



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101939336 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 14

(21) 申请号 200880123225. 9

A61K 31/704 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 11. 12

A61K 31/282 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

07021931. 6 2007. 11. 12 EP

(56) 对比文件

CN 1739030 A, 2006. 02. 22, 说明书第 5 页第 2 段 - 第 6 页第 3 段、第 21 页第 4 段.

US 5468634 A, 1995. 11. 21, 说明书第 7 栏第 31 行 - 第 8 栏第 4 行.

US 5468634 A, 1995. 11. 21, 说明书第 7 栏第 31 行 - 第 8 栏第 4 行.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 06. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2008/009548 2008. 11. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/062690 EN 2009. 05. 22

审查员 李晨

(73) 专利权人 U3 制药有限公司

地址 德国马丁斯里德

(72) 发明人 T·海特曼 J·尼韦纳 J·鲁赫

P·沃特斯 K·泽勒

E·茨维克 - 瓦拉施 M·罗瑟

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

C12N 15/13 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书44页

序列表20页 附图16页

(54) 发明名称

AXL 抗体

(57) 摘要

本发明涉及结合 AXL 受体酪氨酸激酶的细胞外结构域并且至少部分地抑制 AXL 活性的抗体, 特别地单克隆抗体。

1. 结合 AXL 的细胞外结构域并且至少部分地抑制 AXL 活性的单克隆抗体,其重链包含:

- (a) SEQ ID NO:22 中显示的 CDRH1,
 - (b) SEQ ID NO:23 中显示的 CDRH2, 和
 - (c) SEQ ID NO:24 中显示的 CDRH3,
- 且其轻链包含:
- (d) SEQ ID NO:19 中显示的 CDRL1,
 - (e) SEQ ID NO:20 中显示的 CDRL2, 和
 - (f) SEQ ID NO:21 中显示的 CDRL3。

2. 权利要求 1 的单克隆抗体,其减少和 / 或阻断 AXL 介导的信号转导。

3. 权利要求 1 的单克隆抗体,其减少和 / 或阻断 AXL 磷酸化。

4. 权利要求 1 的单克隆抗体,其减少和 / 或阻断细胞增殖。

5. 权利要求 1 的单克隆抗体,其减少和 / 或阻断血管生成。

6. 权利要求 1 的单克隆抗体,其减少和 / 或阻断细胞迁移。

7. 权利要求 1 的单克隆抗体,其减少和 / 或阻断肿瘤转移。

8. 权利要求 1 的单克隆抗体,其减少和 / 或阻断 AXL 介导的抗细胞凋亡。

9. 权利要求 1 的单克隆抗体,其减少和 / 或阻断 AXL 介导的 PI3K 信号转导。

10. 权利要求 1 的单克隆抗体,其为重组抗体。

11. 权利要求 1 的单克隆抗体,其为人源化抗体、嵌合抗体、多特异性抗体或抗体片段,所述抗体片段为 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段或 Fv 片段。

12. 权利要求 11 的单克隆抗体,其是嵌合抗体,并且包含选自 SEQ ID NOs:41,42 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:40 的轻链氨基酸序列。

13. 权利要求 11 的单克隆抗体,其为人源化抗体,并且包含 SEQ ID NO:46 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:45 的轻链氨基酸序列。

14. 权利要求 1 的单克隆抗体,其为 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、双价抗体或单链抗体分子。

15. 权利要求 1 的单克隆抗体,其为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 类型。

16. 权利要求 1 的单克隆抗体,其偶联至标记基团。

17. 权利要求 1 的单克隆抗体,其偶联至效应子基团。

18. 权利要求 1 的单克隆抗体,其是支架蛋白。

19. 权利要求 1 的单克隆抗体,其包含 SEQ ID NO:10 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:9 的轻链氨基酸序列。

20. 一种分离的核酸分子,其选自:

编码权利要求 1 至 19 的任一项的单克隆抗体、其抗体片段或衍生物的核酸序列,其中所述抗体片段为 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段或 Fv 片段,并且所述衍生物为单链抗体,纳米抗体或双价抗体。

21. 包含权利要求 20 的核酸序列的载体。

22. 权利要求 21 的载体,其是表达载体并且所述核酸序列有效地连接至控制序列。

23. 包含权利要求 21 或 22 的载体的宿主,其是原核或真核细胞。

24. 制备权利要求 1 至 19 的任一项的单克隆抗体的方法,其包括从权利要求 23 的宿主获得所述单克隆抗体的步骤。

25. 一种药物组合物,其包含权利要求 1 至 19 的任一项的单克隆抗体或由权利要求 24 的方法产生的单克隆抗体。

26. 权利要求 25 的药物组合物,其包含可药用的载体、稀释剂和 / 或佐剂。

27. 权利要求 25 或 26 的药物组合物,其包含另外的活性剂。

28. 权利要求 25 或 26 的药物组合物,其用于过度增殖性疾病的诊断、预防或治疗。

29. 权利要求 28 的药物组合物,其中所述过度增殖性疾病与 AXL 表达和 / 或过度活跃相关。

30. 权利要求 29 的药物组合物,其中所述过度增殖性疾病与 AXL 过表达和 / 或过度活跃相关。

31. 权利要求 28 的药物组合物,其中所述过度增殖性疾病选自乳腺癌、肺癌和其他表达 AXL 的癌症以及肿瘤转移的形成。

32. 权利要求 31 的药物组合物,其中所述表达 AXL 的癌症是过表达 AXL 的癌症。

33. 权利要求 1 至 19 的任一项的单克隆抗体,其用于过度增殖性疾病的诊断、预防或治疗。

34. 权利要求 1 至 19 的任一项的单克隆抗体用于制备药物组合物的用途,所述药物组合物用于过度增殖性疾病的诊断、预防或治疗,其中所述过度增殖性疾病是权利要求 29-32 的任一项中定义的过度增殖性疾病。

35. 权利要求 1 至 19 的任一项的单克隆抗体在制备药物中的用途,所述药物用于诊断与 AXL 的表达相关的病症。

36. 权利要求 35 的用途,其中所述病症是权利要求 29-32 的任一项中定义的过度增殖性疾病。

37. 权利要求 1 至 19 的任一项的单克隆抗体在制备药物中的用途,所述药物用于预防或治疗患者中与 AXL 的表达相关的病症。

38. 权利要求 37 的用途,其中所述病症是权利要求 29-32 的任一项中定义的过度增殖性疾病。

39. 权利要求 37 或 38 的用途,其中所述患者是哺乳动物患者。

40. 权利要求 39 的用途,其中所述患者是人患者。

41. 包括权利要求 1 至 19 的任一项的单克隆抗体、权利要求 20 的核酸序列或权利要求 21 或 22 的载体的试剂盒。

42. 权利要求 41 的试剂盒,其还包括另外的抗肿瘤剂。

43. 抗 AXL 抗体用于制备用于治疗抗药性癌症的药物组合物的用途,其中所述抗 AXL 抗体是权利要求 1 至 19 的任一项的单克隆抗体。

44. 抗 AXL 抗体用于制备药物的用途,所述药物用于与抗肿瘤剂共施用以治疗过度增殖性疾病,其中所述抗 AXL 抗体是权利要求 1 至 19 的任一项的单克隆抗体。

AXL 抗体

[0001] 描述

[0002] 本发明涉及结合 AXL 受体酪氨酸激酶的细胞外结构域并且至少部分地抑制 AXL 活性的抗体,特别地单克隆抗体。

[0003] 背景

[0004] AXL(Ark、UFO、Tyro-7) 受体酪氨酸激酶是激酶的 Tyro-3 家族的成员,该家族其他成员是 Mer(Eyk、Nyk、Tyro-12) 和 Sky(Rse、Tyro-3、Dtk、Etk、Brk、Tif)。其可通过嗜异性配体 Gas6(与抗凝血因子蛋白 S 同源的 70-kDa 蛋白)的结合来激活。与其他受体酪氨酸激酶相反,AXL 酪氨酸磷酸化还可通过嗜同性结合(homophilic binding)诱导。AXL 激活导致通过 PI-3- 激酶/Akt(Franke 等人, *Oncogene* 22:8983-8998,2003) 和其他主要途径如 Ras/Erk 和 β - 联蛋白/TCF(Goruppi 等人, *Mol. Cell Biol.* 21:902-915,2001) 的信号转导。

[0005] AXL 在许多正常组织包括脑、心脏、骨骼肌、几种其他器官的器官囊和结缔组织中以及在单核细胞但非淋巴细胞中微弱地表达。已在成纤维细胞(Goruppi 等人, *Mol Cell Biol* 17:4442-4453 1997)、内皮细胞(Hasanbasic 等人, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2004)、血管平滑肌细胞(Melaragno 等人, *J. Mol. Cell Cardiol.* 37:881-887, 2004) 和神经元(Allen 等人, *Mol. Endocrinol.* 13:191-2011999) 的存活中描述了由 AXL 诱导的 Akt 磷酸化。此外,AXL 在细胞粘着和趋化性中起着重要作用。AXL 的敲除展示削弱的小血小板聚集稳定作用和血栓形成(由于减少的血小板整联蛋白 IIb3 的激活)。

[0006] 已在不同癌症类型例如乳腺癌(Meric 等人, *Clin. Cancer Res.* 8:361-367, 2002;Berclaz 等人, *Ann. Oncol.* 12:819-824,2001)、结肠癌(Chen 等人, *Int. J. Cancer* 83:579-584,1999;Craven 等人, *Int. J. Cancer* 60:791-797,1995)、前列腺癌(Jacob 等人, *Cancer Detect. Prev.* 23:325-332,1999)、肺癌(Wimmel 等人, *Eur J Cancer* 37:2264-2274,2001)、胃癌(Wu 等人, *Anticancer Res* 22:1071-1078,2002)、卵巢癌(Sun 等人, *Oncology* 66:450-457,2004)、子宫内膜癌(Sun 等人, *Ann. Oncol.* 14:898-906, 2003)、肾癌(Chung 等人, *DNA Cell Biol.* 22:533-540,2003)、肝细胞癌(Tsou 等人, *Genomics* 50:331-340,1998)、甲状腺癌(Ito 等人, *Thyroid* 12:971-975,2002;Ito 等人, *Thyroid* 9:563-567,1999) 和食管癌(Nemoto 等人,1997) 中,此外在 CML(Janssen 等人, A novel putative tyrosinekinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene*,6:2113-2120,1991;Braunger 等人, *Oncogene* 14:2619-26311997;O' Bryan 等人, *Mol Cell Biol* 11:5016-5031,1991)、AML(Rochlitz 等人, *Leukemia* 13:1352-1358,1999)、骨肉瘤(Nakano 等人, *J. Biol. Chem.* 270:5702-5705,2003)、黑素瘤(van Ginkel 等人, *Cancer Res* 64:128-134,2004) 中和在头颈鳞状细胞癌(Green 等人, *Br J Cancer.* 2006 94:1446-5,2006) 中证实了 AXL 的过表达。

[0007] 此外,AXL 被鉴定为与非侵袭性细胞相比在侵袭性乳腺癌细胞系中上调的转移相关基因。在体外,发现 AXL 活性是迁移和侵袭所必需的,并且该活性可通过抗体处理来抑制(W004008147)。类似地,通过 AXL 的显性负形式(dominant negative version) 的表达

(Vajkoczy, P., 等人, Proc. Natl. Acad. Science U. S. A. 103 :5799-5804, 2005) 或通过 AXL 的 siRNA 介导的下调 (Holland 等人, Cancer Res. 65 :9294-9303, 2005) 产生的体内 AXL 活性的消除在鼠异种移植实验中阻止了皮下和同位 (orthotopic) 细胞生长。

[0008] 到目前为止, 已描述了结合 AXL 并且具有生物学活性的两种抗体。一种抗体能够减少 AXL 介导的细胞侵袭 (W004008147), 而另一种抗体据报导减少 AXL/ 配体相互作用。然而两种抗体都是多克隆抗体, 这使得它们不适合于治疗施用。

[0009] 因此, 鉴于 AXL 的治疗潜能, 存在对有效并且特异性地阻断 AXL 介导的信号转导并且适合于治疗性处理的单克隆 AXL 抗体、其抗体片段或衍生物的高度需要。

[0010] 因此本发明的第一方面涉及结合 AXL (特别地人 AXL) 的细胞外结构域并且至少部分抑制 AXL 活性的单克隆抗体, 包括其片段或衍生物。

[0011] 优选, 本发明的抗体还具有至少一个或多个下列特性: 减少或阻断 AXL 介导的信号转导的能力、减少或阻断 AXL 磷酸化的能力、减少或阻断细胞增殖的能力、减少或阻断血管生成的能力、减少或阻断细胞迁移的能力、减少或阻断肿瘤转移的能力、减少或阻断 AXL 介导的 PI3K 信号转导的能力和减少或阻断 AXL 介导的抗细胞凋亡的能力, 从而增加例如细胞对使用抗肿瘤剂的治疗的敏感性。此外, 本发明的抗体可展示对 AXL, 特别地人 AXL 的高特异性并且不显著识别其他 Tyro-3 家族成员, 例如 MER 和 / 或 SKY 和 / 或哺乳动物非灵长类 AXL, 例如鼠 AXL。抗体特异性可通过测量交叉反应性来确定, 如实施例中描述的。

[0012] 术语“活性”是指影响细胞的表型, 特别地但不限于癌症表型例如细胞凋亡的逃脱、生长信号的自足、细胞增殖、组织侵袭和 / 或转移、对抗生长信号的不敏感 (抗细胞凋亡) 和 / 或持续的血管生成的 AXL 的生物学功能。

[0013] 术语“AXL 介导的信号转导”意指通过 AXL 与第二信使分子的直接或间接相互作用触发的第二信使途径的激活。

[0014] 术语“AXL 磷酸化”是指氨基酸残基, 优选酪氨酸残基被第二 AXL 蛋白 (转磷酸作用) 或被另一种具有蛋白质激酶活性的蛋白质磷酸化。

[0015] 术语“细胞增殖”是指引起人细胞特别地但不限于人癌细胞的增殖的所有牵涉 AXL 的过程。它们促成或导致细胞 DNA 的复制、复制的 DNA 至两个同等大小的染色体组的分离以及整个细胞的物理分裂 (称为胞质分裂), 并且受 AXL 的非催化或催化活性 (优选包括 AXL 磷酸化和 / 或 AXL 介导的信号转导) 刺激或介导。

[0016] 术语“血管生成”是指促成从现有血管生长新血管, 特别地但不限于新肿瘤供应血管的所有牵涉 AXL 的过程。这些过程包括多个细胞事件例如血管内皮细胞的增殖、存活、迁移和出芽 (sprouting)、周细胞的吸引和迁移以及用于血管稳定的基底膜形成、血管灌注、或基质或赘生性细胞的血管生成因子的分泌, 并且受 AXL 的非催化或催化活性 (优选包括 AXL 磷酸化和 / 或 AXL 介导的信号转导) 刺激或介导。

[0017] 术语“转移”是指支持癌细胞从原发性肿瘤扩散, 渗入淋巴管和 / 或血管、通过血液循环, 并且在身体的其他部位的正常组织中的远距离病灶 (转移灶) 中生长的所有牵涉 AXL 的过程。特别地, 其是指引起转移并且由 AXL 的非催化或催化活性 (优选包括 AXL 磷酸化和 / 或 AXL 介导的信号转导) 刺激或介导的肿瘤细胞的细胞事件例如增殖、迁移、锚定不依赖性、细胞凋亡的逃脱或血管生成因子的分泌。

[0018] 术语“AXL 介导的抗细胞凋亡”是指阻止人细胞, 优选但不限于人癌细胞程序化细

胞死亡（细胞凋亡）的所有牵涉 AXL 的过程。特别地，其指使人细胞，优选但不限于人癌细胞免受因生长因子的撤离、缺氧、对化疗剂或辐射的暴露或 Fas/Apo-1 受体介导的信号转导的起始而诱导的细胞凋亡，并且受 AXL 的非催化或催化活性（优选包括 AXL 磷酸化和 / 或 AXL 介导的信号转导）刺激或介导的过程。

[0019] 此外，本发明包括其对 AXL 的结合活性为 $KD = 10^{-5}M$ 或更低，优选 $KD = 10^{-7}M$ 或更低，最优选 $KD = 10^{-9}M$ 或更低的抗体。本发明的抗体对 AXL 的结合活性是不是 $KD = 10^{-5}M$ 或更低可通过本领域技术人员已知的方法来测定。例如，活性可利用 Biacore，使用表面等离子共振和 / 或通过 ELISA（酶联免疫吸附测定）、EIA（酶免疫测定）、RIA（放射免疫测定）或荧光抗体技术例如 FACS 来测定。

[0020] 在第二方面，抗体可具有至少一个抗原结合部位，例如，1 或 2 个抗原结合部位。此外，抗体优选包含至少一条免疫球蛋白重链和至少一条免疫球蛋白轻链。免疫球蛋白链包含可变结构域和任选地恒定结构域。可变结构域可包含互补决定区（CDR），例如 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 区，以及构架区。术语“互补决定区”（CDR）在本领域内已有明确定义（参见，例如，Harlow 和 Lane，"Antibodies, a Laboratory Manual"，CSH Press, Cold Spring Harbour, 1988），其是指抗体的可变区内主要与抗原接触的氨基酸区段。

[0021] 本发明的另外的方面涉及结合 AXL 的细胞外结构域的抗体，包括其片段或衍生物，所述抗体包含至少一个含有至少一个选自下述的 CDR 的重链氨基酸序列：

[0022] (a) SEQ ID NOs :16, 22, 28 中显示的 CDRH1，或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRH1 序列，

[0023] (b) SEQ ID NOs :17, 23, 29 中显示的 CDRH2，或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRH2 序列，和

[0024] (c) SEQ ID NOs :18, 24, 30 中显示的 CDRH3，或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRH3 序列，

[0025] 和 / 或至少：

[0026] 一个含有至少一个选自下述的 CDR 的轻链氨基酸序列：

[0027] (d) SHQ ID NOs :13, 19, 25 中显示的 CDRL1，或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRL1 序列，

[0028] (e) SEQ ID NOs :14, 20, 26 中显示的 CDRL2，或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRL2 序列，和

[0029] (f) SEQ ID NOs :15, 21, 27 中显示的 CDRL3，或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRL3 序列，

[0030] 或识别 AXL 的细胞外结构域上的相同表位的单克隆抗体。

[0031] 在优选的实施方案中，抗体包含含有至少一个选自下述的 CDR 的重链：

[0032] (a) SEQ ID NO :16 中显示的 CDRH1，或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRH1 序列，

[0033] (b) SEQ ID NO :17 中显示的 CDRH2，或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRH2 序列，和

[0034] (c) SEQ ID NO :18 中显示的 CDRH3，或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRH3 序列，

[0035] 和 / 或包含至少一个选自下述的 CDR 的轻链：

[0036] (d) SEQ ID NO :13 中显示的 CDRL1，或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRL1 序列，

[0037] (e) SEQ ID NO :14 中显示的 CDRL2，或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRL2 序列，和

- [0038] (f) SEQ ID NO :15 中显示的 CDRL3,或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRL 3 序列,
- [0039] 或识别 AXL 的细胞外结构域上的相同表位的单克隆抗体。
- [0040] 在另外的优选实施方案中,抗体包含含有至少一个选自下述的 CDR 的重链:
- [0041] (a) SEQ ID NO :22 中显示的 CDRH1,或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRH1 序列,
- [0042] (b) SEQ ID NO :23 中显示的 CDRH2,或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRH2 序列,和
- [0043] (c) SEQ ID NO :24 中显示的 CDRH3,或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRH3 序列,
- [0044] 和 / 或包含至少一个选自下述的 CDR 的轻链:
- [0045] (d) SEQ ID NO :19 中显示的 CDRL1,或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRL1 序列,
- [0046] (e) SEQ ID NO :20 中显示的 CDRL2,或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRL2 序列,和
- [0047] (f) SEQ ID NO :21 中显示的 CDRL3,或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRL3 序列,
- [0048] 或识别 AXL 的细胞外结构域上的相同表位的单克隆抗体。
- [0049] 在另外的优选实施方案中,抗体包含含有至少一个选自下述的 CDR 的重链:
- [0050] (a) SEQ ID NO :28 中显示的 CDRH1,或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRH1 序列,
- [0051] (b) SEQ ID NO :29 中显示的 CDRH2,或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRH2 序列,和
- [0052] (c) SEQ ID NO :30 中显示的 CDRH3,或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRH3 序列,
- [0053] 和 / 或包含至少一个选自下述的 CDR 的轻链:
- [0054] (d) SEQ ID NO :25 中显示的 CDRL1,或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRL1 序列,
- [0055] (e) SEQ ID NO :26 中显示的 CDRL2,或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRL2 序列,和
- [0056] (f) SEQ ID NO :27 中显示的 CDRL3,或与其相异 1 或 2 个氨基酸的 CDRL3 序列,
- [0057] 或识别 AXL 的细胞外结构域上的相同表位的单克隆抗体。
- [0058] 在另一个实施方案中,本发明明涉及包含选自 SEQ ID NOs :8,10,12 的重链氨基酸序列或至少其可变结构域或与其具有至少 90% 的序列同一性的氨基酸序列和 / 或选自 SEQ ID NOs :7,9,11 的轻链氨基酸序列或至少其可变结构域或与其具有至少 90% 的序列同一性的氨基酸序列的抗体或识别 AXL 的细胞外结构域上的相同表位的抗体。
- [0059] 如本文中所使用的,两个多肽序列之间的“序列同一性”是指序列之间相同的氨基酸的百分比。本发明的优选的多肽序列具有至少 90% 的序列同一性。
- [0060] 在特别优选的实施方案中,抗体选自 11B7、11D5、10D12 或识别 AXL 的细胞外结构域上的相同表位的抗体。
- [0061] 抗体可以是天然和 / 或合成来源的任何抗体,例如哺乳动物来源的抗体。优选,恒定结构域 — 如果存在 — 是人恒定结构域。可变结构域优选是哺乳动物可变结构域,例如人源化的或人可变结构域。更优选,抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。
- [0062] 本发明的抗体可以是 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM 类型,优选 IgG 或 IgM 类型,包括但不限于 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM1 和 IgM2 类型。在最优选的实施方案中,抗体是人 IgG1、IgG2 或 IgG4 类型。
- [0063] 如所论述的(同上),存在许多抗体的同种型。应理解,所产生的抗体不必一开始就具有这样的同种型,相反,所产生的抗体可具有任何同种型,并且可通过使用本领域内熟知的常规分子生物学技术将分子克隆的 V 区基因或克隆的恒定区基因或 cDNA 用于合适的表达载体,然后使用本领域内已知的技术在宿主细胞中表达抗体来对抗体进行同种型转换。

[0064] 术语抗体包括具有至少一个抗体的抗原结合部位的“片段”或“衍生物”。抗体片段包括 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段以及 Fv 片段。抗体的衍生物包括单链抗体、纳米抗体 (nanobody) 和双价抗体 (diabody)。抗体的衍生物还包括具有结合 AXL 的抗体样结合活性的支架蛋白。

[0065] 在本发明的说明书中,术语“支架蛋白”,如本文中所使用的,意指具有其中氨基酸插入、置换或缺失是高度可耐受的暴露的表面区域的多肽或蛋白质。可根据本发明使用的支架蛋白的实例是来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的蛋白 A、来自大菜粉蝶 (*Pieris brassicae*) 的后胆色素结合蛋白或其他脂质运载蛋白 (lipocalin)、锚蛋白重复序列蛋白 (ankyrin repeat protein) 和人纤连蛋白 (综述于 Binz 和 Plückthun, Curr Opin Biotechnol, 16:459-69, 2005 中)。支架蛋白的工程改造可被认为是将亲和力功能移植或整合至或入稳定折叠的蛋白质的结构构架。亲和力功能根据本发明是指蛋白质结合亲和力。支架在结构上可以与赋予结合特异性的氨基酸序列分离。一般地,表现适合于开发此类人工亲和力试剂的蛋白质可通过合理的,或最常见地,组合蛋白质工程技术例如针对 AXL (纯化的蛋白质或在细胞表面上展示的蛋白质) 淘选体外展示的人工支架文库中的结合剂 (本领域内已知的技术) 来获得 (Skerra, J. Mol. Recog., Biochim Biophys Acta, 1482:337-350, 2000; Binz 和 Plückthun, Curr Opin Biotechnol, 16:459-69, 2005)。此外,具有抗体样结合活性的支架蛋白可来源于含有支架结构域的受体多肽 (可向其移植供体多肽的结合结构域以将供体多肽的结合特异性赋予含有支架结构域的受体多肽)。插入的结合结构域可包括例如抗 AXL 抗体的至少一个 CDR, 优选至少一个选自 SEQ ID NOs:13-30 的 CDR。可通过本领域技术人员已知的各种方法,包括例如多肽合成、编码氨基酸的核酸的合成以及通过本领域技术人员熟知的各种形式的重组方法来实现插入。

[0066] 如已在上文中指出的,抗体、抗体片段或其衍生物的特异性在于 CDR 的氨基酸序列。抗体的可变结构域 (重链 VH 和轻链 VL) 优选包含 3 个互补决定区 (有时称为高变区), 其侧翼连接 4 个相对保守的构架区或“FR”。通常,抗体的特异性由或主要由 CDR 例如 VH 链的 CDR 或多个 CDR 决定。本领域技术人员将容易地理解,抗体的可变结构域、具有上述 CDR 的其抗体片段或衍生物可用于具有进一步提高的特异性和生物学功能的抗体的构建。因此,本发明包括包含上述可变结构域的至少一个 CDR 并且有利地具有与所附实施例中描述的抗体基本上相同、相似或提高的结合特性的抗体、其抗体片段或衍生物。通过始于包含至少一个所附序列表中引述的和本发明的实施方案所需的 CDR 的抗体,本领域技术人员可就增强的特异性和 / 或亲和力组合来自最初鉴定的单克隆抗体或不同抗体的另外的 CDR。CDR 移植在本领域内是熟知的,其还可用于微调本发明的抗体、其片段或衍生物的特异性亲和力和其他特性,只要最初的特异性得到保持即可。有利地抗体、其片段或衍生物包含原始供体抗体的至少 2 个、更优选至少 3 个、更优选至少 4 个或至少 5 个以及特别优选所有 6 个 CDR。在本发明的另外的备选实施方案中,可在新抗体实体中组合来自不同的最初鉴定的单克隆抗体的 CDR。在这些情况下,优选重链的 3 个 CDR 源自相同抗体,而轻链的 3 个 CDR 全部源自不同抗体 (但全部源于相同抗体)。本发明的抗体或它们相应的免疫球蛋白链还可使用本领域内已知的常规技术,例如通过单独地或组合地使用氨基酸缺失、插入、置换、添加和 / 或重组和 / 或本领域内已知的任何其他修饰来进行修饰。用于将此类修饰导入编码免疫球蛋白链的氨基酸序列的 DNA 序列的方法对于本领域技术人员来说是熟知的;

参见,例如, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N. Y.

[0067] 任选地对抗体、抗体片段或其衍生物进行去免疫化 (deimmunized) 以用于治疗目的。去免疫化抗体是不具有或具有减少的可被 T 辅助淋巴细胞识别的表位的蛋白质。鉴定所述表位的方法的实例示于 Tangri 等人, (J Immunol. 174 :3187-96, 2005) 中。可如美国专利 6, 054, 297, 5, 886, 152 和 5, 877, 293 中所述进行去免疫化抗体片段或其衍生物的制备。

[0068] 在一个实施方案中, 本文中的抗体特别地包括其中重链和 / 或轻链的一部分与来源于特定物种或属于特定抗体种类或亚类的抗体中的相应序列同一或同源, 而链的其余部分与来源于另一物种或属于另一抗体种类或亚类的抗体中的相应序列同一或同源的“嵌合”抗体 (免疫球蛋白) 以及此类抗体的片段, 只要它们展示期望的生物学活性 (美国专利 4, 816, 567 ;Morrison 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 :6851-6855 (1984))。嵌合抗体的产生描述于例如 WO 89/09622 中。

[0069] 优选, 本发明涉及嵌合抗体或识别 AXL 的细胞外结构域上的相同表位的抗体, 所述嵌合抗体包含选自 SEQ ID NOs :38, 39, 41, 42 的重链氨基酸序列或至少其可变结构域或与其具有至少 90% 的序列同一性的氨基酸序列和 / 或选自 SEQ ID NOs :37, 40 的轻链氨基酸序列或至少其可变结构域或与其具有至少 90% 的序列同一性的氨基酸序列。

[0070] 在另外的实施方案中, 本发明的抗体是人源化抗体或完全人抗体。可按照本领域内已知的方法例如嵌合化或 CDR 移植来产生抗体的人源化形式。用于产生人源化抗体的备选方法在本领域内是熟知的并且描述于例如 EP-A1 0 239 400 和 W090/07861 中。通常, 人源化抗体具有一个或多个导入其中的来自非人来源的氨基酸残基。此类非人氨基酸残基通常称为“输入”残基, 其通常获自“输入”可变结构域。人源化可以例如按照 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)), 通过用非人来源的 CDR 或 CDR 序列置换人抗体的相应序列来进行。因此, 此类“人源化”抗体是嵌合抗体 (美国专利 4, 816, 567), 其中大体上比完整人可变结构域小的部分被来自非人物种的相应序列置换。实际上, 人源化抗体通常是其中一些 CDR 残基和可能地一些 FR 残基被来自非人抗体中类似位点的残基置换的人抗体。

[0071] 优选, 本发明涉及人源化抗体或识别 AXL 的细胞外结构域上的相同表位的抗体, 所述人源化抗体包含选自 SEQ ID NOs :44, 46 的重链氨基酸序列或至少其可变结构域或与其具有至少 90% 的序列同一性的氨基酸序列和 / 或选自 SEQ ID NOs :43, 45 的轻链氨基酸序列或至少其可变结构域或与其具有至少 90% 的序列同一性的氨基酸序列。

[0072] 用于产生完全人抗体的一个方法是使用已经历工程改造从而包含多至但低于 1000kb 大小的人重链基因座和 κ 轻链基因座的种系配置片段 (germline configured fragment) 的小鼠的 **XenoMouse®** 品系。参见, Mendez 等人, (Nature Genetics 15 :146-156 1997), 以及 Green 和 Jakobovits, (J. Exp. Med. 188 :483-495, 1998)。 **XenoMouse®** 品系可从 AMGEN, Inc. (以前为 ABGENIX, Fremont, CA) 获得。

[0073] 小鼠的 **XenoMouse®** 品系的产生论述和描述于 1990 年 1 月 12 日提交的美国专利申请系列案 07/466, 008, 1990 年 11 月 8 日提交的 07/610, 515, 1992 年 7 月 24 日提交的 07/919, 297, 1992 年 7 月 30 日提交的 07/922, 649, 1993 年 3 月 15 日提交的 08/031, 801,

1993 年 8 月 27 日提交的 08/112,848,1994 年 4 月 28 日提交的 08/234,145,1995 年 1 月 20 日提交的 08/376,279,1995 年 4 月 27 日提交的 08/430,938,1995 年 6 月 5 日提交的 08/464,584,1995 年 6 月 5 日提交的 08/464,582,1995 年 6 月 5 日提交的 08/463,191,1995 年 6 月 5 日提交的 08/462,837,1995 年 6 月 5 日提交的 08/486,853,1995 年 6 月 5 日提交的 08/486,857,1995 年 6 月 5 日提交的 08/486,859,1995 年 6 月 5 日提交的 08/462,513,1996 年 10 月 2 日提交的 08/724,752,1996 年 12 月 3 日提交的 08/759,620,2001 年 11 月 30 日提交的美国公开案 2003/0093820 和美国专利 6,162,963、6,150,584、6,114,598、6,075,181 和 5,939,598 以及日本专利 3 068180 B2、3 068 506 B2 和 3 068 507 B2。也参见 1996 年 6 月 12 日授权公开的欧洲专利 EP 0 463 151 B1,1994 年 2 月 3 日公开的国际专利申请案 W09402602,1996 年 10 月 31 日公开的国际专利申请案 W09634096,1998 年 6 月 11 日公开的 W09824893,2000 年 12 月 21 日公开的 W00076310。上述专利、申请和参考文献各自的公开内容以其全文通过引用合并入本文。

[0074] 在备选方法中,其他公司,包括 GenPharm International, Inc.,已使用“微小基因座 (minilocus)”方法。在微小基因座方法中,通过包含来自 Ig 基因座的片段(单独的基因)来模拟外源 Ig 基因座。因此,将一个或多个 VH 基因、一个或多个 DH 基因、一个或多个 JH 基因、 μ 恒定区和通常第二恒定区(优选 γ 恒定区)组成为用于插入动物的构建体。该方法描述于属于 Surani 等人的美国专利 5,545,807 和各自属于 Lonberg 和 Kay 的美国专利 5,545,806、5,625,825、5,625,126、5,633,425、5,661,016、5,770,429、5,789,650、5,814,318、5,877,397、5,874,299 和 6,255,458,属于 Krimpenfort 和 Berns 的美国专利 5,591,669 和 6,023,010,属于 Berns 等人的美国专利 5,612,205、5,721,367 和 5,789,215,和属于 Choi 和 Dunn 的美国专利 5,643,763,和 1990 年 8 月 29 日提交的 GenPharm 国际美国专利申请系列 07/574,748,1990 年 8 月 31 日提交的 07/575,962,1991 年 12 月 17 日提交的 07/810,279,1992 年 3 月 18 日提交的 07/853,408,1992 年 6 月 23 日提交的 07/904,068,1992 年 12 月 16 日提交的 07/990,860,1993 年 4 月 26 日提交的 08/053,131,1993 年 7 月 22 日提交的 08/096,762,1993 年 11 月 18 日提交的 08/155,301,1993 年 12 月 3 日提交的 08/161,739,1993 年 12 月 10 日提交的 08/165,699,1994 年 3 月 9 日提交的 08/209,741,其公开内容通过引用合并入本文。也参见,欧洲专利 0 546 073 B1、国际专利申请 W09203918、W09222645、W09222647、W09222670、W09312227、W09400569、W09425585、W09614436、W09713852 和 W09824884 以及美国专利 5,981,175、其公开内容以其全文通过引用合并入本文。

