



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106999575 A

(43)申请公布日 2017. 08. 01

(21)申请号 201580045140.3

(22)申请日 2015.07.22

(30)优先权数据

10-2014-0092687 2014.07.22 KR

10-2015-0103214 2015.07.21 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.02.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2015/007627 2015.07.22

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/013871 KO 2016.01.28

(71)申请人 奥隆制药

地址 韩国大田广域市

(72)发明人 金容星 崔东起 辛承敏 金圣勋

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 陈桢

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/32(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

A61K 47/68(2017.01)

G12N 15/13(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书35页

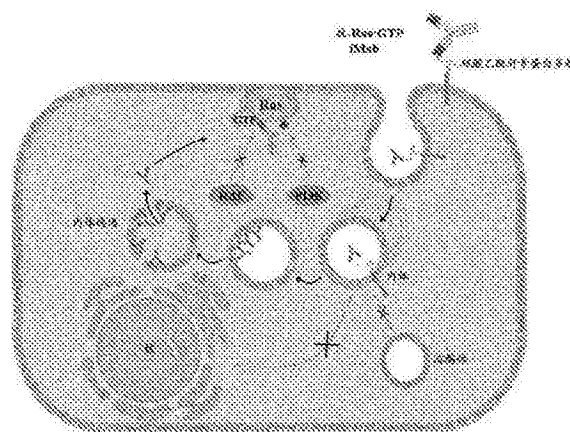
序列表14页 附图26页

(54)发明名称

使用能够穿透细胞质的完整免疫球蛋白类型的抗体抑制在细胞中活化的RAS的方法及其用途

(57)摘要

本发明涉及通过使用具有穿透细胞质的能力和完整免疫球蛋白形式的抗体抑制在细胞中活化的RAS的方法。另外,本发明涉及以下重链可变区(VH)和包含所述重链可变区(VH)的抗体,所述重链可变区(VH)通过经由具有完整免疫球蛋白形式的抗体借助胞吞作用和内体逃逸而主动穿透活细胞的细胞质来诱导与在细胞质中活化的RAS结合。另外,本发明涉及通过使用所述抗体治疗癌症或肿瘤或抑制癌症或肿瘤细胞生长的方法。本发明还涉及筛选与细胞质中的RAS特异性结合的重链可变区的方法。本发明还涉及与所述抗体融合的生物活性分子。本发明还涉及用于预防、治疗或诊断癌症的组合物,其包含所述抗体或与所述抗体融合的生物活性分子。本发明还涉及编码所述轻链可变区和所述抗体的多核苷酸。



1. 抑制细胞内活化的RAS的方法,其使用能够穿透细胞溶胶的完整免疫球蛋白类型的抗体,其中所述抗体与所述细胞溶胶中活化的RAS特异性结合。

2. 权利要求1的方法,其中所述抗体为嵌合、人或人源化抗体。

3. 权利要求1的方法,其中所述抗体为选自以下的任何一种:IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。

4. 权利要求1的方法,其中所述RAS是突变型。

5. 权利要求1的方法,其中所述抗体包含与所述细胞溶胶中活化的RAS特异性结合的重链可变区(VH)。

6. 权利要求5的方法,其中所述重链可变区(VH)包含:

CDR1,其含有与选自以下的氨基酸序列具有至少90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:8、11、14、17、20、23和26;

CDR2,其含有与选自以下的氨基酸序列具有至少90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、12、15、18、21、24和27;和

CDR3,其含有与选自以下的氨基酸序列具有至少90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、13、16、19、22、25和28。

7. 权利要求5的方法,其中所述重链可变区(VH)包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:1至7。

8. 权利要求1的方法,其中所述抗体为主动穿透活细胞的抗体。

9. 权利要求1的方法,其中所述抗体包含具有穿透所述细胞溶胶的能力的轻链可变区(VL)。

10. 权利要求9的方法,其中穿透所述细胞溶胶的能力为通过胞吞作用穿透细胞且然后通过内体逃逸定位在所述细胞溶胶中的能力。

11. 权利要求9的方法,其中所述轻链可变区包含:

CDR1,其含有与选自以下的氨基酸序列具有至少90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:32、35和38;和

CDR3,其含有与选自以下的氨基酸序列具有至少90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:34、27和40。

12. 权利要求9的方法,其中所述轻链可变区为以下轻链可变区,其中由所述轻链可变区的N末端开始编号的第2个和第4个氨基酸分别用亮氨酸(L)和甲硫氨酸(M)取代(其中所述氨基酸的位置根据Kabat编号系统进行编号)。

13. 权利要求9的方法,其中所述轻链可变区为以下轻链可变区,其中由所述轻链可变区的N末端开始编号的第9个、第10个、第13个、第15个、第17个、第19个、第21个、第22个、第42个、第45个、第58个、第60个、第79个和第85个氨基酸分别用丝氨酸(S)、丝氨酸(S)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、天冬氨酸(D)、缬氨酸(V)、异亮氨酸(I)、苏氨酸(T)、赖氨酸(K)、赖氨酸(K)、缬氨酸(V)、丝氨酸(S)、谷氨酰胺(Q)和苏氨酸(T)取代(其中所述氨基酸的位置根据Kabat编号系统进行编号)。

14. 权利要求9的方法,其中所述轻链可变区为以下轻链可变区,其中由所述轻链可变区的N末端开始编号的第89个和第91个氨基酸分别用谷氨酰胺(Q)和酪氨酸(Y)取代(其中所述氨基酸的位置根据Kabat编号系统进行编号)。

15. 权利要求9的方法,其中所述轻链可变区包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:

29、30和31。

16. 权利要求1的方法,其中所述抗体与所述细胞溶胶中活化的RAS的结合抑制活化的RAS与细胞溶胶中的B-Raf、C-Raf或PI3K的结合。

17. 一种重链可变区(VH),其诱导完整免疫球蛋白类型的抗体穿透细胞溶胶且与所述细胞溶胶中活化的RAS结合。

18. 权利要求17的重链可变区(VH),其中所述重链可变区(VH)包含:

CDR1,其含有与选自以下的氨基酸序列具有至少90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:8、11、14、17、20、23和26;

CDR2,其含有与选自以下的氨基酸序列具有至少90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、12、15、18、21、24和27;和

CDR3,其含有与选自以下的氨基酸序列具有至少90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、13、16、19、22、25和28。

19. 权利要求17的重链可变区(VH),其中所述重链可变区(VH)包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:1至7。

20. 一种抗体,其包含权利要求17-19中任一项的重链可变区。

21. 权利要求20的抗体,其中所述抗体为主动穿透活细胞且与所述细胞溶胶中活化的RAS特异性结合的抗体。

22. 权利要求20的抗体,其中所述抗体为嵌合、人或人源化抗体。

23. 权利要求20的抗体,其中所述抗体为选自以下的任何一种:IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。

24. 权利要求20的抗体,其中所述抗体包含具有穿透所述细胞溶胶的能力的轻链可变区(VL)。

25. 权利要求20的抗体,其中穿透所述细胞溶胶的能力为通过胞吞作用穿透细胞且然后通过内体逃逸定位在所述细胞溶胶中的能力。

26. 权利要求24的抗体,其中所述轻链可变区包含:

CDR1,其含有与选自以下的氨基酸序列具有至少90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:32、35和38;和

CDR3,其含有与选自以下的氨基酸序列具有至少90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:34、27和40。

27. 权利要求24的抗体,其中所述轻链可变区可为以下轻链可变区,其中由所述轻链可变区的N末端开始编号的第2个和第4个氨基酸分别用亮氨酸(L)和甲硫氨酸(M)取代(其中所述氨基酸的位置根据Kabat编号系统进行编号)。

28. 权利要求24的抗体,其中所述轻链可变区为以下轻链可变区,其中由所述轻链可变区的N末端开始编号的第9个、第10个、第13个、第15个、第17个、第19个、第21个、第22个、第42个、第45个、第58个、第60个、第79个和第85个氨基酸分别用丝氨酸(S)、丝氨酸(S)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、天冬氨酸(D)、缬氨酸(V)、异亮氨酸(I)、苏氨酸(T)、赖氨酸(K)、赖氨酸(K)、缬氨酸(V)、丝氨酸(S)、谷氨酰胺(Q)和苏氨酸(T)取代(其中所述氨基酸的位置根据Kabat编号系统进行编号)。

29. 权利要求24的抗体,其中所述轻链可变区为以下轻链可变区,其中由所述轻链可变

区的N末端开始编号的第89个和第91个氨基酸分别用谷氨酰胺(Q)和酪氨酸(Y)取代(其中所述氨基酸的位置根据Kabat编号系统进行编号)。

30. 权利要求24的抗体,其中所述轻链可变区包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO: 29、30和31。

31. 抑制癌症或肿瘤细胞生长的方法,所述方法包括将受试者的细胞暴露于与细胞溶胶中活化的RAS特异性结合的抗体的步骤。

32. 治疗癌症或肿瘤的方法,所述方法包括向受试者给药药物有效量的与细胞溶胶中活化的RAS特异性结合的抗体的步骤。

33. 筛选与细胞溶胶中的RAS特异性结合的重链可变区的方法,所述方法包括以下步骤:

- (1) 表达可与结合有GTP的RAS结合的重链可变区文库;
- (2) 使所述文库与结合有GTP的RAS结合;和
- (3) 测量所述文库对结合有GTP的RAS的亲和力。

34. 权利要求33的方法,其中步骤(1)的重链可变区文库在以下氨基酸残基中引起突变:

- 所述重链可变区中CDR1区的第31个至第33个氨基酸残基;
- 所述重链可变区的CDR2区中的第50个和第52个至第56个氨基酸残基;和
- 所述重链可变区的CDR3区的第95个至第100个氨基酸残基。

35. 一种生物活性分子,其与权利要求20-30中任一项的抗体融合且选自肽、蛋白、小分子药物、纳米粒和脂质体。

36. 权利要求35的生物活性分子,其中所述肽为包含SEQ ID NO:41所述氨基酸序列的RGD4C或包含SEQ ID NO:42所述氨基酸序列的RGD10。

37. 用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含:作为活性成分的权利要求20-30中任一项的抗体;或与所述抗体融合且选自以下的生物活性分子:肽、蛋白、小分子药物、纳米粒和脂质体。

38. 用于诊断癌症的组合物,其包含:权利要求20-30中任一项的抗体;或与所述抗体融合且选自以下的生物活性分子:肽、蛋白、小分子药物、纳米粒和脂质体。

39. 一种多核苷酸,其编码权利要求17-19中任一项的轻链可变区或权利要求20-30中任一项的抗体。

使用能够穿透细胞质的完整免疫球蛋白类型的抗体抑制在细胞中活化的RAS的方法及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及使用能够穿透细胞溶胶的完整免疫球蛋白类型的抗体抑制细胞内活化的(GTP结合的)RAS的方法并涉及其用途。

[0002] 另外,本发明涉及诱导完整免疫球蛋白类型的抗体穿透细胞溶胶且与细胞溶胶中活化的RAS结合的重链可变区(VH)并涉及包含所述重链可变区(VH)的抗体。

[0003] 另外,本发明涉及使用所述抗体抑制癌症或肿瘤细胞生长的方法并涉及治疗癌症或肿瘤的方法。

[0004] 另外,本发明涉及筛选与细胞溶胶中的RAS特异性结合的重链可变区的方法。

[0005] 另外,本发明涉及与所述抗体融合且选自以下的生物活性分子:肽、蛋白、小分子药物、纳米粒和脂质体。

[0006] 另外,本发明涉及用于预防、治疗或诊断癌症的组合物,其包含:所述抗体;或与所述抗体融合且选自以下的生物活性分子:肽、蛋白、小分子药物、纳米粒和脂质体。

[0007] 另外,本发明涉及编码所述轻链可变区和所述抗体的多核苷酸。

背景技术

[0008] 完整免疫球蛋白类型的抗体具有高度稳定的Y形结构(分子量:150kDa),其由两条重链(50kDa)蛋白和两条轻链(25kDa)蛋白组成。抗体轻链和重链分为可变区(其氨基酸序列在抗体间不同)和恒定区(其氨基酸序列在抗体间相同)。重链恒定区包括CH1、铰链、CH2和CH3结构域且轻链恒定区包含C κ 或C λ 结构域。抗体重链和轻链可变区具有氨基酸序列在抗体间特别不同的部分且这些部分构成抗原结合位点且因此也称为“互补决定区(CDR)”。当检查抗体的三维结构时,这些CDR形成抗体表面的环。环以下存在结构上支持环的框架区。在重链和轻链中,分别存在三个环结构且这六个环结构彼此组合且与抗原直接接触。抗体的重链恒定区(Fc)通过其与Fc γ Rn(新生Fc受体)的结合保证在血液中的长半衰期且由于该特征,与小分子药物不同的是,抗体在机体中可为持久的。另外,抗体与Fc γ R(Fc γ 受体)等的结合使其可能特异性地通过抗体依赖的细胞的细胞毒性和补体依赖的细胞的细胞毒性诱导过表达靶物质的细胞的死亡。近来出于治疗多种疾病的目的已开发的许多产品可通过多种人源化的方法展现改善的治疗效果,如使用人抗体FR(框架)的CDR移植方法从而克服免疫原性。

[0009] 常规的抗体由于其大尺寸和亲水性而不能直接穿透活细胞。因此,最常规的抗体特异性靶向细胞外分泌蛋白或细胞膜蛋白(Kim SJ等人,2005)。一般的抗体和大分子生物药物具有的局限在于其不能穿过疏水细胞膜且因此不能结合且抑制多种疾病相关物质。一般而言,在用于与机制如细胞生长、特异性抑制等有关的研究的实验中使用的特异性地与细胞内物质结合的商业抗体不能直接用于处理活细胞且为使这些抗体结合细胞内物质,通过细胞膜渗透方法使用两亲糖苷皂苷的在细胞膜中形成孔的预处理过程是必须的。小分子物质、核酸或纳米粒等可通过使用多种试剂或方法如电穿孔或热激转运到活细胞中,但由

于上述的大多试剂和实验条件负面影响蛋白或抗体的特征三维结构,蛋白或抗体可丧失其活性。已开发了特异性地与细胞内蛋白结合且抑制其活性的细胞内抗体(胞内抗体),但这些抗体还不具有穿透活细胞的膜的能力且因此仅可应用于基因疗法且其在未来的应用性非常有限(Manikandan J等人,2007)。

[0010] 与多种类型的抗体片段包括如上文所述的完整免疫球蛋白类型的抗体、大分子物质如重组蛋白等不同的是,小分子物质由于其小尺寸和疏水性质容易且有效地穿透活细胞。然而,为使小分子药物与多种细胞中的疾病相关物质特异性结合,需要靶物质的表面具有疏水口袋。具有该疏水口袋的靶物质仅形成细胞中总的疾病相关物质的约10%且由于该原因,小分子药物不能特异性地靶向大多细胞中的致病性蛋白(Imai K等人,2006)。

[0011] 在多种疾病包括癌症中,存在在细胞中的蛋白-蛋白相互作用(PPI)中发挥重要作用的蛋白或与转录或信号相关的多种蛋白的突变和异常过表达。这样的蛋白中,通过其大和平的表面显示复杂的相互作用的与疾病特别相关的物质难以特异性地通过如上文所述的小分子药物抑制(Blundell等人,2006)。例如RAS,其为细胞溶胶重要的肿瘤相关因子之一(目前尚不存在治疗剂),作为通过细胞膜受体传输细胞外信号至细胞内信号系统的分子开关发挥作用。在约30%的人类癌症特别是结肠直肠癌和胰腺癌中,RAS在细胞中总是由于癌症相关突变活化且这样的致癌相关突变已知为赋予常规抗癌疗法强抗性的主要肿瘤相关因子(Scheffzek K等人,1997)。

[0012] 在克服目前的技术限制的尝试中,已实施多项研究以为可有效抑制蛋白-蛋白相互作用的抗体片段或大分子物质赋予细胞穿透能力。发现了具有碱性氨基酸序列和疏水或两亲性质的蛋白转导结构域(PTD)具有穿透活细胞的能力(Leena N等人,2007)。另外,已作出许多尝试以使蛋白转导结构域与多种类型的抗体片段通过基因工程化方法融合从而识别特异性细胞内蛋白。然而,大多融合蛋白不从动物细胞分泌且仅以非常小的量释放到上清中(Nakajima O等人,2004)且具有富集精氨酸的蛋白转导结构域的融合蛋白具有的问题是其在产生过程中弱抵抗宿主弗林蛋白酶(Chauhan A等人,2007)。另外,存在的问题是融合蛋白的细胞穿透效率低,使得难以将这些融合蛋白开发成为治疗性抗体(Falnes P等人,2001)。在克服表达相关问题的尝试中,已进行研究以在蛋白纯化后通过化学共价键或生物素-链霉亲和素键融合细胞穿透结构域,但这些方法导致蛋白的结构变形。

[0013] 另外,使用一些自身抗体实施的研究报导了抗体和短链可变区(scFv)抗体片段可通过胞吞作用穿透进入细胞。自身抗体是在具有自身免疫疾病的人和小鼠中发现的抗DNA抗体且这些抗体中的一些具有穿透活细胞的特征(Michael R等人,1995;Michael P等人,1996;Jeske Zack D等人,1996)。至今报导的穿透细胞的自身抗体在其引入细胞后大多定位于核且已积极进行研究以将这些穿透细胞的自身抗体与在核中显示效应的特定蛋白融合(Weisbart等人,2012)。然而,蛋白通过使用自身抗体穿透进入活细胞具有的局限是蛋白最终定位于核且因此不能特异性地与胞内细胞溶胶中的多种疾病相关物质结合且抑制其活性。

[0014] 天然存在的大分子物质中,具有穿透细胞的性质的典型物质包括病毒(HIV、HSV)、毒素(霍乱毒素、白喉毒素)等。已知这些物质通过为细胞内活跃的转运机制的胞吞作用穿透细胞。该胞吞作用主要分为三种途径:通过由配体结合参与受体内化的网格蛋白的胞吞作用;在一些毒素如霍乱毒素中发现的通过小窝的胞吞作用;和在葡聚糖、埃博拉病毒等中

发现的巨吞饮。其中网格蛋白和小窝参与的胞吞作用主要开始于当分布在细胞膜上的受体与特异性配体结合时。网格蛋白定位于细胞膜的内表面。当物质与受体结合时,网格蛋白使得纤维壳形成囊泡,其运动进入细胞。小窝通过小窝蛋白-1的作用形成低聚体同时形成运动进入细胞溶胶的稳定囊泡(小窝体)。在巨吞饮中,细胞膜的一部分突出以围绕物质由此形成运动进入细胞溶胶的大染色体(Gerber等人,2013)。其他内体逃逸机制不存在时,通过这样的胞吞作用通路穿透细胞溶胶的物质大多通过溶酶体通路降解。

[0015] 为避免通过溶酶体通路的降解,病毒、毒素等具有的机制是通过该机制其从内体逃逸进入细胞溶胶。尽管内体逃逸机制尚不清楚,至今已知三种内体逃逸机制的假设。第一种假设的机制是通过该机制形成内体膜中发现的孔。在该假设中,内体膜中的物质如阳离子两亲肽与带负电荷的细胞脂质双层结合以引起内部压力或内膜收缩由此形成桶形孔或环形通道(Jenssen等人,2006)。第二种假设的机制是通过该机制内体破裂成为质子海绵效应的结果。在该假设中,由于具有质子化氨基的物质的高缓冲效应,内体的渗透压可增加从而内体膜可降解(Lin和Engbersen,2008)。在第三种假设中,特定的基序(其在中性环境中维持亲水线圈形状但在酸性环境如内体中变为疏水螺旋结构)通过与内体的膜融合从内体逃逸(Horth等人,1991)。然而,基于上述假设所实施的证明多种天然存在的物质的内体逃逸机制的研究仍不充分。

[0016] 因此,本发明的发明人构建了重链可变区(VH)文库以选择具有与活化的RAS特异性结合的能力的重链可变区(VH)且将具有人源化的轻链可变区(VL)的轻链(其穿透活细胞且定位与细胞溶胶中)与所选重链可变区(VH)共表达由此构建了完整免疫球蛋白类型的抗RAS的穿透细胞溶胶的抗体(iMab(内化和干扰单克隆抗体)),其可穿透活细胞且与细胞溶胶中活化的RAS特异性结合。

[0017] 另外,本发明的发明人开发了穿透细胞且定位在细胞溶胶中的人源化的轻链可变(VL)单结构域以发明穿透活细胞且定位在细胞溶胶中的完整免疫球蛋白类型的抗体。另外,为构建稳定的完整免疫球蛋白类型的单克隆抗体,本发明的发明人改进了局域穿透细胞溶胶的能力的单链可变单结构域(VL)抗体片段从而其容易与多种人重链可变区(VH)相互作用并结合同时保持其穿透细胞且定位在细胞溶胶中的能力由此开发穿透细胞且定位在细胞溶胶中的完整免疫球蛋白类型的单克隆抗体。

[0018] 另外,本发明的发明人发现了穿透细胞溶胶的抗RAS单克隆抗体穿透多种RAS依赖性癌细胞系且通过特异性地中和细胞溶胶中的RAS抑制细胞生长且发现了即使当抗体与肽融合用于赋予肿瘤组织特异性时,其在RAS依赖的肿瘤中展现特异性抑制活化的RAS的活性而不负面影响穿透细胞溶胶和中和活化的RAS的能力由此完成了本发明。

发明内容

[0019] 技术问题

[0020] 因此,本发明的目的是提供使用能够穿透细胞溶胶的完整免疫球蛋白类型的抗体抑制细胞内活化的RAS的方法。

[0021] 本发明的另一个目的是提供诱导完整免疫球蛋白类型的抗体穿透细胞溶胶且与细胞溶胶中活化的RAS结合的重链可变区(VH)和包含所述重链可变区(VH)的抗体。

[0022] 本发明的另一个目的是提供使用所述抗体抑制癌症或肿瘤细胞生长的方法和用

于治疗癌症或肿瘤的方法。

[0023] 本发明的另一个目的是提供对与细胞溶胶中的RAS特异性结合的重链可变区进行筛选的方法。

[0024] 本发明的另一个目的是提供与所述抗体融合且选自以下的生物活性分子：肽、蛋白、小分子药物、纳米粒和脂质体。

[0025] 本发明的另一个目的是提供用于预防、治疗或诊断癌症的组合物，其包含：所述抗体；或与所述抗体融合且选自以下的生物活性分子：肽、蛋白、小分子药物、纳米粒和脂质体。

[0026] 本发明的另一个目的是提供编码所述轻链可变区和所述抗体的多核苷酸。

[0027] 技术方案

[0028] 为了实现上述目的，本发明提供使用以下完整免疫球蛋白类型的抗体抑制细胞内活化的RAS的方法，所述抗体通过胞吞作用和内体逃逸主动穿透活细胞的细胞溶胶，其中所述抗体与细胞溶胶中活化的RAS特异性结合。

[0029] 以下将对本发明进行详细描述。

[0030] 本发明的方法通过诱导完整免疫球蛋白类型的抗体穿透细胞溶胶且与细胞溶胶中活化的RAS结合的重链可变区 (VH) 抑制细胞内活化的RAS。

[0031] 根据本发明，可诱导完整免疫球蛋白类型的抗体通过胞吞作用渗透活细胞的膜且通过内体逃逸定位在细胞溶胶中的轻链可变区 (VL) 允许完整免疫球蛋白类型的抗体穿透细胞膜且定位在细胞溶胶中。

