乙二醇 (PEG) 部分附着至抗体或其抗原结合部分以增加血清半衰期。

[0067] 在某些实施方案中，解除免疫的抗体或抗体片段包括改变的恒定区，其中所述抗体或抗原结合片段展示与具有天然恒定区的抗 Eph4B 抗体相比，减弱的效应子功能。在某些实施方案中，减弱的效应子功能包括一个或更多个下列类型的特征 : 与具有天然恒定区的抗 Eph4B 抗体相比较，减弱的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用 (antibody-dependenT-cell-mediated cytotoxicity)(ADCC) 和减弱的补体依赖细胞毒性 (CDC)。

[0068] 在某些实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段包括改变的恒定区，其中所述抗体或抗原结合片段展示相对于具有天然恒定区的抗 Eph4B 抗体，增强的效应子功能。在某些实施方案中，增加的效应子功能包括一个或更多个下列类型的特征 : 与具有天然恒定区的抗 Eph4B 抗体相比较，增强的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 和增强的补体依赖细胞毒性 (CDC)。

[0069] 在某些实施方案中，解除免疫的抗体或其抗原结合片段具有抗癌活性。在某些实施方案中，抗癌活性可抑制肿瘤生长、抑制癌细胞增殖、抑制癌细胞迁移、抑制癌细胞的转移、抑制血管生成或引起肿瘤细胞死亡。

[0070] 在一个实施方案中，本申请提供了包含用于检测前列腺癌的本申请的抗体的诊断组合物。

[0071] 在一个实施方案中，本公开内容提供了结合位于 EphB4 的细胞外部分的表位的解除免疫的抗体或其抗原结合片段。解除免疫的抗体或其抗原结合片段可与位于图 1 的 EphB4 序列的氨基酸 16 至 198 的表位结合。例如，表位可位于 EphB4 的结合肝配蛋白 B2 的球状结构域（图 1 的氨 基酸 29 至 197）内。解除免疫的抗体或其抗原结合片段可抑制 EphB4 与肝配蛋白 B2 的细胞外部分的结合。解除免疫的抗体或其抗原结合片段可结合位于图 1 的 EphB4 序列的氨基酸 327 至 427 或 428 至 537 内的表位。例如，解除免疫的抗体或其抗原结合片段可结合 EphB4 的第一纤连蛋白样结构域（图 1 的氨基酸 324 至 429）或第二纤连蛋白样结构域（图 1 的氨基酸 434 至 426）。

[0072] 在其他实施方案中，对人施用抗体或抗原结合片段在临床上是可接受的。

[0073] 在其他实施方案中，提供了包含编码本文中提供的解除免疫的抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列的多核苷酸。在其他实施方案中，提供了在严格杂交条件下与编码本文中公开的解除免疫的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸杂交的多核苷酸。

[0074] 在其他实施方案中，提供了包含一个或更多个编码本文中公开的解除免疫的抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列的载体。

[0075] 在其他实施方案中，提供了包含表达本文中公开的解除免疫的抗体或其抗原结合片段的载体的分离的细胞。

[0076] 本申请涉及任何上述方面和实施方案的组合。

[0077] 附图概述

[0078] 图 1 显示 EphB4 前体蛋白的氨基酸序列。(Genbank 登录号 NP_004435 和 SEQ ID NO :53)

[0079] 图 2A-2D 显示比较来自亲本小鼠单克隆抗体和解除免疫的变体的可变区的氨基酸比对。图 2A 描述了与 5 个解除免疫的变体比对的小鼠单克隆抗体 #47 的重链可变区 (SEQ ID NO :49) ；图 2B 描述了与 4 个解除免疫的变体比对的 #47 的轻链可变区 (SEQ ID NO :50) ；图 2C 描述了与 5 个解除免疫的变体比对的小鼠单克隆抗体 #131 的重链可变区 (SEQID NO : 51) ；图 2D 描述了与 4 个解除免疫的变体比对的 #131 的轻链可变区 (SEQ ID NO :52)。阴影标示的残基表示与亲本小鼠单克隆抗体不同的氨基酸。

[0080] 图 3A 描述了将嵌合型 #47 抗体的结合与 4 个解除免疫的 #47 变异抗体的结合相比较的细胞外 EphB4 夹心 ELISA 的结果。数字表示可变区的序列。例如“3/7”表示具有 SEQ ID NO :3 的重链可变区和 EQ ID NO :7 的轻链可变区的抗体。图 3B 显示其中在 ELISA 中达到 50％的结合的各抗体的浓度。

[0081] 图 4A 描述了将嵌合型 #131 抗体的结合与 4 个解除免疫的 #131 变异抗体的结合相比较的细胞外 EphB4 夹心 ELISA 的结果。图 4B 显示在于 ELISA 中达到 50％结合的情况下各抗体的浓度。

[0082] 图 5 显示用 10mg/ml 的抗体处理的载有来自 HT29 细胞的裂解物的 SDS 凝胶的

western 印迹（泳道 1：无抗体处理，脉道 2：小鼠单克隆抗体 #131，泳道 3：嵌合型抗体 #131，泳道 4：示例性解除免疫的 #131 抗体，泳道 5：小鼠单克隆抗体 #47，泳道 6：嵌合型抗体 #47，泳道 7：和示例性解除免疫的 #47 抗体，泳道 8 表示分子标记，分子量以 Kda 表示）。印迹用抗 EphB4 一抗进行探测。

[0083] 图 6A 和 6B 描述了体内鳞状上皮细胞癌异种移植物测定的结果。肿瘤体积在 Y 轴上以 mm^3 表示，X 轴相应于在处理开始后的天数。将利用小鼠单克隆抗体 #47 和 #131 的处理与示例性解除免疫的抗体和对照处理相比较。

[0084] 发明详述

[0085] I. 定义

[0086] “受试者”是指脊椎动物，例如，哺乳动物或人。虽然本发明的抗体或抗原结合片段主要牵涉人受试者的治疗，但它们还可在兽医目的上用于其他哺乳动物受试者例如狗和猫的治疗。

[0087] 如本文中所使用的，术语“抗体”（免疫球蛋白）包括但不限于单克隆抗体（包括全长单克隆抗体）、多克隆抗体、从至少两个完整抗体形成的多特异性抗体（例如，双特异性抗体）、人抗体、人源化抗体、camelised 抗体、嵌合型抗体、单链 Fvs(scFv)、单链抗体、单结构域抗体、结构域抗体、Fab 片段、$F(ab')_2$ 片段、展示期望的生物活性的抗体片段、二硫键连接的 Fvs(sdFv)、胞内抗体 (intrabody) 和任何上述抗体的表位结合片段或抗原结合片段。抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学上有活性的片段，即含有抗原结合部位的分子。免疫球蛋白分子可以是任何类型（例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY）、种类（例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2）或亚类。

[0088] 术语“抗原结合片段”是指保持与抗原结合的抗体的任何部分。抗 体的示例性抗原结合片段是重链和 / 或轻链 CDR 或重链和 / 或轻链可变区。

[0089] 术语“免疫原性”是指抗体或抗原结合片段，当对受者施用时，引发免疫应答（体液或细胞）的能力，包括例如 HAMA 应答。当来自受试者的 T 细胞对施用的抗体作出免疫应答时引起 HAMA 应答。然后 T 细胞招募 B 细胞，从而产生特异性“抗 - 抗体”抗体。

[0090] 术语“T 细胞表位”是指以合理的效率结合 MHC II 类分子或能够通过在 MHC II 类上呈递来刺激 T 细胞的特定肽序列。

[0091] 术语“B 细胞表位”是指被 B 细胞识别的肽序列。通常，此类序列是溶剂可及的。

[0092] 术语免疫解除 (deimmunization) 是减少化合物对给定的物种的免疫原性的方法。解除免疫的抗体是在给定的物种中比相应的亲本或非人抗体的免疫原性更低的抗体。

[0093] 如本文中所用的，术语肝配蛋白 (Ephrin) 和 Eph 用于分别指配体和受体。它们可来自多种动物的任一种（例如，哺乳动物 / 非哺乳动物、脊椎动物 / 无脊椎动物，包括人）。该领域中的命名法已发生快速变化，本文中使用的命名法是作为 Eph 命名委员会 (Eph NomenclatureCommittee) 工作的结果提出的，可在 eph-nomenclature.com 上于万维网上访问其以及之前使用的名称。

[0094] II. 概述

[0095] Eph 家族受体是与 Eph 相关的受体蛋白质 - 酪氨酸激酶的家族，受体因其在产生促红细胞生成素的人肝细胞癌细胞系中表达而得名。基于它们的细胞外结构域序列与它们优先结合肝配蛋白 -A 蛋白或肝配蛋白 -B 蛋白的能力的相关性，它们被分为两个亚类。优选

与肝配蛋白 -A 蛋白相互作用的受体是 EphA 受体，优先与肝配蛋白 -B 蛋白相互作用的宏观世界体是 EphB 受体。

[0096] Eph 受体具有由结合配体的球状结构域组成的细胞外结构域、富含半胱氨酸的区域，接着一对 III 型纤连蛋白重复。细胞质结构域由含有两个保守酪氨酸残基的近膜区域、蛋白质酪氨酸激酶结构域、不育 α - 基序 (SAM) 和 PDZ- 结构域结合基序组成。EphB4 对于膜结合配体肝配蛋白 B2 是特异性的 (Sakano, S. 等人 1996 ; Brambilla R. 等人 1995)。肝配蛋白 B2 属于具有跨膜结构域和细胞质区域（具有 5 个保守酪氨酸残基）和 PDZ 结构域的 Eph 配体的种类。Eph 受体通过成簇的膜附着的肝配蛋白的结合来激活 (Davis S 等人，1994)，这表明表达受体的细胞与表达配体的细胞之间的接触是 Eph 的激活所必需的。

[0097] 在配体结合后，Eph 受体二聚化并且自磷酸化近膜酪氨酸残基以获得完全激活 (Kalo MS 等人，1999，Binns KS，2000)。除了通过 Eph 受体的正向信号转导外，还可发生通过肝配蛋白 B 的反向信号转导。肝配蛋白的 Eph 衔接 (engagement) 导致保守的细胞内酪氨酸的快速磷酸化 (Bruckner K，1997) 和稍微较慢的 PDZ 结合蛋白的招募 (Palmer A 2002)。

[0098] EphB4 前体蛋白描述于图 1 中。图 1 的 EphB4 序列的氨基酸 16 至 198 相应于结合肝配蛋白 B2 的球状结构域 (GD)。氨基酸 239-321 相应于富含半胱氨酸的结构域并且氨基酸 324-429 和 434-526 分别相应于 EphB4 的第一纤连蛋白样结构域 (FND1) 和第二纤连蛋白样结构域 (FND2)。

[0099] 几个研究已显示 Eph/ 肝配蛋白的高表达与增加的肿瘤生长、肿瘤发生能力和转移的潜能相关 (Easty DJ，1999 ; Kiyokawa E，1994 ; Tang XX，1999 ; Vogt T，1998 ; Liu W，2002 ; Stephenson SA，2001 ; Steube KG 1999 ; Berclaz G，1996)。申请 10/949,720 证明 EphB4 抗体在异种移植头颈癌肿瘤类型中引起细胞凋亡、减少血管生成和抑制肿瘤生长。

[0100] 本公开内容提供了可用于治疗癌症以及血管生成相关病症和不期望的血管生成相关过程的解除免疫的抗体和抗原结合片段。

[0101] 解除免疫的抗体和抗原结合片段可用于在体外和体内抑制 EphB4 的功能。本公开内容提供了例如通过抑制 EphB4 与 EphB2 相互作用用作受体拮抗剂的抗体。本公开内容还提供了用作激动剂并且激活 EphB4 激酶的活性（通常通过估计 EphB4 的磷酸化状态来评估的）的抗体和其抗原结合部分。令人惊讶地，此类抗体还在基于细胞的测定和体内测定中抑制 EphB4 的功能。因此，此类抗体和抗原结合片段可用于在体外和体内抑制 EphB4 功能，以及用于治疗与不期望的血管生成相关的癌症或病症。虽然不希望受任何特定机制的限定，但预期刺激 EphB4 激酶活性的抗体也影响从膜上除去 EphB4，从而降低总的 EphB4 水平。

[0102] III. 抗体

[0103] 抗体是由脊椎动物中称为 B 细胞的淋巴细胞响应抗原引起的刺激而产生的蛋白质。抗体（或更确切地免疫球蛋白 (Ig)）分子的基本结构单位由 4 条多肽链组成，其组合在一起形成大写字母“Y”的形状。4 条链中的 2 条是相同的轻 (L) 链，2 条是相同的重 (H) 链。存在 5 种不同类型（同种型）的重链，其将抗体分成 5 类，即 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。此外，存在命名为 κ 和 λ 的两种不同的同种型的轻链。每一类重链可与任一类轻链组合。重链和轻链各自包含参与抗原识别的可变区（分别地，VH 和 VL）和恒定 (C) 区。抗原结合部位由 6 个高变区（或确切地互补决定区 (CDR)）组成。来自重链的 3 个 CDR 和来自轻链

的 3 个 CDR 分别位于各链上的 4 个相对保守的反向平行的 β 折叠片（其被称为构架区）(FR1、FR2、FR3 和 FR4) 之间。按惯例，已使用编号系统指示 VH 和 VL 链的构成部分的位置。Kabat 定义基于序列变异，Chothia 定义基于结构环区域的定位。本文中使用 Kabat 定义进行编号。

[0104] 在某些方面，本发明提供了抗 EphB4 的解除免疫的抗体和抗原结合片段。在一些实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段结合 EphB4 的细胞外结构域。应理解，抗体可以是 Fab、Fv、scFv、Fab′ 和 $F(ab')_2$、单克隆和多克隆抗体、基因工程抗体（包括嵌合型抗体、单链抗体、CDR 移植抗体、人源化抗体、完全人抗体和人工选择的抗体）以及使用噬菌体展示或备选技术产生的合成抗体或半合成抗体。

[0105] 在本申请的一个实施方案中，抗体片段是截断的链（在羧基末端截断的）。在某些实施方案中，这些截断的链具有一个或更多个免疫球蛋白活性（例如，补体结合活性）。截断的链的实例包括但不限于 Fab 片段 (VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成）；Fd 片段（由 VH 和 CH1 结构域组成）；Fv 片段（由抗体的单链的 VL 和 VH 组成）；dab 片段（由 VH 结构域组成）；分离的 CDR 区域；$(Fab')_2$片段，二价体片段（包含由铰链区上的二硫键连接的两个 Fab 片段）。截断的链可通过其各自在本领域内是已知的常规生物化学技术例如酶切割或重组 DNA 技术产生。此类多肽片段可利用本领域内熟知的方法通过蛋白水解切割完整的抗体来产生，或使用定向诱变在载体中期望的位置上例如在 CH1 之后插入终止密码子以产生 Fab 片段或在铰链区之后插入终止密码子以产生 $(Fab')_2$片段来产生。单链抗体可通过用编码连接 VL 和 VH 蛋白质片段的肽连接体的 DNA 连接 VL- 和 VH- 编码区来产生。

[0106] 本申请还提供了抗 EphB4 抗体的片段，其可包含完整抗体的部分，例如，完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、$F(ab')_2$和 Fv 片段；双价抗体；线性抗体 (Zapata 等人.，Protein Eng. 1995；8(10)：1057-1062)；单链抗体分子；以及从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0107] 抗体的木瓜蛋白酶降解产生两个相同的抗原结合片段，称为“Fab”片段，各自具有单个抗原结合部位，和残留的“Fc”片段，其名称反映其容易结晶的能力。抗体的胃蛋白酶片段产生具有抗原结合部位并且仍然能够交联抗原的 $F(ab')_2$片段。

[0108] “Fv”通常是指含有完整抗原识别和结合部位的最小抗体片段。该区域由以紧密的非共价缔合的一个重链和一个轻链可变区的二聚体组成。在该构型中，各可变区的 3 个 CDR 相互作用以界定 V_H-V_L二聚体的表面上的抗原结合部位。CDR 共同地赋予抗体抗原结合特异性。然而，甚至单个可变区（或含有 3 个特异于抗原的 CDR 的 Fv 的一半）也具有识别和结合抗原的能力，虽然以可能以比完整结合部位更低的亲和力结合。

[0109] 因此，在某些实施方案中，本申请中公开的抗体可包含 1、2、3、4、5、6 或更多个识别 EphB4 的细胞外结构域的 CDR。

[0110] Fab 片段还包含轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域 (CH1)。Fab' 片段与 Fab 片段相异在于重链 CH1 结构域的羧基端上少数残基的添加，包括一个或更多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。Fab'-SH 在本文中是其中恒定结构域的半胱氨酸残基具有游离巯基的 Fab' 的名称 (designation)。$F(ab')_2$抗体片段最初产生为成对的在其间具有铰链半胱氨酸的 Fab' 片段。抗体片段的其他化学偶联也是知的。“单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 V_H和 V_L结构域，其中这些结构域存在于单个多肽链中。在某些实施方案中，Fv 多

肽还在 V_H 和 V_L 结构域之间包含使得 scFv 形成用于抗原结合的期望的结构的多肽连接体。关于 scFv 的综述，参见 Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，第 113 卷，Rosenburg 和 Moore，eds.(Springer-Verlag：New York，1994)，pp.269-315。

[0111] SMIP 是一类经基因工程改造而包含靶结合区和效应结构域 (effector domain)(CH2 和 CH3 结构域）的单链肽。参见例如，美国专 利申请公开案 20050238646。靶结合区可来源于抗体例如本申请的抗 EphB4 抗体的可变区或 CDR。备选地，靶结合区来源于结合 EphB4 的蛋白质。

[0112] 术语“双价抗体”是指具有两个抗原结合部位的小抗体片段，所述片段包含连接至相同多肽链 (V_H-V_L) 中的轻链可变区 (V_L) 的重链可变区 (V_H)。通过使用太短而不能允许相同链上的两个结构域之间配对的连接体，迫使结构域与另一条链的互补结构域配对，从而产生两个抗原结合部位。在例如 EP 404,097；WO 93/11161；和 Hollinger 等人.，Proc. Natl.Acad.Sci.USA，90：6444-6448(1993) 中更全面地描述了双价抗体。

[0113] 众所周知，具有 Fc 区域的抗体对分子（或病原体）的结合帮助分子（或病原体）的加工和清除。抗体的 Fc 部分被由免疫效应细胞表达的特化受体 (specialized receptors) 识别。IgG1 和 IgG3 抗体的 Fc 部分被存在于吞噬细胞例如巨噬细胞和中性粒细胞的表面上的 Fc 受体识别，所述吞噬细胞从而能够结合并且吞噬包被有此类同种型的抗体的分子或病原体 (Janeway 等人.，Immunobiology第 5 版，第 147 页，GarlandPublishing(New York,2001))。

[0114] 本发明的抗 EphB4 抗体包括具有所有类型的恒定区的抗体，包括 IgM、IgG、IgD、IgA 和 IgE，和任何同种型，包括 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 和 IgG4。抗体的轻链可以是 κ 轻链或 λ 轻链。

[0115] 在某些实施方案中，包含来源于不同物种的部分的单链抗体和嵌合型抗体、人源化抗体或灵长源化 (CDR- 移植）抗体以及嵌合型或 CDR 移植单链抗体也作为抗体的抗原结合片段包括在本公开内容中。此类抗体的不同部分可通过常规技术化学地连接在一起，或可使用基因工程技术制备为连续蛋白质。例如，可表达编码嵌合型或人源化单链的核酸来产生连续蛋白质。参见，例如，美国专利 4,816,567 和 6,331,415；美国专利 4,816,397；欧洲专利 0,120,694；WO 86/01533；欧洲专利 0,194,276B1；美国专利 5,225,539；和欧洲专利 0,239,400B1。也参见，Newman 等人，BioTechnology，10：1455-1460(1992)，关于灵长源化抗体。参见，例如，Ladner 等人，美国专利 4,946,778；和 Bird 等人，Science，242：423-426(1988))，关于单链抗体。

[0116] 在某些方面，本申请提供了具有对于 EphB4 或 EphB4 的部分的结合特异性的抗体和抗原结合片段。在一些方面，抗体和抗原结合片段结 合一个或更多个 EphB4 的特定结构域。例如，抗体或抗原结合片段结合 EphB4 的一个或更多个细胞外结构域（例如球状结构域、富含半胱氨酸的结构域以及第一纤连蛋白 3 型结构域以及第二纤连蛋白 3 型结构域）。在一些方面，免疫球蛋白可以以至少大约 1×10^{6}、1×10^{7}、1×10^{8}、1×10^{9}M 或更小的解离常数 (K_D) 结合 EphB4。在某些实施方案中，本文中公开的抗体和抗原结合片段对于 EphB4 是特异性的，对 Eph 或肝配蛋白家族的其他成员具有最低限度的结合。

[0117] 在某些实施方案中，本申请提供了 EphB4 拮抗剂抗体。如本文中所述的，术语“拮抗剂抗体”是指可抑制 EphB4 的一个或更多个功能例如结合活性（例如，配体结合）和信

号转导活性（例如，EphB4 的成簇或磷酸化、细胞应答的刺激例如细胞迁移或细胞增殖的刺激）的抗体。例如，拮抗剂抗体可抑制（减少或防止）EphB4 受体与天然配体（例如，肝配蛋白 B2 或其片段）的相互作用。在一些实施方案中，抗 EphB4 的拮抗剂抗体可抑制 EphB4 介导的功能，包括内皮细胞迁移、细胞增殖、血管生成和 / 或肿瘤生长。在某些实施方案中，拮抗剂抗体结合 EphB4 的细胞外结构域。

[0118] 在其他实施方案中，抗体或抗原结合片段是 EphB4 拮抗剂。在一些实施方案中，抗体或抗原结合片段激活或增强 EphB4 激酶的活性，甚至不依赖于肝配蛋白 B2。在一些情况下，此类抗体可用于刺激 EphB4。然而，申请者指出在大多数基于细胞的测定和体内测定中，此类抗体令人惊讶地表现如拮抗剂抗体一样。此类抗体似乎结合纤连蛋白 III 型结构域，特别地图 1 的氨基酸 327 至 427 的区域。在一些实施方案中，结合 EphB4 的纤连蛋白 III 型结构域的抗体或抗原结合片段可抑制由 EphB4 介导的功能，包括内皮细胞迁移、细胞增殖、血管发生和 / 或肿瘤生长。