[0075] Kirin 也已证明可从其中已通过微细胞 (microcell) 融合导入了染色体的大片段或完整染色体的小鼠产生人抗体。参见,欧洲专利申请 773 288 和 843 961,其公开内容通过引用合并入本文。此外,已产生作为 Kirin' s Tc 小鼠与 Medarex' s minilocus (Humab) 小鼠的杂交育种的结果的 KMTM 小鼠。此类小鼠具有 Kirin 小鼠的人 IgH 转染色体和 Genpharm 小鼠的 κ 链转基因 (Ishida 等人, Cloning Stem Cells 4:91-102,2002)。

[0076] 人抗体还可通过体外方法产生。合适的实例包括但不限于噬菌体展示 (CAT, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion(以前为 Proliferon), Affimed)、核糖体展示 (CAT)、酵母展示等。

[0077] 对于治疗目的,可用治疗效应物基团例如放射性基团或细胞毒性基团 (cytotoxic

group) 缀合抗体。

[0078] 对于诊断目的,可标记抗体。合适的标记包括放射性标记、荧光标记或酶标记。

[0079] 根据本发明使用的另外的抗体是所谓的异种抗体 (xenogenic antibody)。用于在小鼠中产生异种抗体例如人抗体的一般原理描述于例如 W09110741、W0 9402602、W0 9634096 和 W0 9633735 中。

[0080] 如上所论述的,除了完整抗体外,本发明的抗体还可以以多种形式存在,包括例如 Fv、Fab' 和 F(ab')₂ 以及以单链形式存在;参见例如 W08809344。

[0081] 需要时,可在重链和 / 或轻链的可变结构域中突变本发明的抗体以改变抗体的结合性质。例如,可在一个或多个 CDR 区中产生突变以增加或减少抗体对于 AXL 的 K_d 或改变抗体的结合特异性。定点诱变技术在本领域内是熟知的。参见,例如, Sambrook 等人 and Ausubel 等人,同上。此外,可在 AXL 抗体的可变区中对已知将发生改变 (与种系相比) 的氨基酸残基进行突变。在另一个方面,可将突变导入一个或多个构架区。可在构架区或恒定结构域中产生突变以增加 AXL 抗体的半衰期。参见,例如, W00009560。还可在构架区或恒定结构域中进行突变以改变抗体的免疫原性,以提供用于与另一个分子共价或非共价结合的位点,或以改变性质如补体结合 (complement fixation)。可在单个突变抗体的每一个构架区、恒定结构域和可变区中产生突变。备选地,可以只在单个突变抗体的构架区、可变区或恒定结构域中的一个区域中产生突变。

[0082] 在另外的方面,抗体可具有拥有效应子功能的恒定结构域,由此已在细胞表面上结合抗体、其抗体片段或衍生物的表达 AXL 的细胞可被免疫系统功能攻击。例如,抗体可能能够结合补体和参与补体依赖性细胞毒性 (CDC)。此外,抗体可能能够结合效应子细胞例如单核细胞和天然杀伤 (NK) 细胞上的 Fc 受体,并参与抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。

[0083] 在另一个方面,本发明的抗体可用于治疗性治疗,优选用于治疗过度增殖性疾病、心血管疾病,特别地动脉粥样硬化和血栓形成、糖尿病相关疾病,特别地肾小球肥大或糖尿病性肾病,和特别地与 AXL 表达、过表达或极度活跃相关、与其相伴或由其引起的病症。过度增殖性疾病优选选自与 AXL 表达、过表达或极度活跃相关、与其相伴或由其引起的病症,例如癌症,例如乳腺癌、结肠癌、肺癌、肾癌、滤泡性淋巴瘤、髓性白血病、皮肤癌 / 黑色素瘤、胶质母细胞瘤、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、巴雷特食管 (Barrett's esophagus) 和食管癌、胃癌、膀胱癌、宫颈癌、肝癌、甲状腺癌和头颈癌,或增生性和赘生性疾病或其他表达或过表达 AXL 的过度增殖性疾病。

[0084] 在另一个方面,本发明的抗体可用于与抗肿瘤剂共施用以治疗上述病症之一。

[0085] 如本文中使用的,共施用包括将本发明的抗体与抗肿瘤剂,优选诱导细胞凋亡的抗肿瘤剂一起施用。术语共施用还包括以单一组合物的形式或以两个或更多个不同组合物的形式施用本发明的抗体和抗肿瘤剂,优选诱导细胞凋亡的抗肿瘤剂。共施用包括同时 (即,在相同的时间) 或相继 (即,以一定的间隔) 施用本发明的抗体与抗肿瘤剂,优选诱导细胞凋亡的抗肿瘤剂。

[0086] 本发明还涉及编码本发明的抗体、抗体片段或其衍生物的核酸分子。编码上述抗体、抗体片段或其衍生物的本发明的核酸分子可以是例如 DNA、cDNA、RNA 或合成产生的 DNA 或 RNA 或重组产生的嵌合核酸分子 (其单独地或组合地包含任何此类核酸分子)。核酸分子还可以是相应于完整基因或其大部分或相应于其片段和衍生物的基因组 DNA。核苷酸序

列可以相应于天然发生的核苷酸序列或可包含单个或多个核苷酸置换、缺失或添加。在本发明的特别优选的实施方案中,核酸分子是 cDNA 分子。

[0087] 优选,本发明涉及分离的核酸分子,其选自:

[0088] (a) 编码 SEQ ID NOs:7-12,13-30,37-42,43-46 的多肽的核酸序列

[0089] (b) SEQ ID NOs:1-6,31-36 中显示的核酸序列

[0090] (c) 与 (a) 或 (b) 中的任一序列互补的核酸;和

[0091] (d) 在严格条件下能够与 (a)、(b) 或 (c) 杂交的核酸序列。

[0092] 术语“在严格条件下杂交”意指两个核酸片段在如例如 Sambrook 等人,“Expression of cloned genes in E.coli” in Molecular Cloning:A laboratory manual(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA 中描述的标准杂交条件下彼此杂交。此类条件例如在大约 45°C 下于 6.0xSSC 中杂交,然后在 50°C 下使用 2.0xSSC,优选在 65°C 下使用 2.0xSSC,或在 50°C 下使用 0.2xSSC,优选在 65°C 下使用 0.2xSSC 进行清洗步骤。

[0093] 本发明还涉及包含本发明的核酸分子的载体。所述载体可以是例如,噬菌体、质粒、病毒或逆转录病毒载体。逆转录病毒载体可以是有复制能力或复制缺陷型载体。在后一种情况下,病毒繁殖通常只在互补宿主细胞 (complementing host cell) 中发生。

[0094] 可将本发明的核酸分子与包含选择标记的载体连接以在宿主中进行扩增。通常,以沉淀例如磷酸钙沉淀或氯化铷沉淀的形式,或以与带电荷的脂质的复合物的形式或以碳基簇 (carbon-based cluster) 例如富勒烯 (fulleren) 的形式导入质粒载体。如果载体是病毒,那么其在应用于宿主细胞之前可使用合适的包装细胞系进行体外包装。

[0095] 优选,本发明的载体是其中核酸分子有效地连接至一个或多个控制序列(从而允许在原核和/或真核宿主细胞中转录和任选地表达)的表达载体。所述核酸分子的表达包括核酸分子的转录(优选至可翻译的 mRNA)。确保在真核细胞,优选哺乳动物细胞中表达的调控元件对于本领域技术人员来说是熟知的。它们通常包括确保转录的起始的调控序列和任选地确保转录终止和转录物稳定的 poly-A 信号。另外的调控元件可包括转录和翻译增强子。允许在原核宿主细胞中表达的可能的调控元件包括大肠杆菌 (E.coli) 中的 lac、trp 或 tac 启动子,允许在真核宿主细胞中表达的调控元件的实例是酵母中的 AOX1 或 GAL1 启动子或哺乳动物和其他动物细胞中的 CMV 启动子、SV40 启动子、RSV(劳斯肉瘤病毒)启动子、CMV 增强子、SV40 增强子或珠蛋白内含子。除了负责转录起始的元件以外,此类调控元件还可包括多核苷酸下游的转录终止信号例如 SV40-poly-A 位点或 tk-poly-A 位点。在本说明书中,合适的表达载体在本领域内是已知的,例如 Okayama-Berg cDNA 表达载体 pcDV1 (Pharmacia)、pCDM8、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3 (Invitrogen) 或 pSPORT1 (GIBCO BRL)。优选,所述载体是表达载体和/或基因转移或靶向性载体。源自病毒例如逆转录病毒、痘苗病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒或牛乳头瘤病毒的表达载体可用于将本发明的多核苷酸或载体递送入靶向的细胞群体。本领域技术人员熟知的方法可用于构建重组病毒载体;参见,例如, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (2001, 第 3 版) N.Y. 和 Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994) 中描述的技术。备选地,可将本发明的核酸分子重构入脂质体以递送至靶细胞。

[0096] 本发明还涉及包含本发明的载体的宿主。所述宿主可以是原核或真核细胞或非人转基因动物。可将存在于宿主中的本发明的多核苷酸或载体整合入宿主的基因组或其可以保持在染色体外。在该方面,还应理解,本发明的核酸分子可用于“基因打靶”和/或“基因替代”,以恢复突变基因或通过同源重组产生突变基因;参见例如 Mouellic, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87(1990), 4712-4716; Joyner, Gene Targeting, A Practical Approach, Oxford University Press。

[0097] 宿主可以是任何原核或真核细胞,例如细菌细胞、昆虫细胞、真菌细胞、植物细胞、动物细胞、哺乳动物细胞或优选,人细胞。优选的真菌细胞是例如酵母菌属 (*Saccharomyces*) 的真菌细胞,特别地酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 的真菌细胞。术语“原核的”意欲包括可用多核苷酸转化或转染以表达本发明的变异多肽的所有细菌。原核宿主可包括革兰氏阴性以及革兰氏阳性细菌,例如大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。可使用本领域技术人员公知的任何技术将编码本发明的变异多肽的突变形式的多核苷酸用于转化或转染宿主。用于制备融合的,有效连接的基因和在细菌或动物细胞中表达它们的方法在本领域内是熟知的 (Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (2001, 第3版)。本文中描述的基因构建体和方法可用于在例如原核宿主中表达本发明的变异抗体、其抗体片段或衍生物。通常,结合宿主,使用包含促进插入的核酸分子的有效转录的启动子序列的表达载体。表达载体通常包含复制起点、启动子和终止子以及能够提供转化的细胞的表型选择的特定基因。可按照本领域内已知的技术在发酵罐中生长和培养转化的原核宿主以获得最佳的细胞生长。然后可从生长培养基、细胞裂解物或细胞膜级分分离本发明的抗体、抗体片段或其衍生物。可通过任何常规方法例如制备型色谱分离和免疫分离例如包括单克隆或多克隆抗体的使用的那些来分离和纯化微生物或其他生物表达的本发明的抗体、抗体片段或其衍生物。

[0098] 在本发明的优选实施方案中,宿主是细菌、真菌、植物、两栖动物或动物细胞。优选的动物细胞包括但不限于中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、幼仓鼠肾 (BHK) 细胞、猴肾细胞 (COS)、3T3 细胞、NSO 细胞和许多其他细胞系包括人细胞,例如 Per. C6。在另一个优选实施方案中,所述动物细胞是昆虫细胞。优选的昆虫细胞包括但不限于 SF9 细胞系细胞。

[0099] 在本发明的更优选实施方案中,所述宿主是人细胞或人细胞系。所述人细胞包括但不限于人胚肾细胞 (HEK293、293T、293 freestyle)。此外,所述人细胞系包括但不限于 HeLa 细胞、人肝细胞癌细胞 (例如, Hep G2)、A549 细胞。

[0100] 本发明还提供了转基因非人动物,其包含一个或多个可用于产生本发明的抗体的本发明的核酸分子。可在山羊、牛、马、猪、大鼠、小鼠、兔子、仓鼠或其他哺乳动物的组织或体液例如奶、血液或尿中产生和回收抗体。参见,例如,美国专利 5,827,690; 5,756,687; 5,750,172; 和 5,741,957。如上所述,可通过用 AXL 或其部分进行免疫来产生包含人免疫球蛋白基因座的非人转基因动物。

[0101] 本发明还涉及用于制备抗体的方法,其包括在允许所述抗体合成的条件下培养本发明的宿主和从所述培养物回收所述抗体。

[0102] 可按照本领域内已知的技术在发酵罐中生长和培养转化的宿主以获得最佳细胞生长。在表达后,可按照本领域内的标准方法包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析、凝胶电泳等

纯化本发明的完整抗体、它们的二聚体、单独的轻链和重链或其他免疫球蛋白形式；参见，Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N. Y. (1982)。然后可从生长培养基、细胞裂解物或细胞膜级分分离本发明的抗体或其相应的免疫球蛋白链。可以通过任何常规方法例如制备型色谱分离和免疫分离，例如包括抗例如本发明的抗体的恒定区的单克隆或多克隆抗体的使用的那些分离和纯化例如微生物表达的本发明的抗体或免疫球蛋白链。

[0103] 对于本领域技术人员来说很显然的是，还可将本发明的抗体偶联至其他部分以进行例如药物靶向和成像应用。可在抗体或抗原表达后通过化学方法进行至附着位点的偶联，或在 DNA 水平上将偶联产物工程改造至本发明的抗体或抗原中。然后在合适的宿主系统中表达 DNA，以及，需要时收集和使表达的蛋白质复性。

[0104] 在本发明的优选实施方案中，将抗体偶联至效应物例如放射性同位素或毒性化疗剂。优选，此类抗体缀合物用于靶向表达 AXL 的细胞，例如癌细胞，以消除其。本发明的抗体 / 抗体片段与放射性同位素的连接例如为肿瘤的治疗提供了有利方面。与化学疗法和其他形式的癌症疗法不同，放射免疫疗法或放射性同位素 - 抗体组合的施用直接靶向癌细胞而对周围的正常、健康组织的损害最小。优选的放射性同位素包括例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 。

[0105] 此外，当用毒性化疗药物例如格尔德霉素 (Mandler 等人, J. Natl. Cancer Inst., 92(19), 1549-51(2000)) 和美登素例如美坦生类 (maytansinoid) 药物 DM1 (Liu 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 :8618-8623(1996) 和 auristatin-E 或 monomethylauristatin-E (Doronina 等人, Nat. Biotechnol. 21 :778-784(2003) 或卡奇霉素 (calicheamicin)) 缀合时，本发明的抗体可用于治疗癌症；将在酸性或还原条件下或当暴露于特定的蛋白酶时释放药物的不同连接体用于该技术。可如本领域中所述缀合本发明的抗体。

[0106] 本发明还涉及包含本发明的抗体、核酸分子、载体、宿主或通过本发明的方法获得的抗体的药物组合物。

[0107] 术语“组合物”，如本文中所使用的，包含至少一种本发明的化合物。优选，这样的组合物是药物组合物或诊断组合物。

[0108] 优选，所述药物组合物包含可药用载体和 / 或稀释剂。本文中公开的药物组合物可部分地用于治疗与 AXL 表达、过表达或过度活跃相关、与其相伴或由其引起的病症，例如过度增殖性疾病、心血管疾病，特别地动脉粥样硬化和血栓形成、糖尿病相关疾病，特别地肾小球肥大或糖尿病性肾病。所述病症包括但不限于癌症例如乳腺癌、结肠癌、肺癌、肾癌、滤泡性淋巴瘤、髓性白血病、皮肤癌 / 黑色素瘤、胶质母细胞瘤、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、巴雷特食管和食管癌、胃癌、膀胱癌、宫颈癌、肝癌、甲状腺癌和头颈癌、或其他增生性疾病或赘生性疾病或其他 AXL 表达或过表达的疾病。

[0109] 术语“极度活跃”在本文中是指可由负调控的缺乏和 / 或功能障碍引起的不受控制的 AXL 信号转导。例如，负调控包括蛋白质的去磷酸化、降解和 / 或内吞作用。此外，不受控制的 AXL 信号转导可以是遗传改变（体细胞或种系）的结果，所述遗传改变导致 AXL 氨基酸序列的变化。

[0110] 合适的药物载体、赋形剂和 / 或稀释剂的实例在本领域内是熟知的，包括磷酸缓

冲盐溶液、水、乳剂例如油 / 水乳剂、各种类型的湿润剂、无菌溶液等。包含此类载体的组合物可通过熟知的常规方法来配制。可以以合适的剂量给受试者施用此类药物组合物。可通过不同的方法,例如通过静脉内、腹膜内、皮下、肌内、局部、皮内、鼻内或支气管内施用进行合适的组合物的施用。还可将本发明的组合物直接施用至靶部位,例如通过基因枪(biolistic)递送至外部或内部靶部位如脑。给药方案将由主治医生和临床因素决定。如在医疗领域内是熟知的,用于任何一个患者的剂量取决于许多因素,包括患者的尺寸大小、身体表面积、年龄、待施用的特定化合物、性别、施用的时间和途径、总体健康状况和其他同时施用的药物。蛋白质性质的药物活性物质可以以 $1\mu\text{g}$ 至 100mg/kg 体重 / 剂量的量存在;然而,预期使用低于或高于该示例性范围的剂量,特别地在考虑到上述因素的情况下。如果方案是连续输注,其还应当 1pg 至 100mg/ 千克体重 / 分钟 的范围内。

[0111] 可通过定期评估来监控进展。可局部或全身性施用本发明的组合物。用于胃肠外施用的制剂包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳剂。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油例如橄榄油和可注射有机酯例如油酸乙酯。水性载体包括水、醇 / 水性溶液、乳剂或悬浮液,包括盐水和缓冲的介质。胃肠外媒介物包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖(Ringer's dextrose)、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏或不挥发油。静脉内媒介物包括液体和营养补充剂、电解质补充剂(例如基于林格氏葡萄糖的那些)等。还可存在防腐剂和其他添加剂例如,抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。此外,取决于药物组合物的期望的用途,本发明的药物组合物还可包含另外的试剂。特别优选,药物组合物包含另外的活性剂例如另外的抗肿瘤剂、小分子抑制剂、抗肿瘤试剂或化疗剂。

[0112] 本发明还涉及包含抗 AXL 抗体的药物组合物,其优选是与至少一种另外的抗肿瘤剂组合的本发明的抗体。所述组合在例如抑制异常细胞生长中是有效的。

[0113] 许多抗肿瘤剂目前在本领域内中是已知的。一般地,该术语包括能够预防、减轻和 / 或治疗过度增殖性病征的所有试剂。在一个实施方案中,抗肿瘤剂选自治疗性蛋白,包括但不限于抗体或免疫调节蛋白。在另一个实施方案中,抗肿瘤剂选自小分子抑制剂或化疗剂,其由有丝分裂抑制剂、激酶抑制剂、烷基化试剂、抗代谢药、嵌入抗生素(intercalating antibiotics)、生长因子抑制剂、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、组蛋白脱乙酰基酶抑制剂、抗存活剂(anti-survival agent)、生物学应答调节剂、抗激素例如抗雄激素和抗血管生成剂组成。

[0114] 可与本文中提供的抗体组合使用的抗肿瘤剂的特定实例包括例如吉非替尼、拉帕替尼、舒尼替尼、培美曲塞、贝伐珠单抗、西妥昔单抗、伊马替尼、曲妥珠单抗、阿仑单抗、利妥昔单抗、厄洛替尼、硼替佐米等。用于本文中描述的和要求保护的组合物的其他特定抗肿瘤剂包括例如化疗剂例如卡培他滨、柔红霉素、道诺霉素、放线菌素 D、多柔比星、表柔比星、伊达比星、依索比星、博来霉素、马磷酰胺、异环磷酰胺、阿糖胞苷、双氯乙基亚硝脲、白消安、丝裂霉素 C、放线菌素 D、普卡霉素、泼尼松、羟孕酮、睾酮、他莫昔芬、达卡巴嗪、丙卡巴肼、六甲蜜胺、五甲蜜胺、米托蒽醌、安吡啶、苯丁酸氮芥、甲基环己基亚硝基脲、氮芥、美法仑、环磷酰胺、6- 巯嘌呤、6- 巯鸟嘌呤、阿糖胞苷(CA)、5- 氮杂胞苷、羟基脲、脱氧助间型霉素、4- 羟基过氧环磷酰胺、5- 氟尿嘧啶(5-FU)、5- 氟脱氧尿苷(5-FdR)、甲氨喋呤(MTX)、秋水仙碱、泰素(taxol)、长春新碱、长春碱、依托泊苷、三甲曲沙、替尼泊苷、顺铂和己烯雌酚(DES)。通常参见,The Merck Manual of Diagnosis and Therapy,第 15 版 1987,

pp. 1206-1228, Berkow 等人, eds., Rahway, N. J. 特别优选的是诱导细胞凋亡的此类抗肿瘤剂。

[0115] 当与所述 AXL 抗体一起使用时, 此类抗肿瘤剂可单独地 (例如, 5-FU 和抗体)、相继地 (例如, 5-FU 和抗体进行一段时间, 然后施用 MTX 和抗体) 或与一种或多种其他此类抗肿瘤剂组合 (例如, 5-FU、MTX 和抗体, 或 5-FU、放射疗法和抗体) 使用。

[0116] 术语抗肿瘤剂还可包括治疗方法, 例如辐射或放射疗法。

[0117] 本发明的药物组合物可用于人医疗, 还可用于兽医目的。

[0118] 此外, 本发明涉及本发明的抗体、本发明的核酸分子、载体、宿主或通过本发明的方法获得的抗体用于制备药物组合物的用途, 所述药物组合物用于诊断、预防或治疗过度增殖性疾病、心血管疾病, 特别地动脉粥样硬化和血栓形成、糖尿病相关疾病, 特别地肾小球肥大或糖尿病性肾病, 和特别地与 AXL 表达、过表达或极度活跃相关、与其相伴或由其引起的病症。

[0119] 上述过度增殖性疾病包括任何瘤形成, 即任何异常和 / 或不受控制的新的组织生长。术语“不受控制的新的组织生长”, 如本文中所使用的, 可依赖于生长调控的功能障碍和 / 或丧失。过度增殖性疾病包括肿瘤疾病和 / 或癌症, 例如转移或侵袭性癌症。

[0120] 在本发明的用途的优选实施方案中, 所述过度增殖性疾病特别地是乳腺癌、结肠癌、肺癌、肾癌、滤泡性淋巴瘤、髓性白血病、皮肤癌 / 黑色素瘤、胶质母细胞瘤、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、巴雷特食管和食管癌、胃癌、膀胱癌、宫颈癌、肝癌、甲状腺癌和头颈癌、或增生性或赘生性疾病或其他表达或过表达 AXL 的过度增殖性疾病。

[0121] 在另一个实施方案中, 本发明涉及抗 AXL 抗体 (优选本发明的抗体) 用于制备药物的用途, 所述药物用于与治疗上述病症之一的抗肿瘤剂共施用。

[0122] 根据另外的优选实施方案, 本发明涉及抗 AXL 抗体用于制造用于治疗抗药性癌症的药物组合物的用途。在特别优选的实施方案中, 抗 AXL 抗体是权利要求 1 至 22 中所定义的单克隆抗体。

[0123] 本发明还涉及包含本发明的抗体、本发明的核酸分子、载体、宿主或通过本发明的方法获得的抗体和任选地可药用的载体的诊断组合物。

[0124] 本发明的诊断组合物可用于检测不同细胞、组织或另一个合适的样品中哺乳动物 AXL 的不期望的表达、过表达或过度活跃, 包括将样品与本发明的抗体接触, 和检测 AXL 在样品中的存在。因此, 本发明的诊断组合物可用于评估过度增殖性疾病的起始或疾病状态。

[0125] 此外, 可用本发明的抗体靶向恶性细胞例如表达 AXL 的癌细胞。因此已结合本发明的抗体的细胞可能受到免疫系统功能例如补体系统或受到细胞介导的细胞毒性的攻击, 从而减少癌细胞的数目或根除癌细胞。这些考虑同样地用于治疗转移和再发性肿瘤。

[0126] 在本发明的另一个方面, 将本发明的抗体偶联至标记基团。此类抗体特别适合于诊断应用。如本文中所使用的, 术语“标记基团”是指可检测的标志物, 例如放射性标记的氨基酸或可通过标记的抗生物素蛋白检测的生物素基部分。用于标记多肽或糖蛋白例如抗体的各种方法在本领域内是已知的并且可用于进行本发明。合适的标记基团的实例包括但不限于下列: 放射性同位素或放射性核素 (例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、荧光基团 (例如 FITC、罗丹明、镧系元素 (lanthanide)、磷光体 (phosphor))、酶基团 (例如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光基团、生物素基团或预

先确定的被第二报告分子识别的多肽表位（例如亮氨酸拉链对序列、二抗的结合部位、金属结合结构域、表位标签）。

[0127] 在某些方面，可能期望通过不同长度的间隔臂连接标记基团以减少潜在的位阻。

[0128] 在另一个实施方案中，本发明涉及评估表达 AXL 的细胞的存在的方法，包括将本发明的抗体与怀疑在它们 / 它的表面具有 AXL 的细胞或组织接触。用于检测样品中的 AXL 表达的合适方法可以是酶联免疫吸附测定 (ELISA) 或免疫组织化学 (IHC)。

[0129] 可在微量滴定板版式中进行 ELISA 测定，其中例如微量滴定板的孔吸附有 AXL 抗体。漂洗板，并且用封闭剂例如乳蛋白或白蛋白进行处理以阻止分析物的非特异性吸附。然后用测试样品处理孔。在漂洗掉测试样品或标准后，用标记的第二 AXL 抗体（例如通过生物素缀合）处理孔。在清洗掉过量第二抗体后，用例如抗生物素蛋白缀合的辣根过氧化物酶 (HRP) 和合适的生色底物检测标记。通过与由标准样品产生的标准曲线比较来测定测试样品中 AXL 抗原的浓度。

[0130] 关于 IHC，可使用石蜡包埋的组织，其中例如将组织首先在二甲苯中脱蜡，然后例如用乙醇脱水，和在蒸馏水中漂洗。可通过表位暴露 (epitope unmasking)、酶促降解或皂苷来暴露被甲醛固定和石蜡包埋掩蔽的抗原表位。关于表位暴露，可在蒸气发生器、水浴或微波炉中于表位修复液 (epitope retrieval solution) 例如 2N HCl 溶液 (pH 1.0) 中加热石蜡切片，进行 20 至 40 分钟。在酶促降解的情况下，可将组织切片在不同的酶溶液例如蛋白酶 K、胰蛋白酶、链霉蛋白酶、胃蛋白酶等中于 37℃ 下温育 10 至 30 分钟。

[0131] 在漂洗掉表位修复液或过量的酶后，用封闭缓冲液处理组织切片以防止非特异性相互作用。以合适的浓度加入第一 AXL 抗体。漂洗掉过量的一抗，将切片在室温下于过氧化物酶封闭液中温育 10 分钟。在进行另一个清洗步骤后，将组织切片与第二标记抗体（例如用可用作酶的锚的基团标记）一起温育。因此，实例是被偶联至辣根过氧化物酶的链霉抗生物素蛋白识别的生物素标记的二抗。通过与合适的生色底物一起温育进行抗体 / 酶复合物的检测。

[0132] 在另外的实施方案中，本发明涉及阻断 AXL 功能的方法，其包括将本发明的抗体与怀疑在它们 / 其表面上具有 AXL 的细胞或组织在其中抗体能够阻断 AXL 功能的条件下接触。接触可以是体外或体内的。

[0133] 本发明还涉及治疗过度增殖性疾病、心血管疾病，特别地动脉粥样硬化和血栓形成、糖尿病相关疾病，特别地肾小球肥大或糖尿病性肾病的方法，其包括给有此需要的患者施用合适剂量的本发明的抗体或抗体片段或其衍生物。过度增殖性疾病优选选自与 AXL 表达、过表达或过度活跃相关、与其相伴或由其引起的病症，例如癌症，例如乳腺癌、结肠癌、肺癌、肾癌、滤泡性淋巴瘤、髓性白血病、皮肤癌 / 黑色素瘤、胶质母细胞瘤、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、巴雷特食管和食管癌、胃癌、膀胱癌、宫颈癌、肝癌、甲状腺癌和头颈癌或增生性疾病或赘生性疾病或其他表达或过表达 AXL 的过度增殖性疾病。

[0134] 根据本发明发明的另一个优选实施方案，待治疗的癌症是抗药性癌症。

[0135] 本发明还涉及治疗疾病的方法，其中给哺乳动物施用本发明的抗体并且其中所述疾病与 AXL 的异常水平的表达或活性直接或间接相关。

[0136] 最后，本发明涉及包括抗 AXL 抗体，优选本发明的抗体、抗体片段或其衍生物、编码所述组分的核酸分子和 / 或本发明的载体的试剂盒。

[0137] 包括本文中公开的化合物的所有实施方案可用作单个化合物或组合地用于药物的制备。

[0138] 附图概述

[0139] 图 1. Rat1-模拟和 Rat1-AXL c1.2 成纤维细胞中细胞表面 AXL 的流式细胞术分析。收集通过分别用 pLXSN 和 pLXSN-hAXL 亲嗜性病毒 (ecotrophic virus) 感染 Rat1 成纤维细胞产生的多克隆 Rat1-模拟和克隆性 Rat1-AXL c1.2 细胞,并用 3 μ g/ml 的小鼠对照抗体 72A1 (左图) 或小鼠抗 AXL MAB154 一抗 (右图) 以及 PE-缀合的抗小鼠二抗染色。关于详细内容参见正文。Rat1-AXL c1.2 细胞的染色导致 3 个数量级的偏移,并证明 AXL 在这些细胞的表面上过表达。

[0140] 图 2. NIH3T3-模拟和 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞中细胞表面 AXL 的流式细胞术分析。收集通过分别用 pLXSN 和 pLXSN-AXL 亲嗜性病毒感染 NIH3T3 成纤维细胞产生的多克隆 NIH3T3-模拟和克隆性 NIH3T3-AXL c1.7 细胞,并用 3 μ g/ml 的小鼠对照抗体 72A1 (左图) 或小鼠抗 AXL MAB154 一抗 (右图) 以及 PE-缀合的抗小鼠二抗染色。关于详细内容参见正文。NIH3T3-AXL c1.7 细胞的染色导致 2 个数量级的偏移,并证明 AXL 在这些细胞的表面上过表达。

[0141] 图 3. 大鼠抗 AXL 抗体与小鼠和食蟹猴 AXL 以及 Mer 和 Sky 的交叉反应性的流式细胞术分析。用 pcDNA3、pcDNA3-hAXL、pcDNA3mAXL、pcDNA3-cyAXL、pcDNA3-hMer 或 pcDNA3-hSky 瞬时转染 HEK293T 成纤维细胞。收集细胞,然后用 10 μ g/ml 抗 AXL 1D5、11D5、11B7、10D12、6E7、2A1、11D7 或 12B7 一抗和 / 或 PE 缀合的驴抗大鼠二抗或 PE 缀合的驴抗小鼠二抗 (只用于对照) 染色。关于详细内容参见正文。除了显示与小鼠 AXL 以及人 Mer 和 Sky 的中度交叉反应性的 12B7 外,无抗 AXL 抗体与这些分子交叉反应。相反地,所有测试的抗 AXL 抗体与食蟹猴 AXL 交叉反应。

[0142] 图 4. 研究大鼠抗 AXL 抗体对 AXL 受体磷酸化的作用的 ELISA 实验。饥饿 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞 (A) 和 NCI-H292 肺癌细胞 (B),用 10 μ g/ml 的小鼠对照抗体 72A1 以及大鼠抗 AXL 抗体 2A1、11D7、11D5、11B7、6E7 或 10D12 进行预温育,用或不用 400ng/ml mGas6 进行处理,然后进行裂解。将裂解物转移至抗磷酸-酪氨酸抗体 4G10 包被的 Maxi-Sorp 96 孔板,然后清洗板,用 0.5g/ml 生物素化的大鼠抗 AXL 抗体 12B7、AP 缀合的链霉抗生物素蛋白和 AttoPhos 底物溶液进行温育以收集荧光强度。关于详细内容参见正文。大鼠抗 AXL 抗体 11B7、11D5、6E7 和 10D12 能够阻断或减少配体介导的 AXL 激活 (如通过减少的磷酸化显示的),因此被认为是拮抗型抗 AXL 抗体。相反地,大鼠抗 AXL 抗体 2A1 和 11D7 刺激基础 AXL 激活 (如通过增加的磷酸化显示的),没有显著地减少配体介导的 AXL 激活,因此被认为是激动型抗 AXL 抗体。