[0032] 也就是说，本发明的方法提供诱导抗体穿透细胞溶胶且与细胞溶胶中活化的 (GRP结合的) RAS (肿瘤相关因子) 特异性结合且抑制RAS的活性的方法。

[0033] 所述抗体可为嵌合、人或人源化抗体。

[0034] 所述抗体可为IgG、IgM、IgA、IgD或IgE。例如，所述抗体可为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgE、IgA1、IgA5或IgD且最优选可为IgG型单克隆抗体。

[0035] 在本发明中，完整免疫球蛋白类型的抗体所具有的结构拥有两条全长轻链和两条全长重链且每条轻链通过二硫键 (SS-键) 与每条重链连接。抗体的恒定区分为重链恒定区和轻链恒定区且重链恒定区具有 γ 、 μ 、 α 、 δ 和 ϵ 型及 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 、 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 亚类。轻链恒定区具有 κ 和 λ 型。

[0036] 本文使用的术语“重链”可被理解为包括含有可变区结构域VH和三个恒定区结构域CH1、CH2和CH3的全长重链及其片段，所述可变区结构域VH所包含的氨基酸序列具有足以赋予抗原特异性的可变区序列。另外，本文使用的术语“轻链”可被理解为包括含有可变区结构域VL和恒定区结构域CL的全长轻链及其片段，所述可变区结构域VL所包含的氨基酸序列具有足以赋予抗原特异性的可变区序列。

[0037] 在本发明的一个实施方案中，抗体可为靶向于细胞溶胶中活化的RAS且与其特异性结合的抗体。活化的RAS可为GTP结合的肿瘤相关因子且RAS可为突变的RAS。RAS的突变可为与疾病相关的各种突变且其实例包括但不限于在KRas、HRas或NRas的甘氨酸12、甘氨酸13和谷氨酰胺61处发生的取代突变。

[0038] 完整免疫球蛋白类型的抗体与细胞内活化的RAS的结合通过与细胞溶胶中活化的RAS特异性结合的重链可变区 (VH) 引起。

[0039] 在本发明的一个方面,与细胞溶胶中活化的RAS特异性结合的重链可变区(VH)可包含:

[0040] CDR1,其含有与选自以下的氨基酸序列具有至少90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:8、11、14、17、20、23和26;

[0041] CDR2,其含有与选自以下的氨基酸序列具有至少90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、12、15、18、21、24和27;和

[0042] CDR3,其含有与选自以下的氨基酸序列具有至少90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、13、16、19、22、25和28。

[0043] 关于重链可变区的序列的信息如下:

[0044]

重链可变区的名称	CDR1 序列	SEQ ID NO:	CDR2 序列	SEQ ID NO:	CDR3 序列	SEQ ID NO:
Kabat No.	31 32 33 34 35		39 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55		56 58 59 60 61 62 63 64 65	
RT4	E Y A M S	8	T I S R S G H E T Y Y A D S V K G	9	R P G G I V F D Y	10
RT11	E Y S M S	11	V I S R T E H T T Y Y A D S V R G	12	G P P - - - K D Y	13
RT13	T F S M S	14	V I S R T E H T T Y Y A D S V E G	15	G T F G - - F D Y	16
RT14	T F G M S	17	V I G R T S H T T Y Y A D S V K G	18	P R G W - - F D Y	19
RT15	T F G M S	20	V I G R T S H T T Y Y A D S V K G	21	R F G S - - F D Y	22
RT16	T F G M S	23	V I G R T S H T T Y Y A D S V K G	24	S S G R F V F D Y	25
RT17	T F G M S	26	V I G R T S H T T Y Y A D S V K G	27	G R F G G V F D Y	28

[0045] 在本发明的一个实施方案中,本发明的重链可变区可包含SEQ ID NO:8的CDR1、SEQ ID NO:9的CDR2和SEQ ID NO:10的CDR3。

[0046] 在本发明的一个实施方案中,本发明的重链可变区可包含SEQ ID NO:11的CDR1、SEQ ID NO:12的CDR2和SEQ ID NO:13的CDR3。

[0047] 在本发明的一个实施方案中,本发明的重链可变区可包含SEQ ID NO:14的CDR1、SEQ ID NO:15的CDR2和SEQ ID NO:16的CDR3。

[0048] 在本发明的一个实施方案中,本发明的重链可变区可包含SEQ ID NO:17的CDR1、SEQ ID NO:18的CDR2和SEQ ID NO:19的CDR3。

[0049] 在本发明的一个实施方案中,本发明的重链可变区可包含SEQ ID NO:20的CDR1、SEQ ID NO:21的CDR2和SEQ ID NO:22的CDR3。

[0050] 在本发明的一个实施方案中,本发明的重链可变区可包含SEQ ID NO:23的CDR1、SEQ ID NO:24的CDR2和SEQ ID NO:25的CDR3。

[0051] 在本发明的一个实施方案中,本发明的重链可变区可包含SEQ ID NO:26的CDR1、SEQ ID NO:27的CDR2和SEQ ID NO:28的CDR3。

[0052] 另外,在本发明的优选实施方案中,重链可变区(VH)可由选自以下的氨基酸序列构成:SEQ ID NO:1至7。

[0053] 关于重铈可变区的序列的信息如下:

[0054]

重链可变区的名称	序列	SEQ ID NO:
RT4	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVPGQGLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVSTISRSCHSTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRFQSIFDYWGQGDTLVTVSS	SEQ ID NO: 1
RT11	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVPGQGLRLSCAASGFTFSYMSWVRQAPGKLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNGKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFF---MDYWGQDTLVTVSS	SEQ ID NO: 2
RT13	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVPGQGLRLSCAASGFTFSYMSWVRQAPGKLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTFG---FDYWGQDTLVTVSS	SEQ ID NO: 3
RT14	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVPGQGLRLSCAASGFTFSYFMGWVRQAPGKLEWVSYISRTGHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPRGW---FDYWGQDTLVTVSS	SEQ ID NO: 4
RT15	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVPGQGLRLSCAASGFTFSYFMGWVRQAPGKLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRFQS---FDYWGQDTLVTVSS	SEQ ID NO: 5
RT16	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVPGQGLRLSCAASGFTFSYFMGWVRQAPGKLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSGRFVFDYWGQDTLVTVSS	SEQ ID NO: 6
RT17	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVPGQGLRLSCAASGFTFSYMSWVRQAPGKLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNGKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFFQSIFDYWGQDTLVTVSS	SEQ ID NO: 7

[0055] 与RAS特异性结合且抑制其活性的重链可变区通过以下方法筛选。

[0056] 在本发明的实施例中,筛选使用以下文库进行,其中CDR1、CDR2和CDR3区中共18个残基处的人工突变在所构建的人重链可变区(VH)和重链恒定区(CH1)彼此融合的状态下诱导。

[0057] 在本发明的实施例中,使用其中人重链可变区(VH)和重链恒定区(CH1)彼此融合的文库对重链可变区进行选择,其可与活化的(GTP结合的)RAS特异性结合,即使在其与穿透细胞溶胶的人源化轻链可变区(VL)融合的状态下。

[0058] 在本发明的实施例中,KRas G12D(一种活化的(GTP结合的)RAS突变体)用作靶分子。在一个实施方案中,与癌症相关的RAS突变主要发生在残基12、13和61处,其中残基12和13位于RAS蛋白的P环中且影响GAP(GTP酶活化蛋白)的结合,而GAP水解与RAS蛋白结合的GTP以诱导蛋白结构变为失活形式。另外,残基61与GAP的水解活性位点结合以防止GTP水解。因此,多种与癌症相关的RAS突变不限于KRas G12D突变,这是因为其信号传导相关区(开关I和开关II)与RAS G12D突变的信号传导相关区(开关I和开关II)等同。

[0059] 另外,在一个实施方案中,NRas和HRas中范围在残基1和残基165之间的催化结构域与KRas中的催化结构域都具有至少85%类似性。在催化结构域中,与下游信号传导物质结合的开关I(残基32-38)和开关II(残基59-67)与KRas中的那些完全一致。然而,范围在残基165和残基189之间的C末端早期结构域具有15%类似性,但是其结构不影响下游信号传导。因此,所使用的靶分子不限于活化的KRas G12D。

[0060] 在本发明的实施例中,使用酵母细胞表面展示系统针对活化的(GTP结合的)RAS以

表达重链可变区 (VH) 和重链恒定区 (CH1) 的状态进行初始筛选。然后Fab通过与表达且分泌含有穿透细胞溶胶的轻链可变区 (VL) 和轻链恒定区 (CL) 的轻链的酵母进行配对来筛选。

[0061] 在本发明的一个实施方案中,抗体能够主动穿透活细胞。该穿透细胞溶胶的能力为通过胞吞作用穿透细胞且然后通过内体逃逸定位在细胞溶胶中的能力。

[0062] 该穿透细胞溶胶的能力可通过抗体的穿透细胞溶胶的轻链可变区 (VL) 展现。

[0063] 在本发明的一个实施方案中,轻链可变区可包含:

[0064] CDR1,其含有与选自以下的氨基酸序列具有至少90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:32、35和38;和

[0065] CDR3,其含有与选自以下的氨基酸序列具有至少90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:34、27和40。

[0066] 关于轻链可变区的序列的信息如下:

[0067]

轻链可变区的名称	CDR1 序列	SEQ ID NO:	CDR2 序列	SEQ ID NO:	CDR3 序列	SEQ ID NO:
Kabat No.	5 25 26 27 27a 27b 27c 27d 27e 28 28a 29 31 32 33 34		35 36 37 38 39 40		41 42 43 44 45 46	
hT2 VL	KSSQSILFNSRTTRKNYLA	32	WASTREDS	33	KQSY YHMYT	34
hT3 VL	KSSQSILFNSRTTRKNYLA	35	WASTREDS	36	KQSY YHMYT	37
hT4 VL	KSSQSILFNSRTTRKNYLA	38	WASTREDS	39	QQY Y YHMYT	40

[0068] 另外,在本发明的一个实施方案中,轻链可变区可进一步包含由选自以下的氨基酸序列构成的CDR2或与所述CDR2具有至少90%同源性的序列:SEQ ID NO:33、36和39。

[0069] 在本发明的一个实施方案中,轻链可变区可包含SEQ ID NO:32的

[0070] CDR1、SEQ ID NO:33的CDR2和SEQ ID NO:34的CDR3。

[0071] 另外,在本发明的另一个实施方案中,轻链可变区可包含SEQ ID NO:35的CDR1、SEQ ID NO:36的CDR2和SEQ ID NO:37的CDR3。

[0072] 另外,在本发明的另一个实施方案中,轻链可变区可包含SEQ ID NO:38的CDR1、SEQ ID NO:39的CDR2和SEQ ID NO:40的CDR3。

[0073] 在本发明的一个实施方案中,轻链可变区可为以下轻链可变区,其中由轻链可变区的N末端开始编号的第2个和第4个氨基酸分别用亮氨酸(L)和甲硫氨酸(M)取代。

[0074] 该轻链可变区为通过取代第2个和第4个残基获得的轻链可变区,所述第2个和第4个残基在位于FR(框架)中的CDR游标区所包含的残基中就获得保持其穿透细胞溶胶的能力的CDR结构而言是重要的。

[0075] 在本发明的一个实施方案中,轻链可变区可为以下轻链可变区,其中由轻链可变区的N末端开始编号的第9个、第10个、第13个、第15个、第17个、第19个、第21个、第22个、第42个、第45个、第58个、第60个、第79个和第85个氨基酸分别用丝氨酸(S)、丝氨酸(S)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、天冬氨酸(D)、缬氨酸(V)、异亮氨酸(I)、苏氨酸(T)、赖氨酸(K)、赖氨酸(K)、缬氨酸(V)、丝氨酸(S)、谷氨酰胺(Q)和苏氨酸(T)取代。

[0076] 该轻链可变区为基于以下测序结果获得的轻链可变区,所述测序结果表明共14个残基不同于曲妥单抗(Herceptin),而曲妥单抗在由FDA批准的市售人源化抗体中是高度稳

定的且包含VH3亚基的重链可变区和Vk1亚基的轻链可变区。

[0077] 在本发明的另一个实施方案中,轻链可变区可为以下轻链可变区,其中由轻链可变区的N末端开始编号的第89个和第91个氨基酸分别用谷氨酰胺(Q)和酪氨酸(Y)取代。

[0078] 该轻链可变区基于对人抗体可变区之间的VH-VL界面残基进行分析的结果获得,所述结果表明常规的穿透细胞溶胶的轻链可变区的小鼠CDR3中的两个残基是不同的。

[0079] 在本发明的优选实施方案中,轻链可变区可包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:29、30和31。

[0080] 关于轻链可变区的序列的信息如下:

[0081]

轻链可变区的名称	序列						SEQ ID NO:
hT2 VL	1	10	20	abdef	30	40	50
	QLVMTQSPATLSLSPGERATLSQKSSQSLFNISRTKINYLAWYQQKPGQAPRLIYW						29
	60	70	80	90	100		
ASTRESSGIPDRFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCKQSYIHMYTFGGGTKVEIKR							
hT3 VL	1	10	20	abdef	30	40	50
	QLVMTQSPSSLSASVGRVTITKSSQSLFNISRTKINYLAWYQQKPGKAPKLLIYW						30
	60	70	80	90	100		
ASTRESSGIPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCKQSYIHMYTFGGGTKVEIKR							
hT4 VL	1	10	20	abdef	30	40	50
	QLVMTQSPSSLSASVGRVTITKSSQSLFNISRTKINYLAWYQQKPGKAPKLLIYW						31
	60	70	80	90	100		
ASTRESSGIPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCKQSYIHMYTFGGGTKVEIKR							

[0082] 应该注意的是,在本文提供的SEQ ID NO中表示的所有残基根据Kabat编号系统进行编号(Kabat EA等人,1991)。在本发明的一个实施方案中,抗体与细胞溶胶中活化的RAS的结合可抑制活化的RAS与B-Raf、C-Raf或PI3K的结合。

[0083] 本发明的一个方面提供诱导完整免疫球蛋白类型的抗体穿透细胞溶胶且与细胞溶胶中活化的RAS结合的重链可变区(VH)。

[0084] 在本发明的一个方面,重链可变区(VH)可包含:

[0085] CDR1,其含有与选自以下的氨基酸序列具有至少90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:8、11、14、17、20、23和26;

[0086] CDR2,其含有与选自以下的氨基酸序列具有至少90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、12、15、18、21、24和27;和

[0087] CDR3,其含有与选自以下的氨基酸序列具有至少90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、13、16、19、22、25和28。

[0088] 另外,在本发明的一个实施方案中,重链可变区(VH)可包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:1至7。

[0089] 另外,本发明的一个方面提供包含所述重链可变区(VH)的抗体。

[0090] 另外,在本发明的一个实施方案中,抗体为以下抗体,其主动穿透活细胞且与细胞溶胶中活化的RAS特异性结合。

[0091] 所述抗体可为嵌合、人或人源化抗体。

[0092] 另外,在本发明的一个实施方案中,抗体可为选自以下的任何一种:IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。

[0093] 另外,抗体可包含能够穿透细胞溶胶的轻链可变区(VL)。穿透细胞溶胶的能力可为通过胞吞作用穿透细胞且然后通过内体逃逸定位在细胞溶胶中的能力。

[0094] 在本发明的一个实施方案中,轻链可变区可包含:

[0095] 由选自以下的氨基酸序列构成的CDR1或与所述CDR1具有至少90%同源性的序列:SEQ ID NO:32、35和38;和

[0096] 由选自以下的氨基酸序列构成的CDR3或与所述CDR3具有至少90%同源性的序列:SEQ ID NO:34、27和40。

[0097] 在本发明的一个实施方案中,轻链可变区可为以下轻链可变区,其中由轻链可变区的N末端开始编号的第2个和第4个氨基酸分别用亮氨酸(L)和甲硫氨酸(M)取代。

[0098] 在本发明的一个实施方案中,轻链可变区可为以下轻链可变区,其中由轻链可变区的N末端开始编号的第9个、第10个、第13个、第15个、第17个、第19个、第21个、第22个、第42个、第45个、第58个、第60个、第79个和第85个氨基酸分别用丝氨酸(S)、丝氨酸(S)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、天冬氨酸(D)、缬氨酸(V)、异亮氨酸(I)、苏氨酸(T)、赖氨酸(K)、赖氨酸(K)、缬氨酸(V)、丝氨酸(S)、谷氨酰胺(Q)和苏氨酸(T)取代。

[0099] 在本发明的另一个实施方案中,轻链可变区可为以下轻链可变区,其中由轻链可变区的N末端开始编号的第89个和第91个氨基酸分别用谷氨酰胺(Q)和酪氨酸(Y)取代。

[0100] 在本发明的优选实施方案中,轻链可变区可包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:29、30和31。

[0101] 本发明的一个方面提供抑制癌症或肿瘤细胞生长的方法,所述方法包括将受试者的细胞暴露于与细胞溶胶中活化的RAS特异性结合的抗体的步骤。

[0102] 本发明的一个方面还提供治疗癌症或肿瘤的方法,所述方法包括向受试者给药药物有效量的与细胞溶胶中活化的RAS特异性结合的抗体的步骤。

[0103] 与细胞溶胶中活化的RAS特异性结合的抗体可为以下抗体,其可穿透活细胞且特异性识别细胞溶胶中活化的(GTP结合的)RAS且其可靶向于活细胞的细胞溶胶中活化的(GTP结合的)RAS且抑制RAS的活性。因此,根据本发明的抗体重链可变区或包含所述可变区的抗体可选择性地抑制多种常规肿瘤治疗剂的主要药物抗性相关因子RAS的突变且因此可抑制癌症或肿瘤生长且可治疗癌症或肿瘤。

[0104] 本发明的另一个方面提供对与细胞溶胶中的RAS特异性结合的重链可变区进行筛选的方法。

[0105] 所述筛选方法包括以下步骤:

[0106] (1) 通过使用酵母表面展示系统表达可与结合有GTP的RAS结合的重链可变区文库;

[0107] (2) 使所述文库与结合有GTP的RAS结合;和

[0108] (3) 测量所述文库对结合有GTP的RAS的亲合力。

[0109] 本发明的另一个方面涉及与所述抗体融合且选自以下的生物活性分子：肽、蛋白、小分子药物、纳米粒和脂质体。

[0110] 蛋白可为抗体、抗体片段、免疫球蛋白、肽、酶、生长因子、细胞因子、转录因子、毒素、抗原肽、激素、载体蛋白、运动功能蛋白、受体、信号传导蛋白、储存蛋白、膜蛋白、跨膜蛋白、内部蛋白、外部蛋白、分泌蛋白、病毒蛋白、糖蛋白、裂解的蛋白、蛋白复合物、化学修饰的蛋白等。

[0111] 本发明的具体实施方案提供包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的RGD4C肽或包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的RGD10肽，其与完整免疫球蛋白类型的抗体的轻链可变区的N末端融合，其通过穿透细胞溶胶与活化的(CTP结合的)RAS特异性结合并对其抑制。在一个实施方案中，RGD4C肽通过(G₄S)₁接头与轻链可变区的N末端融合且优选通过(G₄S)₁接头与轻链可变区的N末端融合，但是不限于此。

[0112] 本文使用的术语“小分子药物”是指分子量小于约1000Da且作为对抗疾病的治疗剂具有活性的有机化合物、无机化合物或有机金属化合物。所述术语在本文中以广义使用。本文中的小分子药物涵盖分子量小于约1000Da的寡肽和其它生物分子。

[0113] 在本发明中，“纳米粒”是指包含物质的直径为1-1,000nm的颗粒。纳米粒可为金属纳米粒、由金属纳米粒核和包封所述核的金属壳构成的金属/金属核壳复合体、由金属纳米粒核和包封所述核的非金属壳构成的金属/非金属核壳或由非金属纳米粒核和包封所述核的金属壳构成的非金属/金属核壳复合体。根据一个实施方案，金属可选自金、银、铜、铝、镍、钯、铂、磁性铁及其氧化物，但是不限于此且非金属可选自硅、聚苯乙烯、胶乳和丙烯酸类物质，但是不限于此。

[0114] 在本发明中，脂质体包含至少一个包封内部水性小室的能够自身缔合的脂质双层。脂质体可通过膜类型及其大小表征。小单层囊泡(SUV)可具有单膜且直径可为20-50nm。大单层囊泡(LUV)的直径可为至少50nm。寡层大囊泡和多层大囊泡可具有多重通常是同心的膜层且直径可为至少100nm。具有数重非同心膜的脂质体(即在较大的囊泡中包含数个小囊泡)称为多泡囊泡。

[0115] 本文使用的术语“融合”是指使具有相同或不同功能或结构的两个分子成为一体且融合方法可包括能够使肿瘤组织穿透肽与蛋白、小分子药物、纳米粒或脂质体结合的任何物理、化学或生物方法。优选地，融合可通过接头肽进行且例如接头肽可介导与生物活性分子在本发明的抗体轻链可变区、抗体或其片段的多个位置的融合。

[0116] 本发明还提供用于预防或治疗癌症的药物组合物，其包含：所述抗体；或与所述抗体融合且选自以下的生物活性分子：肽、蛋白、小分子药物、纳米粒和脂质体。

[0117] 癌症可选自鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、鳞状细胞肺癌、腹膜癌、皮肤癌、皮肤或眼黑素瘤、直肠癌、肛门癌、食道癌、小肠癌、内分泌癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、慢性或急性白血病、淋巴瘤、肝癌、胃肠癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝肿瘤、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌和头颈癌。

[0118] 当将组合物制备成用于预防或治疗癌症或血管生成相关疾病的药物组合物时，组合物可包含药用载体。包含在组合物中的药用载体通常在制剂中使用。包含在组合物中的药用载体的实例可包括但不限于乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸

钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油等,但是不限于此。除上述成分外,药物组合物可进一步包含润滑剂、润湿剂、甜味剂、矫味剂、乳化剂、助悬剂、防腐剂等。

[0119] 用于预防或治疗癌症或血管生成相关疾病的药物组合物可口服或胃肠外给药。上述胃肠外给药包括静脉内注射、皮下注射、肌肉注射、腹膜内注射、内皮给药、局部给药、经鼻给药、肺内给药、直肠内给药等。由于蛋白或肽当口服给药时被消化,因此优选将用于口服给药的组合物配制成包覆活性物质或被保护以对抗在胃中降解。另外,药物组合物可通过任何可转运活性物质至靶细胞的装置给药。

[0120] 用于预防或治疗癌症或血管生成相关疾病的药物组合物的合适剂量可随多种因素而变化,例如配制方法、给药方法、患者的年龄、体重、性别、病理状态、食物、给药时间、给药途径、排泄率和反应敏感性等。优选地,组合物的合适剂量基于成人 $0.001-100\text{mg/kg}$ 。本文使用的术语“药物有效剂量”是指足以预防或治疗癌症或血管生成相关疾病的量。

[0121] 组合物可用药用载体和/或赋形剂根据本领域技术人员可容易实施的方法配制且可按单位剂量形式提供或包封在多剂量小瓶中。在本申请中,药物组合物的制剂可为油性或水性介质中的溶液、混悬液、糖浆或乳液形式或可为提取物、粉末、颗粒、片剂或胶囊且可进一步包含分散剂或稳定剂。另外,组合物可单独或与其它治疗剂组合给药且可与常规治疗剂先后或同时给药。同时,组合物包含抗体或抗原结合片段且因此可配制成为免疫脂质体。包含抗体的脂质体可根据本领域已知的方法制备。免疫脂质体为包含磷脂酰胆碱、胆固醇和聚乙二醇衍生的磷脂酰乙醇胺的脂质组合物且可通过反相蒸发法制备。例如,抗体的Fab'片段可通过二硫化物交换反应与脂质体缀合。脂质体可进一步包含化学治疗剂例如多柔比星。