[0119] 在某些实施方案中，包含来源于不同物种的部分的单链抗体和嵌合型抗体、人源化抗体或灵长源化 (CDR- 移植）抗体以及嵌合型或 CDR 移植单链抗体也作为抗体的抗原结合部分包括在本公开内容中。

[0120] 此外，还可产生抗体的抗原结合片段，包括嵌合型抗体、人源化抗体、灵长源化抗体或单链抗体的片段。受试抗体的抗原结合片段保持它们所源自的全长抗体的至少一种结合功能和 / 或调节功能。某些抗原结合片段保持抑制 EphB4 的一个或更多个功能特征例如结合活性、信号转导 活性和 / 或细胞应答的刺激的能力。例如，在一个实施方案中，EphB4 抗体的抗原结合片段可抑制 EphB4 与一种或更多种其配体（例如肝配蛋白 B2）的相互作用和 / 或可抑制一种或更多种受体介导的功能例如细胞迁移、细胞增殖、血管生成和 / 或肿瘤生长。

[0121] 在一个方面，解除免疫的抗体或抗原结合片段是小鼠抗体。在一个方面，重链和轻链可变区各自包含 2 至 20 个氨基酸置换。在一个方面，置换包括用至少一个相应的人氨基酸置换至少一个小鼠氨基酸。在一个方面，基于鉴定与小鼠可变区同源的人种系基因来选择人氨基酸。在一个方面，就小鼠可变区的 4 个构架区中的每一个独立地鉴定同源人种系基因。

[0122] 如本文中所使用的，术语“人源化抗体和抗原结合片段”是指包含不同来源的抗体的部分的抗体或抗原结合片段，其中至少一个部分是人来源的部分。因此，一个实施方案涉及具有对于 EphB4（例如，人 EphB4）的结合特异性的解除免疫的抗体，所述抗体包含非人来源（例如，啮齿动物）的抗原结合区和至少一部分人来源的抗体（例如，人构架区、人恒定区或其部分）。例如，解除免疫的抗体可包含通过常规技术（例如，合成）化学地连接在一起的或使用基因工程技术制备为连续多肽（例如，可表达编码嵌合型抗体的蛋白质部分的 DNA 以产生连续多肽链）的来源于具有需要的特异性的非人来源例如小鼠的抗体和来源于人来源的抗体序列的部分（例如，嵌合型抗体）。

[0123] 在某些实施方案中，构架区来源于最接近的人种系构架区。在某些实施方案中，抗体或抗原结合片段包含来自最接近的人种系基因的 FR1、FR2、FR3 和 FR4 区域。在某些实施方案中，各构架区独立地选自与特定构架区最接近的人种系基因。在某些实施方案中，用来自非人或亲本抗体的相应残基置换影响构架区中抗原结合亲和力的残基。

[0124] 在一个方面，解除免疫的抗体或抗原结合片段包含一个或更多个含有非人来源的 CDR（例如，一个或更多个来源于非人来源的抗体的 CDR）和来源于人来源例如种系抗体基因的轻链和 / 或重链的构架区的抗体链（例如，具有或不具有构架区变化的 CDR 移植抗体）。在一个实施方案中，解除免疫的抗体可与鼠单克隆抗体竞争对 EphB4 多肽的结合。嵌合型或 CDR 移植单链抗体还可包括在术语人源化抗体内。

[0125] 在一个方面，解除免疫的抗体或抗原结合片段包含含有非人来源的 CDR（例如，一个或更多个来源于非人来源的抗体的 CDR）和非人来源的构架区的抗体链。在一个实施方案中，用至少一个来自相应的人构架区的氨基酸置换非人构架区。在一个实施方案中，人氨基酸残基对非人残基的置换减少了抗体在人受试者中的免疫原性。

[0126] 在一个实施方案中，提供了结合 EphB4 的细胞外结构域的解除免疫的抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区和轻链可变区，其中与结合 EphB4 的细胞外结构域的非人或亲本抗体相比较，各可变区具有 2 至 20 个氨基酸置换。可变区包括其间散布 4 个构架区的 3 个 CDR 区。在一个方面，置换存在于构架区中。

[0127] 在一个实施方案中，将非人或亲本抗体与人种系抗体基因的数据库例如来自 V BASE 的数据库相比较，鉴定高度同源的单个的构架区。可使用这样的程序如 SwissPdb，WAM(Web Antibody Modelling) 和 AbM 产生非人或亲本抗体可变区的结构模型。可用来自人种系基因的相应的残基置换残基，例如在与 CDR 或抗原相互作用中不起作用或对抗原结合亲和力没有贡献的残基。

[0128] 在一个实施方案中，将非人或亲本抗体的可变区氨基酸序列中的单个的构架区而非整个构架与人抗体集合中相应的序列相比较。选择具有最高度同源性的人构架置换非人或亲本抗体的原始构架。该技术，称为“framework patching”，详细地描述于美国专利申请案 US2005/0033028 中，其通过引用合并入本文。

[0129] 在一个实施方案中，将称为“构架改组 (framework shuffling)”的具有来自非人或亲本抗体的 CDR 可变区的重组文库按读框融合至单个的人种系构架库 (pool) (Dall′ Acqua 等人，Methods，36 :43(2005))。然后筛选文库以鉴定编码人源化抗体的克隆，所述人源化抗体以与非人或亲本抗体相比较相似的或更大的结合亲和力结合 EphB4 的细胞外结构域。

[0130] 在一个实施方案中，分析非人或亲本抗体以鉴定潜在的 T 细胞表位。可使用预测 MCH II 类结合基序的肽缝合软件 (peptide threadingsoftware) 鉴定 T 细胞表位。计算机结合预测算法包括 iTope™、Tepitope、SYFPEITHI 和 MHCpred。在一个实施方案中，平行地就潜在的 T 细胞表位分析同源单个的人构架区。可不管在非人或亲本可变区和人种系基因中鉴定的表位。然后就可能的置换标记只在非人或亲本可变区中鉴定的表位。

[0131] 在一个实施方案中，分析非人或亲本抗体以鉴定潜在的 B 细胞表位。可通过鉴定非人或亲本抗体构架区中为至少部分溶剂可及的并且与相应的同源人抗体构架残基不同的残基来识别潜在的 B 细胞表位。在一个实施方案中，通过用相应的人残基置换溶剂可及的非人或亲本抗体构架区残基来消除潜在的 B 细胞表位。

[0132] 在一个实施方案中，被导入解除免疫的抗体的置换包括氨基酸置换、缺失或插入。在一个实施方案中，各置换导致来自同源人种系基因或来自人可变区共有序列的相应氨基酸对一个氨基酸的置换。在一个实施方案中，通过用来自同源人种系基因或来自人可变区

共有序列的相应的氨基酸置换 2 至 20 个氨基酸来除去非人或亲本抗体或抗原结合片段的免疫原性。在一个实施方案中，置换可除去一个或更多个 T 细胞或 B 细胞表位。在另一个实施方案中，置换可导入调节 T 细胞表位。在一个实施方案中，解除免疫的非人或亲本抗体或抗原结合片段，当对人受试者施用时，显示高于非人或亲本抗体或抗原结合片段的降低的免疫原性应答。

[0133] 在一个实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段的重链和轻链可变区整个来源于一个或更多个人抗体，如 WO2006/08246 中所描述的。在一个实施方案中，可变区由来自一个或更多个人抗体的氨基酸序列的区段组成。在一个实施方案中，人区段在长度上为 2 或更多个氨基酸。在一个实施方案中，人区段在长度上为 100 个或更少的氨基酸。在另外的实施方案中，人区段在长度上为 50 个或更少，40 个或更少或 30 个或更少的氨基酸。

[0134] 在一个实施方案中，各可变区，与亲本或非人抗体相比较，具有减少的 T 细胞表位数目。在一个实施方案中，各可变区，与亲本或非人抗体相比较，具有减少的 B 细胞表位数目。

[0135] 在一个方面，解除免疫的抗体或抗原结合片段包含小鼠单克隆抗体 #47 的 CDR 区。在 US2005/0249736 中已描述和表征了小鼠单克隆抗体 #47，其以其全文通过引用合并入本文。小鼠单克隆抗体 #47 的重链的 CDR 区定义为 SEQ ID NO :19(CDR1)、SEQ ID NO :20(CDR2) 和 SEQ IDNO :21(CDR3)。小鼠单克隆抗体 #47 的轻链的 CDR 区定义为 SEQ IDNO :22(CDR1)、SEQ ID NO :23(CDR2) 和 SEQ ID NO :24(CDR3)。在一个方面，解除免疫的抗体或抗原结合片段包含小鼠单克隆抗体 #47 的一 个或更多个构架区 (FR1-FR4)。

[0136] 在一个方面，解除免疫的抗体或抗原结合片段在人受试者中比小鼠单克隆抗体 #47 的免疫原性更低（或更确切地，引起减少的 HAMA 应答）。测定免疫原性的测定法完全在本领域技术人员的知识范围之内。可进行确定免疫应答的本领域公认的方法以在特定受试者中或在临床试验期间监控 HAMA 应答。可在所述治疗的开始时和在整个施用过程中对施用了解除免疫的抗体的受试者进行免疫原性评估。例如通过使用本领域技术人员已知的方法（包括表面等离子体共振技术 (BIACORE) 和 / 或固相 ELISA 分析）检测来自受试者的血清样品中抗解除免疫的治疗剂的抗体来测量 HAMA 应答。备选地，设计用于测量 T 细胞活化事件的体外测定也可显示免疫原性。例如，一个测定是 T 细胞增殖测定。在该测定中，就响应抗体或抗体片段的增殖筛选来自在世界上代表大于 80％的 HLA-DR 等位基因的供体的 PBMC。

[0137] 在一个方面，解除免疫的抗体或抗原结合片段以为小鼠单克隆抗体 #47 的结合亲和力的至少 80％或至少 90％的亲和力结合 EphB4 的细胞外结构域。在另一个实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段以为小鼠单克隆抗体 #47 的结合亲和力的至少 100％或更合适地更大的结合亲和力结合 EphB4 的细胞外结构域。

[0138] 结合亲和力的测定完全在本领域技术人员的知识范围之内。本领域公认的方法包括酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射免疫沉淀 (RIP) 测定和 BIAcore 生物传感器测定。实施例 2 更详细地描述了使用夹心 ELISA 进行的结合亲和力的测定。

[0139] 在另一个方面，解除免疫的抗体或抗原结合片段包含重链和轻链，所述重链包含定义为 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQID NO :4 或 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列，所述轻链包含定义为 SEQ IDNO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8 或 SEQ ID NO :9 的氨

基酸序列。在一个实施方案中，重链是 SEQ ID NO :3 并且轻链是 SEQ ID NO :7。在一个实施方案中，重链是 SEQ ID NO :3 并且轻链是 SEQ ID NO :8。在一个实施方案中，重链是 SEQ ID NO :4 并且轻链是 SEQ ID NO :7。在一个实施方案中，重链是 SEQ ID NO :4 并且轻链是 SEQ ID NO :8。在一些实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段结合 EphB4 的细胞外结构域。在一些实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段对人受试者的免疫 原性低于小鼠单克隆抗体 #47。

[0140] 在一个方面，解除免疫的抗体或抗原结合片段包含小鼠单克隆抗体 #131 的 CDR 区。已在 US2005/0249736（其以其全文通过引用合并入本文）中描述和表征了小鼠单克隆抗体 #131。小鼠单克隆抗体 #131 的重链的 CDR 区定义为 SEQ ID NO :25(CDR1)、SEQ ID NO :26(CDR2) 和 SEQID NO :27(CDR3)。小鼠单克隆抗体 #131 的轻链的 CDR 区定义为 SEQ IDNO :28(CDR1)、SEQ ID NO :29(CDR2) 和 SEQ ID NO :30(CDR3)。在一个方面，解除免疫的抗体或抗原结合片段包含小鼠单克隆抗体 #131 的一个或更多个构架区 (FR1-FR4)。

[0141] 在一个方面，解除免疫的抗体或抗原结合片段以为小鼠单克隆抗体 #131 的结合亲和力的至少 80％或至少 90％的结合亲和力结合 EphB4 的细胞外结构域。在另一个实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段以为小鼠单克隆抗体 #131 的结合亲和力的至少 100％或更合适地更大的结合亲和力结合 EphB4 的细胞外结构域。

[0142] 在一个方面，解除免疫的抗体或抗原结合片段在人受试者中比小鼠单克隆抗体 #131 的免疫原性更低（或更确切地，引起减少的 HAMA 应答）。

[0143] 在另一个方面，解除免疫的抗体或抗原结合片段包含重链和轻链，所述重链含有定义为 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13 或 SEQ ID NO :14 的氨基酸序列，所述轻链含有定义为 SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17 或 SEQ ID NO :18 的氨基酸序列。在一个实施方案中，重链是 SEQ ID NO :13 并且轻链是 SEQ IDNO :17。在一个实施方案中，重链是 SEQ ID NO :13 并且轻链是 SEQ IDNO :18。在一个实施方案中，重链是 SEQ ID NO :14 并且轻链是 SEQ IDNO :17。在一个实施方案中，重链是 SEQ ID NO :14 并且轻链是 SEQ IDNO :18。在一些实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段结合 EphB4 的细胞外结构域。在一些实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段对人受试者的免疫原性比小鼠单克隆抗体 #131 的更低。

[0144] 在一些实施方案中，解除免疫的抗体抑制培养的内皮细胞形成管。抑制可通过本领域技术人员已知的任何方法（包括下列方法）来确定。将基质胶 (60μl 的 10mg/ml ; Collaborative Lab, Cat.No.35423) 置于冰冷的 96 孔板的各个孔中。让板在室温下静置 15 分钟，然后在 37℃下温 育 30 分钟以使基质胶聚合。同时，以 $2x10^5$个细胞 /ml 的浓度在 EGM-2(Clonetic, Cat.No.CC3162) 中制备人脐静脉内皮细胞。在相同的培养基中以 2x 期望的浓度 (5 个浓度水平）制备解除免疫的抗体或抗原结合片段。将细胞 (500μl) 和 2x 抗体 (500μl) 混合，将 200μl 该悬浮液以一式两份置于聚合的基质胶上。在 24 小时的温育后，对于每一个浓度，使用 Bioquant Image Analysis 系统拍摄一式三份图象。与未处理的对照相比较，通过测量形成的束的长度和接点 (junction) 的数目来估量蛋白质相加作用 (Protein addition effect)(IC_{50})。

[0145] 在一些实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段在体内抑制组织的血管化作用。抑制可通过本领域技术人员已知的任何方法（包括下列方法）来确定。可在小鼠中将体

内血管生成测定为血管从皮下组织至含有解除免疫的抗体或抗原结合片段的基质胶栓内的生长。基质胶在体温下快速形成固体凝胶，从而捕获因子以使能够缓慢释放至周围组织和延长对周围组织的暴露。将在 4℃以液体形式存在的基质胶 (8.13mg/ml，0.5ml) 与内皮细胞生长添加剂 (Endothelial Cell Growth Supplement)(ECGS)、解除免疫的抗体 +ECGS 或基质胶 + 单独的载体 (含有 0.25％ BSA 的 PBS) 混合。将基质胶 (0.5ml) 沿着腹膜中间线 (peritoneal mid line) 注射入雌性 nu/nu 小鼠 (6 周龄) 的腹部皮下组织内。在第 6 天，处死小鼠，回收栓，然后进行处理以进行组织学分析。通常除去覆盖在上面的皮肤，通过保留用于支持的腹膜衬里切取凝胶，将其固定在 10％的 PBS 中的缓冲福尔马林中，然后包埋在石蜡中。切取 3μm 的切片，用 H&E 或 Masson′ s 三色染色法进行染色，在光学显微镜下进行检查。

[0146] 在一些实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段减少人肿瘤异种移植物在小鼠中的生长。肿瘤生长的抑制可通过本领域技术人员已知的任何方法 (包括实施例中描述的方法) 来确定。

[0147] 在一些实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段抑制植入动物的角膜的组织的血管化作用。抑制可通过本领域技术人员已知的任何方法来确定，所述方法包括按照由 Kenyon 等人，1996 所述的方法进行的小鼠角膜微囊袋测定法 (corneal micropocket assay)。(参见美国申请 2005/0249736，其通过引用合并入本文)。

[0148] 在一些实施方案中，解除免疫的抗体或抗原结合片段促进细胞凋亡。可使用不同方法包括 TUNEL 染色和 Cell Death Detection ELISAplus 试剂盒 (Roche，Piscataway，NJ) 来检查细胞凋亡。

[0149] 在某些方面，本申请提供了杂交瘤细胞系以及由这些杂交瘤细胞系产生的单克隆抗体。公开的细胞系具有除了用于产生单克隆抗体外的用途。例如，可将细胞系与其他细胞 (例如合适的药物标记的人骨髓瘤、小鼠骨髓瘤、人 - 小鼠异源骨髓瘤 (heteromyeloma) 或人淋巴样干细胞) 融合以产生另外的杂交瘤，从而提供编码单克隆抗体的基因的转移。此外，细胞系可用作编码抗 EphB4 免疫球蛋白链的核酸的来源，可分离和表达所述核酸 (例如，在使用任何适当的技术 (参见例如，Cabilly 等人，美国专利 4,816,567 ；Winter，美国专利 5,225,539) 转移至其他细胞后)。例如，可分离 (例如，通过 PCR) 包含重排的抗 EphB4 轻链或重链的克隆或可从从细胞系分离的 mRNA 制备 cDNA 文库，以及可分离编码抗 EphB4 免疫球蛋白链的 cDNA 克隆。因此，可获得编码抗体的重链和 / 或轻链或其部分的核酸，并且按照重组 DNA 技术将其用于在多种宿主细胞中或在体外翻译系统中产生特定的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其变体 (例如，人源化免疫球蛋白)。例如，可将编码变体例如人源化免疫球蛋白或免疫球蛋白链的核酸包括 cDNA 或其衍生物置于合适的原核或真核载体 (例如，表达载体) 中，然后通过适当的方法 (例如，转化、转染、电穿孔、感染) 导入合适的宿主细胞中，以使核酸与一个或更多个表达控制元件有效连接 (例如，在载体中或整合入宿主细胞的基因组)。为了抗体的产生，可在适合于表达的条件下 (例如，在诱导剂、补充有适当的盐、生长因子、抗生素、营养补充剂等的合适的培养基存在的情况下) 维持宿主细胞，由此产生编码的多肽。如果期望，可回收和 / 或分离 (例如，从宿主细胞或培养基) 回收编码的蛋白质。应当理解，产生的方法包括在转基因动物的宿主细胞中的表达 (参见例如，WO 92/03918，GenPharm International，于 1992 年 3 月出版的)。

[0150] 本抗体和抗原结合片段可用于在体内直接杀死或除去癌细胞。直接杀死包括对需要此种治疗的受试者施用抗体（任选地将其融合至细胞毒性药物）。在一些实施方案中，癌症包括以比可供比较的组织的非癌性细胞高的水平表达 EphB4 的癌细胞。因为抗体识别癌细胞上的 EphB4，因此破坏抗体所结合的任何此类细胞。在单独使用抗体杀死或消除癌细胞的情况下，此类杀死或消除可通过起始内源宿主免疫功能例如 CDC 和 / 或 ADCC 来完成。用于确定抗体是否以该方式杀死细胞的测定在本 领域技术人员的能力范围 (purview) 之内。

[0151] 因此，在一个实施方案中，本公开内容的抗体可用于递送多种细胞毒性化合物。可将任何细胞毒性化合物融合至本抗体。可通过化学或遗传学方法（例如，通过以单个融合分子的形式表达）实现该融合。细胞毒性化合物可以是生物学的例如多肽或小分子。如本领域技术人员将理解的，对于小分子，使用化学融合，而对于生物化合物，可使用化学或遗传学融合。

[0152] 细胞毒性化合物的非限定性实例包括治疗性药物、发射放射线的化合物、植物、真菌或细菌来源的分子、生物蛋白质和其混合物。细胞毒性药物可以是在细胞内起作用的细胞毒性药物例如短程辐射发射源 (short-range radiation emitter)，包括例如短程高能 α 发射源。酶促活性毒素和其片段以白喉毒素 A 片段、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A（来自铜绿假单胞菌 (Pseudomonas aeruginosa)）、蓖麻毒素 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、蒴莲根毒素 A 链、α-sacrin、某些油桐蛋白质、某些石竹素蛋白质、美洲商陆蛋白质 (PAP，PAPII 和 PAP-S)、苦瓜抑制剂 (Morodica charantia inhibitor)、泻果素、巴豆毒素、石碱草抑制剂 (Saponaria officinalis inhibitor)、白树毒素、米托肼 (mitogillin)、局限曲菌素、酚霉素和依诺霉素。用于制备免疫毒素的酶促活性多肽的方法描述于 WO84/03508 和 WO85/03508 中，其通过引用合并入本文。某些细胞毒性部分来源于例如阿霉素、苯丁酸氮芥、柔红霉素、氨甲蝶呤、新制癌菌素 (neocarzinostatin) 和铂。

[0153] 用于将抗体与细胞毒性剂缀合的方法之前已进行了描述，并且在本领域技术人员的能力范围之内。

[0154] 在某些实施方案中，还将抗体或抗原结合片段附着至能够被检测的标记物（例如，标记物可以是放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅助因子）。活性部分可以是放射性试剂例如：放射性重金属例如铁螯合物、钆或锰的放射性螯合物、氧、铁、碳或镓的正电子发射体 (positronemitter)、^{43}K、^{52}Fe、^{57}Co、^{67}Cu、^{67}Ga、^{68}Ga、^{123}I、^{125}I、^{131}I、^{132}I 或 ^{99}Tc 等。附着至这样的部分的结合剂可用作显像剂并且以对于在哺乳动物例如人中的诊断用途上是有效的剂施用，然后检测显像剂的定位和累积。显像剂的定位和累积可通过放射性闪烁显像术、核磁共振成像、计算机断层摄影术 (computed tomography) 或正电子发射断层摄影术来检测。可使用利用抗 EphB4 的抗体或其他结合多肽的免疫闪烁成像术来检测和 / 或诊断癌症和脉管系统。例如，用 ^{99}锝、^{111}铟、^{125}碘标记的抗 EphB4 标记的单克隆抗体可有效地用于这样的成像。如对于本领域技术人员将是显然的，待施用的放射性同位素的量取决于放射性同位素。本领域技术人员可基于给定的用作活性部分的放射性核素的比放射性和能量容易地配制待施用的显像剂的量。通常，施用 0.1-100 毫居里 / 剂量的显像剂或 1-10 毫居里 / 剂量的显像剂或 2-5 毫居里 / 剂量的显像剂。因此，公开的组合物用作显像剂，其包含缀合至放射性部分的靶向性部分，所述放射性部分包含 0.1-100 毫居里，在一些实施方案中