[0143] 图 5. 研究大鼠抗 AXL 抗体对 p42/p44MAP 激酶磷酸化的作用的 ELISA 实验。饥饿 CaSki 宫颈癌细胞,用 10 μ g/ml 的同种型对照抗体 1D5 以及大鼠抗 AXL 抗体 11D5、11B7 或 2A1 进行预温育,用或不用 400ng/ml mGas6 进行处理,然后用甲醛进行固定。清洗细胞,进行猝灭,然后用抗磷酸-p44/p42MAP 激酶 (Thr202/Tyr204) 一抗、HRP 缀合的抗兔二抗和四甲基联苯胺溶液进行温育以测量吸光度强度。关于详细内容参见正文。大鼠抗 AXL 抗体 11B7 和 11D5 能够减少配体介导的 p42/p44MAP 激酶激活,如通过减少的磷酸化显示的,从而被认为是拮抗型抗 AXL 抗体。相反地,大鼠抗 AXL 抗体 2A1 刺激基础 p42/p44MAP 激酶激活

(如通过增加的磷酸化显示的),不减少配体介导的 p42/p44MAP 激酶激活,从而被认为是激动型抗 AXL 抗体。

[0144] 图 6. 研究大鼠抗 AXL 抗体对 Akt 激酶磷酸化的作用的 ELISA 实验。饥饿 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞 (A) 和 CaLu-1 肺癌细胞 (B),用 10g/ml 的同种型对照抗体 1D5 以及大鼠抗 AXL 抗体 11D5、11B7 或 2A1 进行预温育,用或不用 400ng/ml mGas6 处理,然后用甲醛进行固定。清洗细胞,进行猝灭,然后用抗磷酸-Akt (Ser473) 一抗、HRP 缀合的抗兔二抗和四甲基联苯胺溶液进行温育以测量吸光度强度。关于详细内容参见正文。大鼠抗 AXL 抗体 11B7 和 11D5 能够阻断或减少配体介导的 Akt 激酶激活,如通过减少的磷酸化显示的,从而被认为是拮抗型抗 AXL 抗体。相反地,大鼠抗 AXL 抗体 2A1 刺激基础 Akt- 激酶激活(如通过增加的磷酸化显示的),不减少配体介导的 Akt 激酶激活,从而被认为是激动型抗 AXL 抗体。

[0145] 图 7. 比较大鼠和嵌合抗 AXL 抗体对 Akt 激酶磷酸化的作用的 ELISA 实验。饥饿 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞,用 50ng/ml、100ng/ml、300ng/ml、500ng/ml 和 1 μ g/ml 的大鼠抗 AXL 抗体 11B7 或嵌合抗 AXL 抗体 ch11B7 以及 50ng/ml、100ng/ml、300ng/ml、500ng/ml、1g/ml、5 μ g/ml 和 10 μ g/ml 的大鼠抗 AXL 抗体 11D5 或嵌合抗 AXL 抗体 ch11D5 进行预温育,用或不用 400ng/ml mGas6 进行处理,然后用甲醛进行固定。清洗细胞,进行猝灭,用抗磷酸-Akt (Ser473) 一抗、HRP 缀合的抗兔二抗和四甲基联苯胺溶液进行温育以测量吸光度强度。关于详细内容参见正文。大鼠抗 AXL 抗体 11B7 和嵌合抗 AXL 抗体 ch11B7 以及大鼠抗 AXL 抗体 11D5 或嵌合抗 AXL 抗体 ch11D5 能够抑制配体介导的 Akt 激酶激活至相似的程度,如通过减少的磷酸化显示的。因此,与它们各自的大鼠对应物相比较,嵌合抗 AXL 抗体 ch11B7 和 ch11D5 保持活性。

[0146] 图 8. 研究大鼠抗 AXL 抗体的结合特性的竞争 ELISA 实验。用 1 μ g/ml 人 AXL-ECD 包被 96 孔 Maxi-Sorp 板,然后用 10 μ g/ml 的未生物素化的同种型对照抗体 1D5 或大鼠抗 AXL 抗体 11B7、11D5、6E7、10D12、11D7 或 2A1 预温育该板。在用 0.5 μ g/ml 的生物素化的同种型对照抗体 1D5 或生物素化的大鼠抗 AXL 抗体 11B7、11D5、6E7、10D12、11D7 或 2A1 温育后,加入 AP 缀合的链霉抗生物素蛋白和 AttoPhos 底物溶液,收集荧光以测量结合的生物素化的抗体。关于详细内容参见正文。对照抗体 1D5 不结合 AXL-ECD。拮抗型抗 AXL 抗体 11B7、11D5、6E7 和 10D12 彼此竞争相同的或结构上相邻的表位。激动型抗体 11D7 和 2A1 识别不同表位并且不与拮抗型抗体竞争对 AXL-ECD 的结合。

[0147] 图 9. 研究大鼠和嵌合抗 AXL 抗体对细胞迁移和增殖的作用的伤口愈合 / 划痕测定。在生长至汇合后,饥饿 NCI-H292 肺癌细胞,用移液器吸头划伤细胞。在 10 μ g/ml 的同种型对照抗体 1D5、拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11D5、11B7、6E7 或 10D12、嵌合抗 AXL 抗体 chn11D5 IgG2 和 chn11B7 IgG2、激动型大鼠抗 AXL 抗体 2A1 和 11D7 以及 10 μ g/ml 的 Erbitux 或 5 μ M Sutent 存在的情况下,允许细胞重新进入清除的区域。24 小时后,固定细胞并且染色,拍摄伤口的照片。关于详细内容参见正文。与同种型对照抗体 1D5 相比较,拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11D5、11B7、6E7 和 10D12 以及嵌合抗 AXL 抗体 chn11D5 IgG2 和 chn11B7IgG2 减少重新进入清除区域,然而激动型大鼠抗 AXL 抗体 2A1 和 11D7 导致完全的伤口闭合。

[0148] 图 10. 研究大鼠抗 AXL 抗体对定向细胞迁移的作用的 Boyden 小室 /transwell 测定。用 10 μ g/ml 的大鼠抗 AXL 抗体 4A6、11B7 或 2A1 预温育血清饥饿的 NIH3T3-AXL c1.7 成

纤维细胞,将其涂板在胶原 I 包被的 FluoreBlock 插入物的顶部,然后暴露于更低的区室中的具有或不具有 Gas6 的无血清培养基。7 小时后,用钙黄绿素-AM 对迁移细胞进行染色,测量各孔的荧光。关于详细内容参见正文。拮抗型抗 AXL 抗体 11B7 减少了 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞的基础和 Gas6 诱导的迁移,然而激动型大鼠抗 AXL 抗体 2A1 增加了 NIH3T3-AXL c1.7 的配体诱导的迁移和特别地基础迁移。抗体 4A6 不影响定向细胞迁移。

[0149] 图 11. 研究大鼠抗 AXL 抗体对 Gas6 诱导的细胞增殖的作用的 AlamarBlue™ 测定。用 20 μ g/ml 的小鼠对照抗体 72A1、大鼠拮抗型抗 AXL 抗体 11D5 和 11B7 以及激动型抗 AXL 抗体 2A1 预温育血清饥饿的 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞,然后在 400ng/ml Gas6 不存在或存在的情况下生长。4 天后,向细胞中加入 AlamarBlue™,然后测量吸光度。关于详细内容参见正文。拮抗型抗 AXL 抗体 11D5 和 11B7 抑制 Gas6 诱导的 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞的增殖,然而激动型大鼠抗 AXL 抗体 2A1 增加 NIH3T3-AXL c1.7 细胞的配体诱导的增殖和特别地基础增殖。

[0150] 图 12. 研究大鼠抗 AXL 抗体对 Gas6 介导的抗细胞凋亡的作用的胱天蛋白酶-3/7 测定。用 10 μ g/ml 的同种型对照抗体 1D5、拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11B7 和 11D5 或激动型大鼠抗 AXL 抗体 11D7 和 2A1 预温育血清饥饿的 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞,然后用或不用 Gas6 进行处理。加入 Apo-ONE 底物溶液,收集荧光以测量胱天蛋白酶-3/7 活性。关于详细内容参见正文。与同种型对照抗体相比较,拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11B7 和 11D5 减少血清饥饿的 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞的 Gas6 介导的抗细胞凋亡,从而诱导细胞凋亡。相反地,无论 Gas6 存在与否,激动型大鼠抗 AXL 抗体 2A1 和 11D7 都诱导血清饥饿的 NIH3T3-AXL c1.7 细胞的抗细胞凋亡,从而抑制细胞凋亡。

[0151] 图 13. 研究大鼠抗 AXL 抗体对 VEGF-A 诱导的内皮细胞出芽的作用的基于球状体的 (Spheroid-based) 细胞血管生成测定。将 HUVEC 球状体包埋在 3D 胶原凝胶中,用 25ng/ml VEGF-A 进行刺激,然后用指定浓度的拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11B7 (A) 和 11D5 (B) 处理 24 小时。每数据点分析 10 个随机选择的球状体的累积出芽长度的平均值 $\pm$ SEM (左图),测定抗体的相对抑制作用 (右图)。用 GraphPad Prism 4.03 进行 IC₅₀ 曲线的拟合和 IC₅₀ 值的计算。关于详细内容参见正文。拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11B7 和 11D5 在基于球状体的血管生成测定中以剂量依赖性的方式抑制 VEGF-A 刺激的 HUVEC 出芽。然而使用最高浓度的 11B7 的处理使 HUVEC 出芽减少至基础水平,使用最高浓度的 11D5 的抑制作用不如前者有效 (左图)。HUVEC 出芽被抑制,对于 11B7 和 11D5, IC₅₀ 值分别为 9.8×10^{-8} M 和 7.0×10^{-7} M (右图)。

[0152] 图 14. 研究大鼠抗 AXL 抗体对裸小鼠中人前列腺癌生长的作用的同位异种移植模型。将 PC-3-LN 前列腺癌细胞同位植入 NMRI^{nu/nu} 小鼠的前列腺。动物被随机分入 4 个组,并且接受 25mg/kg 的同种型对照抗体 1D5 或拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11B7,以及 40mg/kg Sutent 或 12.5mg/kg Taxotere。在处理过程中,通过体内生物发光成像在第 15 天、第 23 天、第 29 天和第 34 天每周一次监控同位生长的 PC-3-LN 肿瘤以及外周转移灶的生长。关于详细内容参见正文。与同种型对照抗体 1D5 相比较,拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11B7 减少了裸小鼠中 PC-3-LN 前列腺肿瘤的总体生长。

[0153] 图 15. 研究大鼠抗 AXL 抗体对裸小鼠中人前列腺癌转移的作用的同位异种移植模型。将 PC-3-LN 前列腺癌细胞同位植入 NMRI^{nu/nu} 小鼠的前列腺。动物被随机分入 4 个

组,并且接受 25mg/kg 的同种型对照抗体 1D5 或拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11B7,以及 40mg/kg Sutent 或 12.5mg/kg Taxotere。尸体剖检后,收集选择的器官(肝、脾、肺、股骨和部分的腰椎)并且通过生物发光成像分析转移的存在。关于详细内容参见正文。与同种型对照抗体 1D5 相比较,本发明的拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11B7 减少了脾转移的发生。值得注意的是,该实验中 11B7 的抗转移作用比 Sutent 更强。

[0154] 图 16. 不同人恶性肿瘤中 AXL 表达的免疫组织化学分析。通过免疫组织化学就 AXL 表达分析 17 个人实体瘤类型,所述肿瘤类型各自由成对的肿瘤组织和匹配的非恶性组织代表。关于详细内容参见正文。概述了结果(A),其中 1 的强度是指在超过 25% 的观察的细胞中存在微弱染色。展示了乳房肿瘤和胃的印戒细胞癌中观察到的最强染色的实例(B)。

[0155] 图 17. 比较大鼠和嵌合抗 AXL 抗体对 Ax1 磷酸化的作用的 ELISA 实验。饥饿 CaSki 宫颈癌细胞,用 50ng/ml、100ng/ml、300ng/ml、750ng/ml、1 μ g/ml 和 10 μ g/ml 的大鼠抗 AXL 抗体 11B7 (A) 或嵌合抗 AXL 抗体 ch11B7 (B) 预温育细胞,用或不用 400ng/ml mGas6 处理细胞,然后进行裂解。将裂解物转移至抗磷酸-酪氨酸抗体 4G10 包被的 Maxi-Sorp 96 孔板。之后,清洗板,用 0.5 μ g/ml 生物素化的大鼠抗 AXL 抗体 12B7、AP 缀合的链霉抗生物素蛋白和 AttoPhos 底物溶液进行温育以收集荧光强度。关于详细内容参见正文。如通过宫颈癌细胞系 CaSki 中相对 Ax1 磷酸化的浓度依赖性减少所显示的,本发明的大鼠抗 Ax1 抗体 11B7 (A) 和嵌合抗 Ax1 抗体 ch11B7 (B) 能够阻止配体介导的受体酪氨酸激酶 Ax1 的激活至相似的程度。

[0156] 图 18. 比较大鼠和嵌合抗 Ax1 抗体对 Ax1 磷酸化的作用的 ELISA 实验。饥饿 CaSki 宫颈癌细胞,用 50ng/ml、100ng/ml、300ng/ml、750ng/ml、1 μ g/ml 和 10 μ g/ml 大鼠抗 AXL 抗体 11B7 (A) 或嵌合抗 Ax1 抗体 ch11B7 (B) 进行预温育,用或不用 400ng/ml mGas6 进行处理,然后用甲醛进行固定。清洗细胞,进行猝灭,并用抗磷酸-p44/p42MAP 激酶 (Thr202/Tyr204) 一抗、HRP 缀合的抗兔二抗和四甲基联苯胺溶液进行温育以测量吸光度强度。关于详细内容参见正文。本发明的大鼠抗 Ax1 抗体 11B7 (A) 和嵌合抗 Ax1 抗体 ch11B7 (B) 能够在宫颈癌细胞中阻止 Gas6 诱导的 p42/p44MAP 激酶的激活至相似的程度,如通过相对 p42/p44MAP 激酶磷酸化的浓度依赖性减少所显示的。

[0157] 图 19. 研究大鼠抗 AXL 抗体和化疗剂克服人卵巢癌细胞中的抗药性的组合作用的 TUNEL 染色。用 10 μ g/ml 的对照抗体或拮抗型抗 Ax1 抗体 11B7 预温育人 NCI/ADR-RES 卵巢癌细胞,然后将其与终浓度为 100 μ M、150 μ M 或 200 μ M 的多柔比星共温育。通过使用可商购获得的试剂盒,进行 TUNEL 染色以显现和测定细胞凋亡。关于详细内容参见正文。对于用 100 μ M 多柔比星处理的 NCI/ADR-RES 卵巢癌细胞,无论将细胞与对照抗体还是与拮抗型抗 Ax1 抗体 11B7 共温育,都没有观察到 TUNEL 染色,从而没有观察到细胞凋亡(上图)。然而,在 150 μ M 多柔比星的浓度上,在用对照抗体共处理的细胞中只检测到非常微弱的细胞凋亡,而与拮抗型抗 Ax1 抗体 11B7 的共温育导致细胞凋亡的显著诱导(中图)。同样在 200 μ M 多柔比星存在的情况下,与和对照 IgG 抗体一起温育的细胞相比较,细胞与 11B7 的共温育显著增加了细胞凋亡比率(下图),这表明甚至多抗药性肿瘤细胞与化疗剂和本发明的拮抗型抗 Ax1 抗体的共处理可适用于克服抗药性。

[0158] 图 20. 研究大鼠抗 AXL 抗体和化疗剂对人黑色素瘤细胞的不依赖于锚定的生长的组合作用的软琼脂测定。人 C-8161 黑色素瘤细胞保持未处理或用大鼠拮抗型抗 AXL 抗体

11B7 以 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 的终浓度进行处理。通过与指定浓度的顺铂组合,让琼脂包埋的细胞在 0.7% 的底部琼脂层的顶部生长,进行 5 天。用 MTT 染色,然后测量集落的面积。关于详细内容参见正文。显示反映集落的总体面积的绝对数目 (A) 和基于这些数据计算的相对生长抑制 (B)。当与未处理的对照细胞相比较时,使用顺铂的温育以剂量依赖性方式导致集落生长迟滞。与在 30% 的范围内的单独的 11B7 的抑制作用相一致,与拮抗型抗 Ax1 抗体 11B7 的组合导致显著增强的顺铂 (特别地较低浓度的顺铂) 对 C-8161 黑色素瘤细胞的软琼脂生长的抑制作用。

[0159] 此外,本发明将通过下列实施例和附图来解释。

实施例

[0160] 一般注释

[0161] 下列实施例,包括进行的实验和获得的结果,仅用于举例说明目的并且不被解释为对本发明的限定。

[0162] 实施例 1 作为免疫原的过表达 AXL 的 Rat1 成纤维细胞和作为实验模型系统的过表达 AXL 的 NIH3T3 成纤维细胞的产生

[0163] 通过侧翼连接限制性核酸内切酶 EcoRI 和 BamHI 的识别元件将根据 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 参照序列 (NM_021913) 的人受体酪氨酸激酶 AXL 转录物变体 1 的全长编码序列亚克隆入 pLXSN,从而产生逆转录病毒表达载体 pLXSN-hAXL。

[0164] 为了产生特异性结合人受体酪氨酸激酶 AXL 的抗体,通过逆转录病毒基因转移产生稳定地过表达人 AXL 的 Rat1 成纤维细胞。简而言之,将 3×10^5 个 Phoenix-E 细胞接种在 60mm 培养皿中,然后使用磷酸钙法用 $2 \mu\text{g/ml}$ pLXSN 载体或 pLXSN-hAXL 转染细胞。24 小时后,用新鲜培养基替换培养基,并且将 Phoenix-E 细胞在其中温育 4 小时。收获释放 pLXSN 或 pLXSN-hAXL 亲嗜性病毒的 Phoenix-E 细胞的上清液,在聚凝胺 (4mg/ml ; Aldrich) 存在的情况下将其用于温育亚汇合的 Rat1 细胞 (2×10^5 个细胞/6cm 皿),进行 3 小时。同时,用新鲜培养基再温育 Phoenix-E 细胞,在进行另外 3 小时之后在聚凝胺 (4mg/ml ; Aldrich) 存在的情况下将其用于 Rat1 成纤维细胞的第二次感染。同样地,进行第三个感染循环。在更换培养基后,开始用 G418 选择 Rat1 细胞。通常,在选择 21 天后挑选稳定的克隆。

[0165] 繁殖一组稳定的克隆,并且通过 FACS 分析就膜定位的人 AXL 表达对其进行定量。具体地,用 10mM 的于 PBS 中的 EDTA 收获 1×10^5 个细胞,用 FACS 缓冲液 (PBS, 3% FCS, 0.4% 叠氮化钠) 清洗细胞一次,将其接种在 96 孔圆底板中。以 1,000rpm 将细胞离心 3 分钟以除去上清液,然后用小鼠抗 AXL 一抗 MAB154 (R&D Systems, $3 \mu\text{g/ml}$) 进行重悬浮。将细胞悬浮液在冰上温育 1 小时,用 FACS 缓冲液清洗 2 次,然后以 $100 \mu\text{l}$ /孔重悬浮于以 1 : 50 稀释于 FACS 缓冲液中的 PE-缀合的驴抗小鼠二抗 (Jackson) 中。将细胞悬浮液在冰上于黑暗中温育 30 分钟,用 FACS 缓冲液清洗 2 次,使用 Epics XL-MCL 流式细胞仪 (Beckman Coulter) 进行分析。

[0166] 图 1 显示用 pLXSN 空载体稳定感染的多克隆 Rat1-模拟群体和用 pLXSN-hAXL 稳定感染的 Rat1-AXL cl. 2 的 FACS 分析,并且证明 AXL 在该代表性克隆的细胞表面上过表达。

[0167] 此外,为了产生用于实验目的合适的细胞模型系统,以类似于对于 Rat1 所描述的

方法产生稳定地过表达 AXL 的 NIH3T3 成纤维细胞。简而言之,将 3×10^5 个 Phoenix-E 细胞接种在 60mm 培养皿中,然后使用磷酸钙法用 $2 \mu\text{g/ml}$ pLXSN 载体或 pLXSN-AXL cDNA 转染细胞。24 小时后,用新鲜培养基替换培养基,并将 Phoenix-E 细胞在其中温育 4 小时。收获释放 pLXSN 或 pLXSN-hAXL 亲嗜性病毒的 Phoenix-E 细胞的上清液,在聚凝胺 (4mg/ml ; Aldrich) 存在的情况下将其用于温育亚汇合的 NIH3T3 细胞 (2×10^5 个细胞 / 6cm 皿),进行 3 小时。同时,用新鲜培养基再温育 Phoenix-E 细胞,在进行另外 3 小时之后在聚凝胺 (4mg/ml ; Aldrich) 存在的情况下将其用于 NIH3T3 成纤维细胞的第二次感染。同样地,进行第三个感染循环。在更换培养基后,开始用 G418 选择 NIH3T3 细胞。通常,在选择 21 天后挑选稳定的克隆。

[0168] 繁殖一组稳定的克隆,并且通过 FACS 分析就膜定位的 AXL 表达对其进行定量。具体地,用 10mM 的在 PBS 中的 EDTA 收获 1×10^5 个细胞,用 FACS 缓冲液 (PBS, 3% FCS, 0.4% 叠氮化钠) 清洗细胞一次,将其接种在 96 孔圆底板中。以 $1,000\text{rpm}$ 将细胞离心 3 分钟以除去上清液,然后用小鼠抗 AXL 一抗 MAB154 (R&D Systems, $3 \mu\text{g/ml}$) 进行重悬浮。将细胞悬浮液在冰上温育 1 小时,用 FACS 缓冲液清洗 2 次,然后以 $100 \mu\text{l}$ / 孔重悬浮于以 1 : 50 稀释于 FACS 缓冲液中的 PE-缀合的驴抗小鼠二抗 (Jackson) 中。将细胞悬浮液在冰上于黑暗中温育 30 分钟,用 FACS 缓冲液清洗 2 次,使用 Epics XL-MCL 流式细胞仪 (Beckman Coulter) 进行分析。

[0169] 图 2 显示用 pLXSN 空载体稳定感染的多克隆 NIH3T3- 模拟群体和用 pLXSN-hAXL 稳定感染的 NIH3T3-AXL c1.7 的 FACS 分析,并且证明 AXL 在该代表性克隆的细胞表面上过表达。

[0170] 实施例 2. 大鼠抗 AXL 单克隆抗体的产生

[0171] 通过将大约 10×10^6 个 Rat1-AXL c1.2 的冷冻细胞注射 (腹膜内和皮下) 入 Lou/C 或 Long Evans 大鼠来产生单克隆大鼠抗 AXL 抗体。在 8 周间隔后,在融合前 3 天腹膜内和皮下给予最终的加强。根据标准方法进行骨髓瘤细胞系 P3X63-Ag8.653 与大鼠免疫脾细胞的融合,产生 105 个杂交瘤。2 周后,收集来自杂交瘤的第一悬浮液,并且就与 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞 (对 NIH3T3- 模拟对照细胞) 的结合在初步的 FACS 筛选中对其进行检测。进一步培养对于 AXL 结合呈阳性的克隆。从 50ml 这些克隆的上清液纯化抗体,并且就与 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞 (对 NIH3T3- 模拟对照细胞) 上的 AXL 的特异性结合对其进行再分析。在 Akt- 激酶磷酸化 ELISA 中进一步检测特异性结合 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞但不结合 NIH3T3- 模拟对照细胞的纯化的抗体,并进行确定同种型的 ELISA。为了纯化大鼠抗体,以 $5,000\text{g}$ 离心上清液 20 分钟,然后进行无菌过滤。加入 $500 \mu\text{l}$ 蛋白 G 琼脂糖 (sepharose) FF, 在 4°C 下于旋转轮 (spinning wheel) 上温育至少 1 小时。将琼脂糖离心,弃去上清液,在使用柠檬酸盐缓冲液 (100mM) pH 2.1 进行蛋白质洗脱之前用 PBS 清洗蛋白 G 基质 2 次。立即通过加入 1M Tris pH 8.0 将洗脱级分再缓冲至中性 pH, 然后对 PBS 进行透析。

[0172] 在测试的寡克隆抗体中,91 个特异性结合 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞但不结合 NIH3T3- 模拟对照细胞,9 个在相同的细胞中抑制 Gas6 诱导的 Akt 磷酸化,然而 71 个刺激 Akt 磷酸化。冷冻保存 (kryoconserve) 和亚克隆 4 个拮抗型抗体 (I11B7、I10D12、I6E7 和 I111D5, 在下列实施例中分别称为 11B7、10D12、6E7 和 11D5)、两个激动型抗体 (I11D7 和

III2A1 ;在下列实施例中称为 11D7 和 2A1) 和 1 个对照抗体 (III1D5 ;在下列实施例中称为 1D5)。

[0173]

编号	克隆	亚类	FACS 偏移 NIH3T3- pLXSN 对照	FACS 偏移 NIH3T3-hAXL- G18
1	I 1B11	2a	0,8	53,8
2	I 1C8	IgM/2a	0,9	55,0
3	I 2F3	2a	0,8	52,4
4	I 6E7	2a	1,8	62,3
5	I 7E6	2a	0,8	47,1
6	I 7G1	G1	0,7	32,0
7	I 7G11	G1	3,5	8,8
8	I 8E5	G1	1	33,0
9	I 9H3	G1	0,5	40,4
10	I 10A10	IgM/2a	0,5	32,6
11	I 10D9	2a	0,7	47,4
12	I 10D12	G1	0,5	37,5
13	I 11B7	IgM/G1/2c	0,6	36,2

[0174]

14	I 11D7	IgM/2a	0,7	9,6
15	I 12B7	2a/2c	0,8	43,6
16	II 2B8	IgM/G1	0,6	2,5
17	II 2D4	2a	0,8	46,5
18	II 6A5	G1	0,6	13,1
19	II 8A8	2a	0,6	34,6
20	III 1A10	2a	1,4	54,5
21	III 1B1	2a	7,5	24,6
22	III 1B3	IgM/2a	1,1	53,3
23	III 1B6	2b	1,1	15,3
24	III 1B11	2b	1,1	11,1
25	III 1C3	2b	1,0	24,2
26	III 1C10	-	1,1	22,1
27	III 1D2	IgM/2b	3,0	26,6
28	III 11D5	2a	1,5	8,9
29	III 1D7	2b	1,0	17,3
30	III 1D11	-	1,1	10,9
31	III 1D12	2b	1,0	7,7
32	III 1E7	-	1,1	81,4
33	III 1E11	G1/2a	1,2	44,0
34	III 1F2	G1	1,2	42,2
35	III 1F3	2b	1,1	9,0
36	III 1G2	-	1,0	30,5
37	III 1G9	2a	1,3	89,2
38	III 1G11	-	1,1	54,7
39	III 1G12	-	1,1	59,4
40	III 1H4	IgM/2b	1,0	20,0
41	III 1H8	2a/2b	1,0	10,1
42	III 1H9	2b	0,9	13,6
43	III 2A1	2a	1,0	36,0
44	III 2A2	2b	1,0	10,5
45	III 2A4	2b	1,2	11,8
46	III 2B1	2b	0,9	16,0
47	III 2B6	2a/2b	1,0	39,7
48	III 2B8	2a	1,0	53,3
49	III 2B10	2b	1,1	10,6
50	III 2C12	2a/2b	1,0	11,2
51	III 2D1	2a/2b	1,0	42,0
52	III 2D3	2b	0,9	17,8
53	III 2D8	2a	1,4	109,7
54	III 2D12	2b	1,8	16,0
55	III 2E11	2b	1,0	14,8
56	III 2G4	-	1,0	8,5
57	III 2H7	-	1,0	91,2
58	III 3A1	2a	1,5	82,5
59	III 3A2	2b	1,0	7,4
60	III 3A3	IgM/G1	2,0	49,6
61	III 3B2	-	1,0	11,3
62	III 3B3	2b	0,8	12,4
63	III 3B4	IgM	1,2	98,0
64	III 3B5	IgM/2b	1,6	74,0
65	III 3B7	2b	1,8	13,4

[0175]

66	III 3B10	2a	1,1	70,6
67	III 3C3	-	1,3	45,7
68	III 3C4	-	1,4	15,2
69	III 3C10	2a	15,2	83,3
70	III 3C12	2b	1,2	41,8
71	III 3D2	2b	0,9	11,8
72	III 3D3	2a	1,0	54,5
73	III 3E1	-	1,2	49,7
74	III 3E3	2a/2b	1,3	16,0
75	III 3E5	2a	1,1	56,4
76	III 3F1	2b	1,0	9,8
77	III 3G1	2a	1,2	57,8
78	III 3G3	2a	1,1	45,7
79	III 3G6	2a	1,1	55,9
80	III 3H4	2b	1,0	43,3
81	III 3H5	2b	1,2	11,8
82	III 4A4	IgM	1,3	8,5
83	III 4A5	2a	1,9	32,8
84	III 4A6	2a	2,5	10,4
85	III 4B1	2b	1,9	10,2
86	III 4B5	2b	1,6	6,4
87	III 4B6	2a	1,9	56,8
88	III 4B9	IgM/2b/2c	1,7	16,6
89	III 4B11	2a	1,2	58,1
90	III 4C2	-	1,6	7,4
91	III 4C8	2a	12,8	21,3
92	III 4D1	-	1,6	7,9
93	III 4D9	-	1,1	31,2
94	III 4D10	2a	3,8	7,5
95	III 4E11	2b	1,5	7,6
96	III 4F6	-	1,2	5,5
97	III 4F8	2a	1,2	51,3
98	III 4F11	IgM	1,2	12,9
99	III 4F12	2a	1,1	52,6
100	III 4G2	2a	1,0	52,4
101	III 4G11	IgM/2b	1,1	8,9
102	III 4H4	2b	3,1	61,3
103	III 4H5	2a	2,7	20,0
104	III 4H10	IgM/2a	1,3	49,2
105	III 4H11	IgM	3,3	124,0

[0176] 实施例 3. 本发明的大鼠抗 AXL 抗体不与小鼠 AXL 或人 AXL 家族的其他成员 Mer 和 Sky 交叉反应

[0177] 本实施例讨论了本发明的大鼠抗 AXL 抗体与小鼠和食蟹猴 AXL 以及与人 AXL 家族的其他成员人 Mer 和人 Sky 的交叉反应性。在将小鼠和猴 AXL 编码序列以及人 Mer 和 Sky 亚克隆入 pcDNA3 中后,将各表达构建体转染入 HEK293T 成纤维细胞。通过 FACS 分析检测本发明的大鼠抗 AXL 抗体结合此类蛋白质的能力。

[0178] 3A. 小鼠 AXL 的克隆

[0179] 在本研究中,产生小鼠 AXL 表达构建体 pcDNA3-mAXL。使用小鼠心脏 cDNA (Ambion) (作为模板) 和根据小鼠 AXL 的 National Center for Biotechnology Information (NCBI)

参照序列 (NM_009465) 的合适引物通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增小鼠 AXL 的全长编码序列。编码小鼠 AXL 的全长序列从而由两个交叠 PCR 片段 5' - 片段和 3' - 片段涵盖。用于扩增此类片段的引物如下：

[0180] 用于 5' - 片段的具有 EcoRI 识别序列的正向引物 MOUSE1：

[0181] 5' -GCG AAT TCG CCA CCA TGG GCA GGG TCC CGC TGG CCT G-3'

[0182] 用于 5' - 片段的反向引物 MOUSE2：

[0183] 5' -CAG CCG AGG TAT AGG CTG TCA CAG ACA CAG TCA G-3'

[0184] 用于 3' - 片段的正向引物 MOUSE3：

[0185] 5' -GCA CCC TGT TAG GGT ACC GGC TGG CAT ATC-3'

[0186] 用于 3' - 片段的具有 NotI 识别序列的反向引物 MOUSE4：

[0187] 5' -ATA AGA ATG CGG CCG CTC AGG CTC CGT CCT CCT GCC CTG-3'

[0188] 使用 EcoRI 和 BstEII 降解 5' - 片段, 使用 BstEII 和 NotI 降解 3' - 片段, 用 EcoRI 和 NotI 切割 pcDNA3。进行分离和纯化的片段的 3 因子连接, 将其转化入 DH5 α 细菌细胞。挑选单个集落, 在氨苄青霉素存在的情况下进行培养。使用可商购获得的质粒纯化试剂盒 (Qiagen), 纯化小鼠 AXL 表达载体 pcDNA3-mAXL, 并验证序列以用于随后瞬时转染入 HEK293T 细胞。

[0189] 3B. 食蟹猴 AXL 的克隆

[0190] 在本研究中, 产生食蟹猴 AXL 表达构建体 pcDNA3-cyAXL。使用从食蟹猴脑组织制备的 cDNA 作为模板 PCR 扩增食蟹猴 AXL 的全长编码序列。因为食蟹猴 AXL 的核苷酸序列是不可获得的, 通过假定与人 AXL 有显著同源性来设计各引物。编码食蟹猴 AXL 的全长序列从而由两个交叠 PCR 片段 5' - 片段和 3' - 片段涵盖。用于扩增此类片段的引物如下：

[0191] 用于 5' - 片段的具有 EcoRI 识别序列的正向引物 CYN01：

[0192] 5' -CGG AAT TCG CCA CCA TGG CGT GGC GGT GCC CCA G-3'

[0193] 用于 5' - 片段的反向引物 CYN02：

[0194] 5' -CTC TGA CCT CGT GCA GAT GGC AAT CTT CAT C-3'

[0195] 用于 3' - 片段的正向引物 CYN03：

[0196] 5' -GTG GCC GCT GCC TGT GTC CTC ATC-3'

[0197] 用于 3' - 片段的具有 NotI 识别序列的反向引物 CYN04：

[0198] 5' -ATA AGA ATG C GG CCG CTC AGG CAC CAT CCT CCT GCC CTG-3'