[0122] 本发明还提供用于诊断癌症的组合物,其包含:所述抗体;或与所述抗体融合并选自以下的生物活性分子:肽、蛋白、小分子药物、纳米粒和脂质体。

[0123] 本文使用的术语“诊断”是指证实病理生理状况的存在或特征。本发明中的诊断是指证实癌症的发生和进展。

[0124] 完整免疫球蛋白类型的抗体及其片段可与荧光物质结合用于分子成像从而通过图像诊断癌症。

[0125] 用于分子成像的荧光物质是指产生荧光的所有物质。优选地发射红色或近红外荧光且更优选地发射具有高量子产率的荧光。然而,荧光不限于此。

[0126] 优选地,用于分子成像的荧光物质为荧光物质、荧光蛋白或用于成像的其它物质,其可与特异性结合于完整免疫球蛋白类型的抗体及其片段的肿瘤组织穿透肽结合,但是不限于此。

[0127] 优选地,荧光物质为荧光素、BODIPY、四甲基罗丹明、Alexa、花青素、allopicocyanine或其衍生物,但是不限于此。

[0128] 优选地,荧光蛋白为Dronpa蛋白、增强绿色荧光蛋白(EGFP)、红色荧光蛋白(DsRFP)、Cy5.5(其为发射近红外荧光的花青素荧光物质)或其它荧光蛋白,但是不限于此。

[0129] 优选地,用于成像的其它物质为氧化铁、放射性同位素等,但是不限于此且其可应用于成像设备例如MR、PET。

[0130] 本发明还提供编码所述轻链可变区或包含所述轻链可变区的抗体或其片段的多

核苷酸。

[0131] 本文使用的术语“多核苷酸”是指以单链或双链形式存在的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物。其包括RNA基因组序列、DNA (gDNA和cDNA) 及由其转录的RNA序列。除非另有描述,其还包括天然多核苷酸的类似物。

[0132] 多核苷酸不但包括编码上述轻链区的核苷酸序列,而且包括与其互补的序列。互补序列包括与核苷酸序列完全互补的序列和与核苷酸序列基本上互补的序列。例如,这是指以下序列,其可在本领域已知的严格条件下与编码SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:3中任意一个的氨基酸序列的核苷酸序列杂交。

[0133] 另外,多核苷酸可为经修饰的。修饰包括核苷酸的添加、缺失、非保守性取代或保守性取代。编码氨基酸序列的多核苷酸被理解为包括与核苷酸序列具有基本同一性的核苷酸序列。基本同一性可指序列当与核苷酸序列比对以尽可能多地与任何其它序列对应且使用本领域通常使用的算法对所比对的序列进行分析时具有至少80%同源性、至少90%同源性或至少95%同源性。

[0134] 本发明的另一个方面可提供使用穿透活细胞且定位在细胞溶胶中的完整免疫球蛋白类型的抗体产生穿透细胞溶胶且与细胞溶胶中活化的 (GTP结合的) 肿瘤相关因子RAS特异性结合且抑制RAS的活性的完整免疫球蛋白类型的抗体的方法。

[0135] 在本发明的一个实施方案中,穿透动物细胞且定位在细胞溶胶中且与细胞溶胶中活化的 (GTP结合的) RAS特异性结合的完整免疫球蛋白类型的抗体使用能够与活化的 (GTP结合的) RAS特异性结合的重链可变区 (VH) 产生且可通过包括以下步骤的方法产生:

[0136] (1) 构建克隆有以下核酸的重链表达载体,所述核酸包含与活化的 (GTP结合的) RAS特异性结合的人重链可变区 (VH) 和重链恒定区 (CH1-铰链-CH2-CH3);

[0137] (2) 将所构建的重链表达载体和包含能够穿透细胞溶胶的轻链可变区的轻链表达载体共转化到蛋白表达动物细胞中且在所述细胞中表达穿透活细胞且定位在细胞溶胶中以特异性识别活化的 (GTP结合的) RAS的完整免疫球蛋白类型的抗体;和

[0138] (3) 纯化和回收所表达的能够穿透细胞溶胶且特异性识别活化的 (GTP结合的) RAS的完整免疫球蛋白类型的抗体。

[0139] 本文使用的术语“载体”是指在宿主细胞中表达靶基因的方式。例如,载体可包括质粒载体、粘粒载体、噬菌体载体和病毒载体如例如腺病毒载体、逆转录病毒载体和腺相关病毒载体。可用作重组载体的载体可通过操作本领域通常使用的质粒 (例如pSC101、pGV1106、pACYC177、ColE1、pKT230、pME290、pBR322、pUC8/9、pUC6、pBD9、pHC79、pIJ61、pLAFR1、pHV14、pGEX系列、pET系列和pUC19等)、噬菌体 (例如λgt4λB、λ-Charon、λΔz1和M13等) 或病毒 (例如CMV、SV40等) 产生。

[0140] 重组载体中本发明的轻链可变区、轻链恒定区 (CL)、重链可变区 (VH) 和重链恒定区 (CH1-铰链-CH2-CH3) 可与启动子可操作地连接。本文使用的术语“可操作地连接”是指核苷酸表达控制序列 (例如启动子序列) 和第二核苷酸序列之间的功能性连接基。因此,控制序列可控制第二核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0141] 重组载体通常可构建成用于克隆的载体或用于表达的载体。作为用于表达的载体,可使用本领域通常用于表达来自植物、动物或微生物的外源蛋白的载体。重组载体可通过本领域已知的多种方法构建。

[0142] 可将重组载体构建成使用原核细胞或真核细胞作为宿主的载体。例如,当所使用的载体为表达载体且使用原核细胞作为宿主时,载体通常包括可促进转录的强启动子(例如pL_A启动子、trp启动子、lac启动子、tac启动子、T7启动子等)、用于启动翻译的核糖体结合位点和针对转录/翻译的终止序列。当载体使用真核细胞作为宿主时,在载体所包括的真核细胞中操作的复制起点可包括f1复制起点、SV40复制起点、pMB1复制起点、腺复制起点、AAV复制起点、CMV复制起点和BBV复制起点等,但是不限于此。另外,可使用源自哺乳动物细胞的基因组的启动子(例如金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物细胞的病毒的启动子(例如腺病毒后期启动子、痘苗病毒7.5K启动子、SV40启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子或HSV的tk启动子)且启动子通常具有作为转录终止序列的聚腺苷酸化序列。

[0143] 本发明的另一个方面提供用所述重组载体转化的宿主细胞。

[0144] 本领域已知的任何种类的宿主细胞可用作宿主细胞。原核细胞的实例包括属于芽孢杆菌属的菌株例如大肠杆菌JM109、大肠杆菌BL21、大肠杆菌RR1、大肠杆菌LE392、大肠杆菌B、大肠杆菌X1776、大肠杆菌W3110、枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、肠道菌群和菌株例如粘质沙雷氏菌和多种假单胞菌属种等。另外,当将载体转化到真核细胞中时,可使用宿主细胞例如酵母(酿酒酵母)、昆虫细胞、植物细胞和动物细胞例如SP2/0、CHO(中国仓鼠卵巢)K1、CHO DG44、PER.C6、W138、BHK、COS-7、293、HepG2、Huh7、3T3、RN和MDCK细胞系等。

[0145] 重组载体可使用本领域已知的插入方法插入到宿主细胞中。例如,当宿主细胞为原核细胞时,转移可根据CaCl₂法或电穿孔法等进行且当宿主细胞为真核细胞时,载体可根据显微镜注射法、磷酸钙沉淀法、电穿孔法、脂质体介导的转化方法和基因轰击法等转移到宿主细胞中,但是转移方法不限于此。当使用微生物例如大肠杆菌等时,生产率比使用动物细胞高。然而,尽管其由于糖基化不适于产生完整Ig形式的抗体,其可用于产生抗原结合片段例如Fab和Fv。

[0146] 用于选择所转化的宿主细胞的方法可根据本领域已知的方法使用由所选标签表达的表型容易地进行。例如,当所选标签为特异性抗生素抗性基因时,转化体可通过在包含抗生素的培养基中培养转化体容易地选择。

[0147] 有利的效果

[0148] 根据本发明,使用能够穿透细胞溶胶的完整免疫球蛋白类型的抗体抑制细胞内活化的RAS的方法通过允许抗体穿透活细胞且特异性识别细胞溶胶中活化的(GTP结合的)RAS来进行。因此,所述抗体可靶向于活细胞的细胞溶胶中活化的(GTP结合的)RAS且抑制RAS的活性。

[0149] 另外,根据本发明的抗体轻链可变区和包含所述可变区的抗体能够通过胞吞作用和内体逃逸穿透活细胞且定位在细胞溶胶中而不必使用特别的外部蛋白递送系统。具体地,根据本发明的抗体轻链可变区可容易与多种人重链可变区(VH)相互作用且具有穿透细胞溶胶且保留在细胞溶胶中的能力且包含所述轻链可变区的完整IgG型单克隆抗体可穿透细胞且定位在细胞溶胶中且没有显示出非特异性针对靶细胞的细胞毒性。

[0150] 根据本发明的抗体重链可变区和包含所述可变区的抗体可选择性地抑制多种常规肿瘤治疗剂的主要药物抗性相关因子RAS的突变且可与常规治疗剂一起展现出协同抗癌活性。另外,根据本发明的穿透细胞溶胶的完整免疫球蛋白类型的抗体可穿透细胞且保留

在细胞溶胶中而不影响人抗体重链可变区 (VH) 对抗原的高特异性和亲和力且因此可定位在目前基于小分子药物被分类为疾病治疗靶标的细胞溶胶中且同时可展现出高效地治疗和诊断通过蛋白和蛋白之间宽且平的表面显示出在结构上复杂的相互作用的肿瘤和疾病相关因子。

附图说明

[0151] 图1的示意图显示了通过使用以下单克隆抗体 (抗Ras • GTP iMab: 内化和干扰单克隆抗体) 诱导特异性针对Ras突变细胞的细胞毒性的策略, 所述抗体通过将IgG类型的cytotransmab的重链可变区 (VH) (仅具有穿透细胞溶胶的能力) 用与结合有GTP的KRas特异性结合的重链可变区 (VH) 进行替换来构建且所述抗体穿透细胞且在细胞溶胶中与结合有GTP的Ras特异性结合。

[0152] 图2的示意图显示了通过将仅能够穿透细胞溶胶的完整IgG类型的cytotransmab的重链可变区 (VH) 用与结合有GTP的KRas特异性结合的重链可变区 (VH) 进行替换来构建抗Ras • GTP iMab的方法。

[0153] 图3的示意图显示了获得仅对GTP结合的KRas G12D蛋白具有高亲和力的人源化抗体重链可变单结构域的文库筛选策略。

[0154] 图4显示了在获得对结合有GTP的KRas G12D的高亲和力的上述过程的每个步骤中对单独的结合有GTP的KRas G12D的条件下和与结合有GTP的KRas G12D竞争的条件下的结合进行FACS分析的结果

[0155] 图5a显示了对以下序列进行分析的结果, 所述序列包含在由小鼠轻链可变区m3D8 VL获得改进的穿透细胞溶胶的与人源化抗体重链可变区稳定结合的人源化轻链可变单结构域hT3 VL的过程中使用的克隆。

[0156] 图5b使用m3D8 VL、人源化轻链可变单结构域hT0 VL及其突变体 (hT2VL和hT3 VL) 的WAM建模通过叠加法比较了模型结构。

[0157] 图6a显示了对轻链可变单结构域穿透细胞溶胶的能力进行共聚焦显微镜观察的结果。

[0158] 图6b显示了为了确认轻链可变单结构域穿透细胞溶胶的机制而进行共聚焦显微镜观察的结果。

[0159] 图7a显示了对hT3 VL的氨基酸序列及常规人抗体阿达木单抗 (Humira) 和人源化抗体贝伐单抗 (Avastin) 的轻链可变域 (VL) 的氨基酸序列进行分析的结果从而确认hT3 VL是否可应用于多种人抗体重链可变域。

[0160] 图7b显示了对可变区之间的界面残基进行分析的结果从而构建与人抗体重链可变区最佳相互作用的稳定的cytotransmab。

[0161] 图8的示意图显示了用能够穿透细胞溶胶的人源化轻链可变区替换不能穿透细胞的轻链可变区从而构建cytotransmab的方法。

[0162] 图9a显示了通过共聚焦显微镜对多种细胞系中的1-2个细胞进行观察的结果从而确认其中轻链可变区用穿透细胞溶胶的轻链区hT4 VL替换的cytotransmab具有穿透细胞溶胶的能力。

[0163] 图9b显示了检查数种细胞穿透细胞溶胶的能力的结果, 其通过如图9a所示的共聚

焦显微镜观察以减小的倍率进行从而在细胞溶胶穿透能力检查实验中检查细胞穿透效率。

[0164] 图10a的图显示了通过在体外用cytotransmab处理HeLa和PANC-1细胞系且评估对细胞生长的抑制而获得的结果。

[0165] 图10b的图像显示了通过在体外用cytotransmab处理HeLa和PANC-1细胞系且评估对细胞的抑制程度而获得的结果。

[0166] 图11显示了纯化后通过12% SDS-PAGE在还原或非还原条件下分析抗Ras • GTP iMab RT4的结果。

[0167] 图12显示了进行ELISA以测量对GTP结合的和GDP结合的野生型KRas及GTP结合的和GDP结合的KRas突变体 (KRas G12D、KRas G12V和KRas G13D) 的亲力的结果。

[0168] 图13显示了通过使用SPR (BIACORE 2000) (GE Healthcare) 分析抗Ras • GTP iMab RT4对GTP结合的KRAS G12D的亲力的结果。

[0169] 图14显示了进行共聚焦显微镜观察以检查抗Ras • GTP iMab RT4穿透细胞溶胶的能力的结果。

[0170] 图15显示了通过在体外用抗Ras • GTP iMab RT4处理NIH3T3、NIH3T3 KRas G12V和NIH3T3HRas G12V细胞系并评估对细胞生长的抑制而获得的结果。

[0171] 图16显示了在NIH3T3HRas G12V细胞系中评估对非粘附细胞生长的抑制的结果。

[0172] 图17显示了对抗Ras RT4是否与细胞中活化的HRas G12V突变体叠加进行共聚焦显微镜观察的结果。

[0173] 图18显示了对抗Ras RT4是否与细胞中结合有GTP的KRas G12V突变体叠加进行共聚焦显微镜观察的结果。

[0174] 图19显示了通过在体外用RGD-TMab4和RGD-RT4处理HCT116和PANC-1细胞系并评估对细胞生长的抑制而获得的结果。

[0175] 图20a显示了在异种移植有HCT116细胞的小鼠中对RGD融合的抗Ras • GTP iMab RT4的肿瘤生长抑制作用进行分析的结果。

[0176] 图20b的图显示了测量小鼠体重从而检查RGD融合的抗Ras • GTP iMab RT4的非特异性副作用的结果。

[0177] 图21a显示了构建人重链可变区文库以改进RT4的亲力的策略。

[0178] 图21b的示意图显示了通过PCR技术构建所设计的文库且通过用经限制酶NheI和ApaI处理的重链单酵母表面展示载体 (pYDS-H) 进行同源重组将所构建的文库转化到酵母表面上的方法。

[0179] 图22显示了进行FACS分析的结果以在每个步骤中就文库表达酵母而言确定与结合有GTP的KRas G12D和结合有GDP的KRas G12D的结合从而确认在上述文库筛选过程中特异性针对结合有GTP的KRas G12D的富集。

[0180] 图23显示了对使用三种文库的各个克隆进行测序的结果。

[0181] 图24显示了通过12% SDS-PAGE在还原或非还原条件下分析具有改进的亲力的抗RAS • GTP iMab的结果。

[0182] 图25显示了通过用具有改进的亲力的Ras • GTP特异性重链可变区替换抗Ras • GTP iMab的重链可变区且然后进行共聚焦显微镜观察以确认抗Ras • GTP iMab是否能够穿透细胞的结果。

[0183] 图26a显示了进行ELISA以测量具有改进的亲合力的抗Ras • GTP iMab克隆对GTP结合的KRas G12D和GDP结合的KRas G12D的亲合力的结果。

[0184] 图26b显示了进行ELISA分析以确认以基于ELISA的结合分析为基础而选择的RT11对多种GTP结合的Ras突变体的亲合力的结果。

[0185] 图27a显示了通过使用SPR (BIACORE 2000) (GE Healthcare) 分析抗Ras • GTP iMab RT11对GTP结合的KRas G12D的亲合力的结果。

[0186] 图27b的传感图显示了分析RT11对最高浓度(1000nM)的GTP或GDP结合的KRas G12D的亲合力的结果。

[0187] 图28显示了进行竞争性ELISA以确认抗Ras • GTP iMab RT11是否可抑制效应分子Raf和细胞内KRas之间的结合的结果。

[0188] 图29显示了进行共聚焦显微镜观察以确认具有改进的亲合力的抗Ras • GTP iMab是否能够穿透多种类型的肿瘤细胞的结果。

[0189] 图30显示了使用非穿透细胞的自身淬灭染料(钙黄绿素(Sigma))进行共聚焦显微镜观察以观察具有改进的亲合力的抗Ras • GTP iMab保留在细胞溶胶中的能力的结果。

[0190] 图31显示了通过在体外用抗Ras • GTP iMab RT11处理多种Ras野生型和Ras突变细胞系并评估对细胞生长的抑制而获得的结果。

[0191] 图32的一组图像显示了进行偏振光显微镜观察以确定每种细胞系的细胞密度的结果。

[0192] 图33显示了进行共聚焦显微镜观察以检查RT11是否与细胞中活化的KRas G12V突变体叠加的结果。

[0193] 图34显示了进行免疫沉淀测定以确认RT11是否与细胞中活化的Ras结合的结果。

[0194] 图35a和35b显示了进行免疫沉淀测定以检查RT11是否抑制Ras • GTP和效应蛋白之间的结合的结果。

[0195] 图36显示了通过测量所构建的RGD10肽融合的RT11对多种GTP结合的和GDP结合的Ras突变体的亲合力而获得的ELISA结果。

[0196] 图37和38显示了通过在体外用RGD10-TMab4和RGD10-RT11处理Co1o320DM、HCT116、PANC-1、SW480和DLD-1细胞系且评估对细胞生长的抑制而获得的结果。

[0197] 图39显示了进行分析以检查RGD10-TMab4和RGD10-RT11是否与细胞表面上的整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ 特异性结合的结果。

[0198] 图40显示了进行共聚焦显微镜观察以检查RGD10-RT11是否与细胞中活化的KRas G12V突变体叠加的结果。

具体实施方式

[0199] 以下将参照实施例对本发明进行进一步详细描述。对于本领域技术人员显而易见的是,这些实施例仅为示意性目的而不应被理解为是对本发明范围的限制。

[0200] 实施例1:通过高度多样性人VH文库对与结合有GTP的KRas特异性结合的重链可变区(VH)进行选择

[0201] 图1的示意图显示了通过使用以下单克隆抗体(抗Ras • GTP iMab:内化和干扰单克隆抗体)诱导特异性针对Ras突变细胞的细胞毒性的策略,所述抗体通过将IgG类型的

cytotransmab的重链可变区(VH) (仅具有穿透细胞溶胶的能力) 用与结合有GTP的KRas特异性结合的重链可变区(VH) 进行替换来构建且所述抗体穿透细胞且在细胞溶胶中与结合有GTP的Ras特异性结合。

[0202] 图2的示意图显示了通过将仅能够穿透细胞溶胶的完整IgG类型的cytotransmab的重链可变区(VH) 用与结合有GTP的KRas特异性结合的重链可变区(VH) 进行替换来构建抗Ras • GTP iMab的方法。

[0203] 具体地,所使用的文库的FR(框架) 为在常规抗体中最常使用的V基因IGHV3-23*04, J_H4且文库中的CDR3具有9个残基。文库的构建和酵母表面展示方法详细描述在先前报道的论文(Baek和Kim, 2014) 中。

[0204] 为了选择待引入到抗Ras • GTP iMab中且与结合有GTP的KRas特异性结合的稳定的人源化重链可变单结构域(VH) 抗体片段而使用在先前的研究中构建的酵母展示VH文库。

[0205] 实施例2:制备GTP结合的KRas G12D蛋白

[0206] 为了制备用于文库筛选和亲和力分析的GTP结合的KRas G12D抗原而在大肠杆菌中进行的表达和纯化详细描述在先前报道的论文(Tanaka T等人, 2007) 中。

[0207] 具体地,通过使用限制酶BamHI/EcoRI将对包含野生型KRas和突变体KRas G12D、KRas G12V和KRas G13D(以较高至较低突变频率列出) 各自的CAAX基序的残基1-188进行编码的DNA克隆到大肠杆菌表达载体pGEX-3X中。在本申请中,将表达载体设计成具有T7启动子-GST-KRas。所有KRas突变使用重叠PCR技术诱导且使用上述方法构建表达载体。通过电穿孔将pGEX-3X-KRas载体转化到大肠杆菌中且在选择培养基中选择。在LB培养基中在100μg/ml氨苄西林抗生素存在下在37℃培养所选择的大肠杆菌直至在600nm的吸光度达到0.6。然后将0.1mM IPTG添加至其中用于蛋白表达且然后将大肠杆菌细胞在30℃再培养5小时。然后通过离心收集大肠杆菌细胞且然后通过超声(SONICS) 破坏。所破坏的大肠杆菌细胞通过离心去除并收集剩余的上清液且使用特异性纯化GST标签蛋白的谷胱甘肽树脂(Clontech) 纯化。谷胱甘肽树脂用50ml洗涤缓冲液(140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM NaH₂PO₄, 1.8mM KH₂PO₄, 1mM EDTA, 2mM MgCl₂ pH 7.4) (SIGMA) 洗涤且然后蛋白用洗脱缓冲液(50mM Tris-HCl pH8.0, 10mM还原型谷胱甘肽, 1mM DTT, 2mM MgCl₂) (SIGMA) 洗脱。对所洗脱的蛋白进行透析以将缓冲液用储存缓冲液(50mM Tris-HCl pH8.0, 1mM DTT, 2mM MgCl₂) (SIGMA) 替换。通过测量在280nm的吸光度和吸光系数对所纯化的蛋白进行定量。SDS-PAGE分析表明蛋白具有约98%或更高的纯度。

[0208] 然后为了使GTPγS (Millipore) 或GDP (Millipore) 底物与KRas蛋白结合,使KRas与底物以1:20的分子比例在反应缓冲液(50mM Tris-HCl pH8.0, 1mM DTT, 5mM MgCl₂, 15mM EDTA) (SIGMA) 中在30℃反应30分钟并向其中添加60mM MgCl₂以停止反应且然后储存在-80℃。

[0209] 实施例3:对特异性针对GTP结合的KRas G12D的重链可变区(VH) 进行选择

[0210] 图15的示意图显示了获得仅对GTP结合的KRas G12D蛋白具有高亲和力的人源化抗体重链可变单结构域的文库筛选策略。

[0211] 具体地,对实施例14所纯化的GTP结合的KRas G12D进行生物素化(EZ-LINK™ Sulfo-NHS-LC-Biotinylation试剂盒(Pierce Inc., USA)) 且然后与在酵母细胞表面上展示的重链可变区文库在室温反应1小时。使酵母细胞表面上与生物素化的结合有GTP的