1-10 毫居里，在一些实施方案中 2-5 毫居里，在一些实施方案中 1-5 毫居里。

[0155] 本申请还提供了包含编码解除免疫的抗 EphB4 抗体或其片段的核苷酸序列的多核苷酸。由于遗传密码子的简并性，因此多种核酸序列可编码每一种抗体氨基酸序列。本申请还提供了在严格或更低的严格性杂交条件（例如，如本文中所定义的）下与编码结合 hEphB4 的解除免疫的抗体的多核苷酸杂交的多核苷酸。

[0156] 严格杂交条件包括但不限于在大约 45℃下在 6X 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) 中与滤膜结合的 DNA 杂交，然后在大约 50-65℃下在 0.2XSSC/0.1％ SDS 中进行一次或更多次清洗，高度严格杂交条件是例如在大约 45℃下在 6X SSC 中与滤膜结合的 DNA 杂交，然后在大约 60℃下在 0.1X SSC/0.2％ SDS 中进行一次或更多次清洗，或本领域技术人员已知的任何其他严格杂交条件（参见，例如，Ausubel，F.M. 等人．，eds.1989Current Protocols in Molecular Biology，第 1 卷，Green PublishingAssociates，Inc.a 和 John Wiley and Sons，Inc.，NY，在第 6.3.1 至 6.3.6 和 2.10.3 页）。

[0157] 可通过本领域内已知的任何方法获得多核苷酸，以及确定多核苷酸的核苷酸序列。例如，如果抗体的核苷酸序列是已知的，则可从化学合成的寡核苷酸（例如，如 Kutmeier 等人，BioTechniques 17 :242(1994) 中所描述的）装配编码抗体的多核苷酸，简而言之，这包括合成含有编码抗体的序列的部分的重叠寡核苷酸，将此类寡核苷酸退火和连接，然后通过 PCR 扩增连接的寡核苷酸。在一个实施方案中，所使用的密码子包含通常用于人或小鼠的密码子（参见，例如，Nakamura，Y.，Nucleic AcidsRes.28 :292(2000)）。

[0158] 编码抗体的多核苷酸还可从来自适当来源的核酸产生。如果包含编码特定抗体的核酸的克隆是不可获得的，但抗体分子的序列是已知的，则编码免疫球蛋白的核酸可通过化学方法合成，或通过 PCR 扩增（使用可与序列的 3′ 和 5′ 末端杂交的合成引物）或使用寡核苷酸探针（所述探针是用以鉴定例如来自 cDNA 文库的编码抗体的 cDNA 克隆的特异于特定基因序列的寡核苷酸探针）通过克隆从适当的来源（例如，从任何表达抗体的组织或细胞例如选择用于表达抗体的杂交瘤细胞产生的抗体 cDNA 文库或 cDNA 文库，或从所述组织或细胞分离的核酸，优选 polyA+RNA) 获得。然后使用本领域内熟知的任何方法将通过 PCR 产生的扩增核酸克隆入可复制的克隆性载体。

[0159] 本申请明还提供了编码本文中描述的抗体的重链和轻链构架区和 CDR 的多核苷酸序列以及用于它们在哺乳动物细胞中有效表达的表达载体。

[0160] IV. 具有改变的效应子功能的抗 Eph4B 抗体

[0161] 具有基因工程改造的或变异的恒定区或 Fc 区的抗体可用于调节效应子功能例如，抗原依赖细胞毒性 (ADCC) 和补体依赖细胞毒性 (CDC)。具有经基因工程改造的或变异的恒定区或 Fc 区的此类抗体在例如其中 Eph4B 在正常组织中表达的情况下是有用的；在这些情况下不具有效应子功能的解除免疫的抗体和抗原结合片段可引起期望的治疗反应而不损伤正常组织。在另一个实施方案中，给抗体或抗原结合片段提供增强的效应子功能，从而其可用于直接的细胞杀伤。

[0162] 因此，本公开内容的某些方面和方法涉及具有改变的效应子功能的抗 Eph4B 抗体，所述抗体包含一个或更多个氨基酸置换、插入和 / 或缺失。在某些实施方案中，这样的变异的抗 Eph4B 抗体展示减弱的效应子功能或无效应子功能。

[0163] 具有减弱的效应子功能的抗 Eph4B 抗体可通过在抗体的某些区域的氨基酸序列

中导入其他类型的变化来产生。此类氨基酸序列变化包括但不限于由 Bluestone 等人描述的 Ala-Ala 突变。(参见 WO 94/28027 和 WO 98/47531 ;也参见 Xu 等人 . 2000Cell Immunol 200 ;16-26)。因此,在某些实施方案中,在恒定区内具有突变(包括 Ala-Ala 突变)的抗 Eph4B 抗体可用于减弱或消除效应子功能。根据此类实施方案,抗 Eph4B 抗体的恒定区包含位点 234 上的至丙氨酸的突变或位点 235 上的至丙氨酸的突变。此外,恒定区可包含双突变 :位点 234 上的至丙氨酸的突变和位点 235 上的至丙氨酸的突变。在一个实施方案中,抗 Eph4B 抗体包含 IgG4 构架区,其中 Ala-Ala 突变将描述位点 234 上从苯丙氨酸至丙氨酸的突变和 / 或位点 235 上从亮氨酸至丙氨酸的突变。在另一个实施方案中,抗 Eph4B 抗体可包含 IgG1 构架区,其中 Ala-Ala 突变将描述位点 234 上从亮氨酸至丙氨酸的突变和 / 或位点 235 上从亮氨酸至丙氨酸的突变。抗 - 抗 Eph4B 抗体可备选地或额外地具有其他突变,包括 CH2 结构域中的点突变 K322A(Hezareh 等人 . 2001J Virol. 75 :12161-8)。在恒定区中具有所述突变的抗体还可以是封闭或非封闭抗体。

[0164] 铰链区中的变化也可影响效应子功能。例如,铰链区的缺失可减少对于 Fc 受体的亲和力和可减弱补体激活 (Klein 等人 . 1981Proc NatlAcad Sci U S A. 78 :524-528)。因而本公开内容还涉及在铰链区中具有改变的抗体。

[0165] 在特定的实施方案中,可修饰抗 Eph4B 抗体以增强或抑制补体依赖细胞毒性 (CDC)。可通过在抗体的 Fc 区域导入一个或更多个氨基酸置换、插入或缺失来获得经调节的 CDC 活性(参见,例如,美国专利 6,194,551)。备选地或额外地,可在 Fc 区域导入半胱氨酸残基,从而允许在该区域中形成链间二硫键。所产生的同型二聚体抗体可具有提高的或减弱的内化 (internalization) 能力和 / 或增强的或减弱的补体介导的细胞杀伤。参见 Caron 等人 . , J. Exp Med. 176 :1191-1195(1992) 和 Shopes, B. J. Immunol. 148 : 2918-2922(1992), WO99/51642, Duncan&WinterNature 322 :738-40(1988) ; 美国专利 5,648,260 ;美国专利 5,624,821 ;和 WO94/29351。还可使用 Wolff 等人 . Cancer Research 53 :2560-2565(1993) 中描述的异双功能交联剂制备具有增强的抗肿瘤活性的同型二聚体抗体。备选地,可对具有双重 Fc 区域的抗体进行基因工程,其从而可具有增强的补体溶血和 ADCC 能力。参见,Stevenson 等人 Anti-CancerDrug Design 3 :219-230(1989).

[0166] 调节抗体的效应子功能的另一个可能的方法包括糖基化的改变。该主题最近已由 Raju 进行了综述,他概述和提及了人 IgG 上发现的低聚糖对它们的效应子功能的程度的重要性 (Raju, TS. BioProcess InternationalApril 2003. 44-53)。根据 Wright 和 Morrison, 人 IgG 低聚糖的微观不均 一性可影响生物学功能例如 CDC 和 ADCC、与不同 Fc 受体的结合以及与 Clq 蛋白的结合 (Wright A. &Morrison SL. TIBTECH 1997, 15 :26-32)。已充分证明,取决于产生性细胞和细胞培养条件,抗体的糖基化模式可以不同 (Raju, TS. BioProcess International April 2003. 44-53)。此类差异可导致效应子功能和药物代谢动力学的变化 (Israel 等人 . Immunology. 1996 ;89(4) :573-578 ;Newkirk 等人 . P. Clin. Exp. 1996 ; 106(2) :259-64)。效应子功能的差异可能与 IgG 结合效应细胞上的 Fcγ 受体 (Fc γR) 的能力相关。Shields, 等人,已显示在氨基酸序列中具有变异的 IgG(其具有提高的与 FcγR 的结合)可展示高至 100％的增强的使用人效应细胞产生的 ADCC(Shields 等人 . J Biol Chem. 2001276(9) :6591-604)。虽然此类变体包含未在结合界面上发现的氨基酸的变化,但糖组分的性质以及其结构模式也可促成观察到的差异。此外,IgG 的低聚糖组分中岩藻糖的

存在或不存在可提高结合和ADCC(Shields等人.J Biol Chem.2002;277(30):26733-40)。缺乏连接至Asn^{297}的岩藻糖基化的碳水化合物的IgG展示正常的与Fcγ受体的受体结合。相反地,与FcγRIIA受体的结合提高了50%并且伴随增强的ADCC,特别地在更低的抗体浓度上。

[0167] 由Shinkawa,等人进行的工作显示,在大鼠杂交瘤中产生的抗人IL-5受体的抗体,当与中国仓鼠卵巢细胞(CHO)中产生的抗体相比较时,显示50%以上的更高的ADCC(Shinkawa等人.J Biol Chem.2003278(5):3466-73)。单糖组成和低聚糖特征显示大鼠杂交瘤产生的IgG具有比CHO产生的蛋白质更低的岩藻糖含量。作者得出IgG1的岩藻糖基化的缺乏在ADCC活性的增强中具有至关重要的作用。

[0168] Umana,等人采用不同的方法,他们改变chCE7(嵌合型IgG1抗成神经细胞瘤抗体)的糖基化模式(Umana等人.Nat Biotechnol.1999Feb;17(2):176-80)。通过使用四环素,它们调节对牵涉于ADCC活性的低聚糖的糖基转移酶(GnnII)的活性。亲本抗体的ADCC活性勉强高于本底水平。在不同四环素水平上产生的chCE7的ADCC活性的测量显示对于最大的chCE7的体外ADCC活性的GnTIH表达的最佳范围。该活性与恒定区相关的对切的复合低聚糖的水平相关。最近最优化的变体展示充分的ADCC活性。类似地,Wright和Morrison在具有糖基化缺陷的CHO细胞系中产生抗体(1994J Exp Med 180:1087-1096)并且显示在该 细胞系中产生的抗体不能进行补体介导的细胞裂解。因此所知的影响效应子功能的改变包括糖基化模式的修饰或糖基化残基的数目的改变,本公开内容涉及Eph4B抗体,在所述抗体中使糖基化改变以增强或减弱效应子功能,包括ADCC和CDC。改变的糖基化包括糖基化残基的数目的减少或增加以及糖基化残基的模式或位置的改变。

[0169] 仍然存在用于改变抗体的效应子功能的其他方法。例如,抗体产生性细胞可以是高突变的,从而产生在整个抗体分子中具有随机改变的核苷酸和多肽残基的抗体(参见WO 2005/011735)。高突变宿主细胞包括在DNA错配修复上具有缺陷的细胞。以该方式产生的抗体可具有较小的抗原性和/或具有有益的药物代谢动力学特性。此外,可就特征例如增强的或减弱的效应子功能选择此类抗体。

[0170] 还应理解,效应子功能可根据抗体的结合亲和力变化而变化。例如,与具有相对低的亲和力的抗体相比较,具有高亲和力的抗体可在激活补体系统中更有效(Marzocchi-Machado等人.1999Immunol Invest 28:89-101)。因此,可改变抗体以使对于其抗原的结合亲和力减小(例如,通过使用方法例如一个或更多个氨基酸残基的置换、添加或缺失改变抗体的可变区)。具有减少的亲和力的抗Eph4B抗体可展示减弱的效应子功能,包括例如减弱的ADCC和/或CDC。

[0171] V.产生抗体的方法

[0172] 结合EphB4的细胞外结构域的解除免疫的抗体或抗原结合片段可通过本领域技术人员已知的许多不同方法来产生。在一个实例中,使非人抗EphB4抗体解除免疫以增加T或B细胞表位的数目或引入调节T细胞表位。可修饰起始非人或亲本抗EphB4抗体;例如,其可以是嵌合型抗体、人源化抗体或灵长源化抗体的任何形式。备选地,在不进行人源化或灵长源化化(primatization)步骤的情况下,解除起始非人或亲本抗EphB4抗体的免疫原性。

[0173] 非人EphB4抗体

[0174] 抗 EphB4 抗体对于本领域技术人员来说是已知的，包括例如美国专利 5,635,177 以及美国申请 2006/0134118 和 2005/0249736 中描述的抗体。这些文献中的每一篇合并入本文。

[0175] 产生新型抗 EphB4 抗体的方法对于本领域技术人员来说也是已知的。例如，用于产生特异性结合 EphB4 多肽的单克隆抗体的方法可包括对小鼠施用一定量的包含有效地刺激可检测的免疫应答的 EphB4 多肽的免疫原性组合物，从小鼠获得抗体产生性细胞，将抗体产生性细胞与骨髓瘤细胞融合以获得抗体产生性杂交瘤，以及检测抗体产生性杂交瘤以鉴定产生特异性结合 EphB4 多肽的单克隆抗体的杂交瘤。当获得后，在细胞培养中，任选地在其中杂交瘤来源的细胞产生特异性结合 EphB4 多肽的单克隆抗体的条件下繁殖杂交瘤。可从细胞培养物中纯化单克隆抗体。

[0176] 此外，用于筛选抗体以鉴定期望的抗体的技术可影响获得的抗体的性质。用于检测抗体 :抗原相互作用以鉴定特别期望的抗体的多种不同技术是可获得的。此类技术包括 ELISA、表面等离子体共振结合测定 (surface plasmon resonance binding assay)(例如，Biacore 结合测定，Bia-core AB，Uppsala，Sweden)、夹心测定 (例如，IGEN International，Inc.，Gaithersburg，Maryland 的顺磁珠粒系统)、western 印迹、免疫沉淀测定和免疫组织化学。

[0177] 可使用产生或分离具有需要的特异性的抗体的其他合适的方法，包括例如从文库中选择重组抗体的方法或依赖于能够产生完全的人抗体库的转基因动物 (例如，小鼠) 的免疫的方法。参见，例如，Jakobovits 等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，90 :2551-2555(1993) ;Jakobovits 等人，Nature，362 :255-258(1993) ;Lonberg 等人，美国专利 5,545,806 ;Surani 等人，美国专利 5,545,807。

[0178] 可以以许多方法对抗体进行基因工程。可将它们制备为单链抗体 (包括小型免疫药物制剂 (small modular immuno pharmaceutical) 或 SMIPs™)、Fab 和 $F(ab')_2$ 片段等。抗体可以是人源化抗体、嵌合型抗体、解除免疫的抗体或完全人抗体。许多出版物列出了许多类型的抗体以及对此类抗体进行基因工程的方法。例如，参见美国专利 6,355,245、6,180,370、5,693,762、6,407,213、6,548,640、5,565,332、5,225,539、6,103,889 和 5,260,203。

[0179] 本申请提供了能够结合 EphB4 受体或其部分的抗原结合片段，包括但不限于 Fv、Fab、Fab′ 和 F(ab′)2 片段。此类片段可通过酶促切割或通过重组技术来产生。例如，木瓜蛋白酶或胃蛋白酶切割可分别产生 Fab 或 F(ab′)2 片段。还可使用其中已在天然终止位点上游导入了一个或更多个终止密码子的抗体基因以多种截断的形式产生抗体。例如，可设计编码 F(ab′)2 重链部分的嵌合基因以包括编码重链的 CH1 结构域和铰链区的 DNA 序列。

[0180] 嵌合型抗体还可通过本领域内已知的重组 DNA 技术产生。例如，用限制性酶降解编码鼠 (或其他物种) 单克隆抗体分子的 Fc 恒定区的基因以除去编码鼠 Fc 的区域，然后用编码人 Fc 恒定区的基因的等价部分替代 (参见 Robinson 等人，国际专利公开案 PCT/US86/02269 ;Akira，等人，欧洲专利申请 184,187 ;Taniguchi，M.，欧洲专利申请 171,496 ;Morrison 等人，欧洲专利申请 173,494 ;Neuberger 等人，国际申请 WO86/01533 ;Cabilly 等人，美国专利 4,816,567 ;Cabilly 等人，欧洲专利申请 125,023 ;Better 等

人 .(1988Science 240 :1041-1043) ;Liu 等 人 .(1987)PNAS 84 :3439-3443 ;Liu 等 人, 1987, J. Immunol. 139 :3521-3526 ;Sun 等 人 .(1987)PNAS 84 :214-218 ;Nishimura 等 人, 1987, Canc. Res. 47 :999-1005 ;Wood 等 人 .(1985)Nature 314 :446-449 ; 和 Shaw 等 人, 1988, J. NatlCancer Inst. 80 :1553-1559)。

[0181] 用于人源化抗体的方法已在本领域内进行了描述。在一些实施方案中,人源化抗体,除了非人 CDR 外,具有一个或更多个导入的来自为非人来源的氨基酸残基。可基本上按照 Winter 和同事的方法 (Jones 等人 ., Nature, 321 :522-525(1986) ;Riechmann 等人, Nature, 332 :323-327(1988) ;Verhoeyen 等人, Science, 239 :1534-1536(1988)),通过用高变区序列替代人抗体的相应序列来进行人源化。因此,此类“人源化的”抗体是其中用来自非人物种的相应序列替代绝明显少于完整人可变区的嵌合型抗体 (美国专利 4,816,567)。实际上,人源化抗体通常是其中一些高变区残基和可能地一些构架区残基被来自啮齿类动物抗体中的类似位点取代的人抗体。

[0182] 属于 Queen 等人的美国专利 5,693,761 公开了对用于人源化抗体的 Winter 的改进,该专利基于将亲合力的丢失归因于人源化构架区中结构基序中的问题的前提,所述人源化构架区中的结构基序,由于立体化学或其他化学不相容性,干扰 CDR 折叠入小鼠抗体中发现的能结合构象 (binding-capable conformation)。为了解决该问题,Queen 教导使用在线性肽序列上与待人源化的小鼠抗体的构架序列紧密同源的人构架 序列。因此, Queen 的方法集中在比较物种之间的构架序列上。通常,将所有可获得的人可变区序列与特定的小鼠序列相比较,并且计算相应的构架残基之间的百分比同一性。选择具有最高百分比的人可变区来提供用于人源化方案的构架序列。Queen 还教导来自对于在能结合构象中支持 CDR 是至关重要的小鼠构架的某些氨基酸残基保留在人源化构架中是非常重要的。根据分子模型估量可能的临界状态 (criticality)。保留的候选残基通常是在线性序列上与 CDR 邻接或在物理上在任何 CDR 残基的 6 埃距离内的残基。

[0183] 在其他方法中,一旦获得低亲合力人源化结构,通过将单个残基回复至小鼠序列,然后如由 Riechmann 等人, (1988) 所述,测定抗原结合来经验地确定特定构架氨基酸残基的重要性。用于鉴定构架序列中重要的氨基酸的另一个示例性方法由属于 Carter 等人的美国专利 5,821,337 和由属于 Adair 等人的美国专利 5,859,205 公开。这些参考文献公开了构架中特定 Kabat 残基的位置,所述位置,在人源化抗体中可能需要用相应的小鼠氨基酸来置换以保持亲合力。

[0184] 人源化抗体的另一种方法,称为“构架改组”,依赖于用按读框融合入单个的人种系构架库的非人 CDR 可变区产生组合文库 (Dall′ Acqua 等人, Methods, 36 :43(2005))。然后筛选文库以鉴定编码保持良好结合的人源化抗体的克隆。

[0185] 用于产生人源化抗体的的人可变区 (轻链和重链的) 的选择对于减少抗原性是非常重要的。根据所谓的“最适”方法,针对整个已知的人可变结构域序列文库筛选啮齿类动物抗体的可变区的序列。然后将与啮齿类动物的序列最接近的人序列接受为用于人源化抗体的人构架区 (framwork 区)(Sims 等人 ., J. Immunol., 151 :2296(1993) ;Chothia 等人 ., J. Mol. Biol., 196 :901(1987))。另一个方法使用来源于具有特定亚群的轻链或重链可变区的所有人抗体的共有序列的特定构架区。相同的构架可用于几种不同的人源化抗体 (Carter 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 :4285(1992) ;Presta 等人, J. Immunol., 151 :

2623(1993))。

[0186] 用于替代入人可变区的非人残基的选择可受许多因素影响。这些因素包括例如氨基酸在特定位点中的稀有性、与 CDR 或抗原相互作用的概率以及参与轻链和重链可变结构域界面之间的界面的概率。(参见,例如美国专利 5,693,761、6,632,927 和 6,639,055)。分析这些因素的一个方 法是通过使用非人和人源化序列的三维模型。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的并且对于本领域技术人员来说是很熟悉的。图解说明和展示选择的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序是可获得的。这些展示的观察允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,例如,分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样,可选择非人残基并且用其替代人可变区残基以获得期望的抗体特征,例如增加的对靶抗原的亲和力。

[0187] 免疫解除

[0188] 解除抗 EphB4 抗体或抗原结合片段的免疫以使其对给定的物种无免疫原性或免疫原性更小。免疫解除可通过对抗 EphB4 抗体进行结构改变来实现。在一个实施方案中,抗 EphBr 是小鼠单克隆抗体。可使用本领域技术人员已知的任何免疫解除技术。在 WO 00/34317(其公开内容以其全文通过引用合并入本文)中描述了例如用于使抗体解除免疫的一个合适的技术。概括地说,本文中描述的一般方法中的典型方案包括下列步骤。

[0189] 1. 确定抗体或其部分的氨基酸序列;

[0190] 2. 通过任何方法确定抗体的氨基酸序列中的潜在 T 细胞表位,包括肽与 MHC 分子的结合的确定、肽 :HLA 复合物与来自接受治疗性蛋白的物种的 T 细胞受体的结合的确定,使用转基因动物,用接受治疗性蛋白的物种的 HLA 分子检测抗体或其部分,或检测用来自接受治疗性蛋白的特种的免疫系统细胞重建的此类转基因动物;