[0199] 使用 EcoRI 和 DraIII 降解 5' - 片段, 使用 DraIII 和 NotI 降解 3' - 片段, 用 EcoRI 和 NotI 切割 pcDNA3。进行分离和纯化的片段的 3 因子连接, 将其转化入 DH5 α 细菌细胞。挑选单个集落, 在氨苄青霉素存在的情况下进行培养。使用可商购获得的质粒纯化试剂盒 (Qiagen) 纯化食蟹猴 AXL 表达载体 pcDNA3-cyAXL, 并验证序列以随后瞬时转染入 HEK293T 细胞。食蟹猴的核苷酸和氨基酸序列如下：

[0200] 核苷酸序列：

[0201] ATGGCGTGGCGGTGCCCCAGGATGGGCAGGGTCCCGCTGGCCTGGTG

[0202] CTTGGCGCTGTGCGGCTGGGTGTGCATGGCCCCAGGGGCACACAGG

[0203] CTGAAGAAAGTCCTTTTCGTGGGTAACCCAGGGAATATCACAGGTGCCC

[0204] GGGGACTCACGGGCACCCTTCGGTGTGCTCAGCTCCAGGTTTCAGGGAGAG

[0205] CCCCCGAGGTACACTGGCTTCGGGACGGACAGATCCTGGAGCTCGC
[0206] GGACAGTACCCAGACCCAGGTGCCCCTGGGTGAAGATGAGCAGGATGA
[0207] CTGGATAGTGGTCAGCCAGCTCAGAATCGCCTCCCTACAGCTTTCCGAC
[0208] GCGGGACAGTACCAGTGTGTTGGTGTCTGGGACATCAGAACTTCGTGT
[0209] CCCAGCCTGGCTACGTAGGGCTGGAGGGCTTACCTTACTTCCTGGAGG
[0210] AGCCTGAGGACAGGACTGTGGCCGCCAACACCCCTTCAACCTGAGCT
[0211] GCCAAGCCCAGGGACCCCCAGAGCCCGTGGACCTACTCTGGCTCCAG
[0212] GATGCTGTCCCCCTGGCCACAGCTCCAGGTCATGGTCCCCAGCGCAAC
[0213] CTGCATGTTCCAGGGCTGAACAAGACATCCTCTTTCTCCTGCGAAGCCC
[0214] ATAACGCCAAGGGAGTCACCACATCCCGCACGGCCACCATCACAGTGC
[0215] TCCCCCAGCAGCCCCGTAACCTCCATCTGGTCTCCCGCCAACCCACGG
[0216] AGCTGGAGGTGGCTTGGACTCCAGGCCTGAGCGGCATCTACCCCTGA
[0217] CCCACTGCACCCTGCAGGCTGTGCTGTCAGACGATGGGATGGGCATCC
[0218] AGGCGGGAGAACCAGACCCCCAGAGGAGCCCTCACCTTGCAAGCAT
[0219] CTGTGCCCCCCCACCAGCTTCGGCTGGGCAGCCTCCATCCTCACACCC
[0220] CTTATCACATCCGTGTGGCATGCACCAGCAGCCAGGGCCCTCATCCT
[0221] GGACACACTGGCTTCCTGTGGAGACGCCGGAGGGAGTGCCCCTGGGC
[0222] CCCCCTGAGAACATTAGTGCCACGCGGAATGGGAGCCAGGCCTTCGTG
[0223] CATTGGCAGGAGCCCCGGGCGCCCTGCAGGGTACCCTGTTAGGGTA
[0224] CCGGCTGGCGTATCAAGGCCAGGACACCCAGAGGTGCTAATGGACAT
[0225] AGGGCTAAGGCAAGAGGTGACCCTGGAGCTGCAGGGGGACGGGTCTG
[0226] TGTCCAATCTGACAGTGTGTGTGGCAGCCTACACTGCTGCTGGGGATG
[0227] GACCCTGGAGCCTCCAGTACCCCTGGAGGCCTGGCGCCAGGGCAA
[0228] GCACAGCCAGTCCACCAGCTGGTGAAGGAACTTCAGCTCCTGCCTTC
[0229] TCGTGGCCCTGGTGGTATATACTGCTAGGAGCAGTCGTGGCCGCTGCC
[0230] TGTGTCTCATCTTGGCTCTCTTCTTGTCCACCGGCGAAAGAAGGAGA
[0231] CCCGTTATGGAGAAGTGTTGAGCCAACAGTGGAAGAGGTGAACTGG
[0232] TAGTCAGGTACCGCGTGCGCAAGTCCTACAGTCGCCGGACCACTGAAG
[0233] CTACCTTGAACAGCCTGGGCATCAGTGAAGAGCTGAAGGAGAAGCTGC
[0234] GGGATGTGATGGTGGACCGGCACAAGGTGGCCCTGGGGAAGACTCTG
[0235] GGAGAAGGAGAGTTTGGAGCCGTGATGGAAGGCCAGCTCAACCAGGA
[0236] CGACTCCATCCTCAAGGTGGCTGTGAAGACAATGAAGATTGCCATCTGC
[0237] ACAAGGTCAGAGCTGGAGGATTTCTGAGTGAAGCAGTCTGCATGAAG
[0238] GAATTCGACCATCCCAATGTCATGAGGCTCATCGGTGTCTGTTCCAGG
[0239] GTTCTGAACGAGAGAGCTTTCCAGCACCTGTGGTCATCTTACCTTTCAT
[0240] GAAGCATGGAGACCTACACAGCTTCCTCCTCTATTCCCGGCTTGGGGA
[0241] CCAGCCAGTGTACCTGCCCCTCAGATGCTAGTGAAGTTCATGGCGGA
[0242] CATCGCCAGTGGCATGGAATATCTGAGTACCAAGAGATTCATACACCGG
[0243] GACCTGGCGGCCAGGAAGTGCATGCTGAATGAGAACATGTCCGTGTGT

[0244] GTGGCGGACTTCGGGCTCTCCAAGAAGATCTACAACGGGGACTACTAC
[0245] CGCCAGGGACGTATCGCCAAGATGCCAGTCAAGTGGATTGCCATTGAG
[0246] AGTCTAGCTGACCGTGTCTACACGAGCAAGAGTGATGTGTGGTCCCTTC
[0247] GGGGTGACAATGTGGGAGATTGCCACAAGAGGCCAAACCCCATATCCA
[0248] GGCGTGGAGAACAGCGAGATTTATGACTATCTGCGCCAGGGAAAATCGC
[0249] CTGAAGCAGCCTGCGGACTGTCTGGATGGACTGTATGCCTTGATGTGC
[0250] CGGTGCTGGGAGCTAAATCCCCAGGACCGGCCAAGTTTTACAGAGCTG
[0251] CGGGAAGATTTGGAGAACACACTGAAGGCCTTGCCCTCCTGCCCAGGAG
[0252] CCTGACGAAATCCTCTATGTCAACATGGATGAAGGTGGAGGTTATCCTG
[0253] AACCTCCCGGCGCTGCTGGAGGAGCTGACCCCCCAACCCAGCTAGACC
[0254] CTAAGGATTCTGTAGCTGCCTCACTTCGGCTGAGGTCCATCCTGCTGG
[0255] ACGCTATGTCCTCTGCCCTTCCACAGCCCCCTAGCCCCGCTCAGCCTGC
[0256] TGATAGGGGCTCCCCAGCAGCCCCAGGGCAGGAGGATGGTGCC
[0257] 氨基酸序列：
[0258] MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWVCMAPRGTAEESEPFVGNPGNITGAR
[0259] GLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDQGILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIV
[0260] VSQRLIASLQLSDAGQYQCLVFLGHQNFVSQPGYVGLGLPYFLEEPEDRT
[0261] VAANTPFNLSCQAQGPPEPVDL LWLQDAVPLATAPGHGPQRNLHVPGLNK
[0262] TSSFSCAEHNAKGVTTSRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTLEVAVTPGLS
[0263] GIYPLTHCTLQAVLSDDGMIQAGEPDPPEEPLTLQASVPPHQLRLGSLHP
[0264] HTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAFV
[0265] HWQEPRAPLQGTLGRLAYQGGDTPEVLMDIGLRQEVTLLELQGDGSVSN
[0266] LTVCAVAAITAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKETSAPAFSWPW
[0267] WYILLGAWAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELWRYRVRK
[0268] SYSRRTTEATLNSLGI SEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEG
[0269] QLNQDDSIKLVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCF
[0270] QGSERESFPAPWILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPYYLPTQMLVKFMADI
[0271] ASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQG
[0272] RIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVVSFGVTMWEIATRGTPTYPGVENSEI
[0273] YDYLRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLK
[0274] ALPPAQEPDEILYVNMDGEGGYPEPPGAAGGADPPTQLDPKDSCSCLTSA
[0275] EVHPAGRYVLCSTAPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA
[0276] 3C. 人 Mer 的克隆

[0277] 在本研究中,产生人 Mer 表达构建体 pcDNA3-hMer。通过用 EcoRI 和 XbaI 切割载体 pCMV6-XL4- 人 Mer (Origene#TC116132) 获得人 Mer 的全长编码序列。在用相同的限制性内切核酸酶降解 pcDNA3 后,连接两个片段以产生 pcDNA3-hMer。为了导入 Kozak 共有序列,使用根据人 Mer 的 NCBI 参照序列 (NM_006343) 的合适引物 PCR 扩增 pcDNA3-hMer 中人 Mer 编码序列的 5' 区域。用于扩增该片段的引物如下：

[0278] 具有 EcoRI 识别序列和 Kozak 共有序列的正向引物 MER1：

[0279] 5' -CGG AAT TCG CCA CCA TGG GGC CGG CCC CGC TGC CGC-3'

[0280] 用于 5' - 片段的反向引物 MER2 :

[0281] 5' -TCG GCT GCC ATT CTG GCC AAC TTC C-3'

[0282] 使用 EcoRI 和 EcoRV 降解 PCR 产物和 pcDNA3-hMer, 然后连接以产生 pcDNA3-Kozak-hMer, 其中全长人 Mer 编码序列之前为 Kozak 共有序列。转化入 DH5 α 细菌细胞, 挑选单个集落, 在氨苄青霉素存在的情况下进行培养。使用可商购获得的质粒纯化试剂盒 (Qiagen) 纯化 pcDNA3-Kozak-hMer 表达载体, 并验证序列以随后瞬时转染入 HEK293T 细胞。

[0283] 3D. 人 Sky 的克隆

[0284] 在本研究中, 产生人 Sky 表达构建体 pcDNA3-hSky。使用载体 pCMV6-XL4- 人 Sky (Origene#MG1044_A02) (作为模板) 和根据人 Sky 的 NCBI 参照序列 (NM_006293) 的合适引物 PCR 扩增人 Sky 的全长编码序列。用于扩增的引物如下:

[0285] 具有 EcoRI 识别序列的正向引物 SKY1 :

[0286] 5' -CGG AAT TCG CCA CCA TGG CGC TGA GGC GGA GC-3'

[0287] 具有 XhoI 识别序列的反向引物 SKY2 :

[0288] 5' -GCC CTC GAG CTA ACA GCT ACT GTG TGG CAG TAG-3'

[0289] 使用 EcoRI 和 XhoI 降解 PCR 产物和 pcDNA3, 然后连接以产生 pcDNA3-hSky 表达载体。转化入 DH5 α 细菌细胞, 挑选单个集落, 在氨苄青霉素存在的情况下进行培养。使用可商购获得的质粒纯化试剂盒 (Qiagen), 纯化 pcDNA3-hSky 表达载体, 并验证序列以随后瞬时转染入 HEK293T 细胞。

[0290] 3E. 小鼠 AXL、食蟹猴 AXL、人 Mer 和人 Sky 的转染和表达

[0291] 为了瞬时表达小鼠 AXL、食蟹猴 AXL、人 Mer 或人 Sky, 使用磷酸钙法用 pcDNA3 空载体、pcDNA3-hAXL、pcDNA3mAXL、pcDNA3-cyAXL、pcDNA3-hMer 或 pcDNA3-hSky 瞬时转染 HEK293T 细胞。简而言之, 在转染前, 将 3×10^6 个 HEK293T 细胞于 16ml 培养基中接种在 15cm 细胞组织培养皿上, 在 7% CO₂ 和 37°C 下培养 30 个小时。将 32 μ g 各表达构建体或空载体的 DNA (于 720 μ l 的 ddH₂O 中) 与 2.5M CaCl₂ 和 2xBBS (pH 6.96) 混合, 在室温下保持 10 分钟。轻轻地向细胞培养物中加入溶液, 在 3% CO₂ 和 37°C 下温育 8 小时。然后用新鲜培养基替换培养基, 将细胞在 7% CO₂ 和 37°C 下培养 24 小时。

[0292] 3F. 就交叉反应性检测大鼠抗 AXL 抗体的 FACS 分析

[0293] 为了进行 FACS 分析, 使用 10mM 的于 PBS 中的 EDTA 收获 2×10^5 个细胞, 用 FACS 缓冲液 (PBS, 3% FCS, 0.4% 叠氮化钠) 清洗 1 次, 然后接种在 96 孔圆底板上。为了除去上清液, 以 1000rpm 离心板 3 分钟, 将细胞重悬浮于 10 μ g/ml 同种型对照抗体 1D5 以及抗 AXL 11D5、11B7、10D12、6E7、2A1、11D7 和 12B7 一抗溶液 (100 μ l/孔) 中。在冰上温育 1 小时后, 用冷冻的 FACS 缓冲液清洗细胞 2 次, 用以 1 : 50 稀释于 FACS 缓冲液 (100 μ l/孔) 中的 PE 缀合的驴抗大鼠 (Jackson) 二抗或 PE 缀合的驴抗小鼠二抗 (用于对照) 重悬浮细胞。免受光照, 将细胞在冰上温育 30 分钟, 用 FACS 缓冲液清洗 2 次, 然后使用 EpicsXL-MCL 流式细胞仪 (Beckman Coulter) 进行分析。

[0294] 图 3 显示该实验的代表性结果。除了显示与小鼠 AXL 以及人 Mer 和 Sky 的中度交叉反应性的 12B7 外, 本发明的其他抗 AXL 抗体没有一个与此类分子交叉反应。相反地, 所

有测试的本发明的大鼠抗 AXL 抗体与食蟹猴 AXL 交叉反应。

[0295] 实施例 4. 本发明的大鼠抗 AXL 抗体体外抑制配体诱导的 AXL 磷酸化

[0296] 进行 ELISA 实验以研究本发明的大鼠抗 AXL 抗体是否能够阻止配体 Gas6- 介导的 AXL 的激活。通过增加的受体酪氨酸磷酸化检测 Gas6- 介导的 AXL 激活。简而言之, 在第 1 天, 将 3×10^4 个细胞 / 孔于正常生长培养基中接种在平底 96 孔板中。第二天, 用无血清培养基替换生长培养基以饥饿细胞过夜, 进行 24 小时。同样地, 还在 4°C 下用 $2 \mu\text{g/ml}$ 的在 PBS 中的小鼠抗磷酸酪氨酸抗体 4G10 包被黑色 Maxi-Sorp 96 孔板 (Nunc) 过夜。在第 3 天, 除去 4G10 抗体溶液, 用 PBS, 0.5% BSA 在室温下封闭 Maxi-Sorp 孔, 进行至少 4 小时。平行地, 用 $10 \mu\text{g/ml}$ 的小鼠对照抗体 72A1 以及大鼠抗 AXL 抗体 2A1、11D7、11D5、11B7、6E7 和 10D12 在 37°C 下预温育细胞 1 小时, 然后用或不用 400ng/ml Gas 6 (R&D Systems) 在 37°C 下处理 10 分钟。然后弃去培养基, 在冰上于补充有磷酸酶和蛋白酶抑制剂 ($10\text{mM Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1mM 苯甲基磺酰氟, 1mM 原钒酸盐, 1mM NaF 和 0.5% 抑肽酶) 的裂解缓冲液 (50mM HEPES, $\text{pH } 7.5$, 150mM NaCl , 1mM EDTA , 10% 甘油和 1% Triton X-100) 中裂解细胞 30 分钟。同时除去封闭缓冲液, 在将裂解物转移和于 4°C 下温育过夜之前, 用清洗缓冲液 (PBS, 0.05% Tween 20) 清洗 Maxi-Sorp 板 6 次。在第 4 天用清洗缓冲液清洗板 6 次后, 在室温下用 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 的在 PBS 中的生物素化的大鼠抗 AXL 抗体 12B7 温育孔, 进行 2 小时。用清洗缓冲液清洗板 6 次, 向各孔中加入以 1 : 4,000 稀释于 PBS 中的 AP 缀合的链霉抗生物素蛋白 (Chemicon#SA110), 在室温下温育 30 分钟。之后, 用清洗缓冲液清洗孔 6 次, 加入 AttoPhos 底物溶液 (Roche#11681982)。通过使用 Victor 板读取器 (Perkin Elmer), 在 430nm 的激发波长和 580nm 的发射波长处收集各孔的荧光。

[0297] 图 4 显示该实验对于 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞 (A) 和 NCI-H292 肺癌细胞 (B) 的代表性结果。本发明的大鼠抗 AXL 抗体 11B7、11D5、6E7 和 10D12 能够阻止或减少配体介导的 AXL 激活, 如通过减少的磷酸化显示的, 从而被认为是拮抗型抗 AXL 抗体。相反地, 本发明的大鼠抗 AXL 抗体 2A1 和 11D7 刺激基础 AXL 激活 (如通过增加的磷酸化显示的), 没有显著减少配体介导的 AXL 激活, 从而被认为是激动型抗 AXL 抗体。在肺癌细胞系 CaLu-1 和 CaLu-6、乳腺癌细胞系 Hs578T 和 MDA-MB-231、前列腺癌细胞系 PC-3、胰腺癌细胞系 PANC-1、黑色素瘤细胞系 C-8161、卵巢癌细胞系 SkOV-3 和 SkOV-8、胶质母细胞瘤细胞系 SF-126、宫颈癌细胞系 CaSki 以及胃癌细胞系 Hs746T 和 MKN-1 中对于相同组的抗体观察到相似的作用。

[0298] 实施例 5. 本发明的大鼠抗 AXL 抗体体外抑制配体诱导的 p42/p44MAP- 激酶磷酸化

[0299] 然后, 进行 ELISA 实验以研究本发明的大鼠抗 AXL 抗体是否能够阻止配体 Gas6 介导的 p42/p44MAP- 激酶的激活。通过增加的蛋白质 (Thr202/Tyr 204) 磷酸化检测 Gas6 介导的 p42/p44MAP- 激酶的激活。简而言之, 在第 1 天, 将 2×10^4 个细胞 / 孔接种在平底 96 孔板中。第二天, 用无血清培养基替换正常生长培养基以饥饿细胞 36 小时。之后, 用 $10 \mu\text{g/ml}$ 的同种型对照抗体 1D5 以及大鼠抗 AXL 抗体 11D5、11B7 和 2A1 在 37°C 下预温育细胞 1 小时, 然后用或不用 400ng/ml Gas6 (R&D Systems) 在 37°C 下处理 10 分钟。弃去培养基, 用 4% 的在 PBS ($\text{pH } 7.5$) 中的甲醛在室温下固定细胞 30 分钟。除去甲醛溶液, 用清洗缓冲液 (PBS, 0.1% Tween20) 清洗细胞 2 次。用 1% H_2O_2 , 0.1% NaN_3 (于清洗缓冲液中) 猝灭细

胞,在室温下温育 20 分钟。之后,除去猝灭溶液,用清洗缓冲液清洗细胞 2 次,然后用 PBS, 0.5% BSA 在 4℃ 下进行封闭,进行 4 小时。加入以 1 : 500 稀释于 PBS,0.5% BSA,5mM EDTA 中的抗磷酸-p42/p44MAP 激酶 (Thr202/Tyr204) 一抗 (多克隆兔 ;CellSignaling #9101), 在 4℃ 下过夜。在第 4 天,除去抗体溶液,用清洗缓冲液清洗板 3 次。然后向各孔中加入以 1 : 2,500 稀释于 PBS,0.5% BSA 中的 HRP 缀合的抗兔二抗 (Dianova #111-036-045),在室温下温育 1.5 小时。用清洗缓冲液清洗板 3 次,用 PBS 清洗 2 次,每次 5 分钟。加入四甲基联苯胺 (TMB,Calbiochem),在 620nm 处进行监控。通过加入 100 μ l 250nM HCl 终止反应,使用 Vmax 板读取器 (ThermoLab Systems),在 450nm 处 (620nm 的参照波长) 读取吸光度。

[0300] 图 5 显示对于宫颈癌细胞系 CaSki 的该实验的代表性结果。本发明的大鼠抗 AXL 抗体 11B7 和 11D5 能够减少配体介导的 p42/p44MAP- 激酶的激活,如通过减少的磷酸化显示的,从而被认为是拮抗型抗 AXL 抗体。相反地,本发明的大鼠抗 AXL 抗体 2A1 刺激基础 p42/p44MAP- 激酶的激活 (如通过增加的磷酸化显示的),不减少配体介导的 p42/p44MAP 激酶的激活,从而被认为是激动型抗 AXL 抗体。在乳腺癌细胞系 Hs578T 和肺癌细胞系 NCI-H292 中对于相同组的抗体观察到相似的作用。

[0301] 实施例 6. 本发明的大鼠抗 AXL 抗体体外抑制配体诱导的 Akt 磷酸化

[0302] 此外,进行 ELISA 实验以研究本发明的大鼠抗 AXL 抗体是否能够阻止配体 Gas6 介导的 Akt- 激酶的激活。通过增加的蛋白质 (Ser473) 磷酸化检测 Gas6 介导的 Akt- 激酶的激活。简而言之,在第 1 天,将 2×10^4 个细胞 / 孔接种在平底 96 孔板中。第二天,用低血清 (对于 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞,使用 DMEM,0.5% FCS) 或无血清 (对于癌细胞系) 培养基替换正常生长培养基以饥饿细胞 36 小时。之后,用 10g/ml 的同种型对照抗体 1D5 以及大鼠抗 AXL 抗体 11D5、11B7 和 2A1 在 37℃ 下预温育细胞 1 小时,然后用或不用 400ng/ml Gas6 (R&D Systems) 在 37℃ 下处理 10 分钟。弃去培养基,用 4% 的在 PBS (pH 7.5) 中的甲醛在室温下固定细胞 30 分钟。除去甲醛溶液,用清洗缓冲液 (PBS,0.1% Tween20) 清洗细胞 2 次。用 1% H_2O_2 ,0.1% NaN_3 (于清洗缓冲液中) 猝灭细胞,在室温下温育 20 分钟。之后,除去猝灭溶液,用清洗缓冲液清洗细胞 2 次,然后用 PBS,0.5% BSA 在 4℃ 下进行封闭,进行 4 小时。加入以 1 : 500 稀释于 PBS,0.5% BSA,5mM EDTA 中的抗磷酸-Akt (Ser473) 一抗 (多克隆兔 ;Cell Signaling #9271),在 4℃ 下过夜。在第 4 天,除去抗体溶液,用清洗缓冲液清洗板 3 次。然后向各孔中加入以 1 : 2,500 稀释于 PBS,0.5% BSA 中的 HRP 缀合的抗兔二抗 (Dianova #111-036-045),在室温下温育 1.5 小时。用清洗缓冲液清洗板 3 次,用 PBS 清洗 2 次,每次 5 分钟。加入四甲基联苯胺 (TMB,Calbiochem),在 620nm 处进行监控。通过加入 100 μ l 250nM HCl 终止反应,使用 Vmax 板读取器 (Thermo Lab Systems),在 450nm 处 (620nm 的参照波长) 读取吸光度。

[0303] 图 6 显示对于 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞 (A) 和 CaLa-1 肺癌细胞 (B) 的该实验的代表性结果。本发明的大鼠抗 AXL 抗体 11B7 和 11D5 能够阻止或减少配体介导的 Akt- 激酶的激活,如通过减少的磷酸化显示的,从而被认为是拮抗型抗 AXL 抗体。相反地,本发明的大鼠抗 AXL 抗体 2A1 刺激基础 Akt- 激酶的激活 (如通过增加的磷酸化显示的),不减少配体介导的 Akt- 激酶的激活,从而被认为是激动型抗 AXL 抗体。在肺癌细胞系 NCI-H292、乳腺癌细胞系 Hs578T 和 MDA-MB-231、前列腺癌细胞系 PC-3、胰腺癌细胞系 PANC-1、黑色素瘤细胞系 C-8161、卵巢癌细胞系 SkOV-3 和 SkOV-8、膀胱癌细胞系 TCC-Sup 以及纤维肉瘤细

胞系 HT1080 中对于相同组的抗体观察到相似的作用。

[0304] 实施例 7. 本发明的大鼠和嵌合抗 AXL 抗体体外抑制配体诱导的 Akt 磷酸化至相似程度

[0305] 作为本发明的部分,产生大鼠抗 AXL 抗体 11B7 和 11D5 的嵌合衍生物(参见下文)。为了研究本发明的大鼠抗 AXL 抗体和本发明的相应嵌合抗 AXL 抗体是否能够阻止 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞中配体 Gas6- 介导的 Akt- 激酶的激活至相似的程度,进行 ELISA 实验。通过减少的蛋白质(Ser473)磷酸化检测抗体介导的 Akt- 激酶的抑制。简而言之,在第 1 天,将 2×10^4 个细胞/孔接种在平底 96 孔板中。第二天,用低血清培养基(DMEM, 0.5% FCS) 替换正常生长培养基以饥饿细胞 36 小时。之后,用 50ng/ml、100ng/ml、300ng/ml、500ng/ml 和 1 μ g/ml 的大鼠抗 AXL 抗体 11B7 或嵌合抗 AXL 抗体 ch11B7 以及 50ng/ml、100ng/ml、300ng/ml、500ng/ml、1 μ g/ml、5 μ g/ml 和 10 μ g/ml 的大鼠抗 AXL 抗体 11D5 或嵌合抗 AXL 抗体 ch11D5 在 37°C 下预温育细胞 1 小时,然后用或不用 400ng/ml Gas6(R&D Systems) 在 37°C 下处理 10 分钟。弃去培养基,用 4% 的在 PBS(pH 7.5) 中的甲醛在室温下固定细胞 30 分钟。除去甲醛溶液,用清洗缓冲液(PBS, 0.1% Tween20) 清洗细胞 2 次。用 1% H_2O_2 , 0.1% NaN_3 (于清洗缓冲液中) 猝灭细胞,在室温下温育 20 分钟。之后,除去猝灭溶液,用清洗缓冲液清洗细胞 2 次,然后用 PBS, 0.5% BSA 在 4°C 下进行封闭,进行 4 小时。加入以 1 : 500 稀释于 PBS, 0.5% BSA, 5mM EDTA 中的抗磷酸-Akt(Ser473) 一抗(多克隆兔;Cell Signaling #9271),在 4°C 下过夜。在第 4 天,除去抗体溶液,用清洗缓冲液清洗板 3 次。然后向各孔中加入以 1 : 2,500 稀释于 PBS, 0.5% BSA 中的 HRP 缀合的抗兔二抗(Dianova #111-036-045),在室温下温育 1.5 小时。用清洗缓冲液清洗板 3 次,用 PBS 清洗 2 次,每次 5 分钟。加入四甲基联苯胺(TMB, Calbiochem),在 620nm 处进行监控。通过加入 100 μ l 250nM HCl 终止反应,使用 Vmax 板读取器(Thermo Lab Systems),在 450nm 处(620nm 的参照波长) 读取吸光度。?

[0306] 图 7 显示本发明的大鼠抗 AXL 抗体 11B7 和嵌合抗 AXL 抗体 ch11B7 以及本发明的大鼠抗 AXL 抗体 11D5 和嵌合抗 AXL 抗体 ch11D5 能够抑制配体介导的 Akt 激酶的激活至相似的程度,如通过减少的磷酸化显示的。因此,与它们各自的大鼠对应物相比,嵌合抗 AXL 抗体 ch11B7 和 ch11D5 保持活性。

[0307] 实施例 8. 本发明的拮抗型大鼠抗 AXL 抗体彼此竞争相同的或结构上相关的表位并且不与本发明的激动型大鼠抗 AXL 抗体共有结合位点

[0308] 检查本发明的抗 AXL 抗体以确定它们是否彼此竞争 AXL-ECD 结构域上的相似结合表位。因此在竞争 ELISA 中确定生物素化的抗 AXL 抗体与用抗 AXL 抗体预温育的 AXL-ECD 结构域包被的板的结合。简而言之,按照厂商的说明书用碘基-NHS-生物素(Pierce #21217) 生物素化 30 μ g 的同种型对照抗体 1D5 以及大鼠抗 AXL 抗体 11B7、11D5、6E7、10D12、11D7 和 2A1,然后使用 Micro-BioSpin P6 柱 SSC(BIO-RAD#732-6200) 进行纯化。在第 1 天,以 100 μ l/孔用 1 μ g/ml 的在 PBS 中的人 AXL-ECD(R&D Systems #154-AL) 在 4°C 下包被黑色 96 孔 Maxi-Sorp 板(Nunc) 过夜。在第 2 天,用封闭缓冲液(PBS, 1% BSA 0.05% TWEEN-20) 在室温下封闭包被的 Maxi-Sorp 板(250 μ l/孔),进行 2 小时,然后用 PBS 或 10 μ g/ml 的在封闭缓冲液中的未生物素化的同种型对照抗体 1D5 以及未生物素化的大鼠抗 AXL 抗体 11B7、11D5、6E7、10D12、11D7 或 2A1(100 μ l/孔) 在室温下温育 1 小时。弃去抗体溶液,不

进行清洗,以 $100\ \mu\text{L}$ /孔加入 PBS 或 $0.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的在封闭缓冲液中的生物素化的同种型对照抗体 1D5 以及生物素化的大鼠抗 AXL 抗体 11B7、11D5、6E7、10D12、11D7 或 2A1,在室温下温育 15 分钟。在用清洗缓冲液 (PBS, 0.1% TWEEN-20) 清洗 6 次后,以 $80\ \mu\text{L}$ /孔加入以 1:4,000 稀释于封闭缓冲液中的 AP 缀合的链霉抗生物素蛋白 (Chemicon #SA110),在室温下温育 20 分钟,用清洗缓冲液再清洗 6 次,最后用 PBS 清洗 1 次。为了进行检测,以 $100\ \mu\text{L}$ /孔加入 Attophos 底物溶液 (Roche #11681982)。使用 Victor 板读取器 (Perkin Elmer),在 430nm 的激发波长和 580nm 的发射波长处收集各孔的荧光。

[0309] 图 8 显示该分析的代表性结果。本发明的拮抗型抗 AXL 抗体 11B7、11D5、6E7 和 10D12 彼此竞争相同的或结构上相邻的表位。本发明的两个激动型抗体 11D7 和 2A1 各自识别不同的表位,从而不相互排斥。此外,11D7 和 2A1 不与拮抗型抗体竞争对 AXL-ECD 的结合。对照抗体 1D5 不结合 AXL-ECD。

[0310] 实施例 9. 本发明的大鼠和嵌合抗 AXL 抗体体外抑制肺癌细胞的迁移和增殖

[0311] 为了检查不同细胞和培养条件的迁移和增殖率,体外伤口愈合/划痕测定已沿用多年。此类测定通常包括首先培养汇合细胞单层。然后破坏小区域,通过用例如移液器吸头划线穿过层来破坏一群细胞或使其移位。然后在一段时间内用显微镜检查缺口(细胞移入和填充被破坏的区域(“愈合”))。简而言之,以 1.5×10^6 个细胞/孔将 NCI-H292 肺癌细胞接种在 12 孔培养板上,并且在正常生长培养基 (RPMI, 10% FCS) 中进行培养。8 小时后,用 PBS 漂洗细胞,在低血清培养基 (RPMI, 0.5% FCS) 中饥饿细胞过夜,进行 24 小时。使用无菌 $200\ \mu\text{L}$ 移液器吸头划穿汇合的 NCI-H292 细胞单层,每孔产生 3 个分开的均一的伤口。用 PBS 轻轻地漂洗细胞,将其与不含添加物的、含有 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的同种型对照抗体 1D5、拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11D5、11B7、6E7 或 10D12、嵌合抗 AXL 抗体 chn11D5 IgG2 和 chn11B7 IgG2、激动型大鼠抗 AXL 抗体 2A1 和 11D7 以及 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Erbitux 或 $5\ \mu\text{M}$ 的 Sutent 的低血清培养基 (RPMI, 0.5% FCS) 一起温育以进行比较。允许细胞迁移入被清除的区域,进行 24 小时,用 PBS 清洗 1 次,用冰冷的甲醇 (100%) 在 -20°C 下固定细胞。在用结晶紫 (0.5% 于 20% 甲醇中) 对细胞染色后,用水漂洗,然后干燥过夜,拍摄伤口照片。

[0312] 图 9 显示对于 NCI-H292 肺癌细胞的该实验的代表性结果。与同种型对照抗体相比较,本发明的拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11D5、11B7、6E7 和 10D12 以及本发明的嵌合抗 AXL 抗体 chn11D5 IgG2 和 chn11B7 IgG2 减少了被清除区域的重新进入,然而本发明的激动型大鼠抗 AXL 抗体 2A1 和 11D7 导致伤口的完全闭合。在卵巢癌细胞系 SkOv-3 或胃癌细胞系 MKN-1 中对于相同组的抗体观察到相似的结果。

[0313] 实施例 10. 本发明的大鼠抗 AXL 抗体体外抑制配体诱导的 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞的迁移