KRas G12D反应的重链可变区文库与链霉亲和素 (Microbead™ (Miltenyi Biotec) 在4℃反应20分钟且然后使用MACS (磁力活化细胞分选) 来富集展示出对GTP-KRAS G12D具有高亲和力的重链可变区的酵母。将所选择的文库展示酵母在选择培养基中培养且在SG-CAA+URA培养基 (20g/L半乳糖, 6.7g/L不含有氨基酸的酵母氮碱, 5.4g/L Na₂HPO₄, 8.6g/L NaH₂PO₄, 5g/L酪蛋白氨基酸, 0.2mg/L尿嘧啶) (SIGMA) 中培养以诱导蛋白表达。然后将酵母与以比结合有GTP的KRas G12D高10倍的浓度与单独的结合有GTP的KRas G12D或非生物素化的结合有GTP的KRas G12D抗原竞争性地展示文库的酵母在室温温育1小时, 然后使其与缀合有PE的链霉亲和素 (链霉亲和素-R-藻红蛋白缀合物 (SA-PE) (Invitrogen) 反应且通过FACS (荧光活化细胞分选) (FACS Caliber) (BD biosciences) 富集。通过FACS分析对筛选条件进行选择后, 使抗原与展示所富集的文库的酵母在与所述相同的条件下结合且然后使用FACS aria II分选仪富集酵母。使通过第一MACS和第一FACS筛选富集的人源化重链区文库与分泌穿透细胞溶胶的轻链可变单结构域 (hT4 VL) 的酵母配对并以Fab形式展示在酵母表面上且然后经历第二FACS和第三FACS筛选。

[0212] 具体地, 为了构建待与重链可变域 (VH) 文库配对并分泌穿透细胞溶胶的轻链可变域 (VL) 的酵母, 通过限制酶NheI和BsiWI将编码穿透细胞溶胶的hT4 VL的DNA克隆到轻链可变域酵母分泌载体pYDS-K中由此获得pYDS-K-hT4 VL。通过电穿孔将所获得的pYDS-K-hT4 VL转化到配对α型酵母配对株YVH10中且与在选择培养基SD-CAA+Trp (20g/L葡萄糖, 6.7g/L不含有氨基酸的酵母氮碱, 5.4g/L Na₂HPO₄, 8.6g/L NaH₂PO₄, 5g/L酪蛋白氨基酸, 0.4mg/L色氨酸) (SIGMA) 中培养的酵母配对。

[0213] 具体地, 就酵母配对而言, 当在600nm的吸光度为1时存在 1×10^7 个酵母细胞。在所培养的酵母细胞中, 将表达所选重链可变域文库的 1.5×10^7 个酵母细胞和包含hT4 VL的 1.5×10^7 个酵母细胞添加至GTP结合的KRas G12D且用YPD (20g/L右旋糖, 20g/L蛋白胨, 10g/L酵母提取物, 14.7g/L柠檬酸钠, 4.29g/L柠檬酸, pH 4.5) (SIGMA) 洗涤三次。然后将酵母细胞重新混悬在100μl YPD中并滴到YPD板上而不铺开, 然后干燥这些酵母细胞且在30℃培养6小时。然后涂覆有干燥的酵母的部分用YPD培养基洗涤三次且然后在选择培养基SD-CAA中在30℃温育24小时至最终酵母浓度为 1×10^6 个细胞或更少且仅选择配对的酵母细胞。将所选择的酵母细胞在SG-CAA培养基中温育以诱导人源化抗体Fab片段的表达且通过第二和第三FACS富集从而使酵母细胞在结合有GDP的KRas G12D的浓度为100nM时与结合有GDP的KRas G12D具有100倍竞争性。

[0214] 图16显示了在获得对结合有GTP的KRas G12D的高亲和力的上述筛选过程的每个步骤中对单独的结合有GTP的KRas G12D的条件下和与结合有GTP的KRas G12D竞争的条件下的结合进行FACS分析的结果。由此发现的是, 可选择出可按重链可变域 (VH) 依赖性方式与结合有GTP的KRas G12D特异性结合的文库。

[0215] 在上述高通量筛选中, 最终通过各个克隆分析从对GTP结合的KRas G12D蛋白具有高亲和力和特异性的文库中选择出RT4克隆。

[0216] 实施例4: 开发穿透细胞溶胶的人源化轻链可变 (VL) 单结构域的原理

[0217] 图5的示意图显示了被称为“cytotransmab”的穿透细胞且定位在细胞溶胶中的完整免疫球蛋白抗体的概念。为了实现该抗体并理解人源化抗体轻链可变区穿透细胞溶胶的能力, 参照了关于小鼠轻链可变单结构域m3D8 VL穿透细胞溶胶的能力和与轻链可变区片

段对应的CDR之间的相关性的常规研究 (Lee等人, 2013)。

[0218] 图5a显示了对以下序列进行分析的结果,所述序列包含在由小鼠轻链可变区m3D8 VL获得改进的穿透细胞溶胶的与人源化抗体重链可变区稳定结合的人源化轻链可变单结构域hT3 VL的过程中使用的克隆。

[0219] 具体地,基于在小鼠轻链可变单结构域m3D8 VL和通过使用CDR移植技术对单结构域m3D8 VL进行人源化而获得的hT0 VL之间比较穿透细胞溶胶的能力而确认的是,即使轻链可变区 (VL) 的CDR1序列是保守的,仍然丧失了穿透细胞溶胶的能力。

[0220] 因此,为了改进CDR1的结构以具有与m3D8 VL类似的结构由此恢复人源化抗体轻链可变单结构域穿透细胞溶胶的能力,对FR (框架) 中的CDR区 (游标区) 进行了比较性分析。由此发现残基2和4不同于能够穿透细胞溶胶的小鼠m3D8 VL的那些。具体地,由于残基2和4作为显著影响CDR1结构 (游标区) 的上部核心,因此通过对hT0 VL进行反向突变开发出具有与m3D8 VL的CDR1结构类似的CDR1结构的hT2 VL (参见图5a)。

[0221] 然后为了构建稳定的cytotransmab并生成VH3和Vk1亚基之间的配对 (其在稳定的抗体中是非常普遍的) 由此开发出与多种人抗体重链可变区互补稳定结合并保持其穿透到细胞溶胶中的能力的轻链可变区,比较性地分析了hT2 VL的FR (框架) 和人源化治疗性单克隆抗体曲妥单抗 (Herceptin) (其具有VH3和Vk1亚基且是非常稳定的) 的轻链可变区FR (框架)。由此证实hT2 VL的FR (框架) 中的14个残基不同于曲妥单抗的轻链可变区FR (框架) 中的那些。这14个残基用曲妥单抗的轻链可变区FR (框架) 的序列进行突变由此开发出hT3 VL (参见图5a)。

[0222] 图5b使用m3D8 VL、人源化轻链可变单结构域hT0 VL及其突变体 (hT2VL和hT3 VL) 的WAM建模通过叠加法比较了模型结构。所发现的是,CDR1区与m3D8 VL的CDR1区的结构差异通过如上所述对残基2和4进行反向突变而减小。

[0223] 实施例5:对能够穿透细胞溶胶的人源化轻链可变 (VL) 单结构域进行表达和纯化

[0224] 为了比较在上述实施例4中设计的hT2 VL和hT3 VL实际穿透细胞溶胶的能力,对人源化轻链可变 (VL) 单结构域进行了纯化。

[0225] 具体地,通过NheI/BamHI限制酶将在N末端包含Pho A信号肽且在C末端包含蛋白A标签的穿透细胞溶胶的轻链可变单结构域克隆到pIg20载体中且然后通过电穿孔将载体转化到用于蛋白表达的大肠杆菌BL21 (DE3) plysE中。在包含100μg/ml氨苄西林的LBA培养基中以180rpm和37℃培养大肠杆菌直至在600nm的吸光度达到0.6-0.8。然后用0.5mM IPTG (异丙基β-D-1-硫代半乳糖苷) 处理培养物且然后在23℃温育20小时以表达蛋白。表达后,通过高速离心机以8,000rpm离心培养物30分钟并收集上清液且然后与IgG-琼脂糖树脂 (GE Healthcare) 反应。用50ml TBS (Tris-HCl, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, pH 7.4) 洗涤树脂且然后用5ml 5mM NH₄Ac (pH 5.0) 缓冲液洗涤。然后通过使用0.1M HAc (pH 3.0) 缓冲液由树脂洗脱蛋白且缓冲液用TBS (pH 7.4) 通过透析替换。然后蛋白浓度通过BCA (二辛可宁酸 (Pierce)) 测定测量且蛋白纯度通过SDS-PAGE分析。

[0226] 实施例6:对穿透细胞溶胶的人源化轻链可变 (VL) 单结构域穿透细胞溶胶的能力和细胞穿透机制进行确认

[0227] 图6a显示了对轻链可变单结构域穿透细胞溶胶的能力进行共聚焦显微镜观察的结果。

[0228] 具体地,为了确认m3D8 VL、hT0 VL、hT2 VL和hT3 VL穿透细胞溶胶的能力,将盖玻片添加至24孔板且将 5×10^4 个HeLa细胞/孔添加至0.5ml含有10%FBS(胎牛血清)的培养基中且在5%CO₂和37℃的条件下培养12小时。当细胞稳定化时,用在0.5ml新鲜培养基中的10 μM m3D8 VL、hT0 VL、hT2VL或hT3 VL处理每个孔且在5%CO₂和37℃的条件下温育6小时。然后去除培养基且用PBS洗涤每个孔且然后用弱酸性溶液(200mM甘氨酸,150mM NaCl,pH 2.5)处理以由细胞表面去除蛋白。然后用PBS洗涤每个孔且在4%多聚甲醛中在25℃固定细胞10分钟。用PBS洗涤后,每个孔用包含0.1%皂苷、0.1%叠氮化钠和1%BSA的PBS缓冲液在25℃温育10分钟以在细胞膜中形成孔。用PBS洗涤后,每个孔用包含2%BSA的PBS缓冲液在25℃温育1小时以消除非特异性结合。然后每个孔用识别轻链可变单结构域的蛋白A标签的兔IgG(Sigma)处理且将每个孔在25℃温育2小时,用PBS洗涤三次且然后用经红色荧光(TRITC)标记的抗兔抗体(Sigma)处理,然后在25℃温育1小时。最后细胞核用Hoechst33342进行蓝色染色且用共聚焦显微镜观察。由此证实除hT0 VL外,m3D8 VL、hT2 VL和hT3 VL具有细胞穿透能力。

[0229] 图6b显示了为了确认轻链可变单结构域穿透细胞溶胶的机制而进行共聚焦显微镜观察的结果。

[0230] 具体地,当如图6a所示制备HeLa细胞并使其稳定化时,将在0.5ml新鲜培养基中的10 μM m3D8 VL、hT2 VL或hT3 VL和10 μg/ml Alexa Fluor 488-转铁蛋白(TF,绿色荧光)、FITC-霍乱毒素B(Ctx-B,绿色荧光)或Oregon绿色葡聚糖(Dextran,绿色荧光)的稀释液添加至每个孔中且在5%CO₂和37℃的条件下温育2小时。然后如图3a所示对轻链可变单结构域进行染色。如图3b所示,所有轻链可变单结构域都与霍乱毒素-B叠加,这表明这些结构域通过胞膜穿穿透细胞溶胶。

[0231] 实施例7:开发容易与人抗体重链可变域相互作用的穿透细胞溶胶的人源化轻链可变(VL)单结构域

[0232] 图7a显示了对hT3 VL的氨基酸序列及常规人抗体阿达木单抗(Humira)和人源化抗体贝伐单抗(Avastin)的轻链可变域(VL)的氨基酸序列进行分析的结果从而确认hT3 VL是否可应用于多种人抗体重链可变域。

[0233] 具体地,对参与重链和轻链可变域之间的相互作用的VH-VL界面残基进行了分析。由此发现VL结构域的CDR3中处于89位的赖氨酸(K)和处于91位的丝氨酸(S)与人抗体中处于89位的谷氨酰胺(Q)和酪氨酸(Y)是对应的。

[0234] 为了谋划对残基进行改进的策略,更详细地分析了VH-VL界面残基对重链可变域和轻链可变区的CDR的作用。

[0235] 图7b显示了对可变区之间的界面残基进行分析的结果从而构建与人抗体重链可变区最佳相互作用的稳定的cytotransmab。

[0236] 具体地,基于文献所报道的关于人抗体可变区之间的界面残基的位置、与位于相对的可变区中的特定界面残基结合的频率和界面残基在人抗体中的丰度的信息,对hT3 VL及在贝伐单抗(Avastin)和阿达木单抗(Humira)(由FDA批准的抗体)的重链和轻链可变区之间的界面残基进行了分析(Vargas-Madrado和Paz-Garcia,2003)。分析结果表明在hT3 VL的小鼠CDR中,参与可变区之间的缔合的CDR3中的残基89和91在人抗体中是高度丰富的且可影响重链可变区(VH)的CDR3结构。这两个残基用人在抗体中高度丰富的氨基酸进行突

变由此得到可与人抗体重链可变区最佳结合的hT4 VL。

[0237] 下表1和2显示了所设计的能够穿透细胞溶胶的人抗体轻链可变区的序列。表1显示了根据Kabat编号系统进行编号的人抗体轻链可变区的全长序列且表2显示了表1所示抗体序列的CDR序列。

[0238] 表1:穿透细胞溶胶的人抗体轻链可变区的全长序列

轻链可变区的名称	序列	SEQ ID NO.
ht2 VL	1 10 20 abcdef 30 40 50 DLVMTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLFNSRTRKNIYLAWYQQKPGQAPRLIYY 60 70 80 90 100 ASTRESGIPIPRFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYQKQSYHYMYTFGGGTKVEIKR	29
ht3 VL	1 10 20 abcdef 30 40 50 DLVMTQSPSSLSASVGRVTITCKSSQSLFNSRTRKNIYLAWYQQKPGKAPKLLIYY 60 70 80 90 100 ASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYQKQSYHYMYTFGGGTKVEIKR	30
ht4 VL	1 10 20 abcdef 30 40 50 DLVMTQSPSSLSASVGRVTITCKSSQSLFNSRTRKNIYLAWYQQKPGKAPKLLIYY 60 70 80 90 100 ASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYQQQSYHYMYTFGGGTKVEIKR	31

[0240] 表2: 穿透细胞溶胶的人抗体轻链可变区的CDR序列

轻链可变区的名称	CDR1 序列	SEQ ID NO:	CDR2 序列	SEQ ID NO:	CDR3 序列	SEQ ID NO:
Kabat No.	24 25 26 27 27a 27c 27d 27f 27g 28 29 30 31 32 33 34		30 31 32 33 34 35 36		39 40 41 42 43 44 45 46 47	
ht2 VL	K Q Q Q Q S L F N Q D T T R K W Y L A	32	K A Q T D F Q	33	K Q S Y Y H W Y T	34
ht3 VL	K Q Q Q Q S L F N Q D T T R K W Y L A	35	K A Q T D F Q	36	K Q S Y Y H W Y T	37
ht4 VL	K Q Q Q Q S L F N Q D T T R K W Y L A	38	K A Q T D F Q	39	Q Q Y Y Y H W Y T	40

[0242] 实施例8：通过用穿透细胞溶胶的人源化轻链区（VL）进行替换来开发
cytotransmab及对cytotransmab进行表达和纯化

[0243] 图8的示意图显示了用能够穿透细胞溶胶的人源化轻链可变区替换不能穿透细胞的轻链可变区从而构建cytotransmab的方法。

[0244] 具体地,为了构建用于产生完整免疫球蛋白类型的单克隆抗体的重链表达载体,将对包含抗体重链可变区(贝伐单抗VH、阿达木单抗VH或人源化hT0VH)和重链恒定区(CH1-铰链-CH2-CH3)的重链进行编码的DNA(其具有融合至5'末端的编码分泌信号肽的DNA)通过NotI/HindIII克隆到pcDNA3.4载体(Invitrogen)中。另外,为了构建表达轻链的载体,将对穿透细胞溶胶的轻链可变区(hT4 VL)或轻链可变区(贝伐单抗VL或阿达木单抗VL)和模型

抗体的轻链恒定区 (CL) 进行编码的DNA (其具有融合至5'末端的编码分泌信号肽的DNA) 通过使用NotI/HindIII克隆到pcDNA3.4载体 (Invitrogen) 中。

[0245] 对轻链和重链表达载体进行瞬时转染并对蛋白进行表达和纯化,然后比较蛋白产率。在摇瓶中,在不含有血清的FreeStyle 293表达培养基 (Invitrogen) 中混悬生长的HEK293-F细胞 (Invitrogen) 用质粒和聚乙烯亚胺 (PEI) (Polyscience) 的混合物进行转染。在摇瓶 (Corning) 中进行200mL转染后,将HEK293-F细胞以 2.0×10^6 个细胞/ml的密度接种到100ml培养基中并以150rpm在8% CO₂中培养。为了产生每种单克隆抗体,在10ml FreeStyle 293表达培养基 (Invitrogen) 中稀释适当的重链和轻链质粒 (125μg重链,125μg轻链,共250μg (2.5μg/ml)) 且将稀释液与10ml包含750μg (7.5μg/ml) PEI的培养基混合且在室温温育混合物10分钟。添加所温育的培养基混合物至100ml所接种的细胞培养物,然后其以150rpm在8% CO₂中培养4小时,然后将100ml FreeStyle 293表达培养基添加至细胞培养物中,然后培养6天。按照标准方案从所收集的细胞培养物上清液中纯化蛋白。将抗体加载于蛋白A琼脂糖柱 (GE Healthcare) 且用PBS (pH 7.4) 洗涤。抗体使用0.1M甘氨酸缓冲液 (pH 3.0) 洗脱且然后立即用1M Tris缓冲液中和。浓缩所洗脱的抗体级份同时缓冲液通过透析用PBS (pH 7.4) 替换。通过测量在280nm的吸光度和吸光系数对所纯化的蛋白进行定量。

[0246] 下表3显示了每升培养物体积产生的纯化的cytotransmab和蛋白的产率。对三次测量进行统计学处理且±表示标准差值。对于所得蛋白的产率,包含改进的hT4 VL以促进其与人重链可变区 (VH) 相互作用的cytotransmab没有显著不同于野生型单克隆抗体。

[0247] 表3:cytotransmab的纯化产率与野生型IgG类型的单克隆抗体 (阿达木单抗和贝伐单抗) 的纯化产率的比较

[0248]

IgG 克隆	VH	VL	IgG纯化产率 (mg/1升所转染的细胞)
TMab2	h3D8 VH	hT2 VL	8.0 ± 0.7
TMab3	h3D8 VH	hT3 VL	8.2 ± 0.5
TMab4	h3D8 VH	hT4 VL	10.8 ± 1.0
阿达木单抗	阿达木单抗VH	阿达木单抗VL	11.6 ± 0.3
HuT2	阿达木单抗VH	hT2 VL	2.1 ± 0.6
HuT3	阿达木单抗VH	hT3 VL	3.5 ± 0.8
HuT4	阿达木单抗VH	hT4 VL	10.9 ± 0.8
贝伐单抗	贝伐单抗VH	贝伐单抗VL	8.8 ± 0.4
AvaT4	贝伐单抗VH	hT4 VL	8.0 ± 1.1

[0249] 这些结果表明通过额外地修饰界面残基获得的人源化轻链可变区 (hT4

[0250] VL) 可与人源化抗体重链可变区最佳相互作用且因此可稳定地表达和纯化。

[0251] 实施例9:确认cytotransmab穿透细胞溶胶的能力

[0252] 图9a显示了通过共聚焦显微镜对多种细胞系中的1-2个细胞进行观察的结果从而确认其中轻链可变区用穿透细胞溶胶的轻链区hT4 VL替换的cytotransmab具有穿透细胞

溶胶的能力。

[0253] 具体地,在24孔板中将 5×10^4 个HeLa、PANC-1、HT29或MCF-7细胞/孔添加至0.5ml含有10%FBS的培养基中且在5%CO₂和37℃的条件下培养12小时。当细胞稳定化时,每个孔用1μM T Mab4、阿达木单抗(Humira)、贝伐单抗(Avastin)、HuT4或AvaT4各自在0.5ml新鲜培养基中的稀释液在5%CO₂和37℃的条件下温育6小时。然后去除培养基且每个孔用PBS洗涤且然后用弱酸性溶液(200mM甘氨酸,150mM NaCl (pH 2.5))处理以由细胞表面去除蛋白。用PBS洗涤后,将细胞在4%多聚甲醛中在25℃固定10分钟。然后每个孔用PBS洗涤且用包含0.1%皂苷、0.1%叠氮化钠和1%BSA的PBS缓冲液在25℃温育10分钟以在细胞膜中成孔。然后每个孔用PBS洗涤且然后用包含2%BSA的PBS缓冲液在25℃温育1小时从而消除非特异性结合。然后每个孔用经FITC(绿色荧光)标记的特异性识别人Fc的抗体在25℃温育1.5小时且细胞核用Hoechst33342进行蓝色染色且用共聚焦显微镜观察。与IgG类型的靶向于细胞外分泌的蛋白的单克隆抗体(阿达木单抗和贝伐单抗)不同的是,T Mab4、HuT4和AvaT4显示出在细胞中的绿色荧光。

[0254] 图9b显示了检查数种细胞穿透细胞溶胶的能力的结果,其通过如图9a所示的共聚焦显微镜观察以减小的倍率进行从而在细胞溶胶穿透能力检查实验中检查细胞穿透效率。

[0255] 所证实的是,引入有穿透细胞溶胶的人源化轻链可变区的cytotransmab穿透所有细胞的细胞溶胶且定位在细胞溶胶中。

[0256] 实施例10:评估cytotransmabs的细胞毒性

[0257] 为了检查在实施例7中确认能够穿透细胞溶胶的cytotransmab是否在体外具有细胞毒性,HeLa或PANC-1细胞用T Mab4、HuT4、阿达木单抗、AvaT4和贝伐单抗中的每种处理且通过MTT测定(Sigma)检查对细胞生长的抑制。

[0258] 具体地,在96孔板中在5%CO₂和37℃的条件下在0.1ml含有10%FBS的培养基中将 1×10^4 个HeLa或PANC-1细胞/孔培养12小时。然后每个孔用1μM T Mab4、HuT4、阿达木单抗、AvaT4和贝伐单抗各自处理20小时或44小时且然后将20μl MTT溶液(1mg/ml PBS)添加至每个孔中,然后温育4小时。将所形成的甲臜溶于200μl DMSO(二甲基亚砷)中并测量在595nm的吸光度以确定细胞活力。

[0259] 图10a的图显示了通过在体外用cytotransmab处理HeLa和PANC-1细胞系且评估对细胞生长的抑制而获得的结果。图10b的图像显示了通过在体外用cytotransmab处理HeLa和PANC-1细胞系且评估对细胞的抑制程度而获得的结果。如图10a和10b所示,所有抗体都没有显示出细胞毒性。

[0260] 实施例11:表达和纯化抗Ras • GTP iMab且分析抗Ras • GTP iMab对KRas突变体的亲和力

[0261] 具有穿透细胞且定位在细胞溶胶中的性质的cytotransmab的重链可变区(VH)用在实施例3中选择的RT4VH替换由此构建可穿透细胞且特异性靶向于细胞溶胶中的GTP结合的Ras的抗Ras • GTP iMab。将所构建的抗Ras • GTP iMab在动物细胞中表达。

[0262] 具体地,为了构建用于产生完整免疫球蛋白类型的单克隆抗体的重链表达载体,将对包含RT11重链可变区(RT11VH)和重链恒定区(CH1-铰链-CH2-CH3)的重链进行编码的DNA(其具有融合至5'末端的编码分泌肽的DNA)通过NotI/HindIII克隆到pcDNA3.4载体(Invitrogen)中。另外,为了构建轻链表达载体,将对包含穿透细胞溶胶的轻链可变区(hT4