[0191] 3. 通过基因工程或用于产生修饰抗体的其他方法,改变抗体以除去一个或更多个潜在 T 细胞表位,从而产生这样的用于检测的改变的抗体。

[0192] 在一个实施方案中,可就 MHC II 类结合基序的存在分析抗体或抗原结合片段的可变区的序列。例如,可以使用 MHC 结合基序的数据库,例如通过在 sitewehil.wehi.edu.au 上搜索万维网上的“基序”数据库来进行比较。备选地,可使用计算机缝合方法例如由 Altuvia 等人.(J.Mol.Biol.249244-250(1995)) 设计的方法鉴定 AHC II 类结合肽,从而就它们与 MHC II 类蛋白的结合能检测来自可变区序列的连续重叠的肽。计算机结合预测算法包括 iTope™、Tepitope、SYFPEITHI 和 MHCpred。为了帮助鉴定 MHC II 类结合肽,可寻找与成功呈递的肽例如两亲性和 Rothbard 基序相关的相关序列特征和组织蛋白酶 B 和其他加工酶的切割位点。

[0193] 在已鉴定了潜在的第二物种(例如人)T 细胞表位后,然后通过改变一个或更多个氨基酸(当需要时)以消除 T 细胞表位来消除这些表位。通常,这将包括 T 细胞表位本身中一个或更多个氨基酸的改变。这可包括改变在蛋白质一级结构上与表位相邻的氨基酸或改变在一级结构上不相邻但在分子的二级结构上邻近的氨基酸。预期的常见改变将是氨基酸置换,但可能在某些情况下氨基酸添加或缺失也将是适当的。所有改变可通过重组 DNA 技术来实现,这样可以例如利用已良好建立的方法通过从重组宿主表达来制备终分子,但也可使用蛋白质化学或任何其他进行分子改变的方法。

[0194] 实际上,已公认,当使用 MHC 结合基序的数据库进行比较时,甚至可在人种系可变

区的构架序列中鉴定潜在的人 T 细胞表位。由于人通常不引发抗它们自己的抗体的免疫应答，因此人对于这些表位是耐受的或这些潜在表位不能被人 APC 呈递，因为它们不能被恰当地加工。因此，种系可变区序列中代表的这样的潜在 T 细胞表位实际上可保留在解除免疫的抗体中。

[0195] 为了在从治疗性抗体序列消除潜在的 T 细胞表位的过程中使额外 T 细胞表位的产生降至最少，可通过置换特定的氨基酸来消除 T 细胞表位，这导致 T 细胞表位中非人或亲本抗体（通常小鼠）的氨基酸至在位点上相应于人种系氨基酸的位点上的氨基酸的转变。Tomlinson, I.A. 等人 .(1992)J.Mol.Biol.227 :776-798 ;Cook, G.P. 等人 .(1995) Immunol.Today 第 16 卷 (5) :237-242 ;Chothia, D. 等人 .(1992)J.Mol.Bio.227 :799-817 中公开了人种系序列。V BASE 目录提供了人免疫球蛋白可变区序列的综合目录（由 Tomlinson, I.A. 等人 .MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK 汇编）。

[0196] 在一个方法中，鉴定与非人或亲本序列同源的人种系序列。备选地，可鉴定与非人或亲本序列的各构架区 (FR1-FR4) 同源的人种系序列。在一个方法中，平行地就 MHC II 类结合肽分析非人或亲本序列以及同源人种系序列。可鉴定其中 MHC II 类结合特征谱在非人或亲本序列与人种系序列之间相异的区域。可就至相应的人氨基酸的转变选择非人或亲本序列的这些区域中的氨基酸。

[0197] 当除去鉴定的 T 细胞表位后，可再次分析解除免疫的序列以确保未产生新的 T 细胞表位并且，如果产生，可如上所述使表位缺失 ；或通过将非人或亲本氨基酸转变成相应的人氨基酸来改变之前至相应的人种系氨基酸的转变，直至所有 T 细胞表位被消除。

[0198] 并非所有计算机鉴定的 T 细胞表位都需要去除。本领域技术人员将认识到特定表位的“强度”或更确切地潜在免疫原性的意义。各种计算机方法产生潜在表位的评分。本领域技术人员将认识到只有高评分表位才需要除去。本领域技术人员也将认识到在除去潜在表位与保持原始非人可变区序列之间存在平衡，所述平衡可影响抗原结合。因此，一个策略是将置换相继地导入非人或亲本抗体，然后就抗原结合和免疫原性对其进行检测。

[0199] 关于治疗性抗体的 CDR，一个或更多个潜在的 T 细胞表位与 CDR 重叠或落入其中是很普遍的，因此表位的除去需要改变 CDR 中的残基。为了消除 T 细胞针对此类表位的应答的诱导，可能期望消除这些表位（虽然这可能减小所得抗体的结合亲和力），从而可能需要就所得的抗原结合的任何改变检测 CDR 的任何潜在改变。

[0200] 在一个实施方案中，改变解除免疫的抗体的序列以除去一个或更多个 B 细胞表位。为了除去人 B 细胞表位，可利用 Padlan(Padlan E.A., MolecularImmunology 28489-498(1991) 和 EP-A-0519596) 的“镶饰 (veneering)”或“表面重建”方法。在镶饰非人抗原结合部位中存在两个一般步骤。开始时，将目的抗体分子的可变区的构架区与可获得的人可变区数据库的相应构架区序列相比较。然后将最同源的人可变区逐个残基地与相应的非人氨基酸相比较。使用本领域内熟知的重组技术用存在于人部分的残基置换非人构架区中与人对应物 (counterpart) 不同的残基。使用至少部分暴露（溶剂可及的）的部分进行残基转换，并且在可对可变区结构域的三级结构具有重大影响的氨基酸残基例如脯氨酸、甘氨酸和带电荷的氨基酸的置换中要特别小心。外部残基的置换通常对内部结构域或对结构域间接触具有极小的影响或没有影响。（参见，例如，美国专利 6,797,492）。

[0201] 通过这种方式，从而设计所得的“镶饰的”非人抗原结合部位以使之保留非人 CDR

残基、十分邻近 CDR 的残基、鉴定为隐蔽或基本上隐蔽（溶剂不可及的）的残基、据信参与重链和轻链结构域之间非共价（例 如，静电和疏水）接触的残基以及来自构架区的保守结构区的据信影响 CDR 环的“经典 (canonical)”三级结构的残基。然后将这些设计标准用于制备将非人抗原结合部位的重链和轻链的 CDR 组合入存在人类中 (human-appearing) 的构架区的重组核苷酸序列，所述序列可用于转染哺乳动物细胞以表达展示非人抗体分子的抗原特异性的重组人抗体。

[0202] 在一个实施方案中，将调节 T 细胞表位导入抗体或抗原结合片段。WO06/082406（其通过引用合并入本文）描述了产生抗体的方法，在所述方法中，修饰抗体的可变区以导入调控 T 细胞表位，所述表位反过来刺激 CD4+CD25+T 细胞并且诱导抑制性细胞因子的分泌，从而减少免疫原性（参见，例如，Prakken BJ，等人 . Proc Natl Acad Sci USA 94 :3284-3289(1997)。

[0203] 抗体或抗原结合片段的构建

[0204] 一般说来，使用遗传工程技术中所使用的公认的操作来实现本文中公开的抗体的构建。例如，用于分离 DNA、制备和选择用于表达 DNA 的载体、纯化和分析核酸的技术，用于制备重组载体 DNA（例如 PCR）、用限制性内切酶切割 DNA、连接 DNA、通过稳定或瞬时方法将 DNA（包括载体 DNA）导入宿主细胞、在选择或非选择培养基中培养宿主细胞以选择和维持表达 DNA 的细胞的方法在本领域内通常是已知的。

[0205] 可使用合成和 / 或重组核酸制备编码期望的解除免疫的链的基因（例如，cDNA）来产生此类解除免疫的免疫球蛋白。例如，可使用 PCR 诱变方法改变编码解除免疫的链的 DNA 序列例如来自之前人源化的可变区的 DNA 模板来构建编码解除免疫的可变区的核酸（例如，DNA）序列（参见，例如 Kamman，M.，等人，Nucl. Acids Res.，17 :5404(1989)）；Sato，K.，等人，Cancer Research，53 :851-856(1993)；Daugherty，B.L. 等人，Nucleic Acids Res.，19(9) :2471-2476(1991)；和 Lewis，A.P. 和 J.S.Crowe，Gene，101 :297-302(1991)）。通过使用此类或其他合适的方法，还可容易地产生变体。在一个实施方案中，可诱变克隆的可变区，然后可选择（例如，从噬菌体文库；参见，例如，Krebber 等人，美国专利 5,514,548；Hoogenboom 等人，WO 93/06213，1993 年 4 月 1 日出版的））编码具有期望的特异性的变体的序列。

[0206] 几个可能的载体系统可获得用于在哺乳动物细胞中表达克隆的重 链和轻链基因。一类载体依赖于期望的基因序列至宿主基细胞基因组中的整合。通过同时导入药物抗性基因例如大肠杆菌 (E.coli)gpt(Mulligan，R.C. 和 Berg，P.，Proc.Natl.Acad.Sci.，USA，78 :2072(1981)) 或 Tn5neo(Southern，P.J. 和 Berg，P.，J.Mol.Appl.Genet.，1 :327(1982)) 选择具有稳定地整合的 DNA 的细胞。可将选择标记基因连接至待表达的 DNA 序列或通过共转染将其导入相同的细胞 (Wigler，M. 等人，Cell，16 :77(1979))。第二类载体利用赋予染色体外质粒自主复制能力的 DNA 元件。此类载体来源于动物病毒例如牛乳头瘤病毒 (bovine papillomavirus)(Sarver，N. 等人 .，Proc.Natl.Acad.Sci.，USA，79 :7147(1982))、多瘤病毒 (Deans，R.J. 等人 .，Proc.Natl.Acad.Sci.，USA，81 :1292(1984)) 或 SV40 病毒 (Lusky，M. and Botchan，M.，Nature，293 :79(1981))。

[0207] 因为免疫球蛋白 cDNA 只由代表编码抗体的成熟 mRNA 的序列组成，因此需要调控基因的转录和 RNA 的加工的额外的基因表达元件来分析免疫球蛋白 mRNA。这些元件可包括

剪接信号、转录启动子，包括诱导型启动子增强子和终止信号。整合此类元件的 cDNA 表达载体包括由 Okayama，H. 和 Berg，P.，Mol.Cell Biol.，3：280(1983)；Cepko，C.L. 等人.，Cell，37：1053(1984)；和 Kaufman，R.J.，Proc.Natl.Acad.Sci.，USA，82：689(1985) 描述的载体。

[0208] 任选地可将可变序列融合至人恒定区，例如，人 IgG1 或 κ 恒定区。可将重组解除免疫的抗体或抗原结合片段转染入用于表达的合适的宿主细胞例如 NS0 或 CHO 细胞以产生完全重组抗体。

[0209] VI. 诊断应用

[0210] 抗体和抗原结合片段用于多种应用，包括研究、诊断和治疗性应用。例如，它们可用于分离和 / 或纯化受体或其部分，以及用于研究受体结构（例如，构象）和功能。

[0211] 在某些方面，公开的不同抗体可用于检测和测量 EphB4 受体例如在内皮细胞（例如，静脉内皮细胞）或在用 EphB4 受体基因转染的细胞上的表达。因此，它们还用于应用例如用于诊断或研究目的细胞分选和成像（例如，流式细胞术和荧光激活细胞分选术）。

[0212] 在某些实施方案中，可就诊断目的标记或不标记抗体或抗原结合片段。通常，诊断测定使得必需检测由于抗体与 EphB4 的结合而引起的复 合物的形成。可直接标记抗体。可使用多种标记物，包括但不限于放射性核素、荧光剂、酶、酶底物、酶辅助因子、酶抑制剂和配体（例如，生物素、半抗原）。许多合适的免疫测定法对于本领域技术人员来说是已知的（参见，例如，美国专利 3,817,827、3,850,752、3,901,654 和 4,098,876）。当未标记时，抗体可用于测定，例如凝集试验。还可将未标记的抗体与另一种（一种或更多种）可用于检测抗体的适当的试剂例如与一抗（例如，对于未标记的免疫球蛋白是特异性的抗独特型抗体或其他抗体）反应的标记抗体（例如，二抗）或其他适当的试剂（例如，标记 A 蛋白）一起使用。

[0213] 在一个实施方案中，抗体和抗体片段可用于酶免疫测定，其中将受试抗体或二抗缀合至酶。当将包含 EphB4 蛋白的生物样品与受试抗体组合时，在抗体与 EphB4 蛋白之间发生结合。在一个实施方案中，将包含表达 EphB4 蛋白的细胞（例如，内皮细胞）的样品与受试抗体组合时，在抗体与具有含有被抗体识别的表位的 EphB4 蛋白的细胞之间发生结合。可将此类结合细胞与未结合的试剂分离，并且可以例如通过将样品与酶的底物（所述底物当通过酶作用时产生颜色或其他可检测变化）接触来确定与细胞特异性结合的抗体 - 酶缀合物的存在。在另一个实施方案中，可以不标记受试抗体，以及可加入识别受试抗体的第二标记抗体。

[0214] 在某些方面，还可制备用于检测 EphB4 蛋白在生物样品中的存在的试剂盒。此类试剂盒将包括结合 EphB4 蛋白或所述受体的部分的抗体以及一种或更多种适用于检测抗体与 EphB4 或其部分之间的复合物的存在的辅助试剂 (ancillary reagent) 可以以冻干的形式单独地或与另外的特异于其他表位的抗体组合来提供公开的抗体组合物。可将可以是标记的或未标记的抗体与辅助成分 (adjunct ingredient)（例如，缓冲液，例如 Tris、磷酸盐和碳酸盐、稳定剂、赋形剂、杀生物剂 (biocide) 和 / 或惰性蛋白质例如牛血清白蛋白）一起包括在试剂盒中。例如，可将抗体与辅助成分以冻干的混合物形式提供，或可分开提供辅助成分以待用户组合。通常这些辅助材料将以低于大约 5％的基于活性抗体的量的重量存在，通常将以至少大约 0.001％的基于抗体浓度的重量的总量存在。在使用能够结合单克

隆抗体的二抗的情况下，可以将这样的抗体例如在分开的小瓶或容器中提供于试剂盒中。通常标记第二抗体（如果存在的话），并且可以以与上文所述的抗体制剂类似的方式配制其。

[0215] 类似地，抗体或抗原结合片段可用于检测和/或定量 EphB4 或受体的部分在细胞中的表达的方法，其中将包含细胞或其级分（例如，膜级分）的组合物与抗体接触，所述抗体在适合于抗体与 EphB4 或受体的部分结合的条件下与 EphB4 或受体的部分结合，并且监控抗体结合。指示抗体与 EphB4 或其部分之间的复合物的形成的抗体的检测表示受体的存在。可通过标准方法例如工作实施例中描述的方法测定抗体与细胞的结合。方法可用于检测 EphB4 在来自个体的细胞上的表达。任选地，可以例如通过流式细胞术估计内皮细胞表面上 EphB4 的定量表达，并且可使染色强度与疾病易感性、进展或风险发生关系。

[0216] 抗体或抗原结合片段还可用于检测哺乳动物对某些疾病的易感性的方法。为了举例说明，方法可用于检测哺乳动物对其进展基于细胞上存在的 EphB4 的量和/或哺乳动物中 EphB4 阳性细胞的数目的疾病的易感性。在一个实施方案中，本申请提供了检测哺乳动物对肿瘤的易感性的方法。在该实施方案中，将待检测的样品与抗体接触，所述抗体在适合于所述抗体与 EphB4 或其部分结合的条件下与其结合，其中样品包含在正常个体中表达 EphB4 的细胞。检测抗体的结合和/或结合的量，所述结合和/或结合的量显示个体对肿瘤的易感性，其中更高的受体水平与增加的个体对肿瘤的易感性相关。本申请者和其他小组已发现 EphB4 的表达与肿瘤生长和进展相关。还可将公开的抗体用于进一步阐明 EphB4 表达与个体中血管生成相关疾病的进展的相关性。

[0217] IIV. 治疗应用

[0218] 在某些实施方案中，本申请提供了抑制血管生成的方法和治疗血管生成相关疾病的方法。在一些实施方案中，本申请提供了用于促进细胞凋亡的方法。在其他实施方案中，本申请提供了抑制或减少肿瘤生长的方法和治疗患有癌症的个体的方法。这些方法包括对个体施用治疗有效量的上文所述的解除免疫的抗体或抗原结合片段。此类方法的目标特别是针对动物，更特别地针对人的治疗性和预防性治疗。在一个实施方案中，当对人受试者施用时，用于本方法的抗体或抗原结合片段比小鼠单克隆抗体 #47 的免疫原性更低。在另一个实施方案中，用于本方法的抗体或抗原结合片段，当对人受试者施用时，比小鼠单克隆抗体 #131 的免疫原性更低。

[0219] 本申请还提供了用于治疗血管生成相关疾病的药物组合物。在一些实施方案中，药物组合物包含本文中描述的抗体或抗原结合片段和可接受的药物载体。

[0220] 本申请提供了促进细胞凋亡的方法，其包括将细胞与有效量的解除免疫的抗体或抗原结合片段接触。在一些实施方案中，细胞是内皮细胞。

[0221] 本申请提供了抑制血管生成的方法，其包括将内皮细胞与有效量的解除免疫的抗体或抗原结合片段接触。在某些实施方案中，所述血管生成由癌细胞诱导。可将抗体或抗原结合片段在体外、离体地或在体内（例如，在受试者中）与内皮细胞接触。在另一个实施方案中，抗体抑制癌细胞的血管生成例如至少 10％、至少 25％、至少 50％、至少 75％或至少 90％。可通过本领域内已知的基于体外细胞的测定例如内皮细胞管形成测定或本领域内已知的体内动物模型测定来检查血管生成的抑制。

[0222] 如本文中所述，血管生成相关疾病包括但不限于血管生成依赖性癌症，包括例如

实体瘤、血液传播瘤(blood born tumor)例如白血病,和瘤转移;良性肿瘤,例如血管瘤、听神经瘤、神经纤维瘤、沙眼和脓性肉芽肿;炎性病症例如免疫和非免疫炎症;慢性关节风湿病和银屑病;眼新生血管性疾病(ocular angiogenic disease)例如糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、黄斑变性、角膜移植片排斥、新生血管性青光眼、晶状体后纤维组织增生症(retrolental fibroplasia)、发红;Osler-Webber综合征;心肌血管新生、斑块新生血管形成、毛细血管扩张、血友病关节、血管纤维瘤;和创伤肉芽形成和创伤愈合、毛细血管扩张银屑病硬皮症、脓性肉芽肿、冠状动脉侧枝、肢端缺血血管再生、角膜疾病、发红、关节炎、糖尿病新生血管化、骨折、血管生成和造血作用。

[0223] 应理解,公开的方法和组合物还用于治疗任何不依赖于血管生成的癌症(肿瘤)。如本文中所使用的,术语"不依赖于血管生成的癌症"是指其中肿瘤组织中不存在或存在极少的新生血管形成的癌症(肿瘤)。

[0224] 特别地,公开的抗体治疗剂用于治疗或预防癌症(肿瘤),包括但不限于结肠癌、乳腺癌、间皮瘤、前列腺癌、膀胱癌、头颈部鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma of the head and neck)(HNSCC)、卡波西肉瘤、卵巢癌和白血病。

[0225] 本申请提供了抑制受试者中癌细胞的生长的方法,包括将有效量的解除免疫的抗体或抗原结合片段施用入受试者。调节可减少或防止所述 受试者的癌细胞的生长例如至少10%、至少25%、至少50%、至少75%或至少90%。作为结果,在癌细胞是实体瘤的情况下,调节可减少实体瘤的大小至少10%、至少25%、至少50%、至少75%或至少90%。

[0226] 癌细胞增殖的抑制可通过基于细胞的测定例如溴脱氧尿苷(BRDU)掺入(Hoshino等 人,Int.J.Cancer 38,369(1986);Campana 等 人,J.Immunol.Meth.107:79(1988));[^{3}H]-胸苷掺入(Chen,J.,Oncogene13:1395-403(1996);Jeoung,J.,J.Biol.Chem.270:18367-73(1995);染料阿尔玛蓝(可从Biosource International获得)(Voytik-Harbin等人,In VitroCell Dev Biol Anim 34:239-46(1998))来测量。通过在软琼脂中进行的集落形成,例如通过计数在软琼脂上面形成的癌细胞集落的数目(参见实施例和Sambrook等人,Molecular Cloning,Cold Spring Harbor,1989)来估量癌细胞的非停泊性生长(anchorage independent growth)。

[0227] 受试者中癌细胞生长的抑制可通过监控受试者中例如动物模型或人受试者中癌细胞生长来估量。一个示例性监控方法是肿瘤发生能力的测定。在一个实例中,异种移植物包含来自预先存在的肿瘤或来自肿瘤细胞系的人细胞。肿瘤异种移植物测定在本领域内是已知的并且在本文中进行了描述(参见,例如,Ogawa等人,Oncogene 19:6043-6052(2000))。在另一个实施方案中,使用中空纤维测定法监控肿瘤发生能力,该方法描述于美国专利5,698,413,其以其全文通过引用合并入本文。

[0228] 通过将在调节剂处理的条件下的癌细胞增殖、非停泊性生长或癌细胞生长与在阴性对照条件(通常在调节剂处理不存在的情况下)下的相比较来计算抑制百分比。例如,在癌细胞或癌细胞集落(集落形成测定)的数目或PRDU或[^{3}H]-胸苷掺入是A(在调节剂处理的条件下)和C(在阴性对照条件下)的情况下,抑制百分比可以是(C-A)/C乘以100%。

[0229] 在此类方法的某些实施方案中,可将一种或更多种抗体治疗剂一起(同时)或在不同的时间(相继)施用。此外,可将抗体治疗剂与另一种类型的用于治疗癌症或抑制血管发生的化合物一起施用。