[0314] 进行移行实验 (transmigration experiment) 以研究本发明的抗体是否阻止细胞迁移。为此,在第 1 天的早晨,将 NIH3T3-AXL c1.7 细胞于正常生长培养基中接种在 15cm 培养皿上,在傍晚用低血清培养基 (DMEM, 0.5% FCS) 更换所述培养基以饥饿细胞 36 小时。第 2 天,用 $10\ \mu\text{g}$ 胶原 I/ mL 0.1M 乙酸在 37°C 下包被 FluoroBlock 96 孔板 (Becton Dickinson #351164, $8\ \mu\text{m}$ 孔大小) 过夜。在第 3 天,用无血清培养基 (DMEM, 0% FCS, 0.1% BSA) 替换低血清培养基 (DMEM, 0.5% FCS),进行另外 4 小时。使用 10mM 的在 PBS 中的 EDTA 收获细胞,以 4×10^5 个细胞/ mL 的细胞密度和 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗体浓度用大鼠抗 AXL 抗体 4A6、11B7

或 2A1 预温育细胞,进行 45 分钟。然后将 50 μ l 细胞悬浮液 (20,000 个细胞)/孔置于 FluoroBlock 96 孔板的顶部小室中,在底部小室中每孔使用 225 μ l 具有或不具有 400ng/ml 小鼠 Gas6 (R&D Systems) 的培养基 (DMEM, 0% FCS, 0.1% BSA)。让细胞在 37°C 下迁移 7 小时,之后用 4.2 μ M 的在 PBS, 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 中的钙黄绿素 -AM (Molecular Probes #C3099) 在 37°C 染色 1 小时。使用 Victor 板读取器 (Perkin Elmer), 在 530nm 波长处测量各孔的荧光。

[0315] 图 10 显示本发明的拮抗型抗 AXL 抗体 11B7 减少 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞的基础和 Gas6 诱导的迁移,然而本发明的激动型大鼠抗 AXL 抗体 2A1 增加 NIH3T3-AXL c1.7 细胞的配体诱导的迁移和特别地基础迁移。抗体 4A6 不影响细胞迁移。

[0316] 实施例 11. 本发明的大鼠抗 AXL 抗体体外抑制配体诱导的 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞的增殖

[0317] 进行体外实验以测定本发明的大鼠抗 AXL 抗体抑制 Gas6 诱导的细胞增殖的能力。为此,以 2,500 个细胞/孔将 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞于含有 FCS 的培养基中接种在 96 孔板上,进行过夜。第 2 天,在低血清培养基 (DMEM, 0.5% FCS) 中饥饿细胞 10 小时,然后用在 DMEM, 0.5% FCS 中的 20 μ g/ml 的小鼠对照抗体 72A1、拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11D5 和 11B7 以及激动型抗体 2A1 在 37°C 下预温育细胞 1 小时。通过向抗体溶液中直接加入配体,用或不用 400ng/ml 小鼠 Gas6 (R&D Systems) 处理细胞,然后让细胞生长 96 小时。加入 AlamarBlue™ (BIOSOURCE #DAL1100), 在黑暗中于 37°C 下进行温育。每 30 分钟在 590nm 处测量吸光度。在加入 AlamarBlue™ 后 4 小时采集数据。

[0318] 图 11 显示该实验的代表性结果。本发明的拮抗型抗 AXL 抗体 11D5 和 11B7 阻止 Gas6 诱导的 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞的增殖,然而本发明的激动型大鼠抗 AXL 抗体 2A1 增加 NIH3T3-AXL c1.7 细胞的配体诱导的增殖和特别地基础增殖。

[0319] 实施例 12. 本发明的大鼠抗 AXL 抗体体外抑制配体介导的血清饥饿的 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞的抗细胞凋亡

[0320] 细胞凋亡的诱导和胱天蛋白酶的激活可由于多种刺激 (包括生长因子撤离、对化疗剂或辐射的暴露或 Fas/Apo-1 受体介导的细胞死亡过程的起始) 而引起。已显示 Gas6-AXL 相互作用参与保护许多细胞类型免受细胞凋亡,包括血清饥饿的 NIH3T3 成纤维细胞 (Goruppi 等人, 1996, Oncogene 12, 471-480) 或肺内皮细胞 (Healy 等人, 2001, Am. J. Physiol., 280, 1273-1281)。在本实施例中,我们检查本发明的大鼠抗 AXL 抗体是否干扰 Gas6 介导的血清饥饿的 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞的抗细胞凋亡,从而诱导细胞凋亡。因此通过测量细胞胱天蛋白酶 -3/7 活性来测定细胞凋亡率。为此,将 NIH3T3-AXL c1.7 细胞以 1.5×10^3 个细胞/孔的密度接种在黑色透明底 96 孔板 (100 μ l/孔) 中。第 2 天,用低血清培养基 (DMEM, 0.5% FCS) 替代正常生长培养基以饥饿细胞过夜,进行 24 小时。次日,以 80 μ g/ml 在 DMEM, 0% FCS, 0.01% BSA 中制备同种型对照抗体 ID5、拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11B7 和 11D5 以及激动型大鼠抗 AXL 抗体 11D7 和 2A1 的抗体溶液。用 PBS 清洗细胞,用 60 μ l DMEM, 0% FCS, 0.01% BSA 覆盖细胞,然后加入 10 μ l 各抗体溶液。在 37°C 下温育 1 小时后,加入 10 μ l 具有或不具有 3.2 μ g/ml 小鼠 Gas6 (R&D Systems) 的 DMEM, 0% FCS, 0.01% BSA (抗体和 Gas6 的终浓度分别为 10 μ g/ml 和 400ng/ml), 将细胞在 37°C 下温育另外 5 小时。下列步骤是对 Apo-ONE Homogenous 胱天蛋白酶 -3/7 测定 (Promega,

G7791) 的技术揭示。简而言之,从培养箱中取出培养板,让其在室温下平衡 20 分钟。将 60 μ l Apo-ONE 底物和 6ml 缓冲液解冻,组合,然后加入至样品中 (75 μ l/孔)。轻轻摇动孔的内容物进行 30 秒,并且保护其免受光照,在室温下温育 1 小时。使用 Victor 板读取器 (Perkin Elmer),在 485nm 的激发波长和 530nm 的发射波长处测量各孔的荧光。

[0321] 图 12 显示该实验的代表性结果。与同种型对照抗体相比较,本发明的拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11B7 和 11D5 减少了 Gas6 介导的血清饥饿的 NIH3T3-AXL c1.7 成纤维细胞的抗细胞凋亡,从而诱导细胞凋亡。相反地,无论 Gas6 存在与否,本发明的激动型大鼠抗 AXL 抗体 2A1 和 11D7 都强烈地诱导血清饥饿的 NIH3T3-AXL c1.7 细胞的抗细胞凋亡,从而抑制细胞凋亡。

[0322] 实施例 13. 本发明的大鼠抗 AXL 抗体体外抑制基于球状体的细胞血管生成

[0323] AXL 是多种血管生成行为 (包括内皮细胞迁移、增殖和体外管形成) 的关键调节剂 (Holland 等人, Cancer Res :65,9294-9303,2005)。因此,就对 VEGF-A 诱导的 HUVEC- 球状体的血管出芽的抑制作用检测本发明的大鼠抗 AXL 单克隆抗体 11B7 和 11D5。按照最初公开的方案 (Korff 和 Augustin :J Cell Sci 112 :3249-58,1999) 的改进方案进行实验。简而言之,如所描述的 (Korff 和 Augustin :J Cell Biol143 :1341-52,1998),通过用移液器将 500 个人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 于悬滴中转移至塑料皿上,让其球状聚集过夜来制备球状体。然后将 50 个 HUVEC 球状体接种于 0.9ml 的胶原溶液 (2mg/ml) 中,并用移液器转移至 24 孔板的单独的孔中以让其聚合。在聚合前将浓度不断减小的大鼠抗 AXL 抗体 11B7 和 11D5 (1×10^{-6} M、 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M) 直接混合在胶原溶液中,然而在 30 分钟后,通过用移液器将 100 μ l 的 10 倍浓缩的工作稀释物转移至聚合的凝胶的顶部来加入生长因子 VEGF-A (终浓度 25ng/ml)。将板在 37°C 下温育 24 小时,然后加入 4% 的多聚甲醛进行固定。通过图像分析系统定量 HUVEC 球状体的出芽强度,所述图像分析系统使用倒置显微镜和数字成像软件 Analysis 3.2 (Soft imaging system, Munster, Germany) 测定每球状体的累积出芽长度。分析 10 个随机选择的球状体的累积出芽长度的平均值,将其作为单个数据点。

[0324] 图 13 显示该实验的结果。本发明的拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11B7 (A) 和 11D5 (B) 在基于球状体的血管生成测定中以剂量依赖性的方式抑制 VEGF-A 刺激的 HUVEC 出芽。使用最高浓度的 11B7 的处理将 HUVEC 出芽减少至基础水平,然而使用最高浓度的 11D5 的抑制不如前者有效 (左图)。11B7 和 11D5 分别以 9.8×10^{-8} M 和 7.0×10^{-7} M 的 IC_{50} 值抑制 HUVEC 出芽 (右图)。

[0325] 实施例 14. 本发明的大鼠抗 AXL 抗体在裸小鼠中减少人前列腺癌生长

[0326] 通常在人异种移植肿瘤研究中评估治疗性抗体的抗肿瘤功效。在此类模型系统中,人肿瘤在免疫削弱的小鼠中生长为异种移植瘤,根据肿瘤生长抑制的程度来测量治疗功效。本研究的目的是评估本发明的拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11B7 在裸小鼠中是否干扰人前列腺癌细胞的肿瘤生长。简而言之,在第 0 天,以 21/ 分钟的氧流速用 1.5-2.0 体积百分比的异氟醚麻醉 7 至 8 周龄的雄性 NMRI^{nu/nu} 小鼠 (适应环境后的大致重量 :30g),将 25 μ l PBS 中的 1×10^6 个 PC-3-LN 细胞同位植入前列腺。PC-3-LN 细胞来源于用编码萤光素酶-新霉素融合蛋白的逆转录病毒感染的 PC-3 前列腺癌细胞系。肿瘤生长的起始和肿瘤生长进展从而可通过体内生物发光成像来测量。为此,将萤光素腹膜内 (i. p.) 注射入小鼠,注射

后 10 分钟使用 NightOWL LB 981 生物发光成像系统 (Berthold Technologies, Germany) 测量光的发射。在第一处理之前,将小鼠随机化,并且进行统计检验以确保处理组 (每组 10 只动物) 间起始肿瘤体积 (平均值、中值和标准差) 的一致性。在第 8 天,开始所有处理并且持续直至第 34 天,然后在第 35 天进行尸体剖检。每周 3 次 (周一、周三、周五) 分别将 25mg/kg 的同种型对照抗体 1D5 和拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11B7 腹膜内 (i. p.) 施用入组 1 和 2 的动物。组 3 的动物每天 1 次口服 (p. o.) 接受 40mg/kg Sutent。组 4 的动物接受 3 次使用 12.5mg/kg 的 Taxotere 的静脉内 (i. v.) 注射 (彼此间隔 4 天)。下面给出治疗组的概述。

[0327]

组		处理	应用		动物 数目
			途径	方案	
1	1D5	25 mg/kg	i. p.	每周 3 次(周一、周三、周五) 始于随机化后第一天 ²⁾	10
2	11B7	25 mg/kg	i. p.	每周 3 次(周一、周三、周五) 始于随机化后第一天 ²⁾	10
5	Sutent	40 mg/kg	p. o.	每天 1 次 始于随机化后第一天 ²⁾	10
6	Taxotere	12.5 mg/kg	i. v.	3 个剂量, 间隔 4 天 始于随机化后第一天	10

[0328] 图 14 显示该实验的结果。与同种型对照抗体 1D5 相比较,本发明的拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11B7 在裸小鼠中减少了 PC-3-LN 前列腺肿瘤的总体生长。

[0329] 实施例 15. 本发明的大鼠抗 AXL 抗体抑制人前列腺癌的转移

[0330] 在与在“本发明的大鼠抗 AXL 抗体在裸小鼠中减少人前列腺癌生长”下所描述的相同的实验中,在尸体剖检后分析 PC-3-LN 肿瘤细胞至其他器官内的再定位 (转移) 以评估本发明的拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11B7 的抗转移作用。为此,在尸体剖检后收集选择的器官 (肝、脾、肺、股骨、部分的腰部脊柱),将其匀浆,并且补充以萤光素。随后,使用 NightOWL LB 981 生物发光成像系统 (Berthold Technologies, Germany) 测量光的发射。

[0331] 图 15 显示该实验对于脾的分析的结果。与同种型对照抗体 1D5 相比较,本发明的拮抗型大鼠抗 AXL 抗体 11B7 减少了脾转移的发生。值得注意的是,该实验中 11B7 的抗转移作用比 Sutent 的抗转移作用强。对于肝、肺、股骨和腰部脊柱转移获得相似观察结果。

[0332] 实施例 16. AXL 主要在肿瘤而非相邻正常组织中表达

[0333] 在本研究中,以组织多阵列形式在福尔马林固定的石蜡包埋的组织上对 17 个不同人恶性肿瘤中的 AXL 表达进行免疫组织化学分析。对于各肿瘤类型,检查成对的肿瘤组织和匹配的非恶性组织。简而言之,将组织在 4% 的中性缓冲的福尔马林中固定 16 至 20 小时,然后包埋在石蜡中。为了构建 60-核组织微阵列 (TMA),由病理学家选择各病例的一个穿孔的健康组织和一个穿孔的相应肿瘤组织。根据 FDA 指南产生具有正常对照组织穿孔 (每一个组织类型 3 个) 的 96 核 TMA。各穿孔直径为 1.5mm。

[0334] 使用切片机,将选择的组织块切成 2-4 μ m 的切片,将切片置于硅烷化的载玻片

(Sigma) 上,然后在 60℃下干燥 30 分钟和在 38℃下干燥过夜。通过在二甲苯浴中温育 5 分钟 2 次,在丙酮中温育 5 分钟 2 次和最终在蒸馏水中温育 5 分钟来使切片脱蜡。在蒸气发生器中于 10mM 柠檬酸盐缓冲液, pH 6.0 中进行切片的热预处理,进行 30 分钟,然后在蒸馏水中进行清洗。通过在室温下用新制备的 0.3% 的在甲醇中的 H₂O₂ 溶液温育 20 分钟来封闭内源过氧化物酶,然后用蒸馏水和 PBS 进行清洗,每次 5 分钟。用多克隆山羊抗人 AXL 抗体 (Santa Cruz SC-1096) (以 1 : 20 稀释于 TBST 中) 在室温下温育切片,进行 60 分钟。在 TBST 中清洗 3 次后,用生物素化的兔抗山羊二抗 (Dianova, 以 1 : 200 稀释于 TBST 中) 在室温下温育切片 45 分钟。在如之前一样进行清洗后,用链霉抗生物素蛋白 /HRP (DAKO, 以 1 : 300 稀释于 TBST 中) 在室温下温育切片 30 分钟,然后如之前一样进行清洗。用 DAB 溶液 (DAKO ;以 1 : 50 稀释于底物缓冲液中) 在室温下染色 10 分钟。最后,用水漂洗载玻片,用 Harris' 苏木精进行复染,然后用载玻片覆盖。用山羊 IgG 对照抗体 (R&D) 而非抗 AXL 一抗温育对照切片。

[0335] 图 16 概述了关于 17 个不同人实体瘤和相应非恶性组织中的 AXL 表达的该分析的结果 (A)。在就各指征进行筛选的所有病例中,在滤泡性淋巴瘤、前列腺癌 (除了单个细胞外) 中和在肾癌中没有检测到明显的表达。黑色素瘤和 Merkel 细胞肿瘤显示非常低的 AXL 表达。在少数肺的肿瘤,主要地腺癌中观察到微弱的表达。食管和巴雷特肿瘤、卵巢、结肠和胰腺肿瘤以及肝肿瘤 (肝细胞癌) 在大约 30% 的病例中显示微弱的染色。头颈肿瘤在大约 40% 的肿瘤中显示微弱至中度的染色。在 60% 至 100% 的分析的乳腺、宫颈、膀胱、甲状腺和胃的肿瘤中检测到微弱至中度的染色。在乳房肿瘤和胃的印戒细胞癌中观察到最强的染色 (B)。除了有时显示高于背景的微弱染色的肾小管外,非恶性组织大部分不显示特异性染色。

[0336] 实施例 17 :抗 AXL 抗体的结构和特征

[0337] 17A. 大鼠抗体可变结构域的核苷酸序列

[0338] 从杂交瘤细胞克隆大鼠抗 AXL 抗体可变结构域。使用 RNA 提取试剂盒 RNeasy (RNeasy midi-kit, Qiagen) 制备 RNA。按照厂商的说明书使用 5' RACE 试剂盒 (Invitrogen) 制备编码抗体基因的 cDNA。

[0339] 简而言之,使用基因特异性 GSP1 引物和 Superscript™ II 逆转录酶从总 RNA 合成第一链 cDNA。在第一链 cDNA 合成后,通过用 RNA 酶混合物 (RNase Mix) 处理除去原始 mRNA 模板。然后向 cDNA 的 3' 末端添加同聚体尾。使用 Taq DNA 聚合酶、与位于 cDNA 分子内的位点退火的嵌套基因特异性引物 (GSP2) 和试剂盒提供的锚定引物进行 PCR 扩增。在扩增后,将 5' RACE 产物克隆入 pLXSN-ESK 载体以进行测序。为了促进克隆,锚定引物 (AP) 包含 Sal I 的识别序列, GSP2 引物包含 Xho I 位点。

[0340] GSP1 引物 :

[0341] kappa_GSP1 :GATGGATGCATTGGTGCAGC

[0342] new_kappa_GSP1 :ATAGATACAGTTGGTGCAGC

[0343] heavy_GSP1 :CAGGGTCACCATGGAGTTA

[0344] GSP2 引物 :

[0345] XhoI-hGSP2 :CCGCTCGAGCGGGCCAGTGGATAGACAGATGG

[0346] XhoI-kGSP2 :CCGCTCGAGCGGCCGTTTCAGCTCCAGCTTGG

[0347] 将 GSP 引物用于大鼠抗 AXL Mab 克隆：

[0348] 11B7 ;kappa GSP1 ;XhoI-kGSP2

[0349] heavy GSP1 ;XhoI-hGSP2

[0350] 10D12 ;kappa_GSP1, new_kappa_GSP1 ;XhoI-kGSP2

[0351] heavy GSP1 ;XhoI-hGSP2

[0352] 11D5 ;new_kappa_GSP1 ;XhoI-kGSP2

[0353] heavy GSP1 ;XhoI-hGSP2

[0354] 17B. 大鼠抗 AXL 抗体可变结构域的氨基酸序列

[0355] 从克隆入 pLXSN-ESK 载体的经测序的基因翻译大鼠抗体可变结构域序列。给出的氨基酸序列始于可变结构域的位点 1。根据 Kabat (Kabat 等人 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 . NIH Publication No. 91-3242, 1991) 定义抗体特异性结合其靶所需的互补决定区 (CDR)。Kabat 定义基于可变结构域内的序列变异性。抗体的抗 AXL 特异性 CDR 区域列于 SEQ ID NO :13-30 中。单独的 CDR 包括下列位点：

[0356] CDR-L1 :24-34

[0357] CDR-L2 :50-56

[0358] CDR-L3 :89-97

[0359] CDR-H1 :31-35b

[0360] CDR-H2 :50-65

[0361] CDR-H3 :95-102

[0362] 17C 大鼠抗体的表达和纯化：

[0363] 在 Celline CL 1000 生物反应器 (Integra Biosciences) 中使用 DMEM (含有 4.5g/L 葡萄糖 ;1% 谷氨酰胺, 1% 丙酮酸盐, 1% 青霉素 / 链霉素) 在 37℃, 5-7% CO₂ 下培养杂交瘤。FCS 补充物是用于营养小室的 1% FCS 和用于细胞小室的 5% 的低 IgG FCS。每周 2 次进行收获和培养基更换。细胞分裂 1/1->1/3 取决于细胞生长。每周 1 次通过 SDS-PAGE 分析检测生产率。将上清液贮存于 -20℃ 下直至进行纯化。每周 1 次进行工作培养物的支原体 (Mycoplasma) 检查。

[0364] 通过 **Äkta** Explorer 100 系统 (GE-Healthcare) 使用蛋白 A 或 G 琼脂糖 FF (GE-Healthcare) 纯化抗体。对于各纯化, 单独地填充柱子。将柱子大小调整至各批次的预期的生产率和大小 (通常 50-500mg)。在可能的情况下将含有蛋白质的溶液保持在冰上或 4℃ 下。在整个过程中使用无菌缓冲液和双蒸水。

[0365] 将上清液解冻, 用 50mM TRIS pH 8.5 进行缓冲, 离心, 通过 0.22 μm 膜过滤, 然后将其装载至柱子上。在用 8 倍柱体积 (CV) 的 50mM PO₄, pH8.5 清洗后, 将抗体洗脱在 10CV 100mM 甘氨酸, pH 3.3 中。立即通过加入 1/51M Tris pH 8.0 (1ml Tris/4ml 洗脱级分) 将洗脱级分再缓冲至中性 pH, 然后利用 rSDS-PAGE 进行分析。混合含有纯抗体的级分, 在 4℃ 下对 PBS 进行透析, 然后无菌过滤。

[0366] 根据各抗体的单独的性调整缓冲系统的要求。特别地, 将大鼠 IgG2a 抗体 11D5 结合至 ProteinG 4FF 基质 (GE-Healthcare), 在高盐 (2M NaCl) 条件下进行清洗。在根据 11D5 的高盐条件下通过 rProteinA (GE-Healthcare) 纯化大鼠抗体 IgG1 11B7。在 pH 5.5 下进行抗体洗脱。大鼠抗体纯化的流速必须保持较低以增加结合效率。

[0367] 作为第二纯化步骤,可进行离子交换层析(在单独的、合适的条件下)或制备型尺寸排阻层析(PBS, pH 7.4)。

[0368] 用于纯化的抗体的质量控制的标准方案包括:

[0369] ● rSDS-PAGE 凝胶分析;考马斯染色或银染

[0370] ● BCA 检测 (Pierce #23227 BCA Protein Assay Kit;大鼠 IgG 标准 #31233)

[0371] ● 分析型尺寸排阻 (Superdex 200 Tricorn 10/300 GL, ~ 250mg 于 250 μ l 中; 0.5ml/ 分钟, Äkta Explorer 100)

[0372] ● 内毒素检测 (LAL, Cambrex **QCL-1000®** Chromogenic LAL Endpoint Assay # US50-648U)

[0373] ● 基于细胞的活性测定 (FACS 结合 ;pAkt ;pAXL)

[0374] 取决于它们的稳定性,在无菌条件下在 4°C 或 -20°C 下将纯化的抗体贮存在 PBS, pH 7.4 中。

[0375] 17D. 通过 FACS scatchard 进行的抗体亲和力测定

[0376] 通过用 10mM 的在 PBS 中的 EDTA 温育来收获过表达人 AXL 的 NIH3T3 细胞,以 6 百万个细胞 /ml 将其重悬浮于 FACS 缓冲液 (PBS pH7.4, 3% FCS, 0.1% NaN₃) 中。在圆底微量滴定板中,向 100 μ l 的在 FACS 缓冲液中以 40 至 0.002 μ g/ml (266 至 0.01nM) 的浓度含有抗体 11B7、11D5、ch11B7-IgG2 或 ch11D5-IgG2 的抗体溶液中加入 100 μ l 细胞悬浮液。让抗体结合在冰上进行 2 小时。然后,用 250 μ l FACS 缓冲液 / 孔清洗细胞 2 次,将其重悬浮于 200 μ l 以 1 : 50 稀释于 FACS 缓冲液中的二抗 (抗大鼠 -PE ;Jackson) 中。在温育 45 分钟后,在 FACS 缓冲液中再清洗细胞 2 次,然后重悬浮于 500ml PBS 中以用于 FACS 分析。在 Beckman-Coulter FACS FC500 上进行分析。为了测定表观亲和常数 K_{Dapp} ,将平均荧光值针对平均荧光与相应抗体浓度 ([M]) 的比作图。由直线的斜率倒数 (inverse slope) 计算的 K_{Dapp} 列于下面:

[0377]

克隆	K_D 值 (nM)
11B7	0.38
Ch11B7-IgG2	0.6

[0378]

11D5	0.81
Ch11D5-IgG2	0.9

[0379] 18. 大鼠抗 AXL 抗体的嵌合化 (chimerization):

[0380] 如下所述从人志愿者的外周血单核细胞 (PBMC) 克隆人 κ 轻链和重链 IgG 1/2 基因:

[0381] 从全血制备 PBMC。将血液在室温下于具有 10U/ml 肝素的 PBS/2mMEDTA 中稀释 1/2,5,在由隔膜 (diaphragm) 覆盖的 15ml Biocoll 溶液 (35ml/ 管) [来自 Biochrom #L6115 的 Biocoll] 的上方分层。以 400xg 在室温下离心样品 30 分钟,弃去血清 (大约

15ml)。使用 Pasteur 移液器小心地回收含有 PBMC 的界面。将 PBMC 在 PBS/2mM EDTA 中清洗 2 次 (第一次清洗 100ml, 第二次清洗 50ml), 以 300xg 离心 10 分钟。将细胞沉淀重悬浮于 RPMI/10% FCS(25ml) 中, 产生 5.5×10^7 个 PBMC。

[0382] 根据厂商的说明书, 使用来自 Qiagen (#75142) 的 RNeasy 试剂盒从 PBMC 制备 RNA。将纯化的 RNA (30 μ g) 以等分在 -80°C 下贮存。

[0383] 按照厂商说明书, 使用下列引物, 利用 Superscript III 逆转录酶 (invitrogen #18080-93) 通过 RT-PCR 从分离的 RNA 制备抗体 IgG γ 1 和 2 以及 κ 链的 cDNA:

[0384] 1) RT- γ : GCG TGT AGT GGT TGT GCA GAG

[0385] 2) RT- γ 2: GGG CTT GCC GGC CGT G

[0386] 3) RT- κ : TGG AAC TGA GGA GCA GGT GG

[0387] 4) 5' B1p: AGA TAA GCT TTG CTC AGC GTC CAC CAA GGG CCC ATCGGT

[0388] 5) 3' Bam(GAG): AGA TGG ATC CTC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGAG

[0389] 6) 5' Bsi: AGA TAA GCT TCG TAC GGT GGC TGC ACC ATC TGT CTTCAT

[0390] 7) 3' Bam(CTT): AGA TGG ATC CCT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGCTCT

[0391] 将引物溶解为 100 μ M。分别使用 2pmol oligo RT γ 和 RT κ , 加入 1 μ g RNA, 10mM dNTP 混合物并且加热 5 分钟至 65°C 来进行 RT-PCR 反应。加入 4 μ l 第一链缓冲液, 1 μ l 0.1M DTT, 1 μ l RNA 酶抑制剂 (40U/ μ l Fermentas #E00311) 和 2 μ l Superscript II RT, 混合, 然后在 50°C 下温育 1 小时, 然后在 70°C 下进行热灭活步骤 15 分钟。

[0392] 使用 Taq 聚合酶 (Eurochrom #EME010001) 将 2 μ l 的第一链反应物用于第二步骤 PCR 以产生抗体恒定结构域的双链 DNA。使用下列 PCR 设置将引物 5' B1p 和 3' Bam(GAG) 用于扩增 γ -链, 且将 5' Bsi 和 3' Bam(CTT) 用于扩增 κ -链恒定区:

[0393] κ -链扩增:

[0394] 94°C 120 秒

[0395] 94°C 30 秒

[0396] 55°C 30 秒

[0397] 72°C 45 秒, 循环 35 次

[0398] 72°C 10 分钟

[0399] γ -链扩增:

[0400] 94°C 120 秒

[0401] 94°C 30 秒

[0402] 45°C 30 秒

[0403] 72°C 60 秒, 循环 5 次

[0404] 94°C 30 秒

[0405] 50°C 30 秒

[0406] 72°C 60 秒, 循环 35 次

[0407] 72°C 10 分钟

[0408] 在 TAE 缓冲的 2% 琼脂糖凝胶上分析 PCR 产物。发现大约 350bp 的单个条带 (对于 κ 轻链) 和大约 1000bp 的单个条带 (对于重链 γ 1 和 γ 2)。按照厂商的说明书, 利用 Qiagen 凝胶提取试剂盒 (QIAGEN, #28784) 纯化 PCR 产物。为了将 PCR 片段克隆 pcDNA3 载

体 (Invitrogen) 的多克隆位点, 用 HindIII (5') 和 BamHI (3') 限制性核酸内切酶降解 pcDNA3 载体和 PCR 片段。将限制性位点编码在 PCR 引物内。使用 Qiagen PCR 纯化试剂盒 (QIAGEN, 28104) 纯化降解的片段, 使用 T4DNA 连接酶在 16°C 下将编码 γ 1、 γ 2 和 κ 链的 DNA 连接入 pcDNA3 载体, 进行过夜。将连接酶在 65°C 下灭活 10 分钟。使用标准方案将连接的 DNA 质粒直接转化入 CaCl₂ 感受态大肠杆菌, 将其涂板至含有氨苄青霉素的 LB 平板上。在 37°C 下温育过夜后, 挑选单个集落, 将其悬浮于 10 μ l H₂O 中, 并且通过 PCR (5 μ l 悬浮的细胞, Taq 聚合酶, 引物 5Blp 和 3Bam(GAG) γ 1/ γ 2 以及 5Bsi 和 3Bam(CTT) (对于 κ 集落)) 就包含含有各抗体链的质粒验证所述集落:

[0409] 94°C 120 秒

[0410] 94°C 30 秒

[0411] 55°C 30 秒

[0412] 72°C 60 秒, 循环 35 次

[0413] 72°C 10 分钟

[0414] 就 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上分析样品。选择含有抗体基因的集落以接种 5ml LB/ 氨苄青霉素培养基。在 37°C 下温育过夜后, 收获大肠杆菌, 使用 Qiagen miniprep 试剂盒 (QIAGEN, #12123) 制备 DNA。对照降解物 (HindIII, BamHI) 在预期的大小上显示所有 κ 和 γ 链基因插入物; 通过在 Medigenomix 上测定 DNA 序列来验证序列。

[0415] 通过 PCR 从 pLXSN-ESK 载体扩增大鼠可变结构域, 然后将其克隆入 g1/g2 和 κ pcDNA3 载体以产生嵌合的全长抗体。使用下列引物 (其在 5' 末端包含 HindIII 和 BsmI 位点且在 3' 末端包含 BsiWI 位点) 扩增可变 VL 结构域:

[0416] VL-11B7-5' :AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA CAT CCA

[0417] GAT GAC CCA GGC TCC

[0418] VL-11B7-3' :AGA TCG TAC GTT TCA GCT CCA GCT TGG

[0419] TGC CTC

[0420] VL-11D5-5' :AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA CAT CCA

[0421] GAT GAC CCA GTC TCC ATC

[0422] VL-11D5-3' :AGA TCG TAC GTT TCA GCT TGG TCC CAG

[0423] 使用下列引物 (其在 5' 末端包含 HindIII 和 BsmI 位点且在 3' 末端包含 B1pI 位点) 扩增可变 VH 结构域:

[0424] VH-11B7/11D5-5' :AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA GGT GCA

[0425] GCT TCA GGA GTC AGG

[0426] VH-11B7/11D5-3' :AGA TGC TGA GCT GAC AGT GAC CAT GAG

[0427] TCC TTG GCC

[0428] 轻链的 BsiWI 和重链的 B1pI 是恒定区的 5' 末端上的单个位点, 其使得能够与可变结构域基因的 3' 末端直接融合。

[0429] 将融合至来源于 $\bullet$ pLNOH2 载体 (Norderhaug 等人. J. Immunol. Methods 204, 1997; Neuberger EMBO J. 1983; 2(8):1373-8, 1983) 的前导序列 SEQ ID No: 69 的编码嵌合抗体链的基因克隆入 pCEP 载体系统以进行重组表达。将轻链基因在 NheI (5') 与 XhoI (3') 之间克隆入 pCEP4 (Invitrogen), 将重链基因在 KpnI (5') 与 XhoI (3') 之间克隆入

pCEP-Pu (Kohfeld FEBS 第 414 卷 ; (3) 557ff, 1997)。

[0430] 使用标准 CaPO_4 转染法, 用 $1 \mu\text{g/ml}$ 的编码轻链和重链基因的各质粒共转染接种在 $20 \times 20 \text{cm}$ 平板中的 HEK293 细胞以进行瞬时表达。培养条件为 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 于 DMEM/F12 高葡萄糖培养基 (含有 5% 的低 IgG FCS, 1% 丙酮酸, 1% 谷氨酰胺, 1% 青霉素 / 链霉素) 中。转染后 24 小时, 用新鲜培养基替换培养基。每 2 至 3 天收集上清液, 进行大约 3 周。如对于大鼠抗体纯化所描述的, 在标准缓冲液条件 (装载: 50mM Tris ; $\text{pH} = 8.5$, 清洗: 50mM PO_4 ; $\text{pH} = 8.5$, 洗脱: 100mM 甘氨酸; $\text{pH} 3, 3$) 下使用 1ml Hitrap rProtein A 柱子 (GE-Healthcare) 从大约 600ml 上清液纯化嵌合抗体。

[0431] 实施例 19. 大鼠抗 AXL 抗体可变结构域的人源化

[0432] 通过 BLAST 搜索免疫球蛋白结构域在蛋白质水平上将嵌合抗体的大鼠可变区与人抗体种系序列相比较。鉴定了 V 基因内最接近的人对应物, 此外其具有相同的 CDR 环长度。在类似的方法中, 根据它们与大鼠序列的同源性从 V-BASE 数据库 (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) 选择相关的 D 和 J 区段。