VL) 和轻链恒定区 (CL) 的轻链进行编码的 DNA (其具有融合至 5' 末端的编码分泌肽的 DNA) 通过 NotI/HindIII 克隆到 pcDNA3.4 载体 (Invitrogen) 中。

[0263] 对轻链和重链表达载体进行瞬时转染并对蛋白进行表达和纯化, 然后比较蛋白产率。在摇瓶中, 在不含有血清的 FreeStyle 293 表达培养基 (Invitrogen) 中混悬生长的 HEK293-F 细胞 (Invitrogen) 用质粒和聚乙烯亚胺 (PEI) (Polyscience) 的混合物进行转染。就在摇瓶 (Corning) 中进行 200mL 转染而言, 将 HEK293-F 细胞以 2.0×10^6 个细胞/ml 的密度接种到 100ml 培养基中并以 150rpm 在 8% CO₂ 中培养。为了产生每种单克隆抗体, 在 10ml FreeStyle 293 表达培养基 (Invitrogen) 中稀释适当的重链和轻链质粒 (125μg 重链, 125μg 轻链, 共 250μg (2.5μg/ml)) 且将稀释液与 10ml 包含 750μg (7.5μg/ml) PEI 的培养基混合且在室温温育混合物 10 分钟。添加所温育的培养基混合物至 100ml 所接种的细胞培养物, 然后其以 150rpm 在 8% CO₂ 中培养 4 小时, 然后将 100ml FreeStyle 293 表达培养基添加至细胞培养物中, 然后培养 6 天。按照标准方案从所收集的细胞培养物上清液中纯化蛋白。将抗体加载于蛋白 A 琼脂糖柱 (GE Healthcare) 且柱用 PBS (pH 7.4) 洗涤。抗体使用 0.1M 甘氨酸缓冲液 (pH 3.0) 洗脱且然后立即用 1M Tris 缓冲液中和。浓缩所洗脱的抗体级份同时缓冲液通过透析用 PBS (pH 7.4) 替换。通过测量在 280nm 的吸光度和吸光系数对所纯化的蛋白进行定量。

[0264] 图 11 显示了纯化后通过 12% SDS-PAGE 在还原或非还原条件下分析抗 Ras • GTP iMab RT4 的结果。

[0265] 具体地, 在非还原条件下出现约 150kDa 的分子量且在还原条件下出现约 50kDa 的重链分子量和约 25kDa 的轻链分子量。这表明所表达和纯化的抗 Ras • GTP iMab 在不具有非共价键的溶液状态下以单体形式存在且不通过非天然二硫键形成二聚体或低聚体。

[0266] 图 12 显示了进行 ELISA 以测量对 GTP 结合的和 GDP 结合的野生型 KRas 及 GTP 结合的和 GDP 结合的 KRas 突变体 (KRas G12D、KRas G12V 和 KRas G13D) 的亲力的结果。

[0267] 具体地, 将作为靶分子的 GTP 结合的 KRas 突变体和 GDP 结合的 KRas 突变体各自在 96 孔 EIA/RIA 板 (COSTAR Corning) 中在 37°C 温育 1 小时且然后板用 0.1% TBST (0.1% 吐温 20, pH 7.4, 137mM NaCl, 12mM Tris, 2.7mM KCl, 5mM MgCl₂) (SIGMA) 以 10 分钟洗涤三次。然后板的每个孔用 4% TBSB (4% BSA, pH 7.4, 137mM NaCl, 12mM Tris, 2.7mM KCl, 10mM MgCl₂) (SIGMA) 温育 1 小时且然后用 0.1% TBST 以 10 分钟洗涤三次。然后每个孔用在 4% TBSB 中以不同浓度稀释的抗 Ras • GTP iMab RT4 (和仅具有穿透细胞溶胶的能力而不具有 Ras 结合能力的 cytotransmab Tmab4) 温育, 然后每个孔用 0.1% PBST 以 10 分钟洗涤三次。山羊碱性磷酸酶缀合的抗人 mAb (SIGMA) 用作标志物抗体。每个孔用 pNPP (棕榈酸对硝基苯基酯) (SIGMA) 处理并测量在 405nm 的吸光度。

[0268] 为了进一步定量分析抗 Ras • GTP iMab RT4 对 GTP 结合的 KRas G12D 的亲力, 使用 Biacore 2000 仪器 (GE healthcare) 进行 SPR (表面等离子体共振)。

[0269] 具体地, 在 10mM 乙酸钠缓冲液 (pH 4.0) 中稀释抗 Ras • GTP iMab RT4 且以约 1100 响应单位 (RU) 的浓度固定在 CM5 传感器芯片 (GE Healthcare) 上。为了分析, 以 30μl/min 的流速冲洗 Tris 缓冲液 (20mM Tris-HCl, pH 8.0, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0.005% 吐温 20) 并以 1000nM–62.5nM 的浓度使用 GTP 结合的 KRas G12D。对缔合和解离进行分析后, 通过以 30μl/min 的流速冲洗缓冲液 (10mM NaOH, 1M NaCl, pH 10.0) 1.5 分钟使 CM5 芯片再生。对在缔合

3分钟和解离3分钟获得的每张传感图进行归一化并扣除空白细胞由此确定亲和力。

[0270] 图13显示了通过使用SPR(BIACORE 2000) (GE Healthcare) 分析抗Ras • GTP iMab RT4对GTP结合的KRAS G12D的亲合力的结果。

[0271] 实施例12:检查抗Ras • GTP iMab RT4穿透细胞溶胶的能力

[0272] 图14显示了进行共聚焦显微镜观察以检查抗Ras • GTP iMab RT4穿透细胞溶胶的能力的结果。在具有突变的KRas的细胞系(PANC-1和HCT116)和具有野生型KRas的细胞系(HT29、HeLa)中分析了抗Ras • GTP iMab RT4穿透细胞的能力。

[0273] 具体地,将每种细胞系以 5×10^4 个细胞/孔的密度添加至24孔板中且在0.5ml含有10%FBS的培养基中在5%CO₂和37℃的条件下培养12小时。当细胞稳定化时,将在0.5ml新鲜培养基中以1μM的浓度稀释的TMab4和RT4各自添加至每个孔中,然后在5%CO₂和37℃的条件下温育6小时。然后去除培养基且每个孔用PBS洗涤且然后用弱酸性溶液(200mM甘氨酸,150mM NaCl (pH 2.5))处理以由细胞表面去除蛋白。用PBS洗涤后,将细胞在4%多聚甲醛中在25℃固定10分钟。然后每个孔用PBS洗涤且用包含0.1%皂苷、0.1%叠氮化钠和1%BSA的PBS缓冲液在25℃温育10分钟以在细胞膜中成孔。然后每个孔用PBS洗涤且然后用包含2%BSA的PBS缓冲液在25℃温育1小时从而消除非特异性结合。然后每个孔用经FITC(绿色荧光)标记的特异性识别人Fc的抗体(Sigma)在25℃温育1.5小时且细胞核用Hoechst33342进行蓝色染色且用共聚焦显微镜观察。观察到抗Ras • GTP iMab显示出在细胞中的荧光,这表明cytotransmab没有丧失其穿透细胞溶胶的能力,即使在其用与结合有GTP的KRas特异性结合的重链可变区替换后。

[0274] 实施例13:评估抗Ras • GTP iMab RT4的细胞毒性

[0275] (1) 评估抗Ras • GTP iMab对粘附细胞生长的抑制作用

[0276] 图15显示了通过在体外用抗Ras • GTP iMab RT4处理NIH3T3、NIH3T3 KRas G12V和NIH3T3HRas G12V细胞系并评估对细胞生长的抑制而获得的结果。

[0277] 具体地,为了检查抗Ras • GTP iMab是否在体外具有特异性针对KRas突变体依赖性细胞的细胞毒性,野生型KRas NIH3T3小鼠成纤维细胞、具有人工过表达的Ras突变体的NIH3T3KRas G12V细胞、NIH3T3HRas G12V突变细胞和KRas G13D突变体人胰腺细胞(PANC-1)用1μM TTab4和RT4中的每种处理并评估对粘附细胞生长的抑制。

[0278] 具体地,将每种类型的NIH3T3和PANC-1细胞以 2×10^3 个细胞/孔的密度添加至24孔板中且在0.5ml含有10%FBS的培养基中在5%CO₂和37℃的条件下培养12小时。然后细胞用1μM TTab4或RT4处理两次每次72小时且观察共144小时且然后对活细胞的数目进行计数由此确定细胞生长程度。

[0279] 如图21所示,用TMab4处理的细胞没有显示出细胞毒性,而RT4抑制KRas突变细胞系(NIH3T3KRas G12V和NIH3T3HRas G12V)的生长且NIH3T3细胞没有显示出细胞毒性。还抑制了KRas G13D突变体PANC-1细胞生长。因此,TMab4不具有细胞毒性,而RT4抑制细胞生长。

[0280] (2) 评估抗Ras • GTP iMab RT4对非粘附细胞生长的抑制作用

[0281] 图16显示了在NIH3T3HRas G12V细胞系中评估对非粘附细胞生长的抑制的结果。

[0282] 具体地,为了检查抗Ras • GTP iMab是否在KRas突变细胞中抑制非粘附细胞生长,通过集落形成测定对NIH3T3HRas G12V突变细胞进行分析。具体地,将0.5ml $2 \times$ DMEM培养基和0.5ml 1%琼脂糖溶液的混合物铺板在12孔板上并硬化以形成0.5%凝胶。然后将

0.4ml 2×DMEM培养基、0.5ml 0.7%琼脂糖和0.05ml 1×10^3 个NIH3T3HRas G12V细胞与0.05ml (20μM) PBS、TMab4、RT4或Lonafarnib (20μM) 混合且将混合物铺板在0.5%琼脂糖凝胶上并硬化。然后0.35%琼脂糖凝胶用1μM PBS、TMab4、RT4或Lonafarnib在0.5ml 1×DMEM中的分散液以3天间隔处理共21天。在第21天,细胞用NBT (硝基蓝四唑鎓) 溶液染色且然后对集落的数目进行计数。

[0283] 与就对粘附细胞生长的抑制所进行的上述实验的结果类似的是,RT4抑制集落形成,而TMab4不抑制集落形成。

[0284] 上述结果表明抗Ras • GTP iMab RT4与细胞溶胶中的Ras突变体特异性结合且抑制粘附和非粘附细胞生长。

[0285] 实施例14:检查抗Ras • GTP iMab RT4是否与细胞中结合有GTP的KRas特异性结合

[0286] 图17显示了抗Ras • GTP iMab RT4是否与细胞中活化的HRas G12V突变体叠加的结果。图18显示了对抗Ras • GTP iMab是否与细胞中结合有GTP的KRas G12V突变体叠加进行共聚焦显微镜观察的结果。

[0287] 具体地,24孔板用纤连蛋白 (Sigma) 涂覆且然后将0.5ml表达mCherry (红色荧光) HRas G12V或mCherry (红色荧光) KRas G12V的NIH3T3细胞的稀释液以 2×10^4 个细胞/孔的密度添加至板中且在5%CO₂和37℃的条件下培养12小时。然后细胞用2μM TMab4和RT4中的每种处理且在37℃培养12小时。然后去除培养基且每个孔用PBS洗涤且然后用弱酸性溶液 (200mM甘氨酸,150mM NaCl (pH 2.5)) 处理以由细胞表面去除蛋白。用PBS洗涤后,将细胞在4%多聚甲醛中在25℃固定10分钟。然后每个孔用PBS洗涤且用包含0.1%皂苷、0.1%叠氮化钠和1%BSA的PBS缓冲液在25℃温育10分钟以在细胞膜中成孔。然后每个孔用PBS洗涤且然后用包含2%BSA的PBS缓冲液在25℃温育1小时从而消除非特异性结合。然后每个孔用经FITC (绿色荧光) 标记的特异性识别人Fc的抗体在25℃温育1.5小时且细胞核用Hoechst33342进行蓝色染色且用共聚焦显微镜观察。

[0288] 如图17和18所示,绿色荧光的RT4与红色荧光的活化的Ras所处的细胞内膜叠加,而TMab没有叠加。

[0289] 上述实验结果表明抗Ras • GTP iMab RT4与细胞中结合有GTP的Ras特异性结合。

[0290] 实施例15:评估RGD融合的抗Ras • GTP iMab RT4的细胞毒性

[0291] 体内实验需要赋予肿瘤组织特异性。常规的cytotransmab与细胞表面上的HSPG结合且不具有针对任何其它肿瘤组织的特异性且由于该原因而不能在体内实验中特异性抑制肿瘤生长。为了克服该问题,经由一个GGGS接头通过遗传工程化方法使对在血管生成细胞和多种肿瘤中过表达的整联蛋白αvβ3具有特异性的RGD4C肽 (CDCRGDCFC; SEQ ID NO:41) 与轻链的N末端融合。RGD4C肽的特征在于其具有比常规的RGD肽高的亲和力且可使用遗传工程化方法融合且可维持其特异性结构,即使当其与N末端融合时 (Koivunen E等人, 1995)。

[0292] 图19显示了通过在体外用RGD-TMab4和RGD-RT4处理HCT116和PANC-1细胞系并评估对细胞生长的抑制而获得的结果。

[0293] 为了检查RGD-TMab4和RGD-RT4本身是否在体外具有细胞毒性,具有KRas G13D突变体的人结肠直肠癌HCT116细胞和具有KRas G12D突变体的人胰腺癌PANC-1细胞用RGD-TMab4和RGD-RT4中的每种处理并评估对细胞生长的抑制。

[0294] 具体地,将每种类型的HCT116和PANC-1细胞以 5×10^3 个细胞/孔的密度添加至24孔板中且在0.5ml含有10%FBS的培养基中在5%CO₂和37℃的条件下培养12小时。然后细胞用1μM RGD-TMab4和RGD-RT4中的每种处理两次每次72小时且观察共144小时且然后对细胞的数目进行计数由此确定细胞生长程度。

[0295] 如图19所示,RGD-TMab4将HCT116细胞生长抑制约20%且将PANC-1细胞生长抑制约15%且RGD-RT4将HCT116和PANC-1细胞生长分别抑制约40%和约50%。根据先前的研究,RGD4C肽对整联蛋白αvβ5所具有的亲和力为对整联蛋白αvβ3的亲和力的约1/3。然而,整联蛋白αvβ3主要在血管生成细胞中过表达且整联蛋白αvβ5在多种肿瘤细胞中表达。因此,RGD4C肽具有与HCT116和PANC-1细胞的αvβ5结合的能力由此抑制细胞粘附(Cao L等人,2008)。

[0296] 因此,RGD4C肽融合的TMab4没有表现出具有细胞毒性。另外,在RGD-TMab4和RGD-RT4之间进行的比较间接确认了TMab4可抑制Ras特异性细胞生长,即使当RGD与其融合时。

[0297] 实施例16:检查RGD融合的抗Ras • GTP iMab在抑制肿瘤生长方面的作用

[0298] 图20a显示了在异种移植有HCT116细胞的小鼠中对RGD融合的抗Ras • GTP iMab RT4的肿瘤生长抑制作用进行分析的结果。图20b的图显示了测量小鼠体重从而检查RGD融合的抗Ras • GTP iMab RT4的非特异性副作用的结果。

[0299] 具体地,为了基于实施例15的体外实验结果检查RGD-RT4在体内的肿瘤生长抑制作用,将KRas G13D突变体人结肠直肠HCT116细胞以 5×10^6 个细胞/小鼠的密度皮下注射到Balb/c裸鼠中。约6天后,当肿瘤体积达到约50mm³时,小鼠被静脉内注射20mg/kg PBS、RGD-TMab4和RGD-RT4中的每种。历时18天以2天间隔共进行9次注射且使用卡尺测量肿瘤体积。

[0300] 如图20a所示,与对照PBS不同的是,RGD-TMab4和RGD-RT4抑制癌细胞生长且RGD-RT4与RGD-TMab4相比更有效地抑制肿瘤生长。另外,如图20b所示,在用RGD-RT4处理的测试组中不存在体重变化,这表明RGD-RT4不具有其它毒性。

[0301] 实施例17:构建和筛选用于改进抗Ras • GTP iMab RT4的亲和力的文库

[0302] 抗Ras • GTP iMab RT4显示出Ras特异性生物活性,但是其通过SPR分析确定的亲和力为约110nM。因此,其对抗原具有非常低的亲和力,即使其为IgG型抗体。为了弥补该缺点并允许抗Ras • GTP iMab RT4即使在低浓度也展现出提高的生物活性而需要改进抗Ras • GTP iMab RT4的亲和力。

[0303] 图21a显示了构建人重链可变区文库以改进RT4的亲和力的策略。为了改进亲和力,对在与抗原结合中发挥重要作用的CDR3(残基95-100a)进行设计以具有6个残基(文库6)、7个残基(文库7)和9个残基(文库9)的长度且使用能够编码所有氨基酸残基的简并密码子(NNK)。另外,为了改进亲和力且保留RT4的抗原结合位点,将能够以50%的比例维持野生型RT4残基的穗状低聚体用于显示出高溶剂可及性的CDR1(残基31-33)和CDR2(残基50和52-56)。在该技术中,对引物进行设计从而使三种对每种残基的氨基酸进行编码的核苷酸中野生型核苷酸的百分比维持在79%且剩余的核苷酸的百分比为7%从而使PCR过程中的野生型氨基酸将维持在50%。

[0304] 图21b的示意图显示了通过PCR技术构建所设计的文库且通过用经限制酶NheI和ApaI处理的重链单酵母表面展示载体(pYDS-H)进行同源重组将所构建的文库转化到酵母表面上的方法。

[0305] 具体地,编码每种所设计的文库的DNA通过PCR技术扩增且然后通过乙醇沉淀富集。用于同源重组的pYDS-H重链酵母表面展示载体用NheI和ApaI限制酶处理,然后通过琼脂糖凝胶提取对其进行纯化且通过乙醇沉淀富集。对于12μg每种编码文库的DNA,通过电穿孔将5μg载体转化到配对用A型酵母JAR200中用于酵母表面展示 (Baek D.S和Kim Y.S, 2014;Lorenzo B等人,2010),然后进行连续稀释。对选择介质SD-CAA+URA (20g/L葡萄糖, 6.7g/L不含有氨基酸的酵母氮碱,5.4g/L Na₂HPO₄,8.6g/L NaH₂PO₄,5g/L酪蛋白氨基酸, 0.2mg/L尿嘧啶)中集落的数目进行测量以确定文库的大小。

[0306] 在每个文库筛选过程中,根据实施例3和4所示方法使用仅展示重链可变区的酵母文库针对GTP结合的KRas G12D以100nM的抗原浓度进行第一MACS。然后对于通过酵母配对的Fab文库,通过竞争性结合于在第一、第二和第三FACS中没有生物素化的结合有GDP的KRas G12D来选择特异性针对结合有GTP的KRas G12D的克隆。

[0307] 图22显示了进行FACS分析的结果以在每个步骤中就文库表达酵母而言确定文库6 (其为具有6个残基的CDR3长度的文库)对GTP结合的KRas G12D和GDP结合的KRas G12D的亲合力从而确认在上述文库筛选过程中特异性针对GTP结合的KRas G12D的富集。如在此所示那样,所筛选的文库的确与结合有GTP的KRas G12D特异性结合且显示出比用作模板的RT4高的亲合力。

[0308] 图23显示了对使用三种文库的各个克隆进行测序的结果。如在此所示那样,仅对具有通过文库诱导的突变的CDR区中的残基进行了突变。

[0309] 表4显示了通过使用RT4作为模板从具有改进的亲合力的文库中选择的各个克隆的人抗体重链可变区 (VH) 序列且下表5显示了特异性针对Ras • GTP的所选重链可变区 (VH) 序列的CDR1、CDR2和CDR3的序列。

[0310] 表4:在抗Ras • GTP iMab中使用的针对Ras • GTP显示出特异性亲合力的人抗体重链可变区 (VH) 序列

[0311]

重链可变区的名称	序列	SEQ ID NO:
RT4	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVPGQGLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVSTISRSQHSTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRFQGIVFDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 1
RT11	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVPGQGLRLSCAASGFTFSYMSWVRQAPGKLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFF---MDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 2
RT13	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVPGQGLRLSCAASGFTFSYMSWVRQAPGKLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTFG---FDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 3
RT14	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVPGQGLRLSCAASGFTFSYMSWVRQAPGKLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPRGW---FDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 4
RT15	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVPGQGLRLSCAASGFTFSYMSWVRQAPGKLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRFQG---FDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 5
RT16	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVPGQGLRLSCAASGFTFSYMSWVRQAPGKLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSGRFVFDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 6
RT17	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVPGQGLRLSCAASGFTFSYMSWVRQAPGKLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGRFQGVFDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 7

[0312] 表5:在抗Ras • GTP iMab中使用的针对Ras • GTP显示出特异性亲和力的人抗体重链可变区 (VH) 的CDR序列

[0313]

重链可变区的名称	CDR1 序列	SEQ ID NO:	CDR2 序列	SEQ ID NO:	CDR3 序列	SEQ ID NO:
Kabat No.	1 2 3 4 5		6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24		25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35	
RT4	S Y A N S	8	T I S R S Q H S T Y Y A D S V K G	9	R F G G I V F D Y	10
RT11	S Y C N S	11	Y I S R T S H T T Y Y A D S V K G	12	G F F - - - M D Y	13
RT13	T F C N S	14	Y I S R T S H T T Y Y A D S V K G	15	G T P S - - F D Y	16
RT14	T F C N C	17	Y I S R T S H T T Y Y A D S V K G	18	P R G W - - F D Y	19
RT15	T F C N C	20	Y I S R T S H T T Y Y A D S V K G	21	R F G S - - F D Y	22
RT16	T F S N C	23	Y I S R T S H T T Y Y A D S V K G	24	S C S R F V F D Y	25
RT17	T F S N C	26	Y I S R T S H T T Y Y A D S V K G	27	G R F G S V F D Y	28

[0314] 实施例18:对具有改进的亲力的抗Ras • GTP iMab进行表达和纯化

[0315] 如实施例11所述,将包含通过文库筛选获得且对Ras • GTP具有改进的亲力的重链可变区和重链恒定区 (CH1-铰链-CH2-CH3) 的重链克隆到动物表达载体中。将所述表达载体和表达穿透细胞溶胶的人源化轻链的载体瞬时共转染到HEK293F蛋白表达细胞中。在细胞中表达抗Ras • GTP iMab并以与实施例11所述相同的方式纯化。

[0316] 图24显示了通过12% SDS-PAGE在还原或非还原条件下分析具有改进的亲力的

抗RAS • GTP iMab的结果。

[0317] 具体地,如实施例11所述,在非还原条件下出现约150kDa的分子量且在还原条件下出现约50kDa的重链分子量和约25kDa的轻链分子量。这表明所表达和纯化的抗Ras • GTP iMab在溶液状态下以单体形式存在且不通过非天然二硫键形成二聚体或低聚体。

[0318] 实施例19:检查具有改进的亲力的Ras • GTP iMab穿透细胞的能力

[0319] 图25显示了通过用具有改进的亲力的Ras • GTP特异性重链可变区替换抗Ras • GTP iMab的重链可变区且然后进行共聚焦显微镜观察以确认抗Ras • GTP iMab是否能够穿透细胞的结果。