[0230] 在某些实施方案中，可单独使用公开的受试方法。备选地，可将受试方法与用于治疗或预防增殖病症（例如，肿瘤）的其他常规抗癌疗法结合使用。例如，此类方法可用于预防性癌症预防、癌症复发和手术后的转移的预防，以及用作其他常规癌症疗法的辅助疗法。本申请承认可通过使用抗体或抗原结合片段增强常规癌症疗法（例如，化学疗法、放 射疗法、光线疗法、免疫疗法和手术）的功效。

[0231] 已显示许多常规化合物具有抗肿瘤活性。此类化合物已在化学治疗中用作缩小实体瘤、防止转移和进一步生长或减少白血病或骨髓恶性肿瘤中恶性细胞的数目的药剂。虽然化学疗法在治疗各种类型的恶性肿瘤中是有效的，但许多抗肿瘤化合物诱导不期望的副作用。已显示，当组合两种或更多种不同治疗时，治疗可协同作用并且可使减少每一种治疗的剂量，从而减小由各化合物在更高剂量上产生的有害副作用。在其他情况下，难以治疗的恶性肿瘤可对两种或更多种不同治疗的组合作出反应。

[0232] 当将本文中公开的抗体或抗原结合片段与另一种常规抗肿瘤剂同时或相继地组合施用时，此类抗体或抗原结合片段可增强抗肿瘤剂的治疗效果或克服对该抗肿瘤剂的细胞抗性。这使得能够减少抗肿瘤剂的剂量，从而减小不期望的副作用，或恢复抗肿瘤剂在抗性细胞中的功效。

[0233] 可用于组合抗肿瘤疗法的药物化合物包括（只用于举例说明）：氨鲁米特、安丫啶、阿那曲唑、天冬酰胺酶、bcg、比卡鲁胺、博来霉素、乙基酰胺、白消安、喜树碱、卡培他滨、卡铂 (carboplatin)、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯膦酸盐、秋水仙素、环磷酰胺、去乙酰环丙氯地孕酮、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素 D、柔红霉素、双烯雌酚、己烯雌酚、多烯紫杉醇、阿霉素、表柔比星、雌二醇、磷雌氮芥、依托泊苷、依西美坦、非格司亭、氟达拉滨、氟氢可的松、氟尿嘧啶、氟甲睾酮、氟他胺、吉西他滨、金雀异黄酮、戈舍瑞林、羟基脲、伊达比星、异磷酰胺、伊马替尼、干扰素、依立替康、伊立替康、来曲唑、甲酰四氢叶酸、醋酸亮丙瑞林、左旋咪唑、洛莫司汀、氮芥、安宫黄体酮、甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、美司钠、甲氨蝶呤、丝裂霉素 C、米托坦、盐酸米托蒽醌、尼鲁米特、诺考达唑、奥曲肽、奥沙利铂、紫杉醇、氨羟二磷酸二钠、喷司他丁、普卡霉素、卟菲尔钠、甲基苄肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链脲佐菌素、苏拉明、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊苷、睾酮、硫鸟嘌呤、塞替派、二氯二茂钛、拓扑替康、曲妥珠单抗、维甲酸、长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。

[0234] 此类化学治疗抗肿瘤化合物可根据它们的作用机制分类为例如下列类型：抗代谢产物 / 抗癌剂例如嘧啶类似物 (5- 氟尿嘧啶、氟尿嘧啶脱氧核苷、卡培他滨、吉西他滨和阿糖胞苷）和嘌呤类似物、叶酸拮抗剂 和相关抑制剂（巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁和 2- 氯脱氧腺苷（克拉屈滨））；抗增殖 / 抗有丝分裂剂，包括天然产物例如长春花生物碱（长春碱、长春新碱和长春瑞滨）、微管干扰剂 (microtubule disruptor) 例如紫杉烷（紫杉醇、多烯紫杉醇、长春新碱、长春碱、诺考达唑、埃博霉素和诺维本、epidipodophyllotoxins（依托泊苷、替尼泊苷），DNA 损伤剂（放线菌素、安吖啶、蒽环类药、博来霉素、白消安、喜树碱、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、环磷酰胺、放线菌素 D、柔红霉素、阿霉素、表柔比星、六甲基三聚氰胺奥沙利铂、异环磷酰胺、美法仑、merchlorehtamine、丝裂霉素 C、盐酸米托蒽醌、亚硝基脲、普卡霉素、盐酸甲基苄肼、泰素、泰素帝、替尼泊苷、三亚乙基硫代磷酰胺和依托泊苷 (VP16)）；抗生素例如放线菌素（放线菌素 D）、柔红霉素、阿霉素（阿霉素 (adriamycin)）、依达比星、蒽环类药、盐酸米托蒽醌、博莱霉素、普卡霉素（光神霉素）和丝

裂霉素 C；酶（全身性引起 L- 天冬酰胺代谢并且剥夺不具有合成它们自身的天冬酰胺的能力的细胞的 L- 天冬酰胺酶）；抗血小板剂；抗增殖 / 抗有丝分裂烷化剂例如氮芥（双氯乙基甲胺 (mechlorethamine)、环磷酰胺和类似物、美法仑、苯丁酸氮芥、乙撑亚胺和甲基三聚氰胺（六甲密胺和噻替派）、烷基磺酸盐 - 白消安、亚硝基脲（卡莫司汀 BCNU) 和类似物，链脲佐菌素、trazenes-dacarbazinine(DTIC)；抗增殖 / 抗有丝分裂抗代谢物例如叶酸类似物（氨甲蝶呤）；铂配位络合物（顺铂、卡铂、甲基苄肼、羟基脲、米托坦、氨鲁米特；激素、激素类似物（雌激素、他莫昔芬、戈舍瑞林、比卡鲁胺、尼鲁米特）和芳香酶抑制剂（来曲唑、阿那曲唑）；抗凝血剂（肝素、合成肝素盐 (syntheticheparin salt) 和凝血酶的其他抑制剂）；纤维蛋白溶解剂（例如组织纤维蛋白溶酶原激活物、溶栓霉和尿激酶、阿司匹林、双嘧达莫、氯苄噻唑啶、氯吡格雷、阿昔单抗；抑制迁移剂 (antimigratory agent)；抑制分泌剂 (antisecretory agent)(breveldin)，免疫抑制剂（环孢霉素 A、他克莫司 (FK-506)、西罗莫司（雷帕霉素）、硫唑嘌呤、霉酚酸酯；抗血管生成化合物 (TNP-470，染料木黄酮）和生长因子抑制剂（血管内皮生长因子 (VEGF) 抑制剂、成纤维细胞生长因子 (FGF) 抑制剂）；血管紧张素体阻断剂 (angiotensin receptor blocker)；一氧化氮供体；反义寡核苷酸；抗体（曲妥单抗）；细胞周期抑制剂和分化诱导剂（维甲酸）；mTOR 抑制剂、拓扑异构酶抑制剂（阿霉素 (adriamycin)、安吖啶、喜树碱、柔红霉素、放 线菌素、去羟栀子苷、表柔比星、依托泊苷、依达比星和盐酸米托蒽醌、拓扑替康、伊立替康、皮质激素（可的松、地塞米松、氢化可的松、甲基强的松龙、泼尼松和泼尼松龙）；生长因子信号转导激酶抑制剂；线粒体机能障碍诱导剂和半胱天冬酶 (caspase) 激活物；和染色质干扰剂 (chromatin disruptor)。

[0235] 在某些实施方案中，可用于组合抗血管生成疗法的药物化合物包括：(1)“血管生成分子”例如 bFGF（碱性成纤维细胞生长因子）的释放抑制剂；(2) 血管生成分子的中和剂例如抗 β bFGF 抗体；和 (3) 内皮细胞对血管生成刺激物的应答的抑制剂，包括胶原酶抑制剂、基底膜周转抑制剂 (basement membrane turnover inhibitor)、血管生成抑制甾醇 (Angiostatic steroids)、真菌来源的血管生成抑制剂、血小板因子 4、血小板反应蛋白 (thrombospondin)、关节炎药物例如 D- 青霉胺和硫代硫酸金 (gold thiomalate)、维生素 D_3 类似物、α 干扰素等。关于另外提及的血管生成的抑制剂，参见，Blood 等人，Bioch. Biophys. Acta.，1032：89-118(1990)，Moses 等人，Science，248：1408-1410(1990)，Ingber 等人，Lab. Invest.，59：44-51(1988)，和美国专利 5,092,885、5,112,946、5,192,744、5,202,352 和 6573256。此外，存在可用于抑制血管生成的多种化合物例如阻断 VEGF 介导的血管生成途径的肽或试剂、内皮他丁蛋白或衍生物、血管他丁的赖氨酸结合片段、黑色素或促黑色素化合物、血纤蛋白溶酶原（例如，血纤蛋白溶酶原的 Kringles 1-3)、肌钙蛋白亚基、玻连蛋白 α_v β_3 的拮抗剂、来源于 Saposin B 的肽、抗生素或类似物（例如，四环素或新霉素）、含有地诺孕素的组合物、含有偶联至肽的 MetAP-2 抑制性核心的化合物、化合物 EM-138、查耳酮 (chalcone) 和其类似物以及二肽酶抑制剂 (naaladase inhibitor)。参见，例如，美国专利 6,395,718、6,462,075、6,465,431、6,475,784、6,482,802、6,482,810、6,500,431、6,500,924、6,518,298、6,521,439、6,525,019、6,538,103、6,544,758、6,544,947、6,548,477、6,559,126 和 6,569,845。

[0236] 取决于组合疗法的性质，在施用其他疗法的同时和 / 或之后，可继续施用 EphB4 解除免疫的抗体或抗原结合片段。可以以单个剂量或更多个剂量进行 EphB4 解除免疫的抗体

或抗原结合片段的施用。在一些情况下，在常规疗法之前至少 7 天开始 EphB4 解除免疫的抗体或抗原结合片段的施用，然而在其他情况下，在即将施用常规疗法之前或同时开 始施用。

[0237] VIII. 施用和配制的模式

[0238] 在某些实施方案中，用药学可接受的载体配制 EphB4 解除免疫的抗体或抗原结合片段。可单独或作为药物制剂（组合物）的成分施用此类抗体或抗原结合片段。可以以用于人或兽医药剂的任何常规方法配制用于施用的抗体或抗原结合片段。湿润剂、乳化剂和润滑剂例如硫酸月桂酯钠和硬脂酸镁以及着色剂、释放剂、包衣衣料、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可存在于组合物中。

[0239] EphB4 解除免疫的抗体或抗原结合片段的制剂包括适合于口服 / 经鼻、局部、胃肠外、直肠和 / 或阴道内施用的制剂。制剂可以常规地以单位剂型的形式存在，以及可通过药学领域内熟知的任何方法来制备。可与载体材料组合以产生单个剂型的活性成分的量可视治疗的宿主，特别地施用模式而变化。可与载体材料组合以产生单个剂型的活性成分的量通常是产生治疗效果的化合物的量。

[0240] 在某些实施方案中，制备此类制剂或组合物的方法包括将另一种类型的抗肿瘤或抗血管生成治疗剂和载体以及任选地，一种或更多种辅助成分组合。一般而言，可用液体载体或固体载体粉末或两者制备制剂，然后如果需要，为产物塑形。

[0241] 用于口服施用的制剂可以以胶囊剂、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂（使用有味道的基质，通常蔗糖和阿拉伯胶或黄芪胶 (tragacanth)）、粉剂、粒剂的形式存在或以水性或非水性液体中的溶液或悬浮液的形式存在，或以水包油或油包水液体乳剂的形式存在，或以酏剂或糖浆剂的形式存在，或以锭剂（使用惰性基质例如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶）和 / 或口腔洗剂等的形式存在，各自包含预先确定量的 EphB4 解除免疫的抗体或抗原结合片段作为活性成分。

[0242] 在用于口服施用的固体剂型（胶囊剂、片剂、丸剂、锭剂、粉剂、粒剂等）中，可将一种或更多种 EphB4 解除免疫的抗体或抗原结合片段与一种或更多种药学上可接受的载体例如柠檬酸钠或磷酸二钙和 / 或任何下列物质混合 :(1) 充填剂或增充剂例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和 / 或硅酸 ;(2) 粘合剂例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和 / 或阿拉伯胶 ;(3) 湿润剂例如甘油 ;(4) 崩解剂例如琼 脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、褐藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠 ;(5) 溶液阻滞剂例如石蜡 ;(6) 吸收促进剂 (absorption accelerator) 例如季胺类化合物 ;(7) 湿润剂例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯 ;(8) 吸收剂例如高岭土和膨润土粘土 ;(9) 润滑剂，例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠 (sodium lauryl sulfate) 和其混合物 ;和 (10) 着色剂。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下，药学上可接受的组合物还可包含缓冲剂。相似类型的固体组合物还可用作软填充胶囊和硬填充胶囊的填充剂，所述胶囊使用这样的赋形剂如乳糖或奶糖 (milk sugar) 以及高分子量聚乙二醇等。

[0243] 用于口服施用的液体剂型包括药学可接受的乳剂、微乳剂、溶液、混悬液、糖浆剂和酏剂。除了活性成分以外，液体剂型可包含本领域内常用的惰性稀释剂例如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3- 丁烯醇、油（特别地棉籽油、落花生油、玉米油、胚油、橄体油、蓖麻油和芝麻油）、甘油、

四氢呋喃甲醇、聚乙二醇和去水山梨糖醇的脂肪酸酯和其混合物。除了惰性稀释剂外，口服组合物还可包含佐剂例如湿润剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味料、着色剂、香味剂和防腐剂。

[0244] 除了活性化合物以外，悬浮液可包含悬浮剂例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇(polyoxyethylene sorbitol)和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝(aluminum metahydroxide)、膨润土、琼脂和黄芪胶和其混合物。

[0245] 特别地，可对皮肤或对粘膜例如子宫颈和阴道上的粘膜局部施用公开的方法。这为在诱导副作用的可能性最小的情况下直接递送至肿瘤提供了最大的可能性。局部制剂还可包含已知作为有效的皮肤或角质层穿透促进剂的许多试剂中的一种或更多种试剂。此类试剂的实例是 2- 吡咯烷酮、N- 甲基 -2- 吡咯烷酮、二甲乙酰胺、二甲基酰胺、丙二醇、甲醇或异丙醇、二甲基亚砜和氮酮 (azone)。还可包含另外的试剂以配制化妆上可接受的制剂。此类试剂的实例是脂肪、蜡、油、染料、香料 (fragrance)、防腐剂、稳定剂和表面活性剂。还可包含角质层分离剂例如本领域内已知的角质层分离剂。实例是水杨酸和硫磺。

[0246] 用于局部或经皮肤施用的剂型包括粉剂、喷雾剂、软膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶、溶液、patches 和吸入剂。将 EphB4 解除免疫的抗体 或抗原结合片段与药学上可接受的载体，以及与可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或喷射剂在无菌条件下混合。除了受试多肽试剂外，软膏、糊剂、乳膏和凝胶还可包含赋形剂例如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄芪胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石和氧化锌或其混合物。

[0247] 粉剂和喷雾剂可包含，除了受试多肽治疗剂外，赋形剂例如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺或此类物质的混合物。喷雾剂可额外地包含常规喷射剂例如氯氟烃和挥发性未取代烃例如丁烷和丙烷。

[0248] 适合于胃肠外施用的药物组合物可包含一种或更多种 EphB4 解除免疫的抗体和抗原结合片段与一种或更多种药学上可接受的无菌等渗水性或非水性溶液、分散体、悬浮液或乳剂或可在即将使用前可重建成无菌注射液或悬浮液的无菌粉剂组合，其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使制剂与期望的受者的血液等渗的溶质或悬浮剂或增稠剂。可用于公开的药物组合物的合适的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等）和其适当的混合物、植物油例如橄榄油和可注射有机酯例如油酸乙酯。可以例如通过使用包衣材料例如卵磷脂，在分散体的情况下通过维持所需颗粒大小以通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。

[0249] 此类组合物还可包含佐剂例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。可通过包含各种抗菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、山梨酸酚 (phenol sorbic acid) 等来确保免受微生物的作用。还可期望在组合物中包含等渗剂例如糖、氯化钙等。此外，可注射药物形式的延长的吸收可通过包含延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来产生。

[0250] 通过在生物可降解的聚合物例如聚乳酸 - 乙醇酸交酯 (polylactide-polyglycolide) 中形成一种或更多种 EphB4 解除免疫的抗体和抗原结合片段的微囊化基质来制备可注射 depot 形式。取决于药物对聚合物的比例以及使用的特定聚合物的性质，可控制药物释放的速度。其他生物可降解的聚合物的实例包括多正酯类和聚酐。还可通过将药物俘获在与身体组织相容的脂质体或微乳剂中来制备 Depot 可注射制剂。

[0251] 用于阴道内或直肠施用的制剂可以以栓剂的形式存在，其可通过将一种或更多种公开的化合物与一种或更多种合适的无刺激性赋形剂或 载体（包含例如可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡（suppository wax）或水杨酸酯）混合来制备，并且其在室温下是固体，但在体温下是液体，从而将在直肠或鞘膜腔熔化，并且释放活性化合物。

[0252] 适合使用的药物组合物包括其中以有效地实现它们的期望的目的的量包含一种或更多种 EphB4 解除免疫的抗体和抗原结合片段的组合物。更特别地，治疗有效量是指有效地预防、减轻或改善疾病的症状或延长正在治疗的受试者的存活时间的抗体的量。特别地根据本文中提供的详细公开内容，治疗有效量的确定完全在本领域技术人员的能力之内。治疗有效量可通过使用体外和体内方法来确定。

实施例

[0253] 实施例 1 :解除免疫的抗体的产生

[0254] 如美国申请 2005/0249736 中所述制备小鼠单克隆抗体 #47 和 #131。简而言之，在小鼠中产生抗 EphB4 的细胞外结构域 (ECD) 的抗 EphB4 单克隆抗体。将 EphB4 的 ECD 克隆入 pGEX-4T-1 以产生 GST- 融合 ECD(GST-ECD)。通过亲和层析纯化在 BL21 大肠杆菌中表达为 GST 融合蛋白的 EphB4ECD，并且用凝血酶切割 GST 结构域。通过标准方案产生单克隆抗体并且通过 A 蛋白层析从杂交瘤上清液纯化所述抗体。使用用 EphB4 稳定地转染的 293 细胞的全细胞裂解物，通过 Western 印迹再次确认抗体的灵敏性和特异性。在序列表中提供了 #47 和 #131 的序列。

[0255] 使用 Swiss Pdb 产生鼠序列的结构模型以鉴定参与抗原结合亲和力的氨基酸。只鉴定 Kabat 和 Chothia CDR。

[0256] 然后在芯片上分析鼠序列以鉴定 MHC II 类结合表位。平行地，就各单个的鼠构架区鉴定最接近的人种系抗体。通过在鼠序列中进行置换消除潜在表位。从同源人种系基因获得置换的残基。产生一系列变体，通常 4 或 5 个，以检测各种置换对抗原结合亲和力的影响。

[0257] 使用标准方法从重叠的寡核苷酸合成变异的可变区。然后克隆可变区并且表达为人 IgG1/κ 抗体。独立地产生 #47 和 #131 的重链和轻链变体的所有组合。将组合瞬时转染入 CHO-K1 细胞，收获细胞和上清液以检测活性。

[0258] 表 1 描述了用于亲本和解除免疫的可变区的 SEQ ID NO。列出了解除免疫的变体的重 (H) 链和轻 (K) 链可变区 (V) 的蛋白质和核苷酸 序列。还列出了小鼠单克隆 #47 和 #131(m47,m131) 抗体的可变区以及重 (H) 链和轻 (K) 链的单个 CDR 的蛋白质序列。图 2A-D 还描述了小鼠单克隆亲本抗体对解除免疫的变体的可变区的比对。

[0259] 表 1.

[0260]

SEQ ID NO:	H 和 K 的蛋白质序列	SEQ ID NO:	H 和 K 的核苷酸序列	SEQ ID NO:	小鼠 #131 和 #47 的蛋白质序列
1	47 HV1	31	47 HV1	49	m47 重链
2	47 HV2	32	47 HV2	50	m47 轻链
3	47 HV3	33	47 HV3	51	m131 重链
4	47 HV4	34	47 HV4	52	m131 轻链
5	47 HV5	35	47 HV5	19	CDR1 H47
6	47 KV1	36	47 KV1	20	CDR2 H47
7	47 KV2	37	47 KV2	21	CDR3 H47
8	47 KV3	38	47 KV3	22	CDR1 K47
9	47 KV4	39	47 KV4	23	CDR2 K47
10	131 HV1	40	131 HV1	24	CDR3 K47
11	131 HV2	41	131 HV2	25	CDR1 H131
12	131 HV3	42	131 HV3	26	CDR2 H131
13	131 HV4	43	131 HV4	27	CDR3 H131
14	131 HV5	44	131 HV5	28	CDR1 K131
15	131 KV1	45	131 KV1	29	CDR2 K131
16	131 KV2	46	131 KV2	30	CDR3 K131
17	131 KV3	47	131 KV3		
18	131 KV4	48	131 KV4		

[0261] 实施例 2 :EphB4 结合的表征

[0262] 使用标准夹心 ELISA 结合测定法检测几种解除免疫的抗体的结合亲和力。简而言之，用 NeutrAvidin 以 2ug/ml 涂铺板，然后加入 1ug/ml 生物素标记的可溶性 EphB4-HAS 融合蛋白。然后以始于 1ug/ml 的浓度加入系列稀释的 (1 ： 3) 解除免疫的 #131 或 #47 变体。使用山羊抗人 Fc-HRP 抗体进行检测。根据一式三份重复计算数据的平均值。图 3 和 4 显示公开的解除免疫的抗体的亚组的表观结合亲和力的图。在 4 种解除 免疫的 #47 变体中，所有变体都显示与嵌合型 #47 相似的结合亲和力，而一种解除免疫的抗体 (SEQ ID NO :3/ SEQ ID NO :8) 显示结合亲和力的提高。当与嵌合型 #131 相比较时，解除免疫的 #131 变体也显示相似的结合亲和力。

[0263] 实施例 3 :EphB4 的降解

[0264] 用 10mg/ml 的指定的单克隆抗体 (Mu- 鼠 ;Ch- 嵌合型和 DeI- 解除免疫的) 处理 HT29 细胞 6 小时，然后用冷 PBS 清洗，直接裂解入 SDS- 缓冲液。在 SDS 凝胶上进行细胞裂

解，使用抗 EphB4 一抗进行 Western 印迹（图 5）。

[0265] 实施例 4：体内异种移植物测定

[0266] 为了表征解除免疫的抗体的体内效应，进行体内肿瘤异种移植物测定。简而言之，繁殖细胞，通过胰蛋白酶降解收集细胞和将其重悬浮于无血清培养基中。将大约 $2x10^6$个细胞注射入 10 至 12 周龄雌性 Balb/C 无胸腺小鼠的侧腹，对于鳞状上皮细胞癌模型使用 SCC15 细胞，对于结肠癌模型使用 H29 细胞。每周测量肿瘤生长 3 次，体积估计为 $0.52XaXb^2$，其中 a 和 b 是可触摸肿瘤的最大和最小长度。在细胞植入后 4 天，计算肿瘤体积以确保大小的均一性，并且将动物随机分成 3 组（n = 6 小鼠 / 组）。每周对各组腹膜内（i.p.）注射 10mg/kg 的受试抗体或仅媒介物（无菌生理盐水，pH 7.4）3 次。4 周后处死动物，收获肿瘤和正常器官。将肿瘤的部分固定在福尔马林中以用于石蜡包埋和组织学分析。将各组中剩余的肿瘤组织和器官混合并且提取蛋白质。所有方法由我们的制度的动物使用和保养委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee) 批准并且按照动物福祉法规 (the Animal Welfare Act regulation) 进行。

[0267] 从体内鳞状上皮细胞癌异种移植物测定收集下列数据（表 2 和 3）。肿瘤体积以 mm^3表示，天数相应于开始处理后的天数。将亲本小鼠单克隆抗体 #47 或 #131 与示例性解除免疫的抗体相比较。对对照组单独施用媒介物。结果也在图 6a 和 6b 中得到图解描述。

[0268] 表 2.