[0433] 对于 11B7 和 11D5 抗体的大鼠可变结构域, 发现下列最佳拟合的人种系序列 (V、D 和 J 区段), 并且将其定义为人构架:

[0434] VL11B7hum: V κ 1-012+J κ 1

[0435] VH11B7hum: VH4-59+D4-4 (阅读框架 3)+JH4

[0436] VL11D5hum: V κ 1-L1+J κ 4

[0437] VH11D5hum: VH4-59+D4-4 (阅读框架 3)+JH4

[0438] 人源化的可变结构域的前导序列采用选择的相关种系 V- 基因序列。针对抗 AXL 特异性, 将根据 Kabat (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版. NIH Publication No. 91-3242, 1991) 定义的大鼠抗 AXL 抗体的 CDR 残基移植入人种系构架以获得抗 AXL 抗体的最终的人源化形式 hum11B7 和 hum11D5。

[0439] 人源化的抗 AXL 抗体 hum11B7 和 hum11D5 的蛋白质序列如下:

[0440] 将蛋白质序列回译成 DNA 序列。使用 Kazusa-Codon-Usage 数据库对 DNA 序列进行密码子最优化以在哺乳动物细胞中进行重组表达。所得的人源化的抗 AXL 抗体的 DNA 序列如下:

[0441] 通过基于交叠寡核苷酸的 PCR 法合成编码人源化的抗 AXL 抗体的最优化的 DNA 序列。

[0442] 使用嵌合抗体构建体 pCEP4_ch11B7k1 的质粒将 VL 基因克隆入 pCEP4 载体。克隆位点是 NheI ($5'$) 和 BsiWI ($3'$), 其也包括在人源化的抗体的合成基因中。使用 KpnI ($5'$) 和 BlnI ($3'$) 作为限制性位点将 VH 基因克隆入相应的嵌合重链载体 pCEP-PU_ch11B7g1 内。在 EurofinsMedigenomix GmbH, Martinsried, Germany 上进行 DNA 最优化、基因合成、克隆和序列验证。

[0443] 实施例 20. 本发明的大鼠和嵌合抗 Ax1 抗体体外抑制配体诱导的 Ax1 磷酸化至相似的程度

[0444] 作为本发明的部分, 产生大鼠抗 Ax1 抗体 11B7 和 11D5 的嵌合衍生物 (参见下文)。为了研究本发明的大鼠抗 Ax1 抗体和本发明的相应的嵌合抗 Ax1 抗体是否能够体外抑制配体 Gas6 介导的 Ax1 激活至相似的程度, 对 CaSki 宫颈癌细胞进行 ELISA 实验。从而

通过增加的受体酪氨酸磷酸化检测 Gas6 介导的 Ax1 激活。简而言之,在第 1 天,将 3×10^4 个细胞 / 孔于正常生长培养基中接种在平底 96 孔板中。第二天,用无血清培养基替换生长培养基以饥饿细胞过夜,进行 24 小时。同样地,用 $2 \mu\text{g/ml}$ 的在 PBS 中的小鼠抗磷酸 - 酪氨酸抗体 4G10 在 4°C 下包被 Maxi-Sorp 96 孔板 (Nunc),进行过夜。在第 3 天,除去 4G10 抗体溶液,用 PBS,0.5% BSA 在室温下封闭 Maxi-Sorp 孔,进行至少 4 小时。平行地,用 50ng/ml 、 100ng/ml 、 300ng/ml 、 750ng/ml 、 $1 \mu\text{g/ml}$ 和 $10 \mu\text{g/ml}$ 的大鼠抗 Ax1 抗体 11B7 或嵌合抗 Ax1 抗体 ch11B7 在 37°C 下预温育细胞 1 小时,然后用或不用 400ng/ml Gas6 (R&D Systems) 在 37°C 下处理 10 分钟。然后弃去培养基,在冰上于补充有磷酸酶和蛋白酶抑制剂 (10mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1mM 苯甲基磺酰氟, 1mM 原钒酸盐, 1mM NaF 和 0.5% 抑肽酶) 的裂解缓冲液 (50mM HEPES, $\text{pH} 7.5$, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 10% 甘油和 1% Triton X-100) 中裂解细胞 30 分钟。同时除去封闭缓冲液,在将裂解物转移和于 4°C 下温育过夜之前,用清洗缓冲液 (PBS, 0.05% Tween 20) 清洗 Maxi-Sorp 板 6 次。在第 4 天用清洗缓冲液清洗板 6 次后,在室温下用 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 的在 PBS 中的生物素化的大鼠抗 Ax1 抗体 12B7 温育孔 2 小时。用清洗缓冲液清洗板 6 次,向各孔中加入以 1 : 4,000 稀释于 PBS 中的 AP 缀合的链霉抗生物素蛋白 (Chemicon #SA110),在室温下温育 30 分钟。之后,用清洗缓冲液清洗孔 6 次,加入 AttoPhos 底物溶液 (Roche#11681982)。使用 Victor 板读取器 (Perkin Elmer),在 430nm 的激发波长和 580nm 的发射波长处收集各孔的荧光。

[0445] 图 17 显示对于宫颈癌细胞系 CaSki 的本实验的代表性结果。如通过相对 Ax1 磷酸化的浓度依赖性减少所证明的,本发明的大鼠抗 Ax1 抗体 11B7 (A) 和嵌合抗 Ax1 抗体 ch11B7 (B) 能够阻止配体诱导的受体酪氨酸激酶 Ax1 的激活至相似的程度。对于黑色素瘤细胞系 C-8161,使用相同的实验设置观察到相当的作用。

[0446] 实施例 21. 本发明的大鼠和嵌合抗 Ax1 抗体体外抑制配体诱导的 p42/p44MAP- 激酶磷酸化至相似的程度

[0447] 为了另外地验证本发明的大鼠抗 Ax1 抗体和本发明的相应嵌合抗 Ax1 抗体是否也能够抑制 CaSki 宫颈癌细胞中 Gas6 诱导的 p42/p44MAP- 激酶的激活至相似的程度,进行 ELISA 实验。此处,通过增加的蛋白质 (Thr202/Tyr204) 磷酸化检测 Gas6 诱导的 p42/p44MAP- 激酶的激活。简而言之,在第 1 天,将 2×10^4 个细胞 / 孔接种在平底 96 孔板中。第二天,用无血清培养基替换正常生长培养基以饥饿细胞 24 小时。之后,用 50ng/ml 、 100ng/ml 、 300ng/ml 、 750ng/ml 、 $1 \mu\text{g/ml}$ 和 $10 \mu\text{g/ml}$ 的大鼠抗 Ax1 抗体 11B7 或嵌合抗 Ax1 抗体 ch11B7 在 37°C 下预温育细胞 1 小时,然后用或不用 400ng/ml Gas6 (R&D Systems) 在 37°C 下处理 10 分钟。弃去培养基,用 4% 的在 PBS ($\text{pH} 7.5$) 中的甲醛在室温下固定细胞 30 分钟。除去甲醛溶液,用清洗缓冲液 (PBS, 0.1% Tween20) 清洗细胞 2 次。用清洗缓冲液中的 1% H_2O_2 , 0.1% NaN_3 猝灭细胞,在室温下温育 20 分钟。之后,除去猝灭溶液,用清洗缓冲液清洗细胞 2 次,然后用 PBS, 0.5% BSA 在室温下进行封闭,进行 4 小时。加入以 1 : 1,000 稀释于 PBS, 0.5% BSA, 0.05% Tween 20, 5mM EDTA 中的抗磷酸 - p42/p44MAP 激酶 (Thr202/Tyr204) 一抗 (多克隆兔; CellSignaling #9101), 在 4°C 下过夜。在第 4 天,除去抗体溶液,用清洗缓冲液清洗板 3 次。然后向各孔中加入以 1 : 2,500 稀释于 PBS, 0.5% BSA, 0.05% Tween20, 5mM EDTA 中的 HRP 缀合的抗兔二抗 (Dianova#111-036-045), 在室温下温育 1.5 小时。用清洗缓冲液清洗板 3 次,每次 5 分钟。加入四甲基联苯胺 (TMB, Calbiochem), 在

620nm 处进行监控。通过加入 100 μ l 250nM HCl 终止反应,使用 Vmax 板读取器 (Thermo Lab Systems),在 450nm 处 (620nm 的参照波长) 读取吸光度。

[0448] 图 18 显示本实验的代表性结果。本发明的大鼠抗 Ax1 抗体 11B7(A) 和嵌合抗 Ax1 抗体 ch11B7(B) 能够阻止 CaSki 宫颈癌细胞中 Gas6 诱导的 p42/p44MAPK 激酶的激活至相似程度,如通过相对 p42/p44MAPK 激酶的磷酸化的浓度依赖性减少所显示的。

[0449] 实施例 22. 本发明的大鼠抗 Ax1 抗体与化疗剂协同作用以在体外克服抗药性

[0450] 由于本发明的大鼠抗 Ax1 抗体本身干扰 Gas6 介导的血清饥饿的 NIH3T3-Ax1 c1.7 成纤维细胞的抗细胞凋亡,因此产生了这样的问题:拮抗型抗 Ax1 抗体是否与化疗剂协同诱导细胞凋亡,从而促进克服抗药性。在本实施例中,将 NCI/ADR-RES (原先称为 MCF-7/AdrR) 细胞 -- 展示高水平的对几种试剂包括多柔比星的抗性 (Fairchild 等人, 1987, Cancer Research, 47, 5141-5148 ;Xu 等人, 2002, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 302, 963-971) 的卵巢癌细胞系 (Liscovitch 和 Ravid, 2007, Cancer Letters, 245, 350-352) -- 与拮抗型抗 Ax1 抗体 11B7 和 / 或多柔比星一起温育,并通过 TUNEL 染色测定细胞凋亡比率。简而言之,以 3×10^4 个细胞 / 孔将 NCI/ADR-RES 细胞于正常生长培养基中接种在用相同培养基在 37°C 下预温育 1 小时的 8 室培养载玻片 (BD Falcon, cat# 354118) 上。第 2 天早晨,除去正常生长培养基,用低血清 (0.5% FCS) 培养基清洗细胞并在其中进行培养。在傍晚,以各自 10 μ g/ml 的终浓度加入同种型对照抗体 1D5 或拮抗型抗 AXL 抗体 11B7。在第 3 天的早晨,以 100 μ M、150 μ M 或 200 μ M 的终浓度加入柔比星,将细胞在 37°C 下进行温育。24 小时后,用 PBS 漂洗细胞 1 次,用 4% 的在 PBS (pH 7.5) 中的甲醛在室温下固定 20 分钟,风干 5 分钟,然后于 -20°C 下贮存。使用可商购获得的 Fluorescein-FragEL™ 试剂盒 (Oncogene, cat#QIA39, 目前通过 Merck-Calbiochem 分销),按照提供商的手册说明书 (章节 'Fluorescein-FragEL™ of cell preparations fixed on slides', 第 10 页) 进行 TUNEL 染色。应用荧光显微镜,分析细胞并且进行照相。

[0451] 图 19 显示本实验的代表性结果。对于用 100 μ M 多柔比星处理的 NCI/ADR-RES 卵巢癌细胞,无论将细胞与对照抗体共温育还是与拮抗型抗 Ax1 抗体 11B7 (上图) 共温育,都没有观察到 TUNEL 染色,从而没有观察到细胞凋亡。然而,在 150 μ M 多柔比星的浓度上,在用对照抗体共处理的细胞中只检测到极弱的细胞凋亡,然而与拮抗型抗 Ax1 抗体 11B7 的共温育导致细胞凋亡的显著诱导 (中图)。同样,在 200 μ M 多柔比星存在的情况下,与和对照 IgG 抗体一起温育的细胞相比较,细胞与 11B7 的共温育也显著地增加细胞凋亡比率 (下图),这表明用化疗剂和本发明的拮抗型抗 Ax1 抗体共处理甚至多抗药性细胞可适用于克服抗药性。

[0452] 实施例 23. 本发明的大鼠抗 Ax1 抗体与化疗剂在体外协同减少锚定不依赖性集落的生长

[0453] 进行软琼脂测定以研究本发明的抗 Ax1 抗体单独地或与化疗剂组合地抑制锚定不依赖性细胞的生长的能力。软琼脂集落形成测定是检测转化的细胞的标准体外测定,因为只有转化的细胞才能够在软琼脂上生长。

[0454] 简而言之,750 个 C-8161 黑色素瘤细胞保持未处理或用 15 μ g/ml 的在 IMDM 培养基 (Gibco) 中的拮抗型大鼠抗 Ax1 抗体 11B7 在 37°C 下预温育 30 分钟。然后,将细胞与 Difco 诺布尔琼脂溶液组合,从而产生 50 μ l 的顶层琼脂细胞悬浮液,琼脂、FCS 和 11B7 的

浓度分别为 0.35%、0.2% 和 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 。将该细胞悬浮液涂板在 50 μl 的含有 20% FCS 的 0.7% 的琼脂糖底层的顶部,最后用另外 50 μl 滋养层溶液(其含有 0.2% FCS 及相应浓度的顺铂)覆盖。在总共 150 μl / 样品中,11B7 和顺铂的终浓度分别为 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 和 1.5 μM 、1.0 μM 、0.75 μM 、0.5 μM 或 0.25 μM 。让集落形成 5 天,然后用 50 μl MTT(Sigma, 1mg/ml 于 PBS 中)在 37°C 下染色 3 小时。使用与 HTS Bonit 集落形成软件(Lemnatec, Wuersele)组合的 Scanalyzer HTS 照相系统,以一式三份重复分析在顺铂不存在或存在的情况下拮抗型大鼠抗 Ax1 抗体 11B7 的作用。

[0455] 图 20 显示该实验的代表性结果。提供的数据是集落的总体面积并且反映测量的绝对数量(A)和由顺铂和/或拮抗型大鼠抗 Ax1 抗体 11B7 产生的相对生长抑制(B)。与未处理的对照细胞相比较,与顺铂一起的温育以剂量依赖性的方式导致集落生长迟滞。与单独的 11B7 在 30% 的范围内的抑制作用相一致,与拮抗型抗 Ax1 抗体 11B7 的组合导致显著增强的顺铂(特别地较低浓度的顺铂)对 C-8161 黑色素瘤细胞的软琼脂生长的抑制作用。

[0456] 实施例 24. 本发明的大鼠抗 Ax1 抗体与抗肿瘤剂协同减少肿瘤相关现象

[0457] 在前述实施例中,关于在多抗药性癌细胞例如卵巢癌细胞系 NCI/ADR-RES 中诱导细胞凋亡和克服抗药性,已观察到本发明的拮抗型抗 Ax1 抗体与多柔比星的共施用的协同作用。此外,使用黑色素瘤细胞系 C-8161 检测到本发明的拮抗型抗 Ax1 抗体与顺铂在减少锚定不依赖性集落生长中的组合作用。因此,当将拮抗型抗 Ax1 抗体与辐照和/或一种或多种另外的抗肿瘤剂组合治疗癌细胞或患有癌症疾病的患者时,预期在诱导肿瘤细胞的细胞凋亡和/或克服其抗药性、抑制肿瘤细胞存活、抑制肿瘤细胞生长和/或增殖、减少肿瘤细胞迁移、扩散和转移或削弱肿瘤血管生成中产生协同作用。特别地,当将拮抗型抗 Ax1 抗体与辐照和/或任何另外的抗肿瘤剂(其优选但不限于顺铂、达卡巴嗪、替莫唑胺/temodal、武活龙(muphoran)/福莫司汀、紫杉醇或多西他赛)组合治疗黑色素瘤细胞或患有黑色素瘤的患者时,预期在诱导肿瘤细胞的细胞凋亡和/或克服其抗药性、抑制肿瘤细胞存活、抑制肿瘤细胞生长和/或增殖、减少肿瘤细胞迁移、扩散和转移或削弱肿瘤血管生成中产生协同作用。此外,当将拮抗型抗 Ax1 抗体与辐照和/或任何另外的抗肿瘤剂(其优选但不限于多柔比星、顺铂、卡铂、紫杉醇、多西他赛、美法仑、六甲蜜胺(altretamine)、拓扑替康、异环磷酰胺、依托泊苷或 5-氟尿嘧啶)组合治疗卵巢癌细胞或患有卵巢癌的患者时,预期在诱导肿瘤细胞的细胞凋亡和/或克服其抗药性、抑制肿瘤细胞存活、抑制肿瘤细胞生长和/或增殖、减少肿瘤细胞迁移、扩散和转移或削弱肿瘤血管生成中产生协同作用。此外,当将拮抗型抗 Ax1 抗体与辐照和/或任何另外的抗肿瘤剂(其优选为但不限于米托蒽醌、多柔比星、紫杉醇、多西他赛或长春碱)组合治疗前列腺癌细胞或患有前列腺癌的患者时,预期在诱导肿瘤细胞的细胞凋亡和/或克服其抗药性、抑制肿瘤细胞存活、抑制肿瘤细胞生长和/或增殖、减少肿瘤细胞迁移、扩散和转移或削弱肿瘤血管生成中产生协同作用。此外,当将拮抗型抗 Ax1 抗体与辐照和/或任何另外的抗肿瘤剂(其优选但不限于 5-氟尿嘧啶、丝裂霉素 C、顺铂、多柔比星、甲氨蝶呤、依托泊苷、亚叶酸钙(leucovorin)、表柔比星、紫杉醇、多西他赛或伊立替康)组合治疗胃部/胃癌细胞或患有胃部/胃癌的患者时,预期在诱导肿瘤细胞的细胞凋亡和/或克服其抗药性、抑制肿瘤细胞存活、抑制肿瘤细胞生长和/或增殖、减少肿瘤细胞迁移、扩散和转移或削弱肿瘤血管生成中产生协同作用。此外,当将拮抗型抗 Ax1 抗体与辐照和/或任何另外的抗肿瘤剂(其优选但不限于多柔比星、表柔比星、

紫杉醇、多西他赛、环磷酰胺、5- 氟尿嘧啶、吉西他滨、卡培他滨、长春瑞滨或曲妥珠单抗）组合治疗乳腺癌细胞或患有乳腺癌的患者时，预期在诱导肿瘤细胞的细胞凋亡和 / 或克服其抗药性、抑制肿瘤细胞存活、抑制肿瘤细胞生长和 / 或增殖、减少肿瘤细胞迁移、扩散和转移或削弱肿瘤血管生成中产生协同作用。此外，当将拮抗型抗 Ax1 抗体与辐照和 / 或任何另外的抗肿瘤剂（其优选但不限于顺铂、异环磷酰胺、伊立替康、5- 氟尿嘧啶、紫杉醇、多西他赛、吉西他滨或拓扑替康）组合治疗宫颈癌细胞或患有宫颈癌的患者时，预期在诱导肿瘤细胞的细胞凋亡和 / 或克服其抗药性、抑制肿瘤细胞存活、抑制肿瘤细胞生长和 / 或增殖、减少肿瘤细胞迁移、扩散和转移或削弱肿瘤血管生成中产生协同作用。此外，当将拮抗型抗 Ax1 抗体与辐照和 / 或任何另外的抗肿瘤剂（其优选但不限于吉西他滨、卡培他滨或 5- 氟尿嘧啶）组合治疗胰腺癌细胞或患有胰腺癌的患者时，预期在诱导肿瘤细胞的细胞凋亡和 / 或克服其抗药性、抑制肿瘤细胞存活、抑制肿瘤细胞生长和 / 或增殖、减少肿瘤细胞迁移、扩散和转移或削弱肿瘤血管生成中产生协同作用。最后，但不排除其他癌症类型，当将拮抗型抗 Ax1 抗体与辐照和 / 或任何另外的抗肿瘤剂（其优选但不限于顺铂、卡铂、多柔比星、紫杉醇、多西他赛、依托泊苷、长春瑞滨、长春新碱、异环磷酰胺、吉西他滨、甲氨蝶呤、环磷酰胺、洛莫司汀或拓扑替康）组合治疗肺癌细胞或患有肺癌的患者时，预期在诱导肿瘤细胞的细胞凋亡和 / 或克服其抗药性、抑制肿瘤细胞存活、抑制肿瘤细胞生长和 / 或增殖、减少肿瘤细胞迁移、扩散和转移或削弱肿瘤血管生成中产生协同作用。

[0001]

序列表

AXL 抗体核苷酸序列

Seq. #1: 大鼠-11B7-VLκ-克隆 33:

1	GACATCCAGATGACCCAGGCTCCATCTTCCCTGCCTGCATCTCTGGGAG	50
51	ACAGAGTCACTATTACTTGCCGGGCAAGCCAAGACATTGGAAATTATTT	100
101	AAGATGGTTCCAGCAGAAACCGGGGAAATCTCCTAGGCTTATGATTTCT	150
151	GGTGCAACCAACTTGGCAGCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTA	200
201	GGTCTGGGTCAGATTATTCTCTGACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGAAGA	250
251	TATGGCAGACTATTACTGTCTACAGTCTAAAGAGTCCCCTTGGACGTTT	300
301	GGTGGA GGCACCAAGCTGGAGCTGAAACGG	350

Seq. #2: 大鼠-11B7-VH-克隆 20:

1	GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGT	50
51	CACTCTCCCTCACTGTTCTGTCACTGGTTACTCCATCACTAGTAATTAC	100
101	TGGGGCTGGATCCGGAAGTTCACAGGAGATAAAATGGAGTGGATGGGAT	150
151	ACATAACCTACAGTGGTAGCACTAGCTACAACCCATCTCTCAAAAAGTCG	200
201	AATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAATCAGTTCTTCTGCAGTTG	250
251	AACTCTGTAACCTTCTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCTATAACAA	300
301	CCTTTT ATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACTGTCTCCTCA	350

Seq. #3: 大鼠-11D5-VLκ-克隆 10:

1	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCATGTCTACATCTCTGGGAG	50
51	ACAGAGTCACTATTACTTGCCGGGCAAGTCAAGACATTGGAAATTATTT	100
101	AAGCTGGTTCCAACAGAAAGTAGGGAAATCTCCTAGGCGTATGATTTAT	150
151	GGTGCAATCAAGTTGGCAGTTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGGAAGTA	200
201	GGTCTGGATCAGATTATTCTCTGACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGAAGA	250
251	TATGGCGATCTATTACTGTCTACAGTATATACAGTTTCCGCTCACGTTT	300
301	GGTTCT GGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG	350

Seq. #4: 大鼠-11D5-VH-克隆 66:

1	GAGGTGCAACTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGT	50
51	CACTCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGTTATTCATCACTAGTAATTA	100
101	CTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCACAGGAAATAAAATGGAGTGGATTGGA	150
151	CACATAACCAACAGTGGTAACACTACCTACAATCCATCTCTCAAAAAGTC	200
201	GAATCTCCATTAGTAGAGACACATCGAGGAATCAGTTCTTCTGCAGTTT	250
251	GAATCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAAAAGGA	300
301	GCGTTT GATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTCGTCA	350

[0002]

Seq. #5: 大鼠-10D12-VLκ-克隆 8:

1	GACATCCAGATGACCCAGGCTCCATCTTCCCTGCCTGCATCTCTGGGAG	50
51	ACAGAGTCACTATTGCTTGCCGGGCAAGCCAAGACATTGGAAATTATTT	100
101	AAGATGGTTCCAGCAGAAACCGGGGAAATCTCCTAGGCTTATGATTTCT	150
151	GGTGCAACCAACTTGGCAGCTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTA	200
201	GGTCTGGGTCAGATTATTCTCGGACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGAAGA	250
251	TATGGCAGACTATTACTGTCTACAGTCTAAAGAGTCCCCTTGGACGTTT	300
301	GGTGGA GGCACCAAGCTGGAGCTGAAACGG	350

Seq. #6: 大鼠-10D12-VH-克隆 5:

1	GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAGCCCTCACAGT	50
51	CACTCTCCCTCACCTGCTCTGTCACCGGTTACTCCATCACTAGTAATTA	100
101	CTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATGGGA	150
151	TACATAACCAACAGTGGTGGCACTGCCTACAACCCATCTCTCAAAAGTC	200
201	GAATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAATCAGTTCTTCCTGCAATT	250
251	GAATCTGTAAATTCCTGAGGACTCAGCCACATACTTCTGTTCAAGAACC	300
301	CCCTGG GACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTCCTCA	336 350

[0003]

AXL 抗体氨基酸序列**11B7:****Seq. #7: 大鼠-11B7-VLκ-克隆 33:**

1	DIQMTQAPSSLPASLGDRVTITCRASQDIGNYLRWFQQKPGKSPRLMIS	50
51	GATNLAAGVPSRFSGSRSGSDYSLTISSEDMADYYCLQSKESPWTF	100
101	GGGTKLELKR	150

Seq. #8: 大鼠-11B7-VH-克隆 20:

1	EVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITSNYWGWIRKFPDGKMEWMG	50
51	YITYSGSTSYNPSLKSRIISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDATYYCAIT	100
101	TFYYWGQGVMVTVSS	150

11D5:**Seq. #9: 大鼠-11D5-VLκ-克隆 10:**

1	DIQMTQSPSSMSTSLGDRVTITCRASQDIGNYLSWFQQKVGKSPRRMIY	50
51	GAIKLAVGVPSRFSGSRSGSDYSLTISSEDMAIYYCLQYIQFPLTF	100
101	GGGTKLELKR	150

Seq. #10: 大鼠-11D5-VH-克隆 66:

1	EVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITSNYWGWIRKFPGNKMEWIG	50
51	HITNSGNTTYNPSLKSRIISRDTSRNQFFLQLNSVTTEDATYYCAKG	100
101	AFDYWGQGVMVTVSS	150

10D12:**Seq. #11: 大鼠-10D12-VLκ-克隆 8:**

1	DIQMTQAPSSLPASLGDRVTIACRASQDIGNYLRWFQQKPGKSPRLMIS	50
51	GATNLAAGVPSRFSGSRSGSDYSRTISSEDMADYYCLQSKESPWTF	100
101	GGGTKLELKR	150

[0004]

Seq. #712: 大鼠-10D12-VH-克隆 5:

1	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSNYWGWIRKFPGNKMEWMG	50
51	YITNSGGTAYNPSLKSRLSITRDTSKNQFFLQLNSVIPEDSATYFCSRT	100
101	PWDWGQGVMTVSS	150

[0005]

CDR 序列

SeqID No:	抗体	CDR	序列
#13	11B7 轻链	1	RASQDIGNYLRL
#14	11B7 轻链	2	GATNLAA
#15	11B7 轻链	3	LQSKESPWT
#16	11B7 重链	1	SNYWG
#17	11B7 重链	2	YITYSGSTSYNPSLKS
#18	11B7 重链	3	-----TTFYY
#19	11D5 轻链	1	RASQDIGNYLS
#20	11D5 轻链	2	GAIKLAV
#21	11D5 轻链	3	LQYIQFPLT
#22	11D5 重链	1	SNYWG
#23	11D5 重链	2	HITNSGNTTYNPSLKS
#24	11D5 重链	3	-----GAFDY
#25	10D12 轻链	1	RASQDIGNYLRL
#26	10D12 轻链	2	GATNLAA
#27	10D12 轻链	3	LQSKESPWT
#28	10D12 重链	1	SNYWG
#29	10D12 重链	2	YITNSGGTAYNPSLKS
#30	10D12 重链	3	-----TPWD-

[0006]

嵌合核苷酸序列**Seq. #31: ch11B7k**

1	GACATCCAGATGACCCAGGCTCCATCTTCCCTGCCTGCATCTCTGGGAG	50
51	ACAGAGTCACTATTACTTGCCGGGCAAGCCAAGACATTGGAAATTATTT	100
101	AAGATGGTTCCAGCAGAAACCGGGGAAATCTCCTAGGCTTATGATTCT	150
151	GGTGCAACCAACTTGGCAGCTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTA	200
201	GGTCTGGGTCAGATTATTCTCTGACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGAAGA	250
251	TATG	300
301	GCAGACTATTACTGTCTACAGTCTAAAGAGTCCCCTTGGACGTTCGGTG	350
351	GAGGCACCAAGCTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT	400
401	CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT	450
451	GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA	500
500	AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGA	550
551	GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTG	600
601	AGCAAA	650
	GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG	
	GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG	

Seq. #32: ch11B7g1

[0007]

1	GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGT	50
51	CACCTCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGTTACTCCATCACTAGTAATTA	100
101	CTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCCAGGAGATAAAATGGAGTGGATGGGA	150
151	TACATAACCTACAGTGGTAGCACTAGCTACAACCCATCTCTCAAAAGTC	200
201	GAATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAATCAGTTCTTCCTGCAGTT	250
251	GAACCTGTAACTTCTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCTATAACA	300
301	ACCTTT	350
351	TATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACTGTCAGCTCAGCGTCCACCA	400
401	AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG	450
451	GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG	500
500	GTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT	550
551	TCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT	600
601	GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG	650
651	AATCAC	700
701	AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG	750
751	ACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG	800
800	ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCTAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATC	850
851	TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG	900
901	ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA	950
951	TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTG	1000
1001	GTCAGT	1050
1051	CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG	1100
1101	GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC	1150
1151	CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA	1200
1200	TCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCA	1250
1251	AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA	1300
1301	GCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC	
	TCCTTC	
	TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA	
	ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC	
	GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA	

[0008]

Seq. #33: ch11B7g2

1	GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGT	50
51	CACTCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGTTACTCCATCACTAGTAATTA	100
101	CTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCAGGAGATAAAATGGAGTGGATGGGA	150
151	TACATAACCTACAGTGGTAGCACTAGCTACAACCCATCTCTCAAAAGTC	200
201	GAATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAATCAGTTCTTCCTGCAGTT	250
251	GAACTCTGTAACCTCTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCTATAACA	300
301	ACCTTT	350
351	TATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACTGTCAGCTCAGCGTCCACCA	400
401	AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGA	450
451	GAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG	500
500	GTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCT	550
551	TCCAGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT	600
601	GACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTA	650
651	GATCAC	700
701	AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTG	750
751	TCGAGTGCCCAACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTT	800
800	CCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT	850
851	GAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCC	900
901	AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA	950
951	GCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTC	1000
1001	ACCGTT	1050
1051	GTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA	1100
1101	ACAAAGGCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGG	1150
1151	GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGAGGAG	1200
1200	ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACC	1250
1251	CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA	1300
1301	CTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC	
	TACAGC	
	AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT	
	GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT	
	CTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA	

Seq. #34: ch11D5k

1	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCATGTCTACATCTCTGGGAG	50
51	ACAGAGTCACCATTACTTGCCGGGCAAGTCAAGACATTGGAAATTATTT	100

[0009]

101	AAGCTGGTTCCAACAGAAAGTAGGGAAATCTCCTAGGCGTATGATTTAT	150
151	GGTGCAATCAAGTTGGCAGTTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGGAAGTA	200
201	GGTCTGGATCAGATTATTCTCTGACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGAAGA	250
251	TATG	300
301	GCGATCTATTACTGTCTACAGTATATACAGTTTCCGCTCACGTTCCGGTT	350
351	CTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT	400
401	CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT	450
451	GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA	500
500	AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGA	550
551	GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTG	600
601	AGCAA	650
	GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG	
	GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG	

Seq. #35: ch11D5g1

1	GAGGTGCAACTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGT	50
51	CACTCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGTTATTCCATCACTAGTAATTA	100
101	CTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATTGGA	150
151	CACATAACCAACAGTGGTAACACTACCTACAATCCATCTCTCAAAAGTC	200
201	GAATCTCCATTAGTAGAGACACATCGAGGAATCAGTTCTTCCTGCAGTT	250
251	GAACTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAAAGGA	300
301	GCGTTT	350
351	GATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACTGTCAGCTCAGCGTCCACCA	400
401	AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG	450
451	GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG	500
500	GTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCT	550
551	TCCCGGCTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT	600
601	GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG	650
651	AATCAC	700
701	AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTG	750
751	ACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG	800
800	ACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATC	850
851	TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG	900
901	ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA	950
951	TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTG	1000
1001	GTCAGC	1050
1051	GTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT	1100
1101	GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTC	1150
1151	CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA	1200
1200	TCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA	1250
1251	AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA	1300
1301	GCCGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC	
	TCCTTC	
	TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA	
	ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC	
	GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA	

[0010]

Seq. #36: ch11D5g2

1	GAGGTGCAACTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGT	50
51	CACTCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGTTATTCCATCACTAGTAATTA	100
101	CTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATTGGA	150
151	CACATAACCAACAGTGGTAACACTACCTACAATCCATCTCTCAAAAGTC	200
201	GAATCTCCATTAGTAGAGACACATCGAGGAATCAGTTCTTCCTGCAGTT	250
251	GAACCTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAAAGGA	300
301	GCGTTT	350
351	GATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACTGTCAGCTCAGCGTCCACCA	400
401	AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGA	450
451	GAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG	500
500	GTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCT	550
551	TCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT	600
601	GACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTA	650
651	GATCAC	700
701	AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTG	750
751	TCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTT	800
800	CCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT	850
851	GAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCC	900
901	AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA	950
951	GCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCTGTGGTCAGCGTCCTC	1000
1001	ACCGTT	1050
1051	GTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA	1100
1101	ACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGG	1150
1151	GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG	1200
1200	ATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACC	1250
1251	CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA	1300
1301	CTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC	
	TACAGC	
	AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT	
	GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT	
	CTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA	

[0011]