[0320] 具体地,用0.5ml含有10%FBS的培养基将HeLa细胞以 5×10^4 个细胞/孔的细胞密度添加至24孔板的每个孔中且在5%CO₂和37℃的条件下培养12小时。当细胞稳定化时,将TMAb4、RT11、RT13、RT14、RT15、RT16和RT17各自在0.5ml新鲜培养基中的1:17稀释液添加至每个孔中,然后将其在5%CO₂和37℃的条件下温育6小时。后续操作以与实施例14所述RT4染色操作相同的方式进行。观察到RT11、RT13、RT14、RT15、RT16和RT17(其为具有改进的亲力的抗Ras • GTP iMab)的细胞内荧光,这表明其具有穿透细胞的能力。

[0321] 实施例20:分析具有改进的亲力的抗Ras • GTP iMab克隆对GTP结合的Ras的特异性亲和力

[0322] 图26a显示了进行ELISA以测量具有改进的亲力的抗Ras • GTP iMab克隆对GTP结合的KRas G12D和GDP结合的KRas G12D的亲力的结果。

[0323] 具体地,根据与实施例11所述相同的方法,将作为靶分子的GTP结合的KRas突变体和GDP结合的KRas突变体各自在96孔EIA/RIA板(COSTAR Corning)中在37℃温育1小时且然后板用0.1%TBST(0.1%吐温20,pH 7.4,137mM NaCl,12mM Tris,2.7mM KCl,5mM MgCl₂)(SIGMA)以10分钟洗涤三次。然后板的每个孔用4%TBSB(4%BSA,pH 7.4,137mM NaCl,12mM Tris,2.7mM KCl,10mM MgCl₂)(SIGMA)温育1小时且然后用0.1%TBST以10分钟洗涤三次。然后每个孔用在4%TBSB中以不同浓度稀释的每种抗Ras • GTP iMab克隆温育,然后每个孔用0.1%TBST以10分钟洗涤三次。山羊碱性磷酸酶缀合的抗人mAb(SIGMA)用作标志物抗体。每个孔用Ultra TMB-ELISA底物溶液(Thermo Scientific)温育且然后测量在450nm的吸光度。

[0324] 如图26a所示,在具有改进的亲力的抗Ras • GTP iMab克隆中,将RT11选作对GTP结合的KRas G12D具有高特异性亲和力的克隆。

[0325] 图26b显示了进行ELISA分析以确认以基于ELISA的结合分析为基础而选择的RT11对多种GTP结合的Ras突变体的亲和力的结果。

[0326] 具体地,使用与对具有改进的亲力的抗Ras • GTP iMab的亲和力进行的上述分析所用相同的ELISA方法分析了抗Ras • GTP iMab RT11对GTP或GDP结合的野生型KRas、KRas G12D、KRas G12V、KRas G13D、野生型HRas和HRas G12V的亲和力。

[0327] 如图26b所示,抗Ras • GTP iMab RT11不与多种GTP结合的Ras突变体结合。

[0328] 实施例21:定量分析抗Ras • GTP iMab RT11对KRas G12D的亲和力

[0329] 为了定量分析抗Ras • GTP iMab RT11对GTP结合的KRas G12D的亲和力,使用Biacore 2000仪器(GE Healthcare)进行SPR(表面等离子体共振)。

[0330] 图27a显示了通过使用SPR(BIACORE 2000)(GE Healthcare)分析抗Ras • GTP

iMab RT11对GTP结合的KRas G12D的亲合力的结果。

[0331] 图27b的传感图显示了分析RT11对最高浓度(1000nM)的GTP或GDP结合的KRas G12D的亲合力的结果。

[0332] 具体地,根据与实施例11所述相同的方法,将抗Ras • GTP iMab RT11以约1100响应单位(RU)的浓度固定在CM5传感器芯片(GE Healthcare)上。为了分析,以30 μ l/min的流速冲洗Tris缓冲液(20mM Tris-HCl,pH 8.0,100mM NaCl,5mM MgCl₂,0.005%吐温20)并以1000nM-62.5nM的浓度使用GTP或GDP结合的KRas G12D。

[0333] 由此证实RT11的确以高亲和力(12.9nM)与KRas G12D结合。

[0334] 实施例22:分析抗Ras • GTP iMab RT11抑制GTP结合的KRas和Raf之间的结合的能力

[0335] 图28显示了进行竞争性ELISA以确认抗Ras • GTP iMab RT11是否可抑制效应分子Raf和细胞内KRas之间的结合的结果。

[0336] 具体地,通过限制酶BamHI/EcoRI将效应蛋白cRaf(NM_002880.2)的Ras结合位点(RBD:1-149)片段克隆到大肠杆菌表达载体pGEX-3X中且然后根据与实施例2所述相同的方法表达和纯化。将所纯化的cRaf-RBD在96孔EIA/RIA板(COSTAR Corning)中在37°C温育1小时且然后板用0.1%TBST(0.1%吐温20,pH 7.4,137mM NaCl,12mM Tris,2.7mM KCl,5mM MgCl₂)(SIGMA)以10分钟洗涤三次。板的每个孔用4%TBSB(4%BSA,pH 7.4,137mM NaCl,12mM Tris,2.7mM KCl,10mM MgCl₂)(SIGMA)温育1小时且然后用0.1%TBST以10分钟洗涤三次。然后以不同浓度(1 μ M-5.64pM)在4%TBSB中稀释的每种浓度的抗Ras • GTP iMab RT11用1 μ M生物素化的结合有GTP的KRas G12D温育且然后每个孔用0.1%TBST以10分钟洗涤三次。山羊碱性磷酸酶缀合的抗人mAb(SIGMA)用作标志物抗体。每个孔用pNPP(棕榈酸对硝基苯基酯)(SIGMA)温育并测量在405nm的吸光度。

[0337] 如图28所示,抗Ras • GTP iMab RT11显示出对与效应蛋白cRaf的结合进行抑制的能力(IC₅₀=35nM)。

[0338] 实施例23:检查抗Ras • GTP iMab RT11穿透多种肿瘤细胞的能力

[0339] 图29显示了进行共聚焦显微镜观察以确认具有改进的亲合力的抗Ras • GTP iMab是否能够穿透多种类型的肿瘤细胞的结果。

[0340] 包括人结肠直肠癌细胞系(SW480(KRas G12V突变体)、PANC-1(KRas G12D突变体)、DLD-1(KRas G13D突变体)、HCT116(KRas G13D突变体))和人纤维肉瘤细胞系(HT1080(NRas Q61L突变体)在内的多种肿瘤细胞系用作Ras突变细胞系且人乳腺癌细胞系(MCF7)和人结肠直肠癌细胞系(HT29、CaCo2、CoLo320DM)用作Ras野生型细胞系。

[0341] 具体地,用0.5ml含有10%FBS的培养基将上述Ras突变体和Ras野生型细胞系各自以5 $\times 10^4$ 个细胞/孔的密度添加至24孔板的每个孔中且在5%CO₂和37°C的条件下培养12小时。当细胞稳定化时,将在新鲜孔中以2 μ M的浓度稀释的TMab4和RT11各自添加至每个孔中,然后将其在5%CO₂和37°C的条件下温育12小时。后续操作以与实施例14所述RT4染色操作相同的方式进行。作为结果,具有改进的亲合力的抗Ras • GTP iMab RT11显示出在多种类型的肿瘤细胞中的荧光,这表明其具有以与TMab4相同的方式穿透多种肿瘤细胞系的能力。

[0342] 实施例24:检查抗Ras • GTP iMab RT11保留在细胞溶胶中的能力

[0343] 图30显示了使用非穿透细胞的自身淬灭染料(钙黄绿素(Sigma))进行共聚焦显微

镜观察以观察具有改进的亲合力的抗Ras • GTP iMab保留在细胞溶胶中的能力的结果。

[0344] 具体地,用0.5ml含有10%FBS的培养基将HCT116细胞以 5×10^4 个细胞/孔的密度添加至24孔板的每个孔中且在5%CO₂和37℃的条件下培养12小时。然后每个孔用1μM TMab4和RT4处理4小时且然后用100μM钙黄绿素处理2小时。然后去除培养基且每个孔用PBS洗涤且然后用弱酸性溶液(200mM甘氨酸,150mM NaCl pH 2.5)处理以由细胞表面去除钙黄绿素。用PBS洗涤后,细胞用4%多聚甲醛在25℃固定10分钟。然后每个孔用PBS洗涤且细胞核用Hoechst33342进行蓝色染色且用共聚焦显微镜观察。如图30所示,抗Ras • GTP iMab RT11和cytotransmab TMab4都显示出贯穿细胞溶胶的钙黄绿素荧光。然而,PBS仅显示出囊泡形荧光。上述结果表明抗Ras • GTP iMab RT11保留在细胞溶胶中。

[0345] 实施例25:评估抗Ras • GTP iMab RT11的细胞毒性

[0346] 图31显示了通过在体外用抗Ras • GTP iMab RT11处理多种Ras野生型和Ras突变细胞系并评估对细胞生长的抑制而获得的结果且图32的一组图像显示了进行偏振光显微镜观察以确定每种细胞系的细胞密度的结果。

[0347] 具体地,为了在体外检查抗Ras • GTP iMab RT11是否具有特异性针对Ras突变细胞系的细胞毒性,使用小鼠NIH3T3成纤维细胞和人结肠直肠癌Colo320DM细胞作为Ras野生型细胞系且使用小鼠NIH3T3KRas G12V突变细胞、人结肠直肠癌细胞系(HCT116细胞(KRas G13D)、HCT116(KRas G13D)、SW480(KRas G12V)、DLD-1(KRas G13D))和人胰腺细胞系(PANC-1(KRasG12D))评估对细胞生长的抑制。

[0348] 具体地,用0.5ml含有10%FBS的培养基将每种类型的上述细胞系以 $2-5 \times 10^3$ 个细胞/孔的密度添加至24孔板的每个孔中且在37℃和5%CO₂的条件下培养12小时。然后每个孔用TMab4和RT11中的每种处理两次每次72小时且观察共144小时且然后对活细胞的数目进行计数由此确定细胞生长程度。

[0349] 如图31和32所示,TMab4没有显示出细胞毒性,而RT11仅抑制Ras突变细胞(NIH3T3KRas G12V、HCT116、PANC-1、SW480和DLD-1)的生长且在Ras野生型细胞系(NIH3T3和Colo320DM)中没有显示出细胞毒性。

[0350] 实施例26:检查抗Ras • GTP iMab RT11与细胞内活化的Ras特异性结合及抑制活化的Ras和效应蛋白之间的结合的能力

[0351] (1) 检查抗Ras • GTP iMab RT11与细胞内Ras • GTP特异性结合的能力

[0352] 图33显示了进行共聚焦显微镜观察以检查RT11是否与细胞中活化的KRas G12V突变体叠加的结果。

[0353] 具体地,24孔板用纤连蛋白(Sigma)涂覆且然后将0.5ml表达mCherry(红色荧光)HRas G12V的NIH3T3细胞的稀释液以 2×10^2 个细胞/孔的密度添加至板中且在5%CO₂和37℃的条件下培养12小时。然后细胞用2μM TMab4和RT11中的每种处理且在37℃培养12小时。然后细胞在与实施例14所述相同的条件下染色且用共聚焦显微镜观察。

[0354] 如图33所示,绿色荧光的RT11与红色荧光的活化的Ras所处的细胞内膜叠加,而TMab没有叠加。

[0355] 图34显示了进行免疫沉淀测定以确认RT11是否与细胞中活化的Ras结合的结果。

[0356] 具体地,将表达KRas G12V突变体的NIH3T3细胞系和HCT116细胞系中的每种的10ml稀释液以 2×10^6 个细胞/孔的密度添加至100mm³板中且在37℃和5%CO₂的条件下培养

12小时。然后细胞用2 μ M TAb4和RT11中的每种处理且在37℃培养12小时。然后使用细胞裂解缓冲液(25mM Tris-Cl pH 7.4, 150mM NaCl, 1%NP-40, 10mM MgCl₂, 10%甘油, 蛋白酶抑制剂)裂解细胞且通过沉淀去除细胞碎片。将蛋白A/G琼脂糖添加至细胞裂解物中且温育2小时且然后使抗体沉淀。然后使用抗KRas抗体(Santa Cruz)和人Fc抗体(Sigma)进行Western印迹分析。

[0357] 如图34所示, 仅在RT11中观察到KRas, 但是没有在TMab4和PBS中观察到KRas。

[0358] 上述实验结果表明RT11与细胞内活化的Ras特异性结合。

[0359] (2) 检查抗Ras • GTP iMab RT11抑制Ras • GTP和效应分子之间的结合的能力

[0360] 图35a和35b显示了进行免疫沉淀测定以检查RT11是否抑制Ras • GTP和效应蛋白之间的结合的结果。

[0361] 具体地, 将表达KRas G12V突变体的NIH3T3细胞系和HCT116细胞系中的每种的10ml稀释液以2 $\times 10^6$ 个细胞/孔的密度添加至100mm³板中且在37℃和5%CO₂的条件下培养12小时。然后细胞用2 μ M TAb4和RT11中的每种处理且在37℃培养12小时。然后使用细胞裂解缓冲液(25mM Tris-Cl pH 7.4, 150mM NaCl, 1%NP-40, 10mM MgCl₂, 10%甘油, 蛋白酶抑制剂)裂解细胞且通过沉淀去除细胞碎片。KRas G12V突变细胞裂解物用抗HA抗体(Covance)温育2小时且然后用蛋白A/G琼脂糖处理以使抗HA抗体沉淀。将Raf-1RBD琼脂糖(Millipore)添加至HCT116细胞裂解物中且温育2小时且然后沉淀。然后使用抗B-Raf、C-Raf、PI3K和KRas抗体(Santa Cruz)及人Fc抗体(Sigma)进行Western印迹分析。

[0362] 如图35a所示, 抗Ras • GTP iMab RT11抑制Ras • GTP和效应蛋白(B-Raf和C-Raf)之间的结合, 而TMab4没有抑制所述结合。类似地, 图35b显示仅抗Ras • GTP iMab RT11抑制效应蛋白C-Raf和Ras • GTP之间的结合, 而TMab4没有抑制所述结合。

[0363] 上述实验结果表明RT11与细胞内Ras • GTP特异性结合由此抑制Ras • GTP和效应蛋白(B-Raf和C-Raf)之间的结合。

[0364] 实施例27: 构建RGD10肽融合的抗Ras • GTP iMab RT11和分析与Ras • GTP结合的能力

[0365] 如实施例15所述, 抗Ras • GTP iMab RT11通过与细胞表面上的HSPG结合来进行穿透。因此, 需要向抗Ras • GTP iMab RT11赋予组织特异性用于体内实验。出于该目的, 经由包含共10个残基(GGGGSGGGGS)的接头通过遗传工程化方法使对在血管生成细胞和多种肿瘤中过表达的整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ 具有特异性的RGD10肽(DGARYCRGDCFDG; SEQ ID NO: 42)与轻链的N末端融合。RGD10肽将对整联蛋白具有亲和力, 这与上述融合至RT4的RGD4C肽是类似的且其在肽中具有一个二硫键且因此被预期较容易与抗体的N末端融合。因此, 通过遗传工程化方法使RGD10肽与抗Ras • GTP iMab RT11融合。

[0366] 图36显示了通过测量所构建的RGD10肽融合的RT11对多种GTP结合的和GDP结合的Ras突变体的亲和力而获得的ELISA结果。

[0367] 具体地, 根据与实施例11所述相同的方法, 将作为靶分子的GTP结合的KRas G12D和GDP结合的Ras各自在96孔EIA/RIA板(COSTAR Corning)中在37℃温育1小时且然后板用0.1%TBST(0.1%吐温20, pH 7.4, 137mM NaCl, 12mM Tris, 2.7mM KCl, 5mM MgCl₂) (SIGMA)以10分钟洗涤三次。然后板的每个孔用4%TBSB(4%BSA, pH 7.4, 137mM NaCl, 12mM Tris, 2.7mM KCl, 10mM MgCl₂) (SIGMA)温育1小时且然后用0.1%TBST以10分钟洗涤三次。然后每

个孔用在4%TBSB中以不同浓度稀释的每种抗Ras • GTP iMab克隆温育,然后每个孔用0.1%PBST以10分钟洗涤三次。山羊碱性磷酸酶缀合的抗人mAb (SIGMA) 用作标志物抗体。每个孔用Ultra TMB-ELISA底物溶液 (Thermo Scientific) 温育且然后测量在450nm的吸光度。

[0368] 如图36所示, RGD10肽融合的RT11 (RGD10-RT11) 显示出对GTP结合的Ras突变体具有相同的亲和力。

[0369] 实施例28:评估RGD10融合的抗Ras • GTP iMab RT11的细胞毒性

[0370] 图37和38显示了通过在体外用RGD10-TMab4和RGD10-RT11处理Co1o320DM、HCT116、PANC-1、SW480和DLD-1细胞系且评估对细胞生长的抑制而获得的结果。

[0371] 为了评估RGD10-TMab4和RGD-RT11本身是否在体外具有细胞毒性,使用人结肠直肠癌Co1o320DM细胞作为Ras野生型细胞系且使用人结肠直肠癌细胞系 (HCT116 (KRas G13D)、SW480 (KRas G12V)、DLD-1 (KRas G13D)) 和人胰腺癌细胞系 (PANC-1 (KRas G12D)) 评估对细胞生长的抑制。

[0372] 具体地,用0.5ml含有10%FBS的培养基将细胞以 5×10^3 个细胞/孔的密度添加至24孔板的每个孔中且在37°C和5%CO₂的条件下培养12小时。然后细胞用1μM RGD10-TMab4和RGD10-RT11中的每种处理两次每次72小时且观察共144小时且然后对活细胞的数目进行计数以确定细胞生长程度。

[0373] 如图37所示,在RGD10-TMab4和RGD10-RT11之间进行的比较表明KRas突变细胞系 (HCT116、SW480、DLD-1和PANC-1) 在细胞生长方面显示出约8-12%的差异,而Ras野生型细胞系在细胞生长方面没有显示出差异。因此,在RGD10-TMab4和RGD10-RT11之间进行的比较表明RT11可抑制Ras特异性细胞生长,即使当RGD10肽与其融合时。

[0374] 实施例29:检查RGD10融合的抗Ras • GTP iMab RT11是否与整联蛋白αvβ3特异性结合

[0375] 图39显示了进行分析以检查RGD10-TMab4和RGD10-RT11是否与细胞表面上的整联蛋白αvβ3特异性结合的结果。

[0376] 具体地,将K562细胞系和K562整联蛋白αvβ3过表达细胞系中的每种以 2×10^5 个细胞的密度添加至1.5ml,然后用洗涤缓冲液 (pH 7.4PBS, 2%FBS) 洗涤两次。将100nM TMab4、RGD10-TMab4和RGD10-RT11中的每种与300IU/ml肝素 (Sigma) 混合且将细胞与混合物在4°C温育1小时。细胞用洗涤缓冲液洗涤两次且然后用特异性识别人IgG的经Alexa488 (绿色荧光) 标记的抗体 (Invitrogen) 在4°C染色1小时。然后细胞用洗涤缓冲液洗涤两次且通过FACS分析。

[0377] 如图39所示,与TMab4不同的是, RGD10-TMab4和RGD10-RT11的确与K562整联蛋白αvβ3细胞特异性结合。这表明RGD10肽与整联蛋白αvβ3特异性结合。

[0378] 实施例30:检查抗Ras • GTP iMab RT11是否与细胞内Ras • GTP特异性结合

[0379] 图40显示了进行共聚焦显微镜观察以检查RGD10-RT11是否与细胞中活化的KRas G12V突变体叠加的结果。

[0380] 具体地,24孔板用纤连蛋白 (Sigma) 涂覆且然后将0.5ml表达mCherry (红色荧光) KRas G12V的NIH3T3细胞的稀释液以 2×10^2 个细胞/孔的密度添加至每个孔中且在5%CO₂和37°C的条件下培养12小时。然后细胞用1μM RGD10-TMab4和RGD10-RT11中的每种处理且在

37℃的条件下温育12小时。然后细胞在与实施例14所述相同的条件下染色且用共聚焦显微镜观察。

[0381] 如图40所示,绿色荧光的RGD10-RT11与红色荧光的活化的Ras所处的细胞内膜叠加,而RGD10-TMab没有叠加。

[0382] 上述实验结果表明RGD10-RT11与细胞内活化的Ras特异性结合。

序列表

<110> 奥隆制药

<120> 使用能够穿透细胞质的完整免疫球蛋白类型的抗体抑制在细胞中活化的RAS的方法及其用途

<130> PF-B1812

<140> PCT/KR2015/007627

<141> 2015-07-22

<150> 10-2014-0092687

<151> 2014-07-22

<150> 10-2015-0103214

<151> 2015-07-21

<160> 42

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT4

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Thr Ile Ser Arg Ser Gly His Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Arg Phe Gly Ser Ile Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT11

<400> 2

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

<210> 3

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT13

<400> 3

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

85								90				95							
Ala	Arg	Gly	Thr	Phe	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val				
100								105				110							
Thr	Val	Ser	Ser																
115																			
<210> 4																			
<211> 116																			
<212> PRT																			
<213> 人工																			
<220>																			
<223> RT14																			
<400> 4																			
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly				
1				5				10				15							
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Phe				
20								25				30							
Ser	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
35						40						45							
Ser	Tyr	Ile	Ser	Arg	Thr	Ser	His	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val				
50						55						60							
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr				
65					70								75				80		
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
				85								90				95			
Ala	Arg	Pro	Arg	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val				
				100								105				110			
Thr	Val	Ser	Ser																
115																			
<210> 5																			
<211> 116																			
<212> PRT																			
<213> 人工																			
<220>																			
<223> RT15																			
<400> 5																			
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly				
1				5				10				15							
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Phe				
20								25				30							

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

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT16

<400> 6

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

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT17

<400> 7

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

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT4 CDR1

<400> 8

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT4 CDR2

<400> 9

Thr Ile Ser Arg Ser Gly His Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT4 CDR3

<400> 10

Arg Phe Gly Ser Ile Val Phe Asp Tyr

1 5

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT11 CDR1

<400> 11

Ser Tyr Ser Met Ser

1 5

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT11 CDR2

<400> 12

Tyr Ile Ser Arg Thr Ser His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT11 CDR3

<400> 13

Gly Phe Phe Met Asp Tyr

1 5

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT13 CDR1

<400> 14

Thr Phe Ser Met Ser

1 5

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT13 CDR2

<400> 15

Tyr Ile Ser Arg Thr Ser His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT13 CDR3

<400> 16

Gly Thr Phe Gly Phe Asp Tyr

1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT14 CDR1

<400> 17

Thr Phe Ser Met Ser

1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT14 CDR2

<400> 18

Tyr Ile Ser Arg Thr Ser His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT14 CDR3

<400> 19

Pro Arg Gly Trp Phe Asp Tyr

1 5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT15 CDR1

<400> 20

Thr Phe Ser Met Ser

1 5

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT15 CDR2

<400> 21

Tyr Ile Ser Arg Thr Ser His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT15 CDR3

<400> 22

Arg Phe Gly Ser Phe Asp Tyr

1 5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT16 CDR1

<400> 23

Thr Phe Ser Met Ser

1 5

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT16 CDR2

<400> 24

Tyr Ile Ser Arg Thr Ser His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT16 CDR3

<400> 25

Ser Ser Gly Arg Phe Val Phe Asp Tyr

1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RT17 CDR1

<400> 26

Thr Phe Ser Met Ser

1 5
 <210> 27
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> RT17 CDR2
 <400> 27
 Tyr Ile Ser Arg Thr Ser His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> RT17 CDR3
 <400> 28
 Gly Arg Phe Gly Ser Val Phe Asp Tyr
 1 5
 <210> 29
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> hT2 VL
 <400> 29
 Asp Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30
 Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Ile
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95