[0269]

天	3	5	7	12
对照	141.2	159.5	172.8	207.3
85L	163.3	190.1	201.7	223.2
m47	153	109.4	90.3	83.1
h47	167.3	127.4	101.53	83.8

[0270] 表 3.

[0271]

天	4	6	8	10	12	14
对照	96.30563	120.8	129	157.5	176.1	201.3
m 131	116.3825	92.8	77.1	66.6	62.1	75.1
h 131	99.52313	80.3	69.4	75	66.6	67.1

[0272] 示例性解除免疫的 #47 抗体和示例性解除免疫的 #131 抗体都分别显示与小鼠单克隆 #47 和 #131 抗体相似的肿瘤生长抑制水平。这是与对照以及与不同的小鼠单克隆抗 EphB4 抗体 #85L（美国申请 2005/0249736 中描述的）形成鲜明的对比。

[0273] 在处理的第 14 天从结肠癌异种移植物模型收集下列数据（表 4）。如上文所述，比较使用小鼠单克隆抗体或解除免疫的变体的处理的效果。此外，还将 IgG1 的施用用作对照。

[0274] 表 4.

[0275]

对照	448.7
IgG1	436
m131	207
h131	170

[0276]

对照	448.7
IgG1	436
m47	212
h47	230

[0277] 根据上述结果，很明显公开的解除免疫的抗体在至少两个癌症异种移植物模型中在减缓肿瘤的生长中是有效的。

[0278] 序列的概述

[0279] SEQ ID NOs :1-5 相应于来源于小鼠单克隆抗体 #47 的重链可变区解除免疫的变体的氨基酸序列。

[0280] SEQ ID NOs :6-9 相应于来源于小鼠单克隆抗体 #47 的轻链可变区解除免疫的变体的氨基酸序列。

[0281] SEQ ID NOs :10-14 相应于来源于小鼠单克隆抗体 #131 的重链可变区解除免疫的变体的氨基酸序列。

[0282] SEQ ID NOs :15-18 相应于来源于小鼠单克隆抗体 #131 的轻链可变区解除免疫的变体的氨基酸序列。

[0283] SEQ ID NOs :19-21 相应于来源于小鼠单克隆抗体 #47 的重链可变区解除免疫的 CDR 的氨基酸序列。

[0284] SEQ ID NOs :22-24 相应于来源于小鼠单克隆抗体 #47 的轻链可变区 CDR 的氨基酸序列。

[0285] SEQ ID NOs :25-27 相应于来源于小鼠单克隆抗体 #131 的重链可变区 CDR 的氨基酸序列。

[0286] SEQ ID NOs :28-30 相应于来源于小鼠单克隆抗体 #131 的轻链可变区 CDR 的氨基酸序列。

[0287] SEQ ID NOs :31-35 相应于来源于小鼠单克隆抗体 #47 的重链可变区解除免疫的变体的核酸序列。

[0288] SEQ ID NOs :36-39 相应于来源于小鼠单克隆抗体 #47 的轻链可变区解除免疫的变体的核酸序列。

[0289] SEQ ID NOs :40-44 相应于来源于小鼠单克隆抗体 #131 的重链可变区解除免疫的变体的核酸序列。

[0290] SEQ ID NOs :45-48 相应于来源于小鼠单克隆抗体 #131 的轻链可变区解除免疫的变体的核酸序列。

[0291] SEQ ID NO :49-52 分别相应于抗体 #47 的小鼠单克隆重链和轻链可变区和抗体 #131 的小鼠单克隆重链和轻链可变区。

[0292] SEQ ID NO :53 相应于人 EphB4 前体蛋白。

[0293] 序列表

[0294] SEQ ID NO :1 :重链可变区解除免疫的 47 变体 1

[0295] EVQLVQSGAELKKPGASVKISCKASGYTFTDYYMNWVKQAHGK GLEWIGDNNPNNGGTTYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELRSLRSEDSAVYYCARGKYYGTSYGWYFDVWGQGTTVTVSS

[0296] SEQ ID NO :2 :重链可变区解除免疫的 47 变体 2

[0297] EVQLVQSGAELKKPGASVKISCKASGYTFTDYYMNWVKQAHGKGLEWIGDNNPNNGGTTYNQKFKGRAT

LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARGKYYGTSYGWYFDVWGQGTTVTVSS

[0298] SEQ ID NO:3:重链可变区解除免疫的 47 变体 3

[0299] EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYYMNWVKQAPGKGLEWIGDNNPNNGGTTYNQKFKGRAT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGKYYGTSYGWYFDVWGQGTTVTVSS

[0300] SEQ ID NO:4:重链可变区解除免疫的 47 变体 4

[0301] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVKQAPGKGLEWIGDNNPNNGGTTYNQKFKGRVT LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGKYYGTSYGWYFDVWGQGTTVTVSS

[0302] SEQ ID NO:5:重链可变区解除免疫的 47 变体 5

[0303] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWIGDNNPNNGGTTYNQKFKGRVT ITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGKYYGTSYGWYFDVWGQGTTVTVSS

[0304] SEQ ID NO:6:轻链可变区解除免疫的 47 变体 1

[0305] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNIDSYLAWFQQKQGKAPKLLVYDATVLADGVPSRFSGSGSGT QYTLTINSLQSEDAARYYCQVYYSIPWTFGQGTKLE I K

[0306] SEQ ID NO:7:轻链可变区解除免疫的 47 变体 2

[0307] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNIDSYLAWFQQKPGKAPKLLVYDATVLADGVPSRFSGSGSGT DYTLTINSLQAEDAARYYCQVYYSIPWTFGQGTKLEIK

[0308] SEQ ID NO:8:轻链可变区解除免疫的 47 变体 3

[0309] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNIDSYLAWFQQKPGKAPKLLVYDATVLADGVPSRFSGSGSGT DYTLTINSLQAEDAATYYCQVYYSIPWTFGQGTKLEIK

[0310] SEQ ID NO:9:轻链可变区解除免疫的 47 变体 4

[0311] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNIDSYLAWYQQKPGKAPKL LVYDATVLADGVPSRFSGSGSG TDYTLTINSLQAEDAATYYCQVYYSIPWTFGQGTKLEIK

[0312] SEQ ID NO:10:重链可变区解除免疫的 131 变体 1

[0313] QVQLVQSGAELKKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQAPGQGLEWIGKIGPRIGTNYYNENFKGRAT LTADISTNTAYMELSSLRSEDSAVYFCARSEDYSGYVSYALDYWGQGTSVTVSS

[0314] SEQ ID NO:11:重链可变区解除免疫的 131 变体 2

[0315] QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQAPGQGLEWIGKIGPRIGTNYYNENFKGRAT LTADISTNTAYMELSSLRSEDTAVYFCARSEDYSGYVSYALDYWGQGTLVTVSS

[0316] SEQ ID NO:12:重链可变区解除免疫的 131 变体 3

[0317] QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQAPGQGLEWIGKIGPRIGTNYYNENFKGRVT LTADISTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSEDYSGYVSYALDYWGQGTLVTVSS

[0318] SEQ ID NO:13:重链可变区解除免疫的 131 变体 4

[0319] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWIGKIGPRIGTNYYNENFKGRVT LTADISTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSEDYSGYVS YALDYWGQGTLVTVSS

[0320] SEQ ID NO:14:重链可变区解除免疫的 131 变体 5

[0321] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWIGKIGPRIGTNYYNENFKGRVT LTADISTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSEDYSGYVSYALDYWGQGTLVTVSS

[0322] SEQ ID NO:15:轻链可变区解除免疫的 131 变体 1

[0323] NIVMTQSPASLSLSPGERVTLSCKASENVDTYVSWYQQKPDQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSAT

DFTLTISSLQAEDVADYHCGQTYRYPFTFGQGTKVEIK

[0324] SEQ ID NO:16:轻链可变区解除免疫的 131 变体 2

[0325] NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCKASENVDTYVSWYQQKPDQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSAT DFTLTISSLQAEDVADYHCGQTYRYPFTFGQGTKVEIK

[0326] SEQ ID NO:17:轻链可变区解除免疫的 131 变体 3

[0327] NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCKASENVDTYVSWYQQKPDQSP KLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSA TDFTLTISSLQAEDVAVYYCGQTYRYPFTFGQGTKVEIK

[0328] SEQ ID NO:18:轻链可变区解除免疫的 131 变体 4

[0329] NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCKASENVDTYVSWYQQKPDQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFSGSGSAT DFTLTI SSLQAEDVAVYYCGQTYRYPFTFGQGTKVEIK

[0330] SEQ ID NO:19:小鼠单克隆抗体 #47 重链 CDR1

[0331] DYYMN

[0332] SEQ ID NO:20:小鼠单克隆抗体 #47 重链 CDR2

[0333] DNNPNNGGTTYNQKF

[0334] SEQ ID NO:21:小鼠单克隆抗体 #47 重链 CDR3

[0335] GKYYGTS YGWYFDV

[0336] SEQ ID NO:22:小鼠单克隆抗体 #47 轻链 CDR1

[0337] RISDNIDSYLA

[0338] SEQ ID NO:23:小鼠单克隆抗体 #47 轻链 CDR2

[0339] DATVLAD

[0340] SEQ ID NO:24:小鼠单克隆抗体 #47 轻链 CDR3

[0341] QVYYSIPWT

[0342] SEQ ID NO:25:小鼠单克隆抗体 #131 重链 CDR1

[0343] DYYIN

[0344] SEQ ID NO:26:小鼠单克隆抗体 #131 重链 CDR2

[0345] KIGPRIGTNYYNENFK

[0346] SEQ ID NO:27:小鼠单克隆抗体 #131 重链 CDR3

[0347] SEDYSGYVSYALDY

[0348] SEQ ID NO:28:小鼠单克隆抗体 #131 轻链 CDR1

[0349] KASENVDTYVS

[0350] SEQ ID NO:29:小鼠单克隆抗体 #131 轻链 CDR2

[0351] GASNRYT

[0352] SEQ ID NO:30:小鼠单克隆抗体 #131 轻链 CDR3

[0353] GQTYRYPFT

[0354] SEQ ID NO:31:重链可变区解除免疫的 47 变体 1

[0355] GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGCTGAAGAAGCCT GGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAA GGCTTCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATGAACTGGGTGAAACAGGCACATGGAAAGGGACTTGAGTGGATTG GAGATAATAATCCTAATAATGGTGGTACTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACATTGACTGTAGACAAG TCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGCGATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGAAA

ATACTACGGTACTAGCTACGGCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

[0356] SEQ ID NO:32:重链可变区解除免疫的 47 变体 2

[0357] GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAG GCTTCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATGAACTGGGTGAAACAGGCACATGGAAAGGGACTTGAGTGGATTGG AGATAATAATCCTAATAATGGTGGTACTAACTACAACCA GAAGTTCAA GGGCAGGGCCACATTGACTGTAGACAA GTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGAA AATACTACGGTACTAGCTACGGCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

[0358] SEQ ID NO:33:重链可变区解除免疫的 47 变体 3

[0359] GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAG GCTTCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATGAACTGGGTGAAACAGGCACCTGGAAAGGGACTTGAGTGGATTGG AGATAATAATCCTAATAATGGTGGTACTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACATTGACTGTAGACAAGT CCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGAAAA TACTACGGTACTAGCTACGGCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

[0360] SEQ ID NO:34:重链可变区解除免疫的 47 变体 4

[0361] GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTATCCTGTAAG GCTTCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATGAACTGGGTGAAACAGGCACCTGGAAAGGGAC TTGAGTGGATTG GAGATAATAATCCTAATAATGGTGGTACTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGTCACATTGACTGTAGACAAG TCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGAAA ATACTACGGTACTAGCTACGGCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

[0362] SEQ ID NO:35:重链可变区解除免疫的 47 变体 5

[0363] GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTATCCTGTAAG GCTTCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATGAACTGGGTGAGACAGGCACCTGGAAAGGGACTTGAGTGGATTGG AGATAATAATCCTAATAATGGTGGTACTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGTCACAATTACTGTAGACAAGT CCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGAAAA TACTACGGTACTAGCTACGGCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

[0364] SEQ ID NO:36:轻链可变区解除免疫的 47 变体 1

[0365] GACATCCAGATGACTCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACCGTGTCACCATCACAT GTCGAATAAGTGACAATATTGACAGTTATTTAGCATGGTTTCAGCAGAAACAGGGAAAAGCTCCTAAGCTCCTGG TCTATGATGCAACAGTCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTATACTC TCACGATCAACAGCCTGCAGTCTGAAGATGCTGCGAGATATTACTGTCAAGTTTATTATAGTATTCCGTGGACGT TCGGTCAAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

[0366] SEQ ID NO:37:轻链可变区解除免疫的 47 变体 2

[0367] GACATCCAGATGACTCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACCGTGTCACCATCACATGT CGAATAAGTGACAATATTGACAGTTATTTAGCATGGTTTCAGCAGAAACCGGGAAAAGCTCCTAAGCTCCTGGTCTA TGATGCAACAGTCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGACTATACTCTCACGA TCAACAGCCTGCAGGCTGAAGATGCTGCGAGATATTACTGTCAAGTTTAT TATAGTATTCCGTGGACGTTCGGTCA AGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

[0368] SEQ ID NO:38:轻链可变区解除免疫的 47 变体 3

[0369] GACATCCAGATGACTCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACCGTGTCACCATCACAT

GTCGAATAAGTGACAATATTGACAGTTATTTAGCATGGTTTCAGCAGAAACCGGGAAAAGCTCCTAAGCTCCTGG
TCTATGATGCAACAGTCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGACTATACTC
TCACGATCAACAGCCTGCAGGCTGAAGATGCTGCGACATATTACTGTCAAGTTTATTATAGTATTCCGTGGACGT
TCGGTCAAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

[0370] SEQ ID NO:39:轻链可变区解除免疫的 47 变体 4

[0371] GACATCCAGATGACTCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACCGTGTCACCATCACAT
GTCGAATAAGTGACAATATTGACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACCGGGAAAAGCTCCTAAGCTCCTGG
TCTATGATGCAACAGTCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGACTATACTC
TCACGATCAACAGCCTGCAGGCTGAAGATGCTGCGACATATTACTGTCAAGTTTATTATAGTATTCCGTGGACGT
TCGGTCAAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

[0372] SEQ ID NO:40:重链可变区解除免疫的 131 变体 1

[0373] CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATTTCCTGCAAG
GCTTCTGGCTACACCTTCACTGACTACTACATTAACTGGGTGAAGCAGGCGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGG
CAAGATTGGTCCTCGAATTGGTACTAATTACTACAATGAAAACTTCAAGGGCAGGGCCACACTGACTGCAGACATTT
CCACCAACACAGCCTACATGGAGCTCTCCTCCCTGAGATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTTCTGTGCAAGATCTGAG
GACTACTCTGGTTATGTTTCCTATGCTTTAGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCCGTCACCGTCTCCTCA

[0374] SEQ ID NO:41:重链可变区解除免疫的 131 变体 2

[0375] CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGGCTTCAGTGAAGATTTCCTGCAA
GGCTTCTGGCTACACCTTCACTGACTACTACATTAACTGGGTGAAGCAGGCGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTG
GCAAGATTGGTCCTCGAATTGGTACTAATTACTACAATGAAAACTTCAAGGGCAGGGCCACACTGACTGCAGACATT
TCCACCAACACAGCCTACATGGAGCTCTCCTCCCTGAGATCTGAGGACACTGCTGTCTATTTCTGTGCAAGATCTGA
GGACTACTCTGGTTATGTTTCCTATGCTTTAGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTCGTCACCGTCTCCTCA

[0376] SEQ ID NO:42:重链可变区解除免疫的 131 变体 3

[0377] CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATTTCCTGCAAG
GCTTCTGGCTACACCTTCACTGACTACTACATTAACTGGGTGAAGCAGGCGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGG
CAAGATTGGTCCTCGAATTGGTACTAATTACTACAATGAAAACTTCAAGGGCAGGGTCACACTGACTGCAGACATTT
CCACCAACACAGCCTACATGGAGCTCTCCTCCCTGAGATCTGAGGACACTGCTGTCTATTACTGTGCAAGATCTGAG
GACTACTCTGGTTATGTTTCCTATGCTTTAGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTCGTCACCGTCTCCTCA

[0378] SEQ ID NO:43:重链可变区解除免疫的 131 变体 4

[0379] CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAG
GCTTCTGGCTACACCTTCACTGACTACTATATTAACTGGGTGAGGCAGGCGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGG
CAAGATTGGTCCTCGAATTGGTACTAATTACTACAATGAAAACTTCAAGGGCAGGGTCACACTGACTGCAGACATTT
CCACCAACACAGCCTACATGGAGCTCTCCTCCCTGAGATCTGAGGACACTGCTGTCTATTACTGTGCAAGATCTGAG
GACTACTCTGGTTATGTTTCCTATGCTTTAGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTCGTCACCGTCTCCTCA

[0380] SEQ ID NO:44:重链可变区解除免疫的 131 变体 5

[0381] CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAG
GCTTCTGGCTACACCTTCACTGACTACTACATTAACTGGGTGAGGCAGGCGCCTGGACAGGGCCT TGAGTGGATTG
GCAAGATTGGTCCTCGAATTGGTACTAATTACTACAATGAAAACTTCAAGGGCAGGGTCACACTGACTGCAGACATT
TCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCTCCTCCCTGAGATCTGAGGACACTGCTGTCTATTACTGTGCAAGATCTGA

GGACTACTCTGGTTATGTTTCCTATGCTTTAGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTCGTCACCGTCTCCTCA

[0382] SEQ ID NO:45:轻链可变区解除免疫的 131 变体 1

[0383] AACATTGTAATGACCCAATCTCCCGCATCCCTGTCCCTGTCACCAGGAGAGAGGGTCACCTTGAGCT GCAAGGCCAGTGAGAATGTGGATACTTATGTATCCTGGTATCAACAGAAACCAGACCAGTCTCCTAAATTGCTAA TTTACGGGGCATCCAACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTCACTC TGACCATCAGCAGTCTTCAGGCTGAAGACGTTGCAGATTATCACTGTGGACAGACTTACAGGTATCCGTTCACGT TCGGACAGGGGACCAAGGTGGAAATAAAA

[0384] SEQ ID NO:46:轻链可变区解除免疫的 131 变体 2

[0385] AACATTGTAATGACCCAATCTCCCGCAACCCTGTCCCTGTCACCAGGAGAGAGGGTCACCTTGAGCT GCAAGGCCAGTGAGAATGTGGATACTTATGTATCCTGGTATCAACAGAAACCAGACCAGTCTCCTAAATTGCTAA TTTACGGGGCATCCAACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTCACTC TGACCATCAGCAGTCTTCAGGCTGAAGACGTTGCAGATTATCACTGTGGACAGACTTACAGGTATCCGTTCACGT TCGGACAGGGGACCAAGGTGGAAATAAAA

[0386] SEQ ID NO:47:轻链可变区解除免疫的 131 变体 3

[0387] AACATTGTAATGACCCAATCTCCCGCAACCCTGTCCCTGTCACCAGGAGAGAGGGTCACCTTGAGCT GCAAGGCCAGTGAGAATGTGGATACTTATGTATCCTGGTATCAACAGAAACCAGACCAGTCTCCTAAATTGCTAA TTTACGGGGCATCCAACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTCACTC TGACCATCAGCAGTCTTCAGGCTGAAGACGTTGCAGTTTATTACTGTGGACAGACTTACAGGTATCCGTTCACGT TCGGACAGGGGACCAAGGTGGAAATA AAA

[0388] SEQ ID NO:48:轻链可变区解除免疫的 131 变体 4

[0389] AACATTGTAATGACCCAATCTCCCGCAACCCTGTCCCTGTCACCAGGAGAGAGGGTCACCTTGAGCT GCAAGGCCAGTGAGAATGTGGATACTTATGTATCCTGGTATCAACAGAAACCAGACCAGTCTCCTAAATTGCTAA TTTACGGGGCATCCAACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCTCAGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTCACTC TGACCATCAGCAGTCTTCAGGCTGAAGACGTTGCAGTTTATTACTGTGGACAGACTTACAGGTATCCGTTCACGT TCGGACAGGGGACCAAGGTGGAAATAAAA

[0390] SEQ ID NO:49:小鼠单克隆抗体 #47 重链

[0391] EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYMNWVKQSHGKGLEWIGDNNPNNGGTTYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARGKYYGTS YGWYFDVWGTGTTVTVSS

[0392] SEQ ID NO:50:小鼠单克隆抗体 #47 轻链

[0393] DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRISDNIDSYLAWFQQKQGKSPQLLVYDATVLADGVPSRFSGSGSGT QYSLKINSLQSEDAARYYCQVYYSIPWTFGGGTKLEIK