嵌合氨基酸序列**Seq. #37: 11B7 LC κ**

```

1    D I Q M T Q A P S S L P A S L G D R V T I T C R A    25
25   S Q D I G N Y L R W F Q Q K P G K S P R L M I S G    50
51   A T N L A A G V P S R F S G S R S G S D Y S L T I    75
76   S S L E S E D M A D Y Y C L Q S K E S P W T F G G    100
101  G T K L E L K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L    125
126  K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V    150
151  D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L    200
176  S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G    225
201  L S S P V T K S F N R G E C                            250

```

Seq. #38: 11B7-HC γ 1

```

1    E V Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C S V T    25
25   G Y S I T S N Y W G W I R K F P G D K M E W M G Y    50
51   I T Y S G S T S Y N P S L K S R I S I T R D T S K    75
76   N Q F F L Q L N S V T S E D T A T Y Y C A I T T F    100
101  Y Y W G Q G V M V T V S S A S T K G P S V F P L A    125
126  P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V    150
151  T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L    200
176  Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H    225
201  K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C    250
226  P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S    275
251  R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V    300
301  D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S    325
326  V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P    350
350  A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S    375
376  R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V    400
401  E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F    425
426  F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H    450
451  E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

```

[0012]

Seq. #39: 11B7 HC γ 2

1	E V Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C S V T	25
25	G Y S I T S N Y W G W I R K F P G D K M E W M G Y	50
51	I T Y S G S T S Y N P S L K S R I S I T R D T S K	75
76	N Q F F L Q L N S V T S E D T A T Y Y C A I T T F	100
101	Y Y W G Q G V M V T V S S A S T K G P S V F P L A	125
126	P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V	150
151	T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L	200
176	Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T Y T C N V D H	225
201	K P S N T K V D K T V E R K C C V E C P P C P A P	250
226	P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E	275
251	V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G V E	300
301	V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V	325
326	V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A P I E	350
350	K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M	375
376	T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S	400
401	N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G S F F L Y S	425
426	K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H	450
451	N H Y T Q K S L S L S P G K	

Seq. #40: 11D5 LC κ

1	D I Q M T Q S P S S M S T S L G D R V T I T C R A	25
25	S Q D I G N Y L S W F Q Q K V G K S P R R M I Y G	50
51	A I K L A V G V P S R F S G S R S G S D Y S L T I	75
76	S S L E S E D M A I Y Y C L Q Y I Q F P L T F G S	100
101	G T K L E L K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L	125
126	K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V	150
151	D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L	200
176	S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G	225
201	L S S P V T K S F N R G E C	250

[0013]

Seq. #41: 11D5 HC γ 1

1	E V Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C S V T	25
25	G Y S I T S N Y W G W I R K F P G N K M E W I G H	50
51	I T N S G N T T Y N P S L K S R I S I S R D T S R	75
76	N Q F F L Q L N S V T T E D T A T Y Y C A K G A F	100
101	D Y W G Q G V M V T V S S A S T K G P S V F P L A	125
126	P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V	150
151	T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L	175
176	Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H	200
201	K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C	225
226	P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S	250
251	R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V	275
276	D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S	300
301	V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P	325
326	A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S	350
350	R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V	375
376	E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F	400
401	F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H	425
426	E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K	450

Seq. #42: 11D5 HC γ 2

1	E V Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C S V T	25
25	G Y S I T S N Y W G W I R K F P G N K M E W I G H	50
51	I T N S G N T T Y N P S L K S R I S I S R D T S R	75
76	N Q F F L Q L N S V T T E D T A T Y Y C A K G A F	100
101	D Y W G Q G V M V T V S S A S T K G P S V F P L A	125
126	P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V	150
151	T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L	200
176	Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T Y T C N V D H	225
201	K P S N T K V D K T V E R K C C V E C P P C P A P	250
226	P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E	275
251	V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G V E	300
301	V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V	325
326	V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A P I E	350
350	K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M	375
376	T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S	400
401	N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G S F F L Y S	425
426	K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H	450
451	N H Y T Q K S L S L S P G K	

[0014]

人源化氨基酸序列**Seq. #43: Hum11B7-VLk:**

```
1   M D M R V P A Q L L G L L L L W L R G A R C D I Q   25
25  M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D   50
51  I G N L R W Y Q Q K P G K A P K L L I Y G A T N L   75
76  A A G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q  100
101 P E D F A T Y Y C L Q S K E S P W T F G Q G T K V  125
126 E I K                                               150
```

Seq. #44: Hum11B7-VH:

```
1   M K H L W F F L L L V A A P R W V L S Q V Q L Q E   25
25  S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S I S S   50
51  N Y W G W I R Q P P G K G L E W I G Y I T Y S G S   75
76  T S Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K  100
101 L S S V T A A D T A V Y Y C A R T T F Y Y W G Q G  125
126 T L V T V S S                                       150
```

Seq. #46: Hum11D5-VLk:

```
1   M D M R V L A Q L L G L L L L C F P G A R C D I Q   25
25  M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D   50
51  I G N Y L S W F Q Q K P G K A P K S L I Y G A I K   75
76  L A V G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L  100
101 Q P E D F A T Y Y C L Q Y I Q F P L T F G G G T K  125
126 V E I K                                               150
```

[0015]

Seq. #45: Hum11D5-VH:

1	M K H L W F F L L L V A A P R W V L S Q V Q L Q E	25
25	S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S I S S	50
51	N Y W G W I R Q P P G K G L E W I G H I T N S G N	75
76	T T Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K	100
101	L S S V T A A D T A V Y Y C A R G A F D Y W G Q G	125
126	T L V T V S S	150

[0016]

人源化核苷酸序列**Seq. #47: Hum11B7-VLk (427 bp)**

1	AATTAAAAGCTAGCAAGCTTGCCACCATGGATATGCGTGACCTGCACA	50
51	GCTGTAGGACTGCTTCTGCTCTGGCTTAGGGGAGCAAGATGCGACATC	100
101	CAGATGACTCAGAGCCCAAGCTCCTTGTCTGCCAGTGTGGGTGATAGGG	150
151	TCACCATAACCTGTCGAGCTTCACAGGATATCGGCAACTACCTACGCTG	200
201	GTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGCCCCAAAGCTGCTGATCTATGGCGCC	250
251	ACCAATCTGGCTGCTGGTGTTCCTCTCGGTTTCAGTGGGTCTGGATCAG	300
301	GCACAGACTTCACACTCACCATTTCAGCCTCCAACCCGAGGACTTTGC	350
351	GACGTACTACTGCTTGCAGTCCAAGGAATCCCCTTGGACATTTGGGCAA	400
401	GGGACTAAGGTGGAGATTAAGCGTACGAATTAAAA	

Seq. #48: Hum11B7-VH (429 bp)

1	AATTAAGGTACCAAGCTTGCCACCATGAAGCACCTCTGGTTCTTTCTCC	50
51	TGCTAGTGGCTGCTCCTCGCTGGGTGTTGAGCCAGGTTTCAGTTGCAGGA	100
101	ATCTGGACCAGGACTGGTCAAACCCTCTGAGACACTGTCACCTGACATGC	150
151	ACT	200
201	GTGTCAGGTGGCTCCATTTCTCCTCCAACCTATTGGGGCTGGATTTCGGCAAC	250
251	CTCCGGGAAAAGGGCTTGAGTGGATAGGCTACATCACCTATTCTGGGAG	300
301	TACCTCCTACAATCCAGTCTTAAGAGCAGGGTGACTATCAGCGTAGAC	350
351	ACC	400
401	TCCAAGAACCAGTTTAGCCTCAAGCTGAGTTCTGTGACTGCAGCGGATA	
	CAGCCGTCTACTATTGTGCCAGAACCGTTCTACTATTGGGGTTCAGGG	
	CACATTAGTCACCGTTAGCTCAGCGAATTAA	

Seq. #49: Hum11D5-VLk (427 bp)

1	AATTAAAAGCTAGCAAGCTTGCCACCATGGATATGCGCGTCTTAGCCCA	50
51	ACTACTCGGTCTGCTTCTGTTGTGCTTTCCAGGAGCCAGGTGTGACATC	100
101	CAGATGACACAGTCCCCTAGTAGCCTGTCTGCGTCTGTAGGCGATCGAG	150
151	TGA	200

[0017]

201	CCATTACCTGCAGAGCTTCCCAGGATATTGGCAACTATCTGAGCTGGTT	250
251	TCAGCAGAAACCAGGCAAAGCACCCAAGAGTCTCATCTATGGGGCCATC	300
301	AAGCTCGCTGTTGGTGTGCCTTCACGGTTTTCCGGATCTGGGTCAGGCA	350
351	CAG	400
401	ACTTCACTCTGACCATTTCCAGCCTTCAACCGGAAGACTTCGCAACGTA	
	CTACTGTCTGCAGTACATCCAGTTCCCCTTGACTTTCGGTGGAGGGACA	
	AAGGTGGAGATAAAGCGTACGAATTAAAA	

Seq. #50: Hum11D5-VH (429 bp)

1	AATTAAGGTACCAAGCTTGCCACCATGAAGCATCTGTGGTTCTTTCTGC	50
51	TGCTTGTGGCTGCTCCTAGGTGGGTGTTAAGCCAGGTCAGCTCCAGGA	100
101	ATCTGGTCCCGGATTGGTGAAACCGAGTGAGACTCTATCCCTGACATGC	150
151	ACC	200
201	GTTAGTGGAGGCAGTATCTCTAGCAACTATTGGGGCTGGATTCGGCAAC	250
251	CACCTGGTAAGGGCCTTGAGTGGATTGGGCACATCACCAACTCTGGGAA	300
301	TACCACCTACAATCCCTCCCTGAAATCACGCGTCACGATAAGCGTGGAC	350
351	ACT	400
401	TCCAAGAACCAGTTCTCCCTCAAGCTCTCAAGCGTCACAGCAGCGGATA	
	CAGCCGTATACTACTGTGCAAGAGGGGCCTTTGACTATTGGGGACAGGG	
	CACATTGGTGACTGTCAGCTCAGCGAATTAA	

[0018]

引物

SeqID No	引物	序列
#51	kappa_GSP1	GATGGATGCATTGGTGCAGC
#52	new_kappa_GSP1	ATAGATACAGTTGGTGCAGC
#53	heavy_GSP1	CAGGGTCACCATGGAGTTA
#54	XhoI-hGSP2	CCGCTCGAGCGGGCCAGTGGATAGACAGATGG
#55	XhoI-kGSP2	CCGCTCGAGCGGCCGTTTCAGCTCCAGCTTGG
#56	RT-gamma:	GCG TGT AGT GGT TGT GCA GAG
#57	RT-gamma2	GGG CTT GCC GGC CGT G
#58	RT-kappa	TGG AAC TGA GGA GCA GGT GG
#59	5'Blp	AGA TAA GCT TTG CTC AGC GTC CAC CAA GGG CCC ATC GGT
#60	3' Bam(GAG):	AGA TGG ATC CTC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA G
#61	5'Bsi:	AGA TAA GCT TCG TAC GGT GGC TGC ACC ATC TGT CTT CAT
#62	3'Bam(CTT):	AGA TGG ATC CCT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC TCT
#63	VL-11B7-5':	AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA CAT CCA GAT GAC CCA GGC TCC
#64	VL-11B7-3':	AGA TCG TAC GTT TCA GCT CCA GCT TGG TGC CTC
#65	VL-11D5-5':	AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA CAT CCA GAT GAC CCA GTC TCC ATC
#66	VL-11D5-3':	AGA TCG TAC GTT TCA GCT TGG TCC CAG
#67	VH-11B7/ 11D5-5':	AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA GGT GCA GCT TCA GGA GTC AGG
#68	VH-11B7/ 11D5-3':	AGA TGC TGA GCT GAC AGT GAC CAT GAC TCC TTG GCC
#69	小鼠 1	GCG AAT TCG CCA CCA TGG GCA GGG TCC CGC TGG CCT G
#70	小鼠 2	CAG CCG AGG TAT AGG CTG TCA CAG ACA CAG TCA G
#71	小鼠 3	GCA CCC TGT TAG GGT ACC GGC TGG CAT ATC
#72	小鼠 4	ATA AGA ATG CGG CCG CTC AGG CTC CGT CCT CCT GCC CTG
#73	CYNO1	AAT TCG CCA CCA TGG CGT GGC GGT GCC CCA G
#74	CYNO2	CTC TGA CCT CGT GCA GAT GGC AAT CTT CAT C
#75	CYNO3	GTG GCC GCT GCC TGT GTC CTC ATC
#76	CYNO4	ATA AGA ATG C GG CCG CTC AGG CAC CAT CCT CCT GCC CTG

[0019]

#77	MER1	CGG AAT TCG CCA CCA TGG GGC CGG CCC CGC TGC CGC
#78	MER2	TCG GCT GCC ATT CTG GCC AAC TTC C
#79	SKY1	CGG AAT TCG CCA CCA TGG CGC TGA GGC GGA GC
#80	SKY2	GCC CTC GAG CTA ACA GCT ACT GTG TGG CAG TAG

前导序列

核苷酸序列

Seq #81: 1 ATGGGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGG TGTGCATTCC 52

氨基酸序列

Seq #82: 1 M G D N D I H F A F L S T G V H S 17

[0020]

小鼠和食蟹猴 AXL

Seq #83: 食蟹猴 AXL 核苷酸序列

1	ATGGCGTGGCGGTGCCCCAGGATGGGCAGGGTCCCGCTGGCCTGGTGCT	50
51	TGGCGCTGTGCGGCTGGGTGTGCATGGCCCCAGGGGCACACAGGCTGA	100
101	AGAAAGTCCTTTCGTGGGTAAACCCAGGGAATATCACAGGTGCCCGGGGA	150
151	CTCACGGGCACCCTTCGGTGTGTCAGCTCCAGGTTTCAGGGAGAGCCCCCG	200
201	AGGTACACTGGCTTCGGGACGGACAGATCCTGGAGCTCGCGGACAGTAC	250
251	CCAGACCCAGGTGCCCCCTGGGTGAAGATGAGCAGGATGACTGGATAGTG	300
301	GTCAGCCAGCTCAGAATCGCCTCCCTACAGCTTTCGACGCGGGACAGT	350
351	ACCAGTGTGTTGGTGTGTTCTGGGACATCAGAACTTCGTGTCCCAGCCTGG	400
401	CTACGTAGGGCTGGAGGGCTTACCTTACTTCCTGGAGGAGCCTGAGGAC	450
451	AGGACTGTGGCCGCAACACCCCCCTTCAACCTGAGCTGCCAAGCCCAGG	500
501	GACCCCCAGAGCCCGTGACCTACTCTGGCTCCAGGATGCTGTCCCCCT	550
551	GGCCACAGCTCCAGGTCATGGTCCCCAGCGCAACCTGCATGTTCCAGGG	600
601	CTGAACAAGACATCCTCTTCTCTCTGCGAAGCCATAACGCCAAGGGAG	650
651	TCACCACATCCCGCACGGCCACCATCACAGTGCTCCCCAGCAGCCCCG	700
701	TAACCTCCATCTGGTCTCCCGCCAACCCACGGAGCTGGAGGTGGCTTGG	750
751	ACTCCAGGCCTGAGCGGCATCTACCCCTGACCCACTGCACCCTGCAGG	800
801	CTGTGCTGTCAGACGATGGGATGGGCATCCAGGCGGGAGAACCAGACCC	850
851	CCCAGAGGAGCCCCCTCACCTTGCAAGCATCTGTGCCCCCCCACCAGCTT	900
901	CGGCTGGGCAGCCTCCATCCTCACACCCCTTATCACATCCGTGTGGCAT	950
951	GCACCAGCAGCCAGGGCCCCCTCATCCTGGACACACTGGCTTCCTGTGGA	1000
1001	GACGCCGGAGGGAGTGCCCCCTGGGCCCCCTGAGAACATTAGTGCCACG	1050
1051	CGGAATGGGAGCCAGGCCTTCGTGCATTGGCAGGAGCCCCGGGCGCCCC	1100
1101	TGCAGGGTACCCTGTTAGGGTACCGGCTGGCGTATCAAGGCCAGGACAC	1150
1151	CCCAGAGGTGCTAATGGACATAGGGCTAAGGCAAGAGGTGACCCTGGAG	1200
1201	CTGCAGGGGGACGGGTCTGTGTCCAATCTGACAGTGTGTGTGGCAGCCT	1250
1251	ACACTGCTGCTGGGGATGGACCCTGGAGCCTCCCAGTACCCCTGGAGGC	1300
1301	CTGGCGCCAGGGCAAGCACAGCCAGTCCACCAGCTGGTGAAGGAACT	1350
1351	TCAGTCTCTGCCTTCTCGTGGCCCTGGTGGTATATACTGCTAGGAGCAG	1400
1401	TCGTGGCCGCTGCCTGTGTCTCATCTTGGCTCTCTTCTTGTCCACCG	1450
1451	GCGAAAGAAGGAGACCCGTTATGGAGAAGTGTTGAGCCAACAGTGGAA	1500
1501	AGAGGTGAAGTGGTAGTCAGGTACCGCGTGCAGCAAGTCCCTACAGTCGCC	1550
1551	GGACCACTGAAGCTACCTTGAACAGCCTGGGCATCAGTGAAGAGCTGAA	1600
1601	GGAGAAGCTGCGGGATGTGATGGTGGACCGGCACAAGGTGGCCCTGGGG	1650
1651	AAGACTCTGGGAGAAGGAGAGTTTGGAGCCGTGATGGAAGGCCAGCTCA	1700
1701	ACCAGGACGACTCCATCCTCAAGGTGGCTGTGAAGACAATGAAGATTGC	1750
1751	CATCTGCACAAGGTCAGAGCTGGAGGATTTCTTGAGTGAAGCAGTCTGC	1800
1801	ATGAAGGAATTCGACCATCCCAATGTCATGAGGCTCATCGGTGTCTGTT	1850
1851	TCCAGGGTTCTGAACGAGAGAGCTTTCCAGCACCTGTGGTTCATCTTACC	1900
1901	TTTCATGAAGCATGGAGACCTACACAGCTTCCTCCTCTATTCCCGGCTT	1950
1951	GGGGACCAGCCAGTGTACCTGCCCACTCAGATGCTAGTGAAGTTCATGG	2000
2001	CGGACATCGCCAGTGGCATGGAATATCTGAGTACCAAGAGATTTCATACA	2050
2051	CCGGGACCTGGCGGCCAGGAACTGCATGCTGAATGAGAACATGTCCGTG	2100
2101	TGTGTGGCGGACTTCGGGCTCTCCAAGAAGATCTACAACGGGGACTACT	2150
2151	ACCGCCAGGGACGTATCGCCAAGATGCCAGTCAAGTGGATTGCCATTGA	2200
2201	GAGTCTAGCTGACCGTGTCTACACGAGCAAGAGTGATGTGTGGTCCCTTC	2250
2251	GGGGTGACAATGTGGGAGATTGCCACAAGAGGCCAAACCCCATATCCAG	2300
2301	GCGTGGAGAACAGCGAGATTTATGACTATCTGCGCCAGGGAAATCGCCT	2350
2351	GAAGCAGCCTGCGGACTGTCTGGATGGACTGTATGCCTTGATGTGCGG	2400

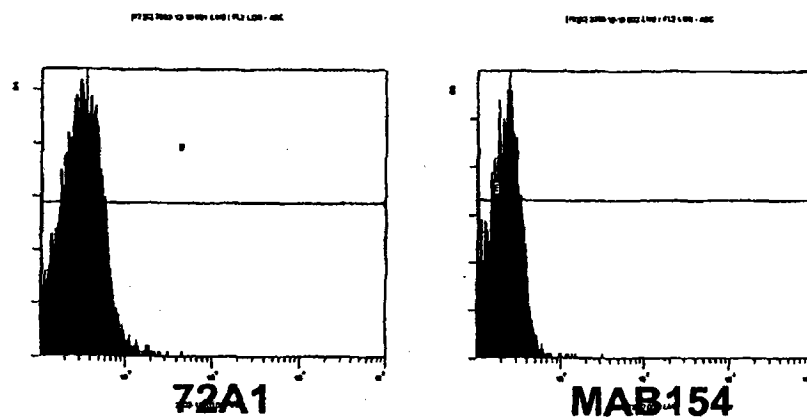
[0021]

2401	TGCTGGGAGCTAAATCCCCAGGACCGGCCAAGTTTACAGAGCTGCGGG	2450
2451	AAGATTTGGAGAACACACTGAAGGCCTTGCCCTCCTGCCCAGGAGCCTGA	2500
2501	CGAAATCCTCTATGTCAACATGGATGAAGGTGGAGGTTATCCTGAACCT	2550
2551	CCCGGCGCTGCTGGAGGAGCTGACCCCCCAACCCAGCTAGACCCTAAGG	2600
2601	ATTCCTGTAGCTGCCTCACTTCGGCTGAGGTCCATCCTGCTGGACGCTA	2650
2651	TGTCCTCTGCCCTTCCACAGCCCCTAGCCCCGCTCAGCCTGCTGATAGG	
	GGCTCCCCAGCAGCCCCAGGGCAGGAGGATGGTGCC	

Seq #84: 食蟹猴 AXL 氨基酸序列

1	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWVCMAPRGTQAEESPFVGNPGNITGARG	50
51	LTGTLRCQLQVQGEPPVHWRDQGILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIV	100
101	VSQRLIASLQLSDAGQYQCLVFLGHQNFVSQPGYVGLEGLPYFLEEPED	150
151	RTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRNLHVP	200
201	LNKTSFSCEAHNAKGVTTSTRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTTELEVAW	250
251	TPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTLQASVPPHQL	300
301	RLGSLHPHTFYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISAT	350
351	RNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTL	400
401	LQGDGSVSNLTVCVAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKET	450
451	SAPAFSWPWWYILLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVE	500
501	RGELVVRVRYRKSYSRRTTEATLNSLGISEELKEKL RDVMVDRHKVALG	550
551	KTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVC	600
601	MKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRL	650
651	GDQPVYLPQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSV	700
701	CVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSF	750
751	GVTMWEIATRGTPTYPGVENSEIYDYL RQGNRLKQPADCLDGLYALMSR	800
801	CWELNPQDRPSFTELREDLENTL KALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEP	850
851	PGAAGGADPPTQLDPKDCSCLTSAEVHPAGRYVLC PSTAPSPAQPADR	900
	GSPAAPGQEDGA	

大鼠1-模拟多克隆



大鼠1-Ax1-cl.2

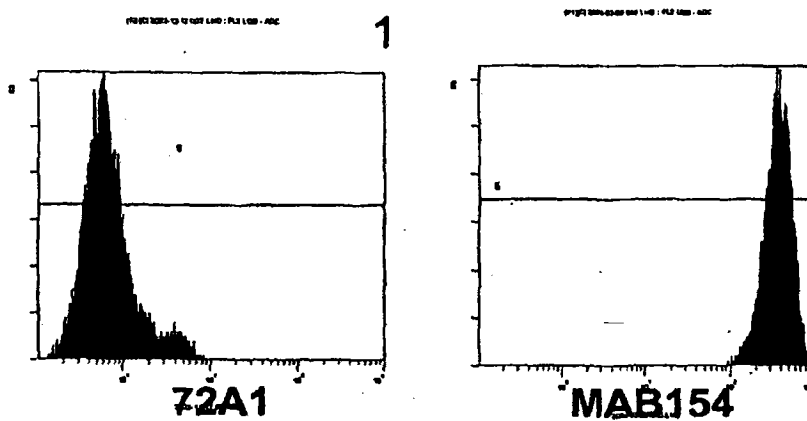


图 1

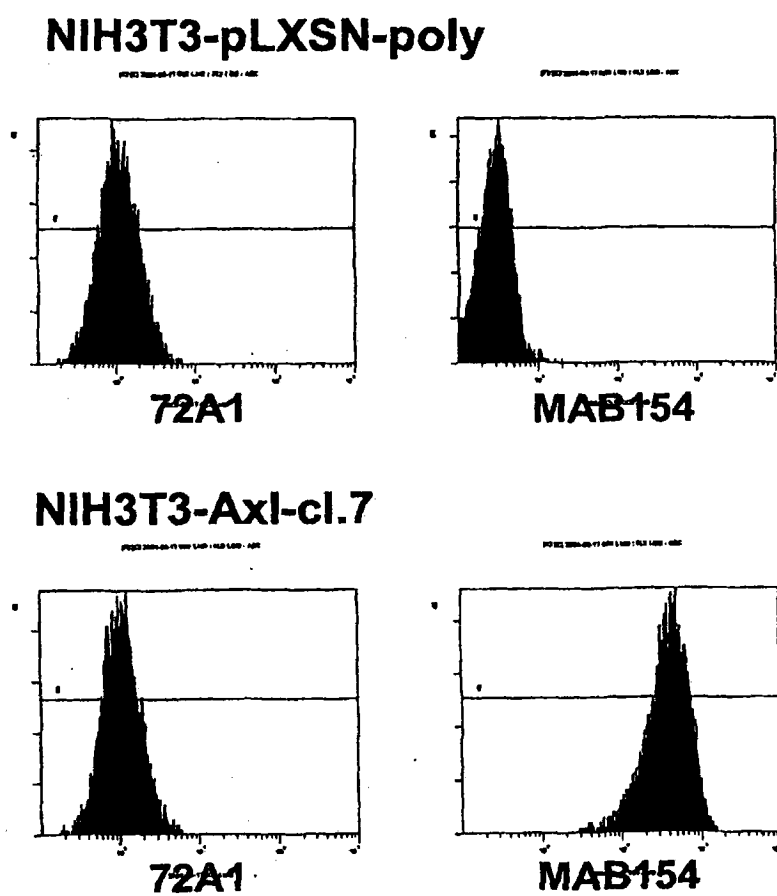


图 2

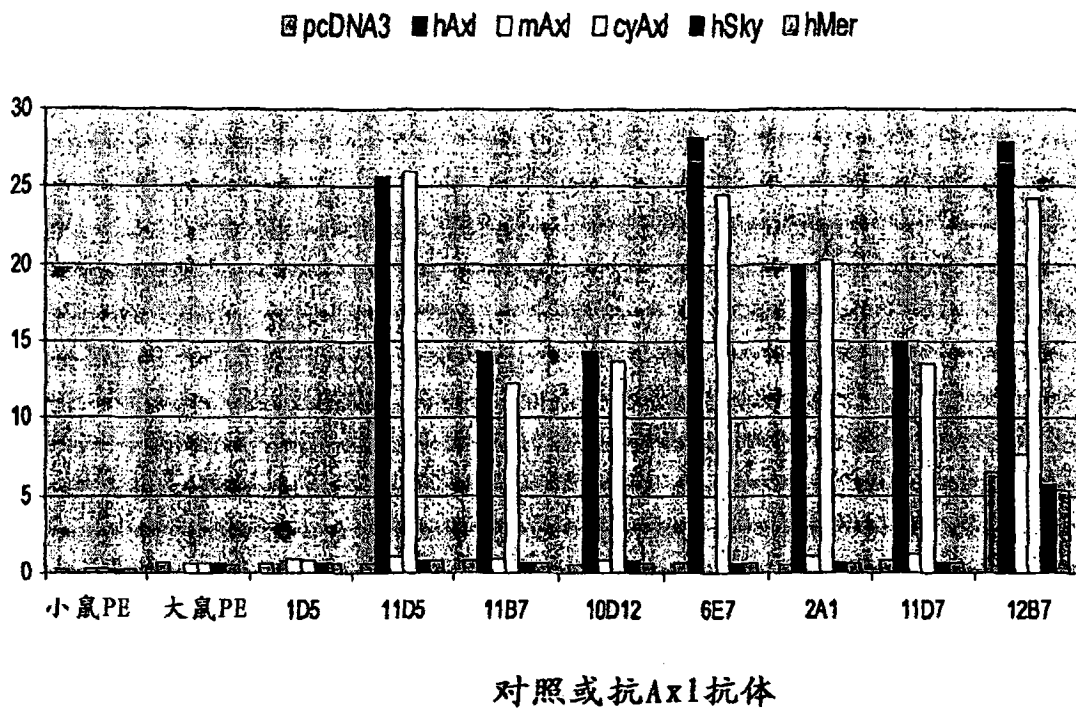
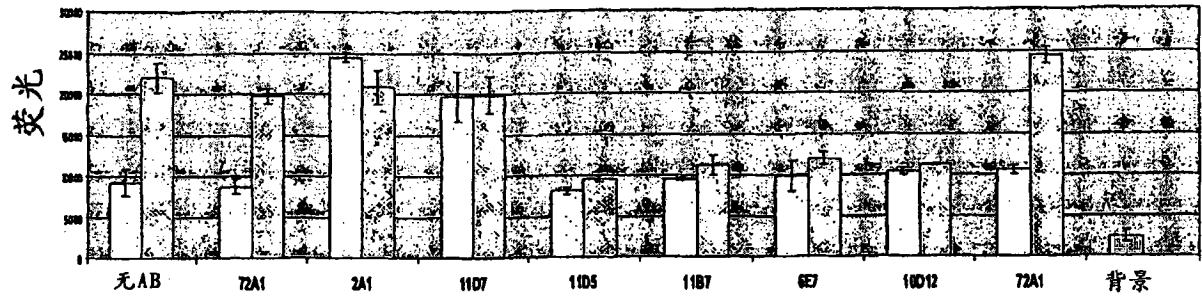


图 3

A NIH3T3-Axl cl.7

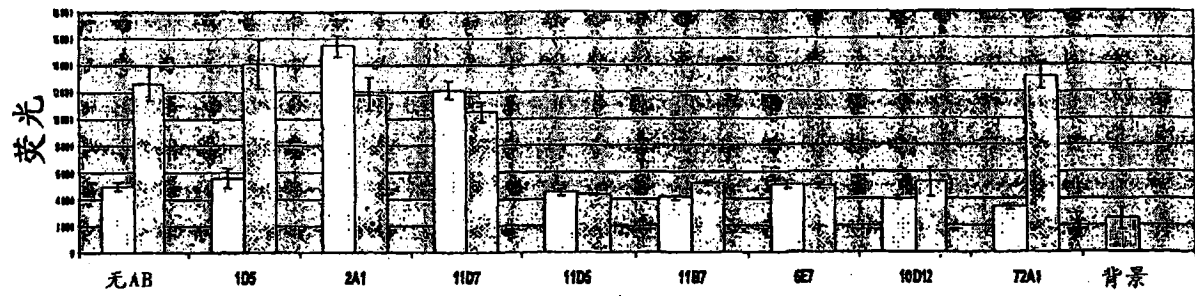
□ 未刺激的 □ 400ng/ml mGAS6



对照或抗Axl抗体

B NCI-H292

□ 未刺激的 □ 400ng/ml mGAS6



对照或抗Axl抗体

图 4

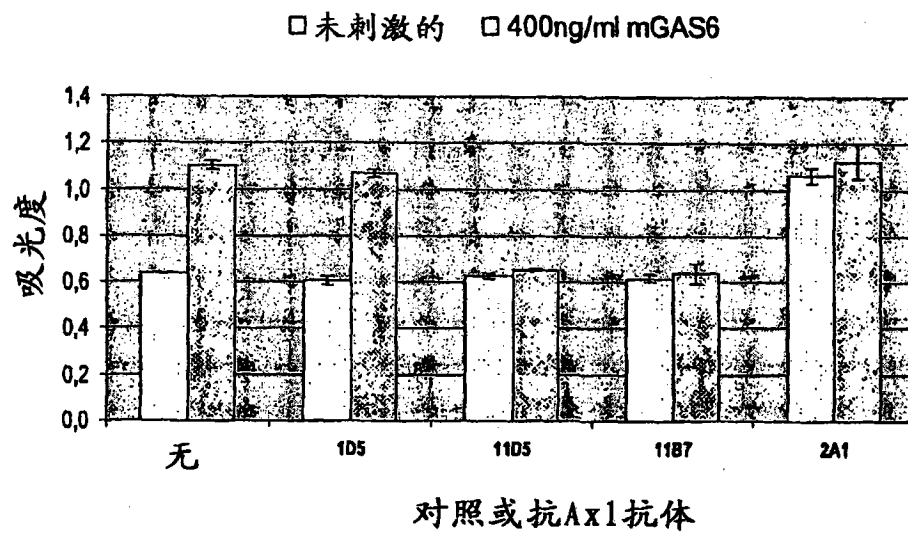


图 5

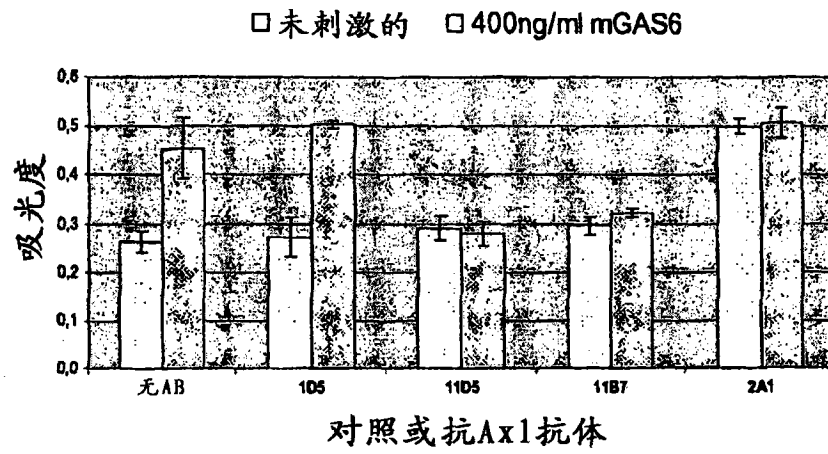
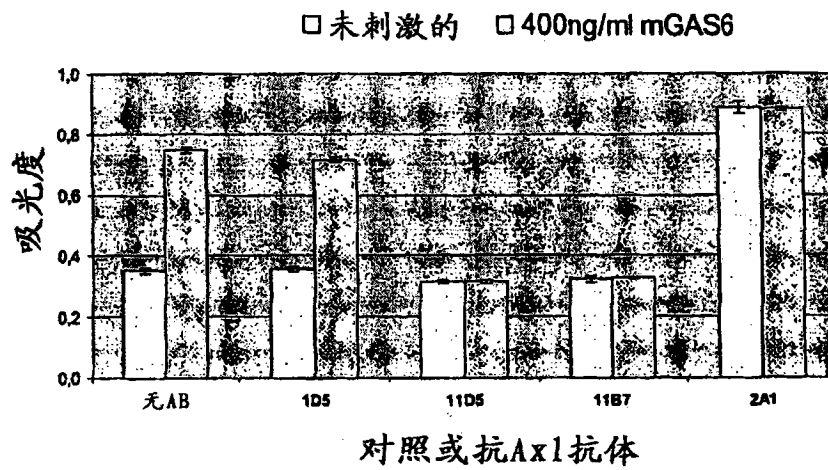
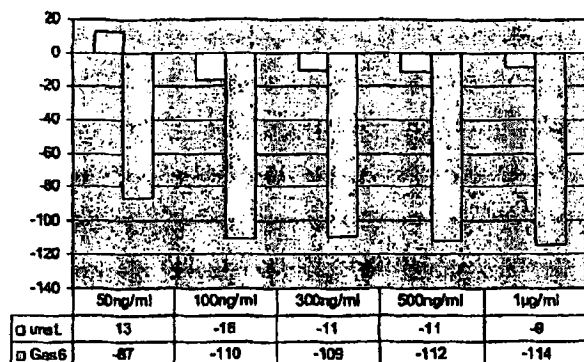
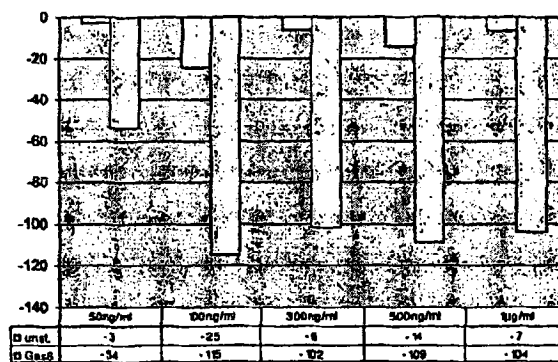
A NIH3T3-Axl cl.7**B CaLu-1**