Ser Tyr Tyr His Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg

<210> 30

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> hT3 VL

<400> 30

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45

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

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

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95

Ser Tyr Tyr His Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg

<210> 31

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> hT4 VL

<400> 31

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45

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

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

Lys Arg

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> hT2 VL CDR1

<400> 32

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> hT2 VL CDR2

<400> 33

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> hT2 VL CDR3

<400> 34

Lys Gln Ser Tyr Tyr His Met Tyr Thr
1 5

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> hT3 VL CDR1

<400> 35

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> hT3 VL CDR2

<400> 36

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> hT3 VL CDR3

<400> 37

Lys Gln Ser Tyr Tyr His Met Tyr Thr

1 5

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> hT4 VL CDR1

<400> 38

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> hT4 VL CDR2

<400> 39

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> hT4 VL CDR3

<400> 40

Gln Gln Tyr Tyr Tyr His Met Tyr Thr

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RGD4C

<400> 41

Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys

1 5

<210> 42

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> RGD10

<400> 42

Asp Gly Ala Arg Tyr Cys Arg Gly Asp Cys Phe Asp Gly

1 5 10

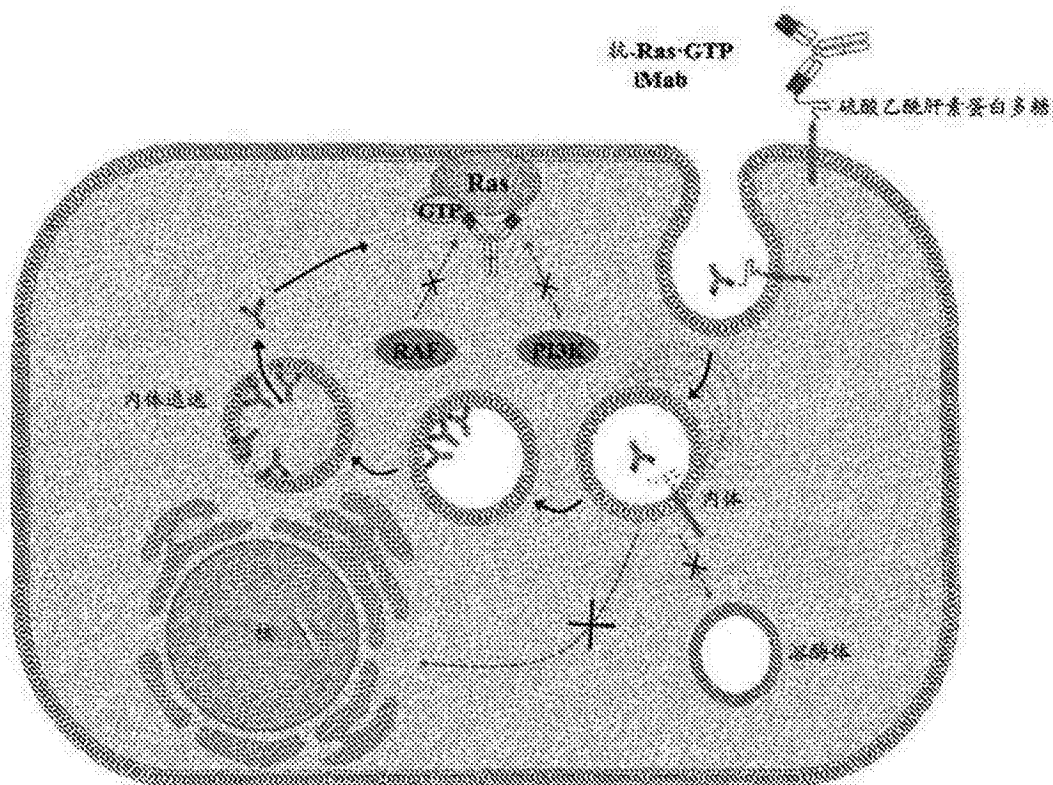


图1

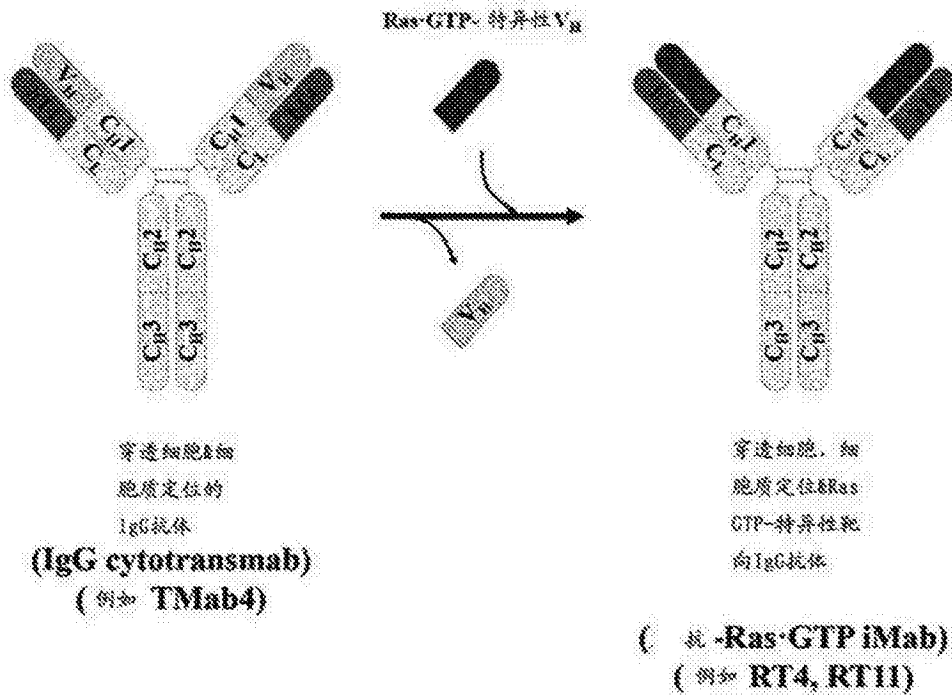


图2

第1 MACS, FACS 筛选

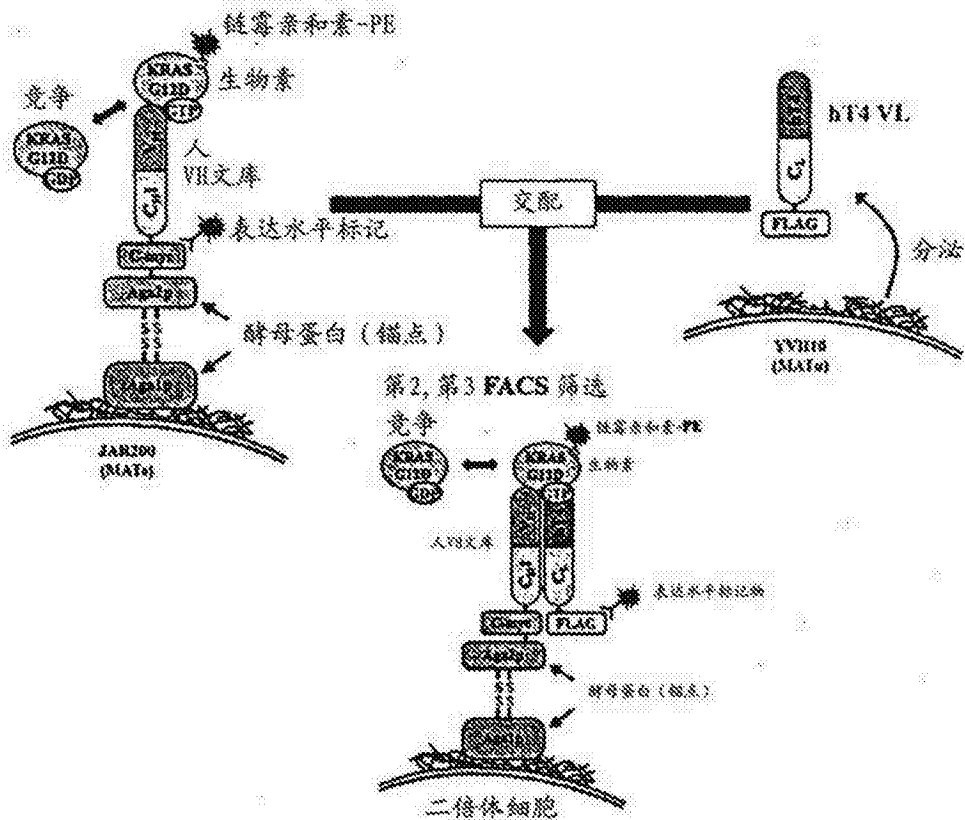


图3

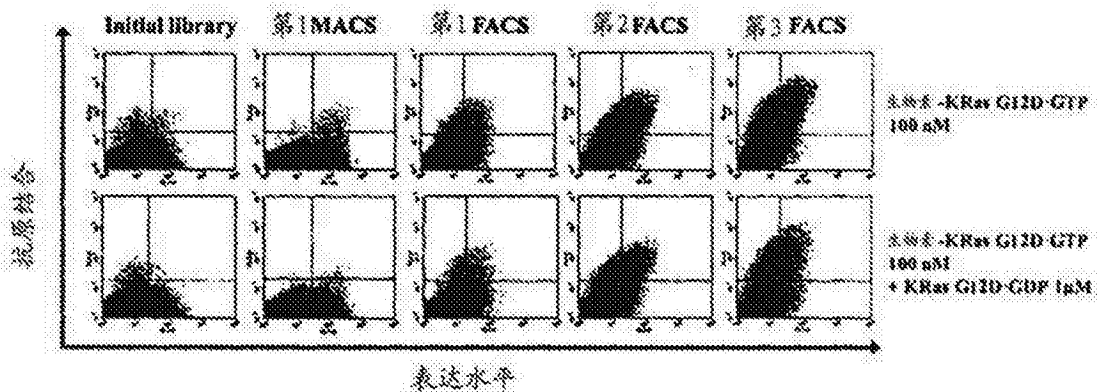


图4

		CDR1					CDR2	
		10	20	30	40	50		
m3D8 VL(Vk8)	DLVMSQSPSSLA	VSA	GERV	TMSC	[KSSQSLFNSRTRKNYLA]	WYQKPGQSPRLIIY	[WASTRES]	
hT0 VL(Vk3)	DIIVLTQSPATLS	SLSPGERATL	SC	[KSSQSLFNSRTRKNYLA]	WYQKPGQAPRLIIY	[WASTRES]		
hT2 VL(Vk3)	DLVMTQSPATLS	SLSPGERATL	SC	[KSSQSLFNSRTRKNYLA]	WYQKPGQAPRLIIY	[WASTRES]		
hT3 VL(Vk1)	DLVMTQSPSSLSA	SVGDRVTITC	[KSSQSLFNSRTRKNYLA]	WYQKPGKAPKLLIY	[WASTRES]			
		CDR3						
		60	70	80	90	100		
m3D8 VL(Vk8)	GVPDRFTSGSGSGT	DFTLTIS	SVQAE	DLAVYYC	[KQSYIHMYT]	FGSGTKLEIKR		
hT0 VL(Vk3)	GIPDRFSGSGSGT	DFTLTIS	SLEPED	FAVYYC	[KQSYIHMYT]	FGGGRKVEIKR		
hT2 VL(Vk3)	GIPDRFSGSGSGT	DFTLTIS	SLEPED	FAVYYC	[KQSYIHMYT]	FGGGRKVEIKR		
hT3 VL(Vk1)	GVPDRFSGSGSGT	DFTLTIS	SLEPED	FAVYYC	[KQSYIHMYT]	FGGGRKVEIKR		

图5a

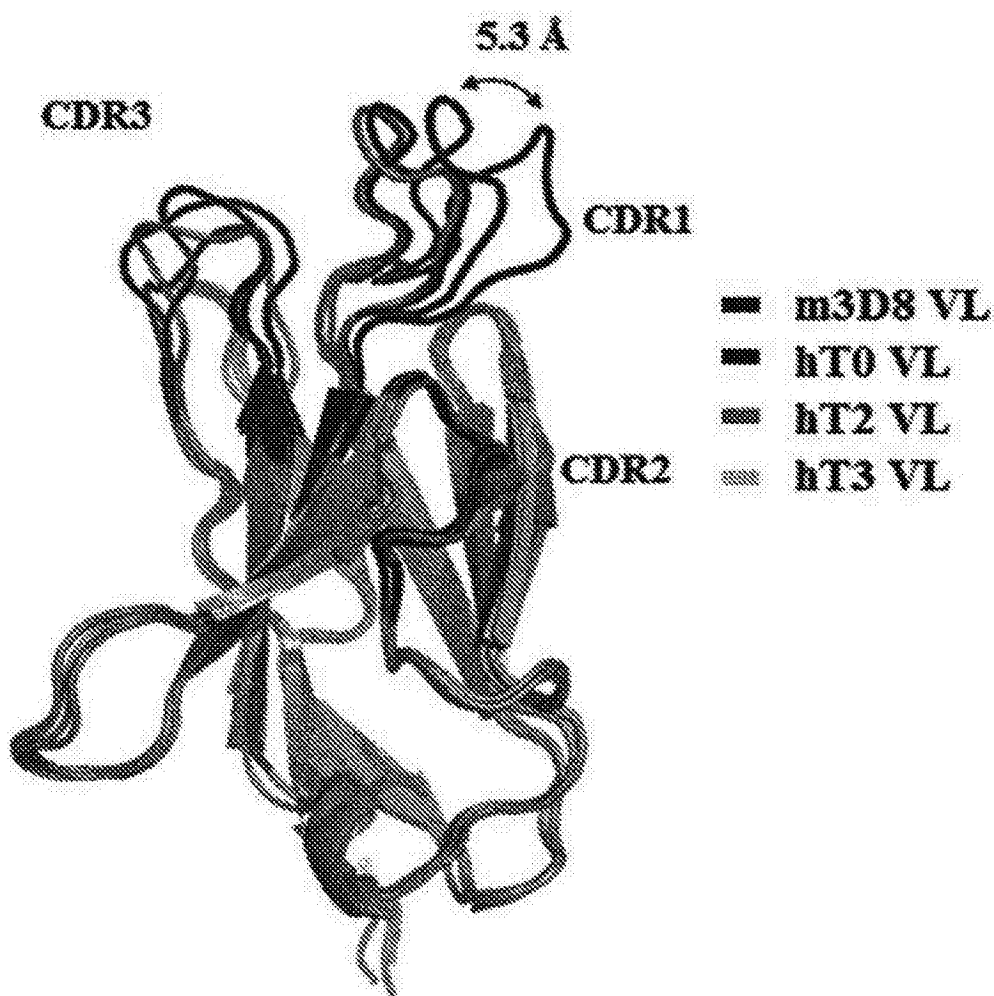


图5b

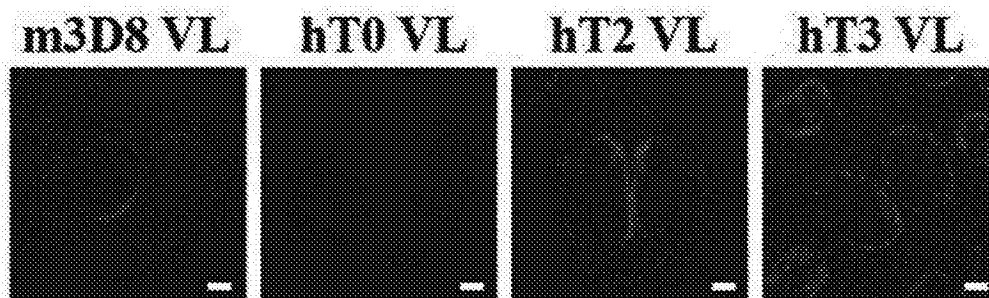


图6a

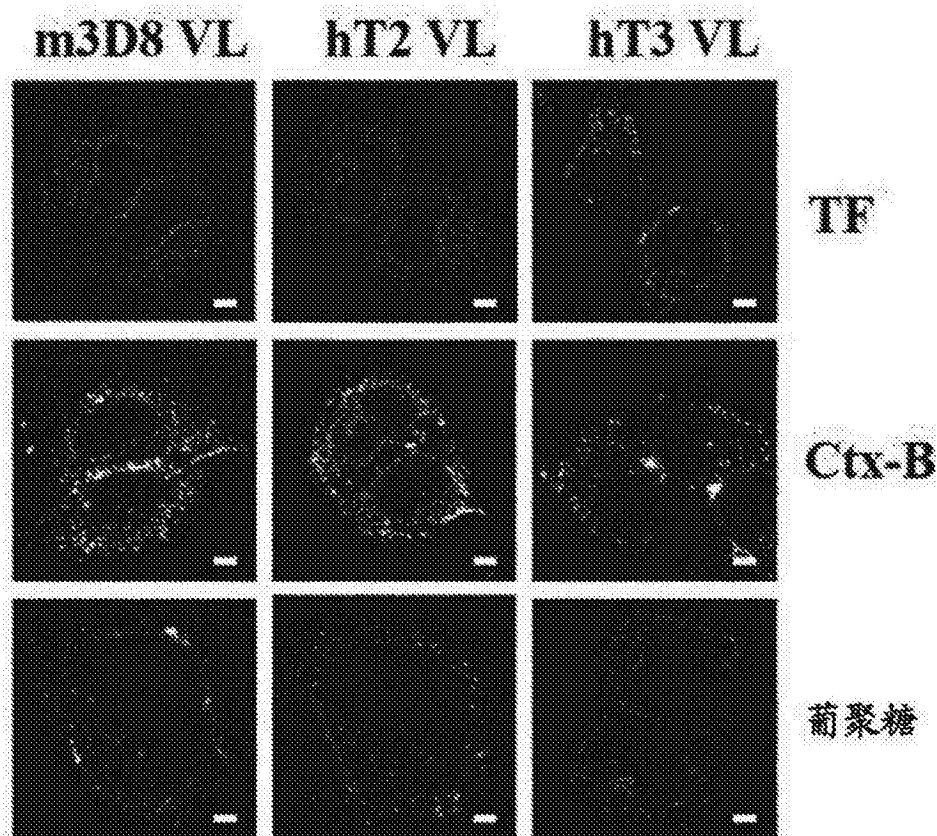


图6b

	10	20	CDR1 30	40	CDR2 50
hT3 VL (VR1)	DIYNTQSTFSLGASVGRVTITC	[KSSQSLFNSTKCYLA]	WTQQKTPQAPKLLTY	[WASTRES]	
hT4 VL (VR1)	DIYNTQSTFSLGASVGRVTITC	[KSSQSLFNSTKCYLA]	WTQQKTPQAPKLLTY	[WASTRES]	
阿达木单抗 VL (VR1)	DIYNTQSTFSLGASVGRVTITC	[KSSQSLFNSTKCYLA]	WTQQKTPQAPKLLTY	[WASTRES]	
贝伐单抗 VL (VR1)	DIYNTQSTFSLGASVGRVTITC	[KSSQSLFNSTKCYLA]	WTQQKTPQAPKLLTY	[WASTRES]	
	60	70	80	CDR3 90	100
hT3 VL (VR1)	GVPSRFSGGSGSTDTLTISSLQPEDPATYXC	[KSSQSLFNSTKCYLA]	WTQQKTPQAPKLLTY	[WASTRES]	
hT4 VL (VR1)	GVPSRFSGGSGSTDTLTISSLQPEDPATYXC	[KSSQSLFNSTKCYLA]	WTQQKTPQAPKLLTY	[WASTRES]	
阿达木单抗 VL (VR1)	GVPSRFSGGSGSTDTLTISSLQPEDPATYXC	[KSSQSLFNSTKCYLA]	WTQQKTPQAPKLLTY	[WASTRES]	
贝伐单抗 VL (VR1)	GVPSRFSGGSGSTDTLTISSLQPEDPATYXC	[KSSQSLFNSTKCYLA]	WTQQKTPQAPKLLTY	[WASTRES]	