[0394] SEQ ID NO:51:小鼠单克隆抗体 #131 重链

[0395] QVQLKQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQRPGQGLEWIGKIGPRIGTNYYNENFKGKAT LTADISSNTAYMQLHTLTSEDSAVYFCARSEDYSGYVSYALDYWGQGTSVTVSS

[0396] SEQ ID NO:52:小鼠单克隆抗体 #131 轻链

[0397] NIVMTQSPKSMSMSVGERVTLSCKASENVDTYVSWYQQKPDQSPELLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSAT DFTLTISSVQAEDLADYHCGQTYRYPFTFGGGTKLEIK

[0398] SEQ ID NO:53:人 EphB4 前体蛋白

[0399] MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGLDEEQHSVRTYEVCDVQRAPGQ

AHWLRTGWVPRRGAVHVYATLRFTMLECLSLPRAGRSCKETFTVFYYESDADTATALTPAWMENPYIKVDTVAAEHL
TRKRPGAEATGKVNVKTLRLGPLSKAGFYLAFQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTVNLTRFPETVPRELVVPVAGSC
VVDAVPAPG PSPSLYCREDGQWAEQPVTGCSCAPGFEAAEGNTKCRACAQGTFKPLSGEGSCQPCPANSHSNTIGS
AVCQCRVGYFRARTDPRGAPCTTPPSAPRSVVSRLNGSSLHLEWSAPLESGGREDLTYALRCRECRPGGSCAPCGG
DLTFDPGPRDLVEPWVVVRGLRPDFTYTFEVTALNGVSSLATGPVPFEPVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLSL
AWAVPRAPSGAVLDYEVKYHEKGAEGPSSVRFLKTSENRAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGPFGQEHHSQTQLD
ESEGWREQLALIAGTAVVGVVLVLVVIVVAVLCLRKQSNGREAEYSDKHGQYLIGHGTKVYIDPFTYEDPNEAVREF
AKEIDVSYVKIEEVIGAGEFGEVCRGRLKAPGKKESCVAIKTLKGGYTERQRREFLSEASIMGQFEHPNIIRLEGVV
TNSMPVMILTEFMENGALDSFLRLNDGQFTVIQLVGMLRGIASGMRYLAEMSYVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFG
LSRFLEENSSDPTYTSSLGGKIPIRWTAPEAIAFRKFTSASDAWSYGIVMWEVMSFGERPYWDMSNQDVINAIEQDY
RLPPPPDCPTSLHQLMLDCWQKDRNARPRFPQVVSALDKMIRNPASLKIVARENGGASHPLLDQRQPHYSAFGSVGE
WLRAIKMGRYEESFAAAGFGSFELVSQISAEDLLRIGVTLAGHQKKILASVQHMKSQAKPGTPGGTGGPAPQY

[0400] 通过引用合并

[0401] 本文中提及的所有出版物以它们的全文通过引用合并入本文就如同特定地及个别地将各个公开案、专利揭示内容以引用的方式合并入一样。

[0402] 虽然已论述了本发明的特定实施方案中，但上述说明书是举例说明性的而非限定性的。当回顾本说明书和下面的权利要求时，本发明的许多变型对于本领域技术人员来说将变得显然。本发明的全部范围以及它们的等价物和说明书以及此类变型的全部范围应当参照权利要求来确定。

序列表

<110>VASGENE THERAPEUTICS
<120> 使用结合 EphB4 的人源化抗体的癌症治疗
<130>VASG-010-WO1
<140>PCT/US2008/009619
<141>2008-08-11
<150>60/964,496
<151>2007-08-13
<160>53
<170>PatentIn version 3.5
<210>1
<211>123
<212>PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多肽"
<400>1

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

<210>2
<211>123
<212>PRT

<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多肽"
<400>2
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ala His Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asp Asn Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Lys Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210>3
<211>123
<212>PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多肽"
<400>3
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asp Asn Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Lys Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>4
<211>123
<212>PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多肽"
<400>4
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asp Asn Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Lys Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>5
<211>123
<212>PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源

<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多肽"

<400>5

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

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

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

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

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

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

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

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>6

<211>107

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多肽"

<400>6

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 Arg Ile Ser Asp Asn Ile Asp Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Asp Ala Thr Val Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Arg Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Tyr Ser Ile Pro Trp

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
<210>7
<211>107
<212>PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多肽"
<400>7
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 Arg Ile Ser Asp Asn Ile Asp Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45
Tyr Asp Ala Thr Val Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Arg Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Tyr Ser Ile Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
<210>8
<211>107
<212>PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多肽"
<400>8
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 Arg Ile Ser Asp Asn Ile Asp Ser Tyr
20 25 30

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

<210>9
<211>107
<212>PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多肽"
<400>9
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 Arg Ile Ser Asp Asn Ile Asp Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45
Tyr Asp Ala Thr Val Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Tyr Ser Ile Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210>10
<211>123
<212>PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源

<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多肽"
<400>10
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Lys Ile Gly Pro Arg Ile Gly Thr Asn Tyr Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ile Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Glu Asp Tyr Ser Gly Tyr Val Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210>11
<211>123
<212>PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多肽"
<400>11
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Lys Ile Gly Pro Arg Ile Gly Thr Asn Tyr Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ile Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95
Ala Arg Ser Glu Asp Tyr Ser Gly Tyr Val Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210>12
<211>123
<212>PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多肽"
<400>12
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Lys Ile Gly Pro Arg Ile Gly Thr Asn Tyr Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Ile Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Glu Asp Tyr Ser Gly Tyr Val Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210>13
<211>123
<212>PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多肽"
<400>13

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

<210>14
<211>123
<212>PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多肽"
<400>14

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

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>15
<211>107
<212>PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多肽"
<400>15

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

<210>16
<211>107
<212>PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多肽"
<400>16

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

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

<210>17
<211>107
<212>PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多肽"
<400>17
Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Tyr
20 25 30
Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Thr Tyr Arg Tyr Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210>18
<211>107
<212>PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成

多肽"

<400>18

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210>19

<211>5

<212>PRT

<213> 鼠

<400>19

Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210>20

<211>15

<212>PRT

<213> 鼠

<400>20

Asp Asn Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15

<210>21

<211>14

<212>PRT

<213> 鼠

<400>21

Gly Lys Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210>22

<211>11

<212>PRT
<213> 鼠
<400>22
Arg Ile Ser Asp Asn Ile Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10
<210>23
<211>7
<212>PRT
<213> 鼠
<400>23
Asp Ala Thr Val Leu Ala Asp
1 5
<210>24
<211>9
<212>PRT
<213> 鼠
<400>24
Gln Val Tyr Tyr Ser Ile Pro Trp Thr
1 5
<210>25
<211>5
<212>PRT
<213> 鼠
<400>25
Asp Tyr Tyr Ile Asn
1 5
<210>26
<211>16
<212>PRT
<213> 鼠
<400>26
Lys Ile Gly Pro Arg Ile Gly Thr Asn Tyr Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
1 5 10 15
<210>27
<211>14
<212>PRT
<213> 鼠
<400>27
Ser Glu Asp Tyr Ser Gly Tyr Val Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr

1 5 10

<210>28

<211>11

<212>PRT

<213> 鼠

<400>28

Lys Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Tyr Val Ser

1 5 10

<210>29

<211>7

<212>PRT

<213> 鼠

<400>29

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210>30

<211>9

<212>PRT

<213> 鼠

<400>30

Gly Gln Thr Tyr Arg Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210>31

<211>369

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多核苷酸"

<400>31

gaggtccagc tggtgcagtc tggagctgag ctgaagaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgtaagg cttctggata cacgttcact gactactaca tgaactgggt gaaacaggca 120

catggaaagg gacttgagtg gattggagat aataatccta ataatggtgg tactaactac 180

aaccagaagt tcaagggcag ggccacattg actgtagaca agtccaccag cacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgcg atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagaggaaaa 300

tactacggta ctagctacgg ctggtacttc gatgtctggg gccaagggac cacggtcacc 360

gtctcctca 369

<210>32

<211>369
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多核苷酸"
<400>32
gaggtccagc tggtgcagtc tggagctgag ctgaagaagc ctggggcttc agtgaagata 60
tcctgtaagg cttctggata cacgttcact gactactaca tgaactgggt gaaacaggca 120
catggaaagg gacttgagtg gattggagat aataatccta ataatggtgg tactaactac 180
aaccagaagt tcaagggcag ggccacattg actgtagaca agtccaccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgcg atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagaggaaaa 300
tactacggta ctagctacgg ctggtacttc gatgtctggg gccaagggac cacggtcacc 360
gtctcctca 369
<210>33
<211>369
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多核苷酸"
<400>33
gaggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaagata 60
tcctgtaagg cttctggata cacgttcact gactactaca tgaactgggt gaaacaggca 120
cctggaaagg gacttgagtg gattggagat aataatccta ataatggtgg tactaactac 180
aaccagaagt tcaagggcag ggccacattg actgtagaca agtccaccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgcg atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagaggaaaa 300
tactacggta ctagctacgg ctggtacttc gatgtctggg gccaagggac cacggtcacc 360
gtctcctca 369
<210>34
<211>369
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多核苷酸"

<400>34

gaggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggta 60
tcctgtaagg cttctggata cacgttcact gactactaca tgaactgggt gaaacaggca 120
cctggaaagg gacttgagtg gattggagat aataatccta ataatggtgg tactaactac 180
aaccagaagt tcaagggcag ggtcacattg actgtagaca agtccaccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgcg atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagaggaaaa 300
tactacggta ctagctacgg ctggtacttc gatgtctggg gccaagggac cacggtcacc 360
gtctcctca 369

<210>35

<211>369

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多核苷酸"

<400>35

gaggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggta 60
tcctgtaagg cttctggata cacgttcact gactactaca tgaactgggt gagacaggca 120
cctggaaagg gacttgagtg gattggagat aataatccta ataatggtgg tactaactac 180
aaccagaagt tcaagggcag ggtcacaatt actgtagaca agtccaccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgcg atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagaggaaaa 300
tactacggta ctagctacgg ctggtacttc gatgtctggg gccaagggac cacggtcacc 360
gtctcctca 369

<210>36

<211>321

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多核苷酸"

<400>36

gacatccaga tgactcagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtgggaga ccgtgtcacc 60
atcacatgtc gaataagtga caatattgac agttatttag catggtttca gcagaaacag 120
ggaaaagctc ctaagctcct ggtctatgat gcaacagtct tagcagatgg tgtgccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tatactctca cgatcaacag cctgcagtct 240
gaagatgctg cgagatatta ctgtcaagtt tattatagta ttccgtggac gttcggtcaa 300
ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210>37
<211>321
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多核苷酸"
<400>37
gacatccaga tgactcagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtgggaga ccgtgtcacc 60
atcacatgtc gaataagtga caatattgac agttatttag catggtttca gcagaaaccg 120
ggaaaagctc ctaagctcct ggtctatgat gcaacagtct tagcagatgg tgtgccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc aggcacagac tatactctca cgatcaacag cctgcaggct 240
gaagatgctg cgagatatta ctgtcaagtt tattatagta ttccgtggac gttcggtcaa 300
ggcaccaagc tggaaatcaa a 321
<210>38
<211>321
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多核苷酸"
<400>38
gacatccaga tgactcagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtgggaga ccgtgtcacc 60
atcacatgtc gaataagtga caatattgac agttatttag catggtttca gcagaaaccg 120
ggaaaagctc ctaagctcct ggtctatgat gcaacagtct tagcagatgg tgtgccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc aggcacagac tatactctca cgatcaacag cctgcaggct 240
gaagatgctg cgacatatta ctgtcaagtt tattatagta ttccgtggac gttcggtcaa 300
ggcaccaagc tggaaatcaa a 321
<210>39
<211>321
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多核苷酸"
<400>39

gacatccaga tgactcagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtgggaga ccgtgtcacc 60
atcacatgtc gaataagtga caatattgac agttatttag catggtatca gcagaaaccg 120
ggaaaagctc ctaagctcct ggtctatgat gcaacagtct tagcagatgg tgtgccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc aggcacagac tatactctca cgatcaacag cctgcaggct 240
gaagatgctg cgacatatta ctgtcaagtt tattatagta ttccgtggac gttcggtcaa 300
ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210>40
<211>369
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多核苷酸"
<400>40
caggtccagc tggtgcagtc tggagctgag ctgaagaagc ctggggcttc agtgaagatt 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcact gactactaca ttaactgggt gaagcaggcg 120
cctggacagg gccttgagtg gattggcaag attggtcctc gaattggtac taattactac 180
aatgaaaact tcaagggcag ggccacactg actgcagaca tttccaccaa cacagcctac 240
atggagctct cctccctgag atctgaggac tctgctgtct atttctgtgc aagatctgag 300
gactactctg gttatgtttc ctatgcttta gactactggg gtcaaggaac ctccgtcacc 360
gtctcctca 369

<210>41
<211>369
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多核苷酸"
<400>41
caggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaagatt 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcact gactactaca ttaactgggt gaagcaggcg 120
cctggacagg gccttgagtg gattggcaag attggtcctc gaattggtac taattactac 180
aatgaaaact tcaagggcag ggccacactg actgcagaca tttccaccaa cacagcctac 240
atggagctct cctccctgag atctgaggac actgctgtct atttctgtgc aagatctgag 300
gactactctg gttatgtttc ctatgcttta gactactggg gtcaaggaac cctcgtcacc 360
gtctcctca 369

<210>42

<211>369
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多核苷酸"
<400>42
caggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaagatt 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcact gactactaca ttaactgggt gaagcaggcg 120
cctggacagg gccttgagtg gattggcaag attggtcctc gaattggtac taattactac 180
aatgaaaact tcaagggcag ggtcacactg actgcagaca tttccaccaa cacagcctac 240
atggagctct cctccctgag atctgaggac actgctgtct attactgtgc aagatctgag 300
gactactctg gttatgtttc ctatgcttta gactactggg gtcaaggaac cctcgtcacc 360
gtctcctca 369
<210>43
<211>369
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多核苷酸"
<400>43
caggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcact gactactata ttaactgggt gaggcaggcg 120
cctggacagg gccttgagtg gattggcaag attggtcctc gaattggtac taattactac 180
aatgaaaact tcaagggcag ggtcacactg actgcagaca tttccaccaa cacagcctac 240
atggagctct cctccctgag atctgaggac actgctgtct attactgtgc aagatctgag 300
gactactctg gttatgtttc ctatgcttta gactactggg gtcaaggaac cctcgtcacc 360
gtctcctca 369
<210>44
<211>369
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多核苷酸"

<400>44

caggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcact gactactaca ttaactgggt gaggcaggcg 120
cctggacagg gccttgagtg gattggcaag attggtcctc gaattggtac taattactac 180
aatgaaaact tcaagggcag ggtcacaotg actgcagaca tttccaccag cacagcctac 240
atggagctct cctccctgag atctgaggac actgctgtct attactgtgc aagatctgag 300
gactactctg gttatgtttc ctatgcttta gactactggg gtcaaggaac cctcgtcacc 360
gtctcctca 369

<210>45

<211>321

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多核苷酸"

<400>45

aacattgtaa tgacccaatc tcccgcatcc ctgtccctgt caccaggaga gagggtcacc 60
ttgagctgca aggccagtga gaatgtggat acttatgtat cctggtatca acagaaacca 120
gaccagtctc ctaaattgct aatttacggg gcatccaacc ggtacactgg agtccctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctga ccatcagcag tcttcaggct 240
gaagacgttg cagattatca ctgtggacag acttacaggt atccgttcac gttcggacag 300
gggaccaagg tggaaataaa a 321

<210>46

<211>321

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多核苷酸"

<400>46

aacattgtaa tgacccaatc tcccgcaacc ctgtccctgt caccaggaga gagggtcacc 60
ttgagctgca aggccagtga gaatgtggat acttatgtat cctggtatca acagaaacca 120
gaccagtctc ctaaattgct aatttacggg gcatccaacc ggtacactgg agtccctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctga ccatcagcag tcttcaggct 240
gaagacgttg cagattatca ctgtggacag acttacaggt atccgttcac gttcggacag 300
gggaccaagg tggaaataaa a 321

<210>47

<211>321
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多核苷酸"
<400>47
aacattgtaa tgacccaatc tcccgcaacc ctgtccctgt caccaggaga gagggtcacc 60
ttgagctgca aggccagtga gaatgtggat acttatgtat cctggtatca acagaaacca 120
gaccagtctc ctaaattgct aatttacggg gcatccaacc ggtacactgg agtccctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctga ccatcagcag tcttcaggct 240
gaagacgttg cagtttatta ctgtggacag acttacaggt atccgttcac gttcggacag 300
gggaccaagg tggaaataaa a 321
<210>48
<211>321
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223>/ 标注＝" 人工序列的描述 :合成
多核苷酸"
<400>48
aacattgtaa tgacccaatc tcccgcaacc ctgtccctgt caccaggaga gagggtcacc 60
ttgagctgca aggccagtga gaatgtggat acttatgtat cctggtatca acagaaacca 120
gaccagtctc ctaaattgct aatttacggg gcatccaacc ggtacactgg agtccctgat 180
cgcttctcag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctga ccatcagcag tcttcaggct 240
gaagacgttg cagtttatta ctgtggacag acttacaggt atccgttcac gttcggacag 300
gggaccaagg tggaaataaa a 321
<210>49
<211>123
<212>PRT
<213> 鼠
<400>49
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

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

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

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

Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>50

<211>107

<212>PRT

<213> 鼠

<400>50

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ile Ser Asp Asn Ile Asp Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Thr Val Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Arg Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Tyr Ser Ile Pro Trp
85 90 95

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

<210>51

<211>123

<212>PRT

<213> 鼠

<400>51

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

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

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

<210>52
<211>107
<212>PRT
<213> 鼠
<400>52

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

<210>53
<211>987
<212>PRT
<213> 智人
<400>53

Met Glu Leu Arg Val Leu Leu Cys Trp Ala Ser Leu Ala Ala Ala Leu
1 5 10 15
Glu Glu Thr Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Thr Ala Asp Leu Lys Trp

20 25 30

Val Thr Phe Pro Gln Val Asp Gly Gln Trp Glu Glu Leu Ser Gly Leu
35 40 45

Asp Glu Glu Gln His Ser Val Arg Thr Tyr Glu Val Cys Asp Val Gln
50 55 60

Arg Ala Pro Gly Gln Ala His Trp Leu Arg Thr Gly Trp Val Pro Arg
65 70 75 80

Arg Gly Ala Val His Val Tyr Ala Thr Leu Arg Phe Thr Met Leu Glu
85 90 95

Cys Leu Ser Leu Pro Arg Ala Gly Arg Ser Cys Lys Glu Thr Phe Thr
100 105 110

Val Phe Tyr Tyr Glu Ser Asp Ala Asp Thr Ala Thr Ala Leu Thr Pro
115 120 125

Ala Trp Met Glu Asn Pro Tyr Ile Lys Val Asp Thr Val Ala Ala Glu
130 135 140

His Leu Thr Arg Lys Arg Pro Gly Ala Glu Ala Thr Gly Lys Val Asn
145 150 155 160

Val Lys Thr Leu Arg Leu Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu
165 170 175

Ala Phe Gln Asp Gln Gly Ala Cys Met Ala Leu Leu Ser Leu His Leu
180 185 190

Phe Tyr Lys Lys Cys Ala Gln Leu Thr Val Asn Leu Thr Arg Phe Pro
195 200 205

Glu Thr Val Pro Arg Glu Leu Val Val Pro Val Ala Gly Ser Cys Val
210 215 220

Val Asp Ala Val Pro Ala Pro Gly Pro Ser Pro Ser Leu Tyr Cys Arg
225 230 235 240

Glu Asp Gly Gln Trp Ala Glu Gln Pro Val Thr Gly Cys Ser Cys Ala
245 250 255

Pro Gly Phe Glu Ala Ala Glu Gly Asn Thr Lys Cys Arg Ala Cys Ala
260 265 270

Gln Gly Thr Phe Lys Pro Leu Ser Gly Glu Gly Ser Cys Gln Pro Cys
275 280 285

Pro Ala Asn Ser His Ser Asn Thr Ile Gly Ser Ala Val Cys Gln Cys
290 295 300

Arg Val Gly Tyr Phe Arg Ala Arg Thr Asp Pro Arg Gly Ala Pro Cys
305 310 315 320

Thr Thr Pro Pro Ser Ala Pro Arg Ser Val Val Ser Arg Leu Asn Gly
325 330 335

Ser Ser Leu His Leu Glu Trp Ser Ala Pro Leu Glu Ser Gly Gly Arg
340 345 350
Glu Asp Leu Thr Tyr Ala Leu Arg Cys Arg Glu Cys Arg Pro Gly Gly
355 360 365
Ser Cys Ala Pro Cys Gly Gly Asp Leu Thr Phe Asp Pro Gly Pro Arg
370 375 380
Asp Leu Val Glu Pro Trp Val Val Val Arg Gly Leu Arg Pro Asp Phe
385 390 395 400
Thr Tyr Thr Phe Glu Val Thr Ala Leu Asn Gly Val Ser Ser Leu Ala
405 410 415
Thr Gly Pro Val Pro Phe Glu Pro Val Asn Val Thr Thr Asp Arg Glu
420 425 430
Val Pro Pro Ala Val Ser Asp Ile Arg Val Thr Arg Ser Ser Pro Ser
435 440 445
Ser Leu Ser Leu Ala Trp Ala Val Pro Arg Ala Pro Ser Gly Ala Val
450 455 460
Leu Asp Tyr Glu Val Lys Tyr His Glu Lys Gly Ala Glu Gly Pro Ser
465 470 475 480
Ser Val Arg Phe Leu Lys Thr Ser Glu Asn Arg Ala Glu Leu Arg Gly
485 490 495
Leu Lys Arg Gly Ala Ser Tyr Leu Val Gln Val Arg Ala Arg Ser Glu
500 505 510
Ala Gly Tyr Gly Pro Phe Gly Gln Glu His His Ser Gln Thr Gln Leu
515 520 525
Asp Glu Ser Glu Gly Trp Arg Glu Gln Leu Ala Leu Ile Ala Gly Thr
530 535 540
Ala Val Val Gly Val Val Leu Val Leu Val Val Ile Val Val Ala Val
545 550 555 560
Leu Cys Leu Arg Lys Gln Ser Asn Gly Arg Glu Ala Glu Tyr Ser Asp
565 570 575
Lys His Gly Gln Tyr Leu Ile Gly His Gly Thr Lys Val Tyr Ile Asp
580 585 590
Pro Phe Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Glu Ala Val Arg Glu Phe Ala Lys
595 600 605
Glu Ile Asp Val Ser Tyr Val Lys Ile Glu Glu Val Ile Gly Ala Gly
610 615 620
Glu Phe Gly Glu Val Cys Arg Gly Arg Leu Lys Ala Pro Gly Lys Lys
625 630 635 640
Glu Ser Cys Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Gly Gly Tyr Thr Glu Arg