图 6

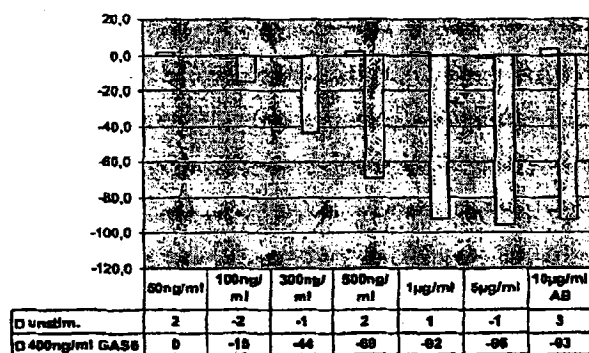
11B7 (rlgG2a)



ch11B7 (hlgG2)



11D5 (rlgG2a)



ch11D5 (hlgG2)

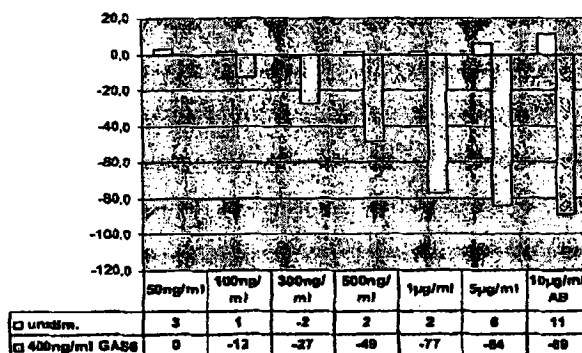


图 7

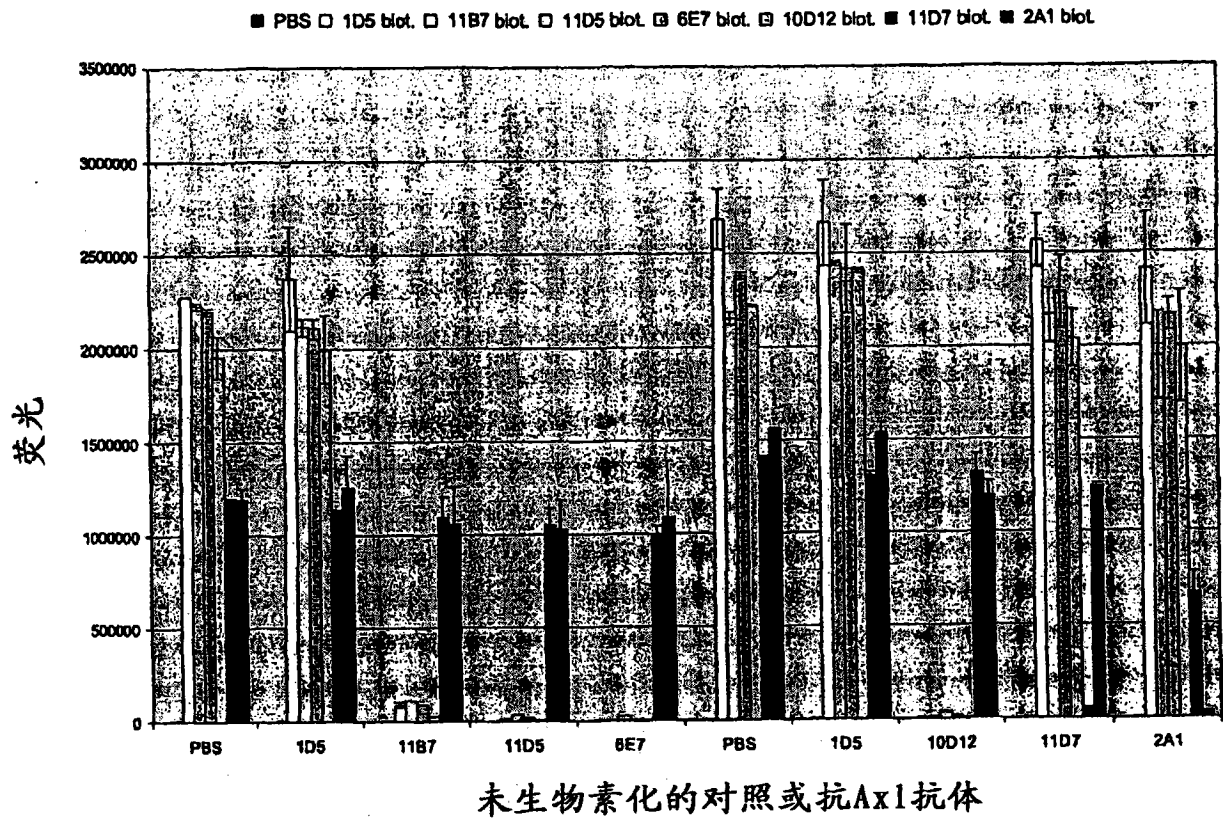


图 8

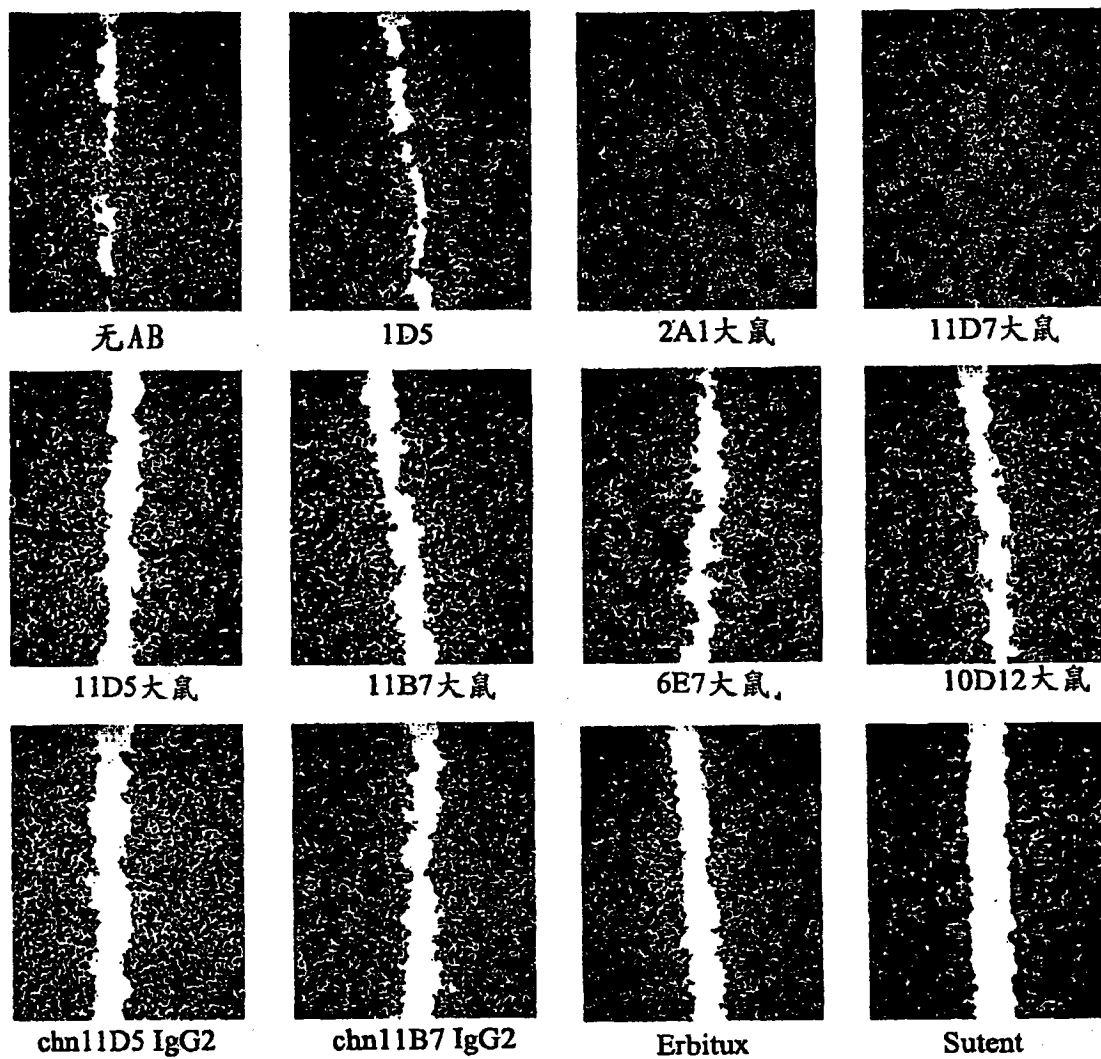


图 9

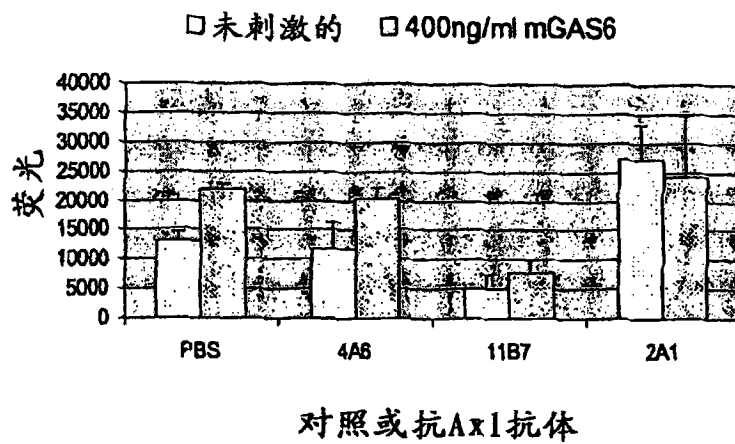


图 10

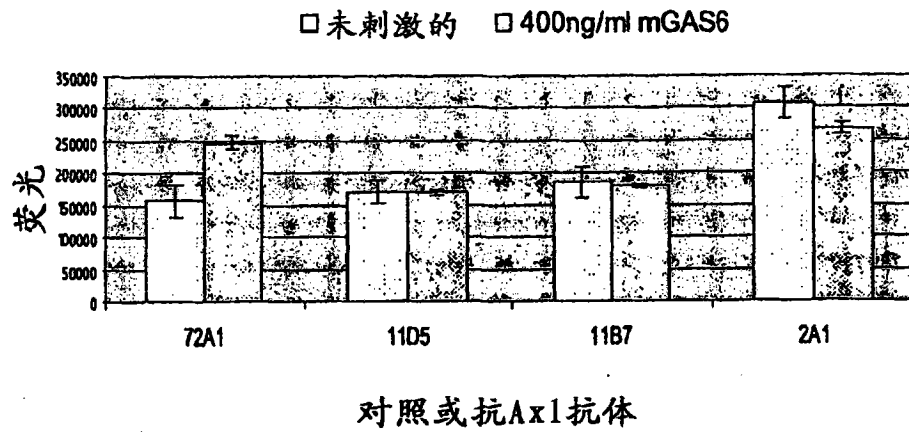


图 11

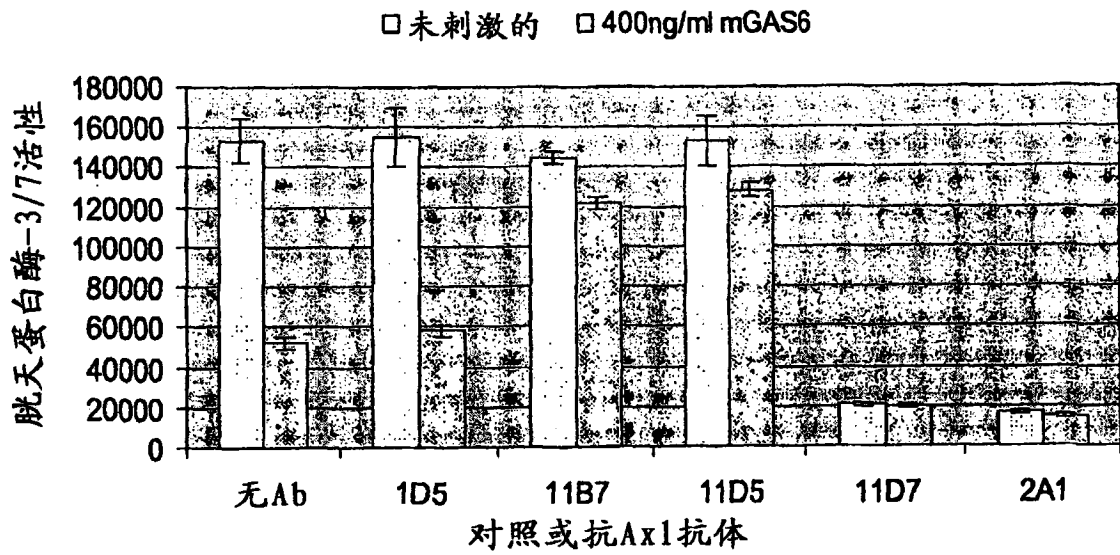
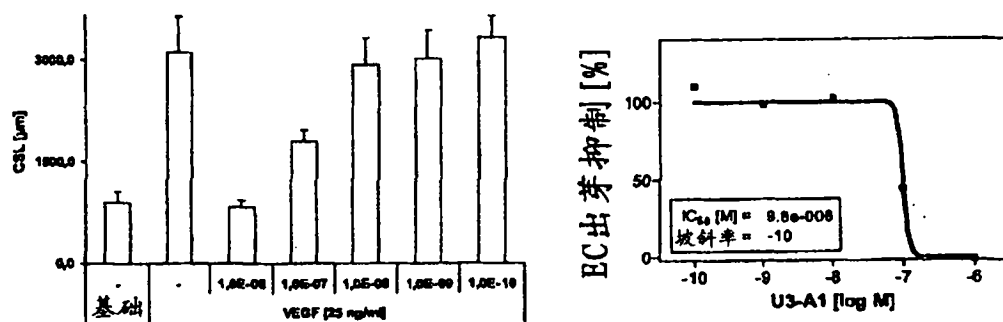


图 12

A 11B7



B 11D5

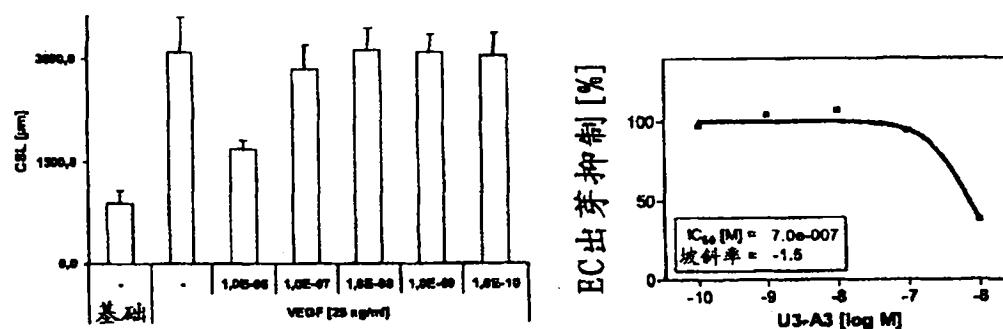


图 13

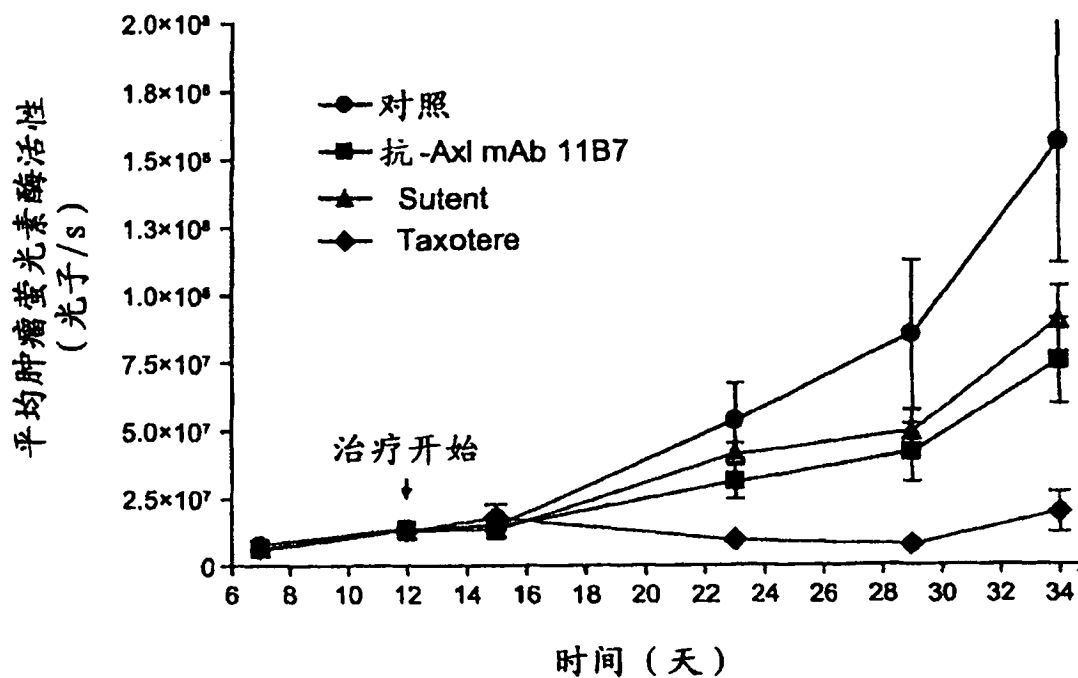


图 14

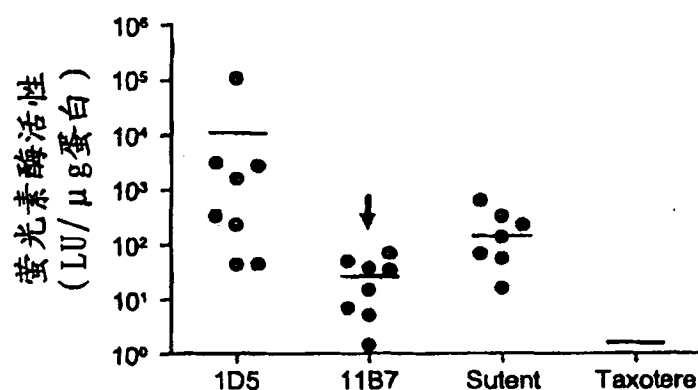
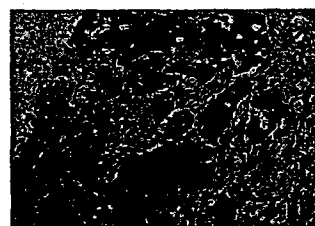


图 15

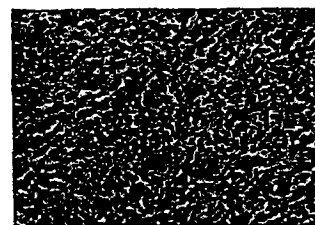
A

	强度 ≥ 1	
	肿瘤	邻近
乳腺	3/3	0/3
结肠	3/11	0/11
肺	2/9	0/9
肾	0/10	0/10
滤泡性淋巴瘤	0/12	0/3
皮肤/黑色素瘤	1/13	0/12
卵巢	4/11	0/9
前列腺	0/11	0/9
胰腺	2/9	0/11
食管	4/10	0/10
巴雷特	4/11	0/9
胃	6/10	0/7
膀胱	8/10	0/10
宫颈	7/9	0/9
肝	3/9	0/7
甲状腺	5/9	0/11
头&颈	8/20	0/17

B

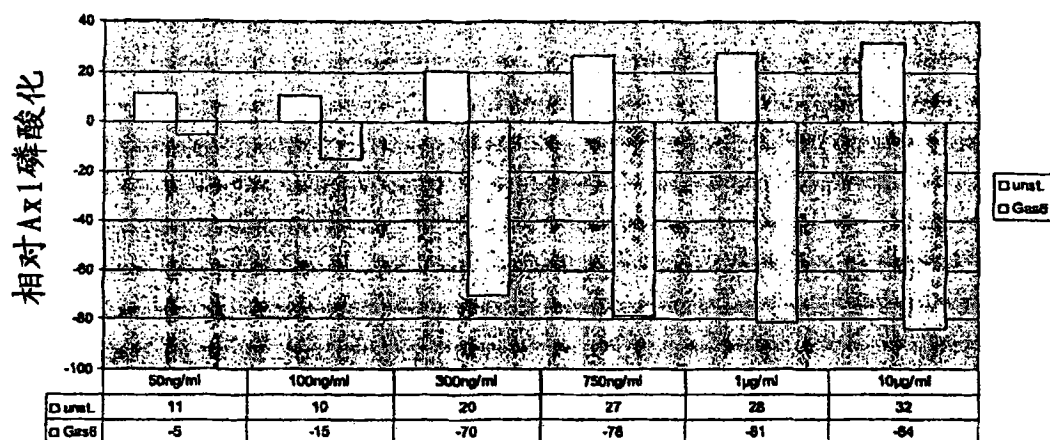


乳腺癌

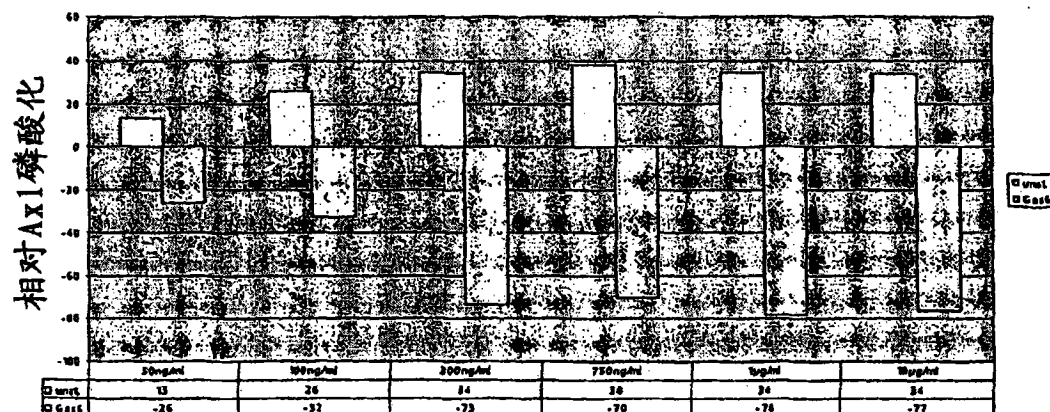


胃印戒细胞癌

图 16

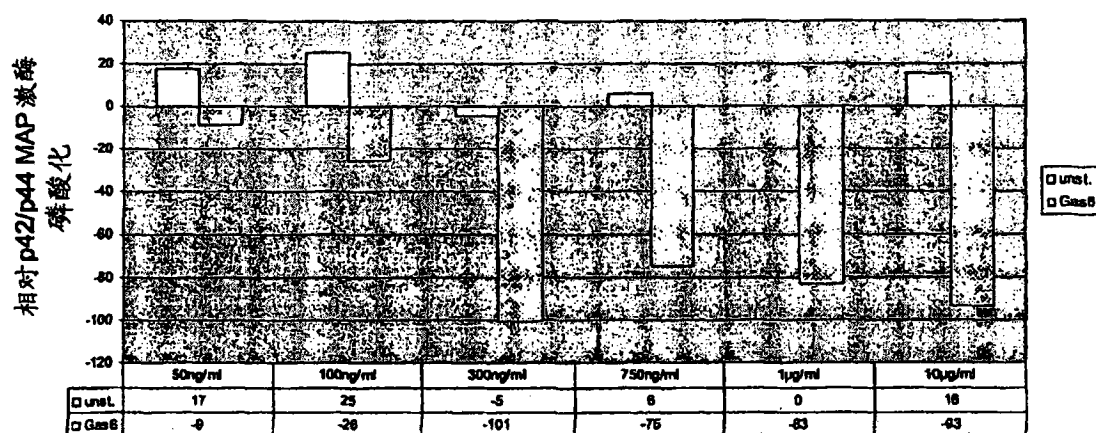
A 11B7 (rlgG1)

抗体治疗

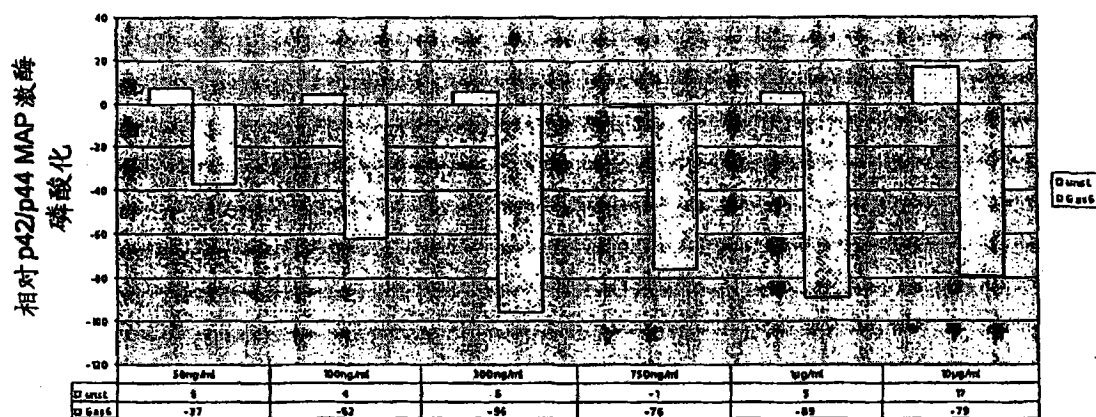
B ch11B7 (hlgG1)

抗体治疗

图 17

A 11B7 (rlgG1)

抗体治疗

B ch11B7 (hlG1)

抗体治疗

图 18

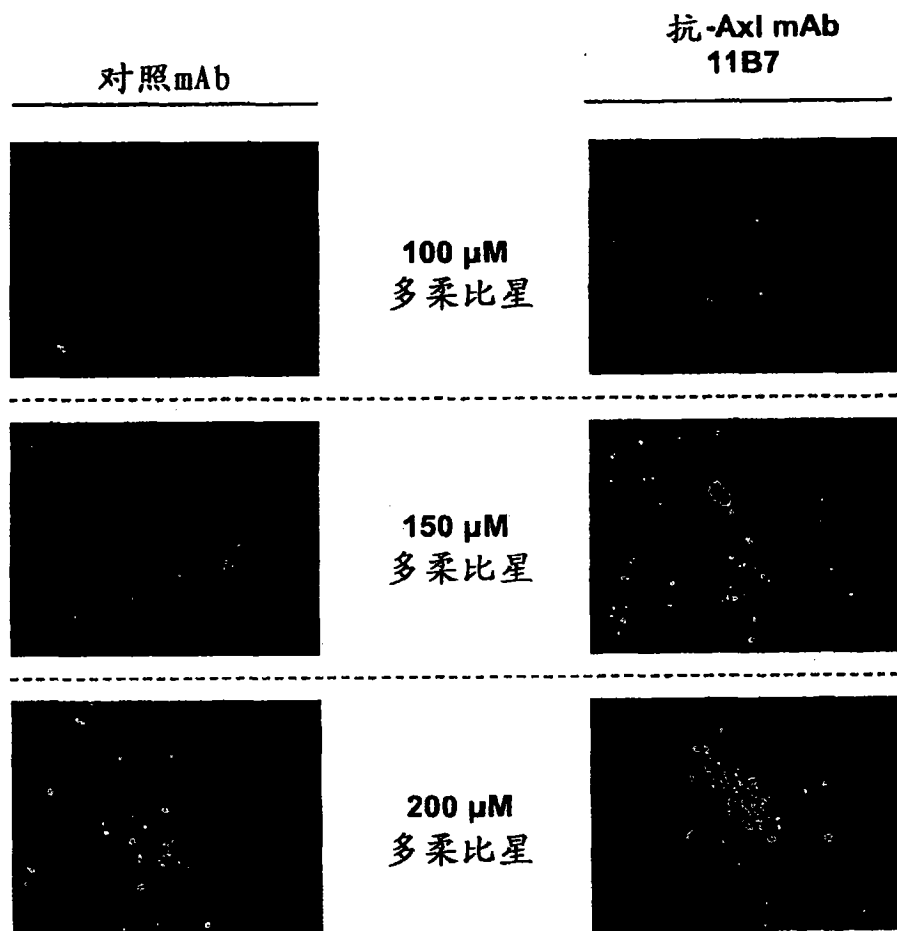
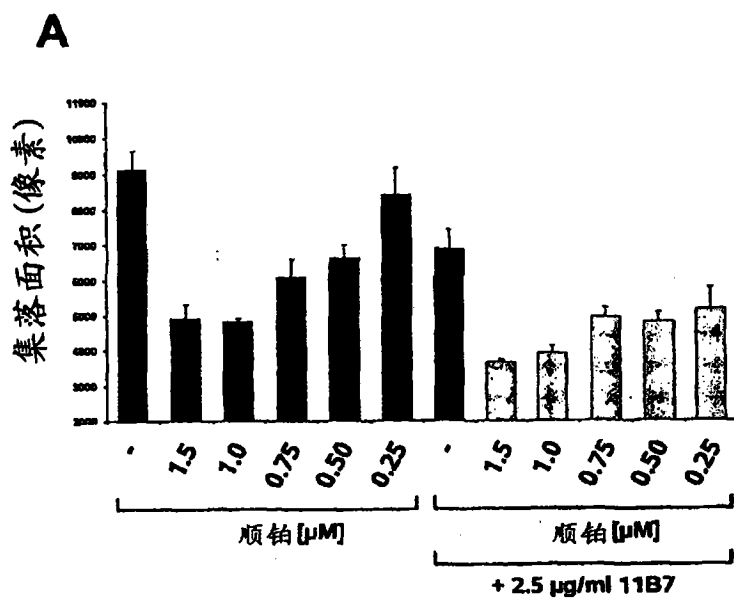
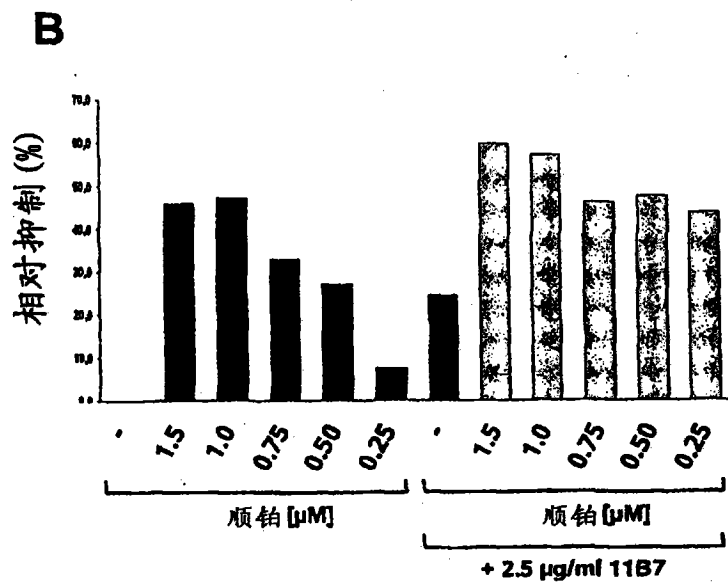


图 19



集落面积, 绝对数目



集落面积, 相对抑制

图 20