645 650 655

Gln Arg Arg Glu Phe Leu Ser Glu Ala Ser Ile Met Gly Gln Phe Glu
660 665 670

His Pro Asn Ile Ile Arg Leu Glu Gly Val Val Thr Asn Ser Met Pro
675 680 685

Val Met Ile Leu Thr Glu Phe Met Glu Asn Gly Ala Leu Asp Ser Phe
690 695 700

Leu Arg Leu Asn Asp Gly Gln Phe Thr Val Ile Gln Leu Val Gly Met
705 710 715 720

Leu Arg Gly Ile Ala Ser Gly Met Arg Tyr Leu Ala Glu Met Ser Tyr
725 730 735

Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Asn Ser Asn Leu
740 745 750

Val Cys Lys Val Ser Asp Phe Gly Leu Ser Arg Phe Leu Glu Glu Asn
755 760 765

Ser Ser Asp Pro Thr Tyr Thr Ser Ser Leu Gly Gly Lys Ile Pro Ile
770 775 780

Arg Trp Thr Ala Pro Glu Ala Ile Ala Phe Arg Lys Phe Thr Ser Ala
785 790 795 800

Ser Asp Ala Trp Ser Tyr Gly Ile Val Met Trp Glu Val Met Ser Phe
805 810 815

Gly Glu Arg Pro Tyr Trp Asp Met Ser Asn Gln Asp Val Ile Asn Ala
820 825 830

Ile Glu Gln Asp Tyr Arg Leu Pro Pro Pro Pro Asp Cys Pro Thr Ser
835 840 845

Leu His Gln Leu Met Leu Asp Cys Trp Gln Lys Asp Arg Asn Ala Arg
850 855 860

Pro Arg Phe Pro Gln Val Val Ser Ala Leu Asp Lys Met Ile Arg Asn
865 870 875 880

Pro Ala Ser Leu Lys Ile Val Ala Arg Glu Asn Gly Gly Ala Ser His
885 890 895

Pro Leu Leu Asp Gln Arg Gln Pro His Tyr Ser Ala Phe Gly Ser Val
900 905 910

Gly Glu Trp Leu Arg Ala Ile Lys Met Gly Arg Tyr Glu Glu Ser Phe
915 920 925

Ala Ala Ala Gly Phe Gly Ser Phe Glu Leu Val Ser Gln Ile Ser Ala
930 935 940

Glu Asp Leu Leu Arg Ile Gly Val Thr Leu Ala Gly His Gln Lys Lys
945 950 955 960

Ile Leu Ala Ser Val Gln His Met Lys Ser Gln Ala Lys Pro Gly Thr
965 970 975
Pro Gly Gly Thr Gly Gly Pro Ala Pro Gln Tyr
980 985

```
  1 melrvllcwa slaaaleetl lntkletadl kwvtfpqvdg qweelsglde eqhsvrtyev
 61 cdvqrapgqa hwlrtgwvpr rgavhvyatl rftmleclsl pragrscket ftvfyyesda
121 dtataltpaw menpyikvdt vaaehltrkr pgaeatgkvn vktlrlgpls kagfylafqd
181 qgacmallsl hlfykkcaql tvnltrfpet vprelvvpva gscvvdavpa pgpspslycr
241 edgqwaeqpv tgcscapgfe aaegntkcra caqgtfkpls gegscqpcpa nshsntigsa
301 vcqcrvgyfr artdprgapc ttppsaprsv vsrlngsslh lewsaplesg gredltyalr
361 crecrpggsc apcggdltfd pgprdlvepw vvvrglrpdf tytfevtaln gvsslatgpv
421 pfepvnvttd revppavsdi rvtrsspssl slawavprap sgavldyevk yhekgaegps
481 svrflktsen raelrglkrg asylvqvrar seagygpfgq ehhsqtqlde segwreqlal
541 iagtavvgvv lvlvvivvav lclrkqsngr eaeysdkhgq ylighgtkvy idpftyedpn
601 eavrefakei dvsyvkieev igagefgevc rgrlkapgkk escvaiktlk ggyterqrre
661 flseasimgq fehpniirle gvvtnsmpvm iltefmenga ldsflrlndg qftviqlvgm
721 lrgiasgmry laemsyvhrd laarnilvns nlvckvsdfg lsrfleenss dptytsslgg
781 kipirwtape aiafrkftsa sdawsygivm wevmsfgerp ywdmsnqdvi naieqdyrlp
841 pppdcptslh qlmldcwqkd rnarprfpqv vsaldkmirn paslkivare nggashplld
901 qrqphysafg svgewlraik mgryeesfaa agfgsfelvs qisaedllri gvtlaghqkk
961 ilasvqhmks qakpgtpggt ggpapqy
```

图 1

```
SEQ ID NO: 49   EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYMNWVKQSHGKGLEWIGDNNPNNGGTTYNQKFK
SEQ ID NO: 1    EVQLVQSGAELKKPGASVKISCKASGYTFTDYYMNWVKQAHGKGLEWIGDNNPNNGGTTYNQKFK
SEQ ID NO: 2    EVQLVQSGAELKKPGASVKISCKASGYTFTDYYMNWVKQAHGKGLEWIGDNNPNNGGTTYNQKFK
SEQ ID NO: 3    EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYYMNWVKQAPGKGLEWIGDNNPNNGGTTYNQKFK
SEQ ID NO: 4    EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVKQAPGKGLEWIGDNNPNNGGTTYNQKFK
SEQ ID NO: 5    EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWIGDNNPNNGGTTYNQKFK

SEQ ID NO: 49   GKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARGKYYGTSYGWYFDVWGTGTTVTVSS
SEQ ID NO: 1    GRATLTVDKSTSTAYMELRSLRSEDSAVYYCARGKYYGTSYGWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 2    GRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARGKYYGTSYGWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 3    GRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGKYYGTSYGWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 4    GRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGKYYGTSYGWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 5    GRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGKYYGTSYGWYFDVWGQGTTVTVSS
```

图 2A

```
SEQ ID NO: 50   DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRISDNIDSYLAWFQQKQGKSPQLLVYDATVLADGVPSRFSGS
SEQ ID NO: 6    DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNIDSYLAWFQQKQGKAPKLLVYDATVLADGVPSRFSGS
SEQ ID NO: 7    DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNIDSYLAWFQQKPGKAPKLLVYDATVLADGVPSRFSGS
SEQ ID NO: 8    DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNIDSYLAWFQQKPGKAPKLLVYDATVLADGVPSRFSGS
SEQ ID NO: 9    DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNIDSYLAWYQQKPGKAPKLLVYDATVLADGVPSRFSGS

SEQ ID NO: 50   GSGTQYSLKINSLQSEDAARYYCQVYYSIPWTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 6    GSGTQYTLTINSLQSEDAARYYCQVYYSIPWTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 7    GSGTDYTLTINSLQAEDAARYYCQVYYSIPWTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 8    GSGTDYTLTINSLQAEDAATYYCQVYYSIPWTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 9    GSGTDYTLTINSLQAEDAATYYCQVYYSIPWTFGQGTKLEIK
```

图 2B

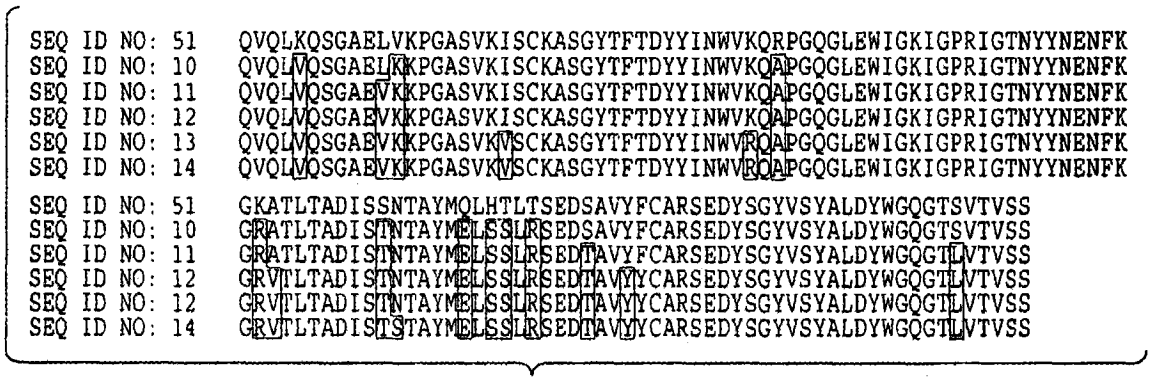

SEQ ID NO: 51 QVQLKQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQRPGQGLEWIGKIGPRIGTNYYNENFK
SEQ ID NO: 10 QVQLVQSGAELKKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQAPGQGLEWIGKIGPRIGTNYYNENFK
SEQ ID NO: 11 QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQAPGQGLEWIGKIGPRIGTNYYNENFK
SEQ ID NO: 12 QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQAPGQGLEWIGKIGPRIGTNYYNENFK
SEQ ID NO: 13 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWIGKIGPRIGTNYYNENFK
SEQ ID NO: 14 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWIGKIGPRIGTNYYNENFK
SEQ ID NO: 51 GKATLTADISSNTAYMQLHTLTSEDSAVYFCARSEDYSGYVSYALDYWGQGTSVTVSS
SEQ ID NO: 10 GRATLTADISTNTAYMELSSLRSEDSAVYFCARSEDYSGYVSYALDYWGQGTSVTVSS
SEQ ID NO: 11 GRATLTADISTNTAYMELSSLRSEDTAVYFCARSEDYSGYVSYALDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 12 GRVTLTADISTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSEDYSGYVSYALDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 12 GRVTLTADISTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSEDYSGYVSYALDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 14 GRVTLTADISTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSEDYSGYVSYALDYWGQGTLVTVSS

图 2C

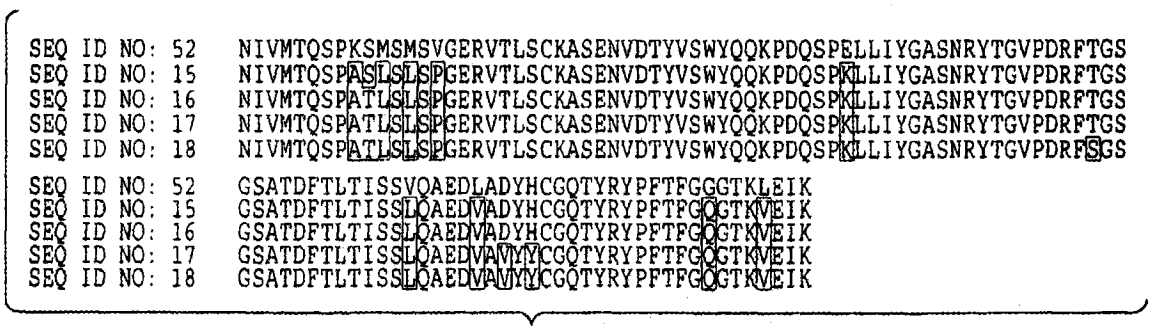

SEQ ID NO: 52 NIVMTQSPKSMSMSVGERVTLSCKASENVDTYVSWYQQKPDQSPELLIYGASNRYTGVPDRFTGS
SEQ ID NO: 15 NIVMTQSPASLSLSPGERVTLSCKASENVDTYVSWYQQKPDQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGS
SEQ ID NO: 16 NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCKASENVDTYVSWYQQKPDQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGS
SEQ ID NO: 17 NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCKASENVDTYVSWYQQKPDQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGS
SEQ ID NO: 18 NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCKASENVDTYVSWYQQKPDQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFSGS
SEQ ID NO: 52 GSATDFTLTISSVQAEDLADYHCGQTYRYPFTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 15 GSATDFTLTISSLQAEDVADYHCGQTYRYPFTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 16 GSATDFTLTISSLQAEDVADYHCGQTYRYPFTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 17 GSATDFTLTISSLQAEDVAVYYCGQTYRYPFTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 18 GSATDFTLTISSLQAEDVAVYYCGQTYRYPFTFGQGTKVEIK

图 2D

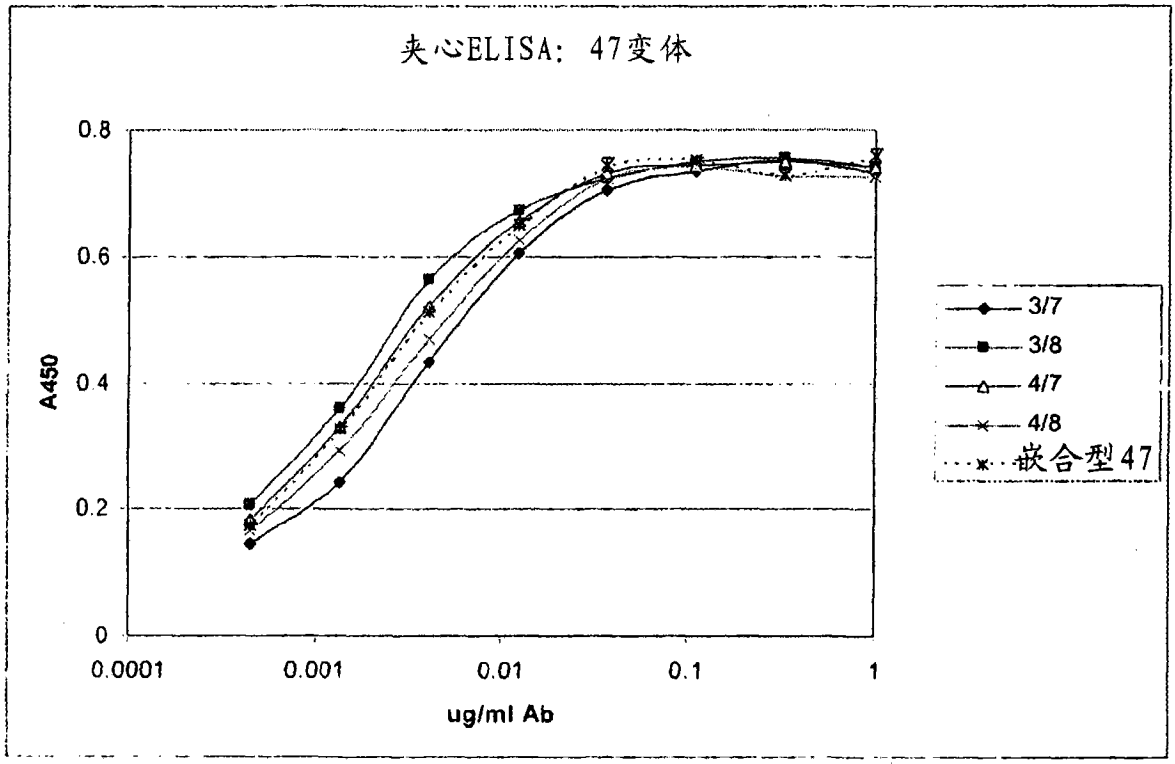


图 3A

	50% 结合 (ng/ml)
嵌合型47	2
3/8	1.8
4/7	2
4/8	2.8
3/7	3.3

图 3B

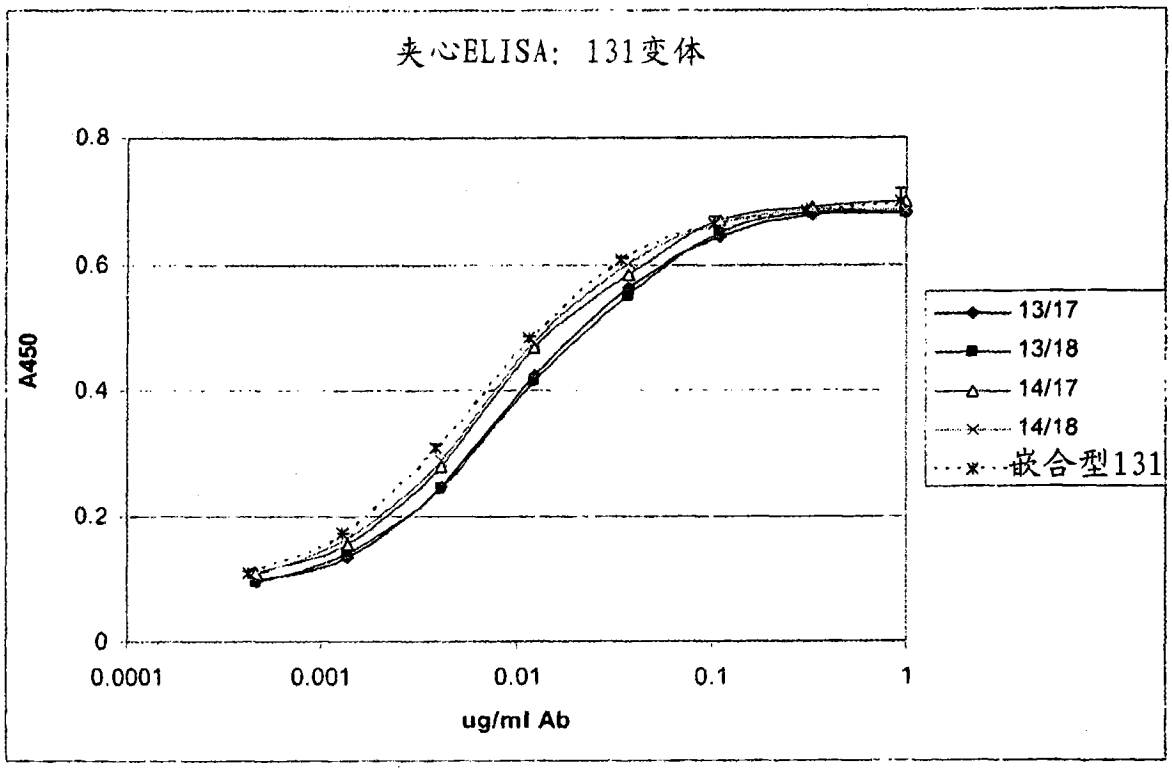


图 4A

	50% 结合 (ng/ml)
嵌合型131	14
14/18	8
14/17	8.2
13/17	10
13/18	11

图 4B

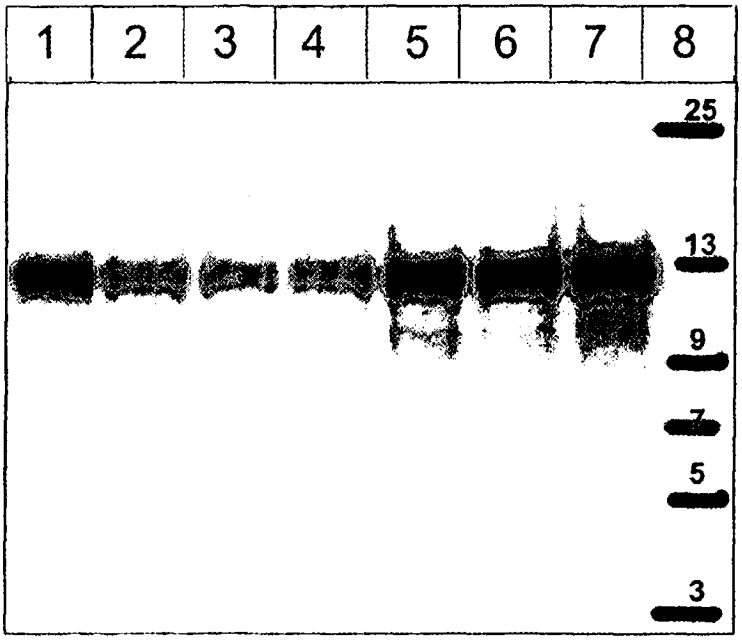


图 5

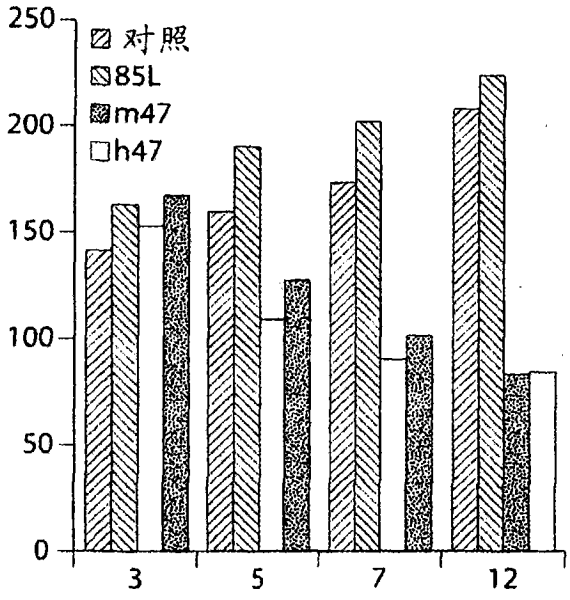


图 6A

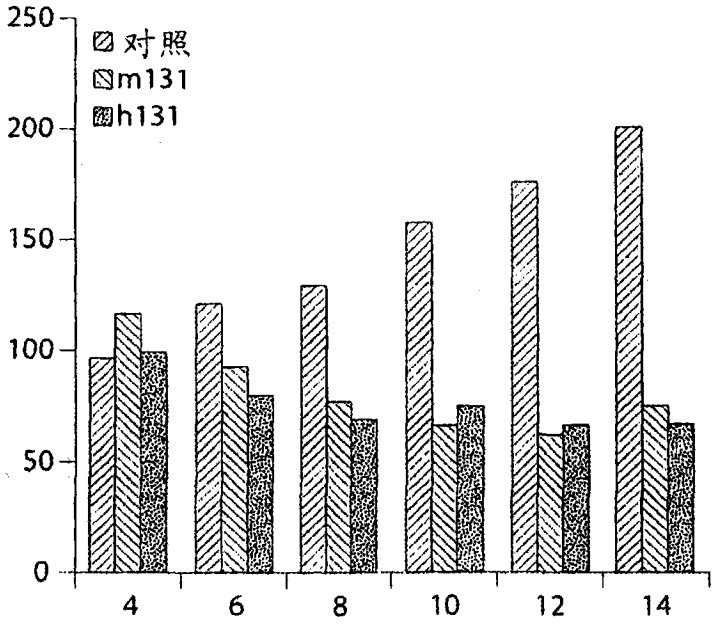


图 6B