图7a

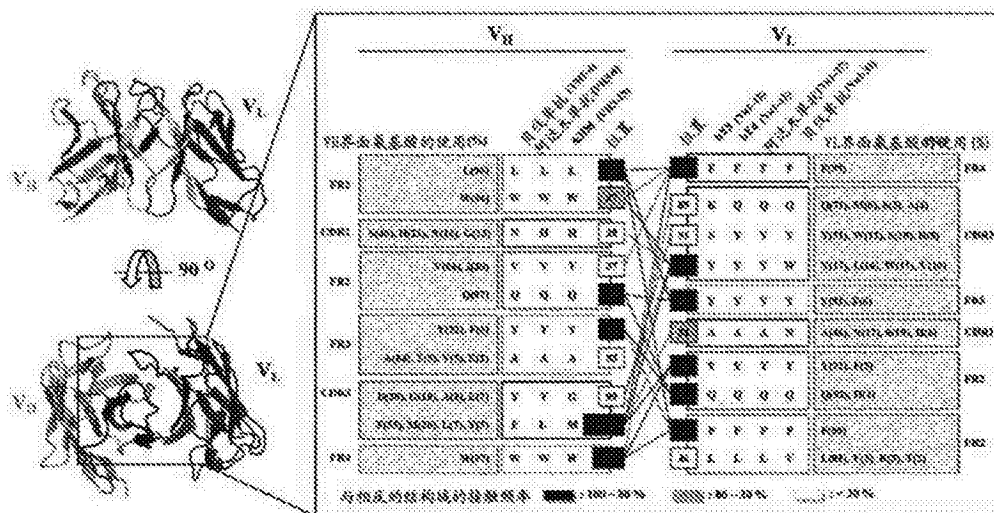


图7b

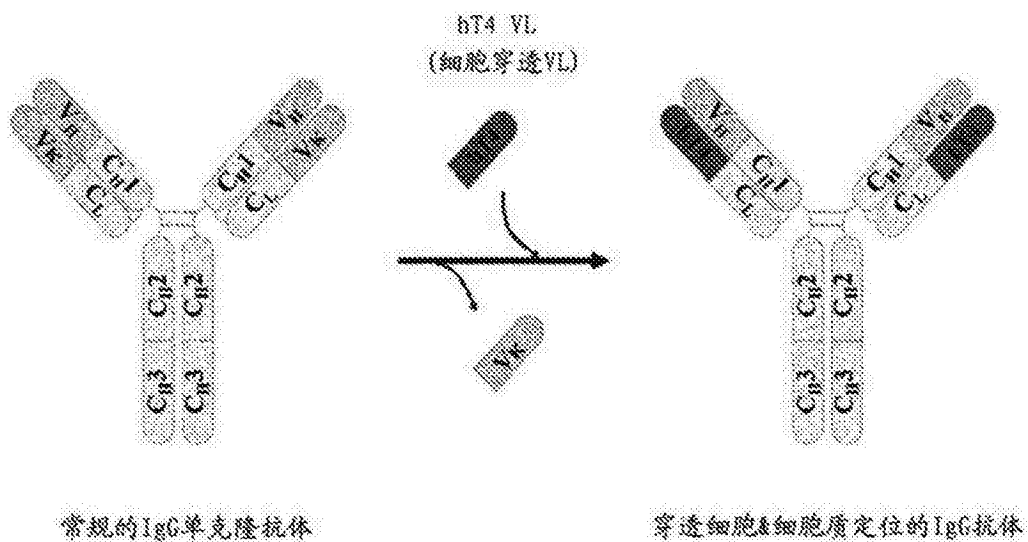


图8

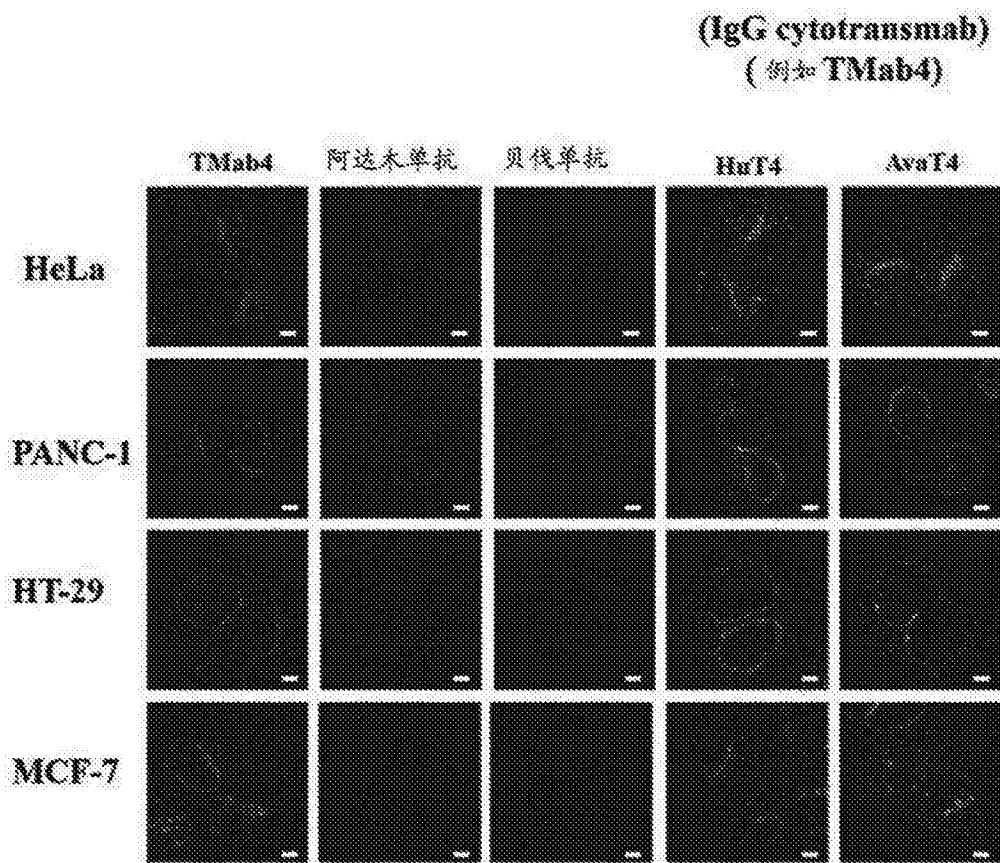


图9a

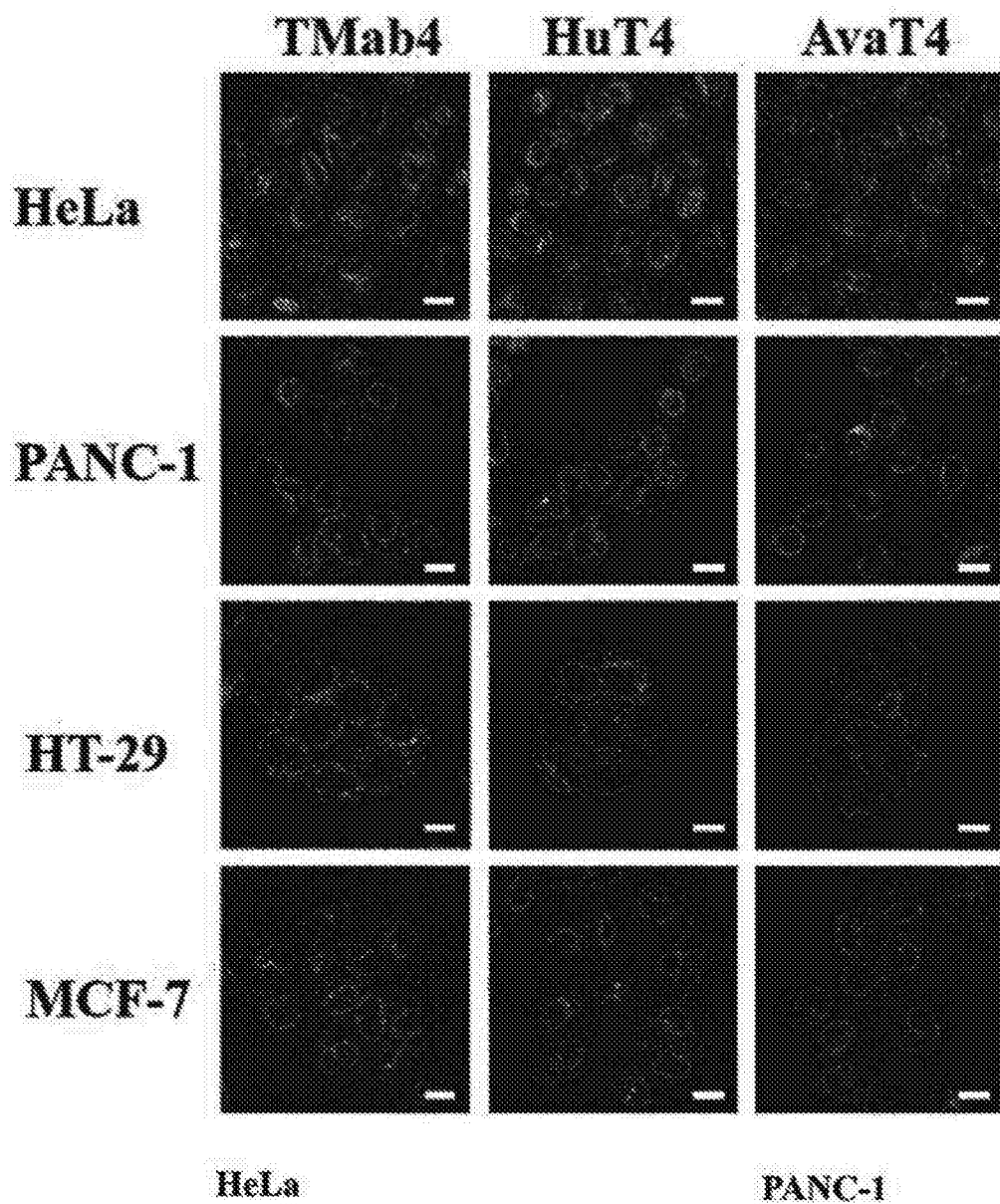


图9b

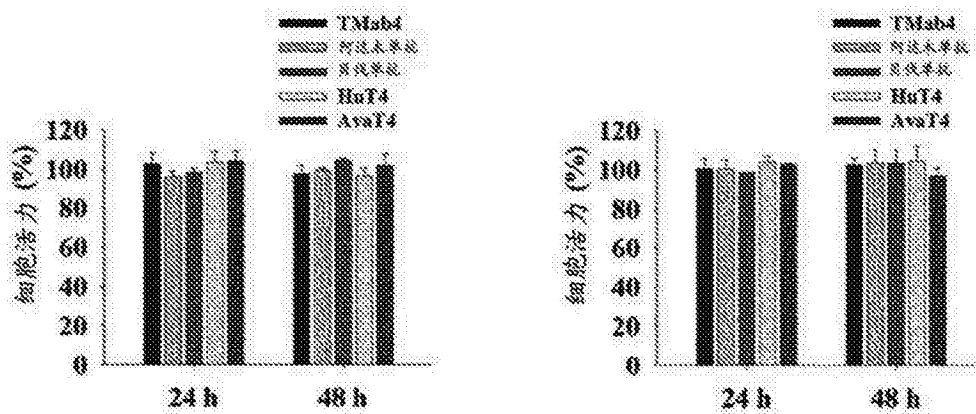


图10a

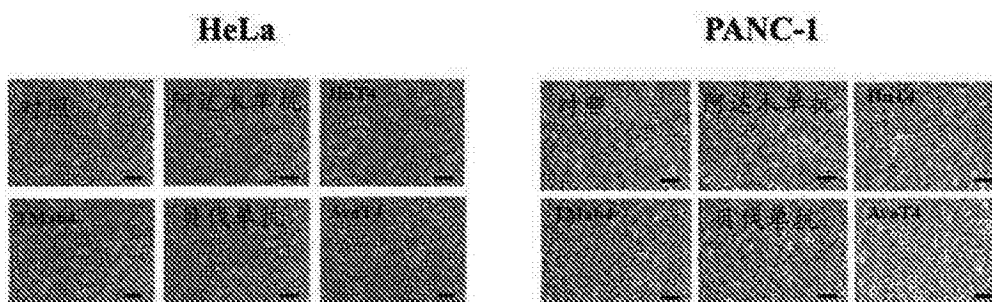


图10b

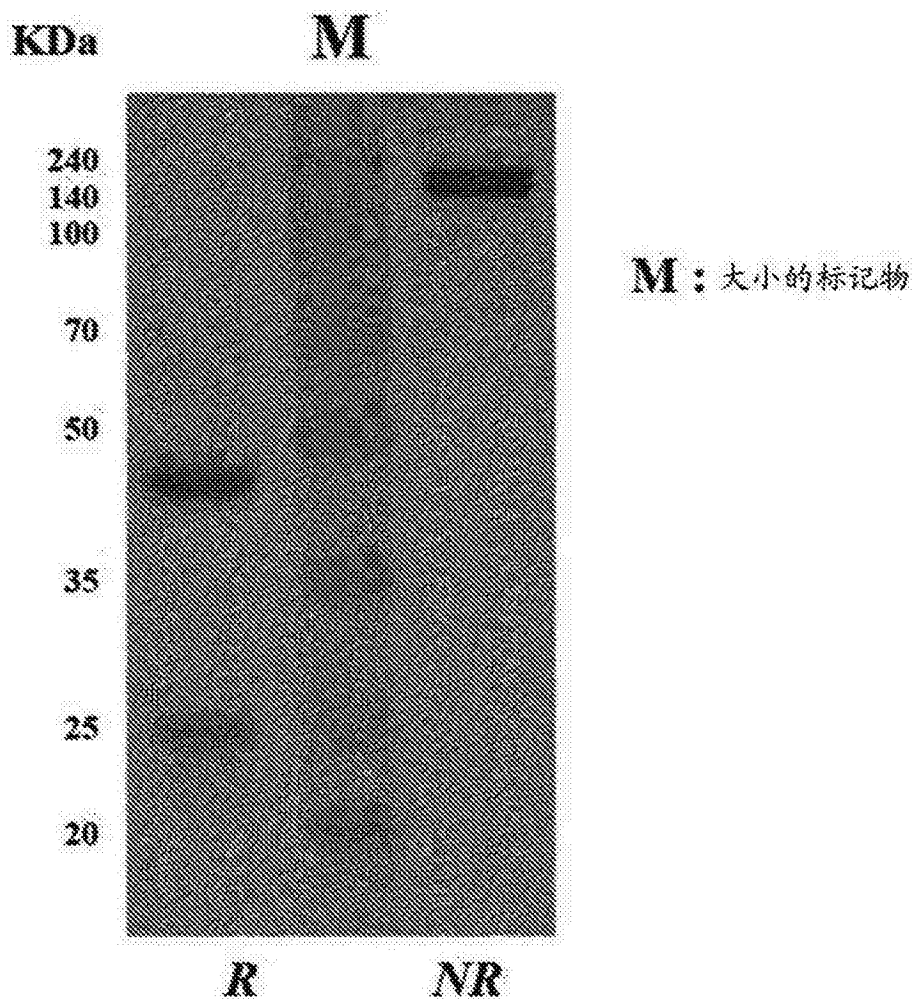


图11

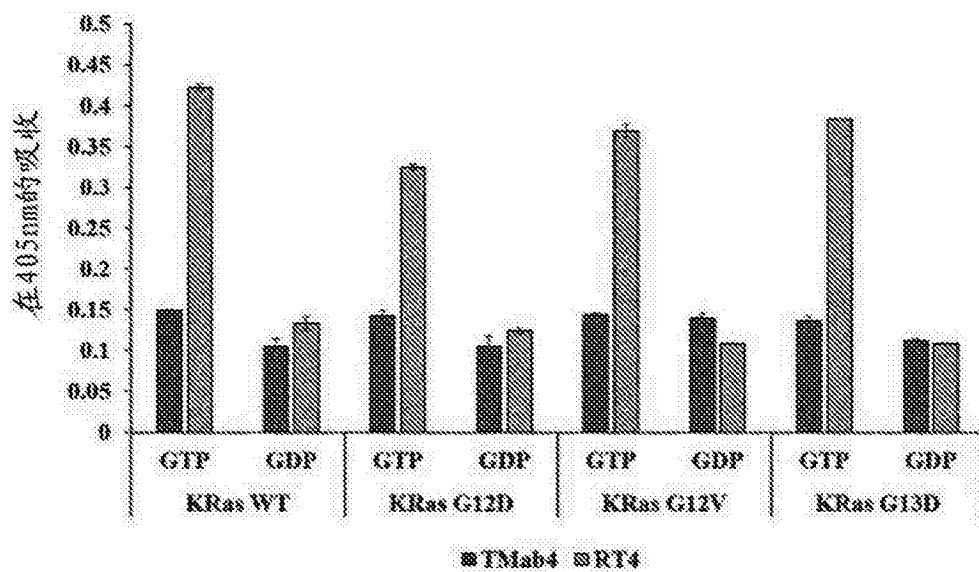
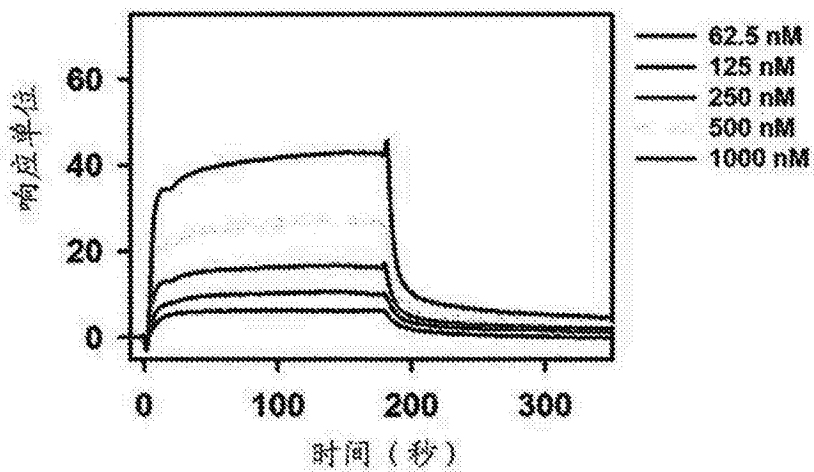


图12



KRas G12D-GTP	$k_a(\text{M}^{-1}\text{S}^{-1})$	$k_d(\text{S}^{-1})$	$K_D(\text{M})$
RT4	2.99×10^4	3.5×10^{-3}	1.1×10^{-7}

图13

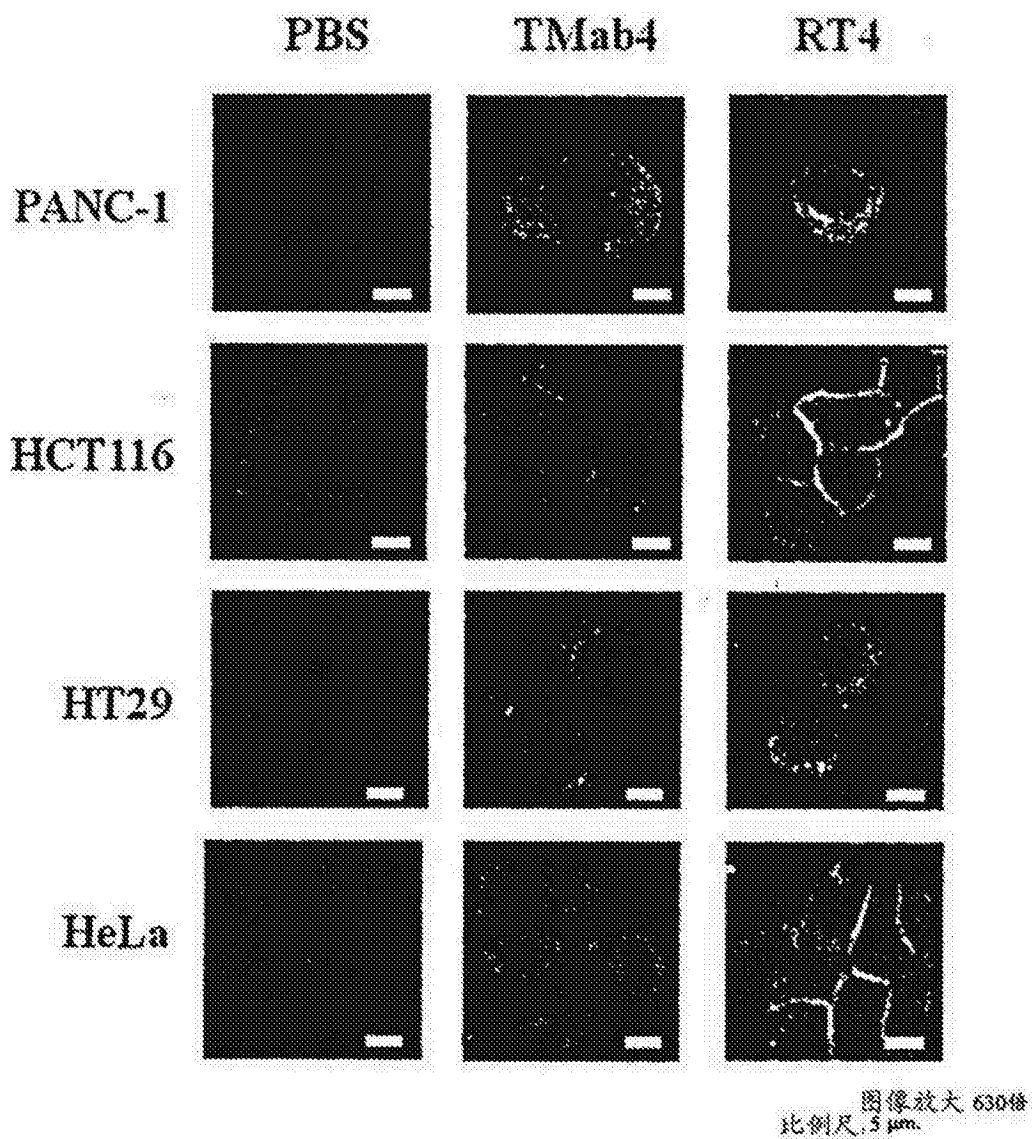


图14

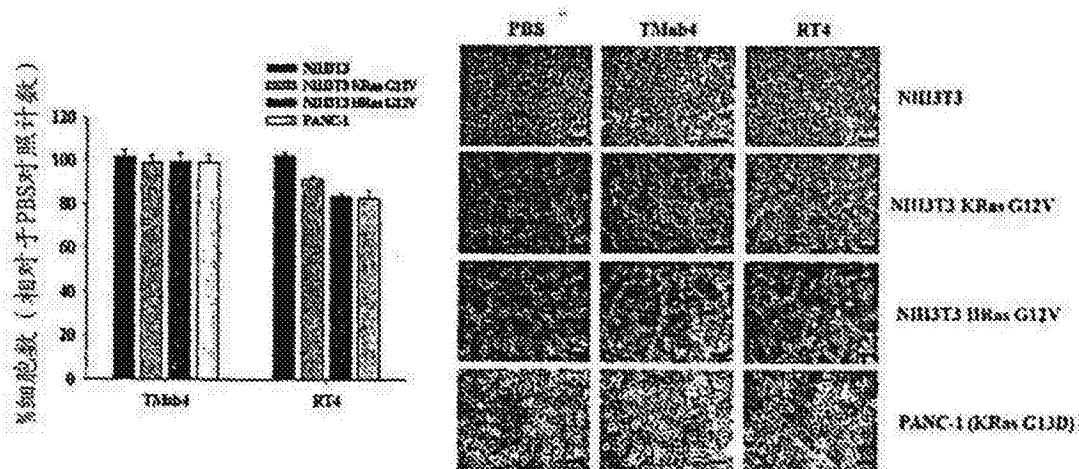


图15

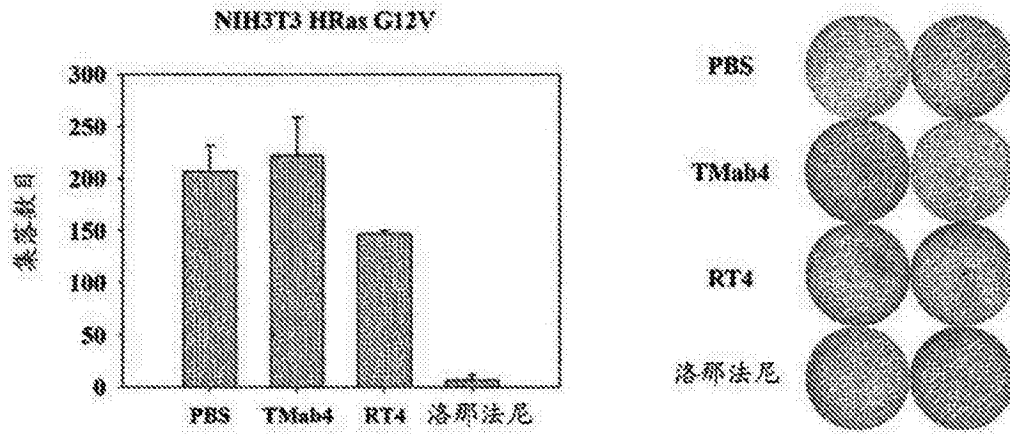


图16

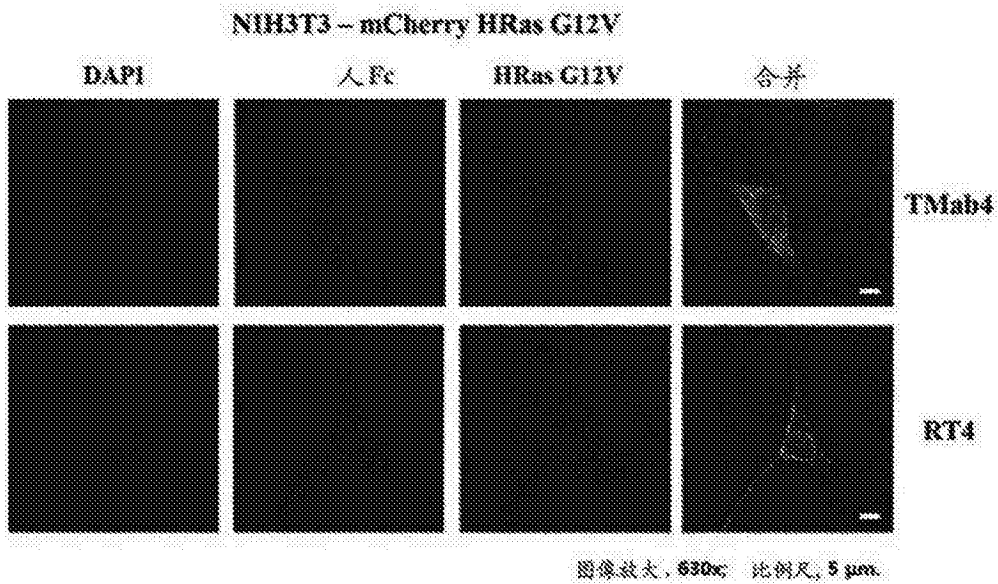


图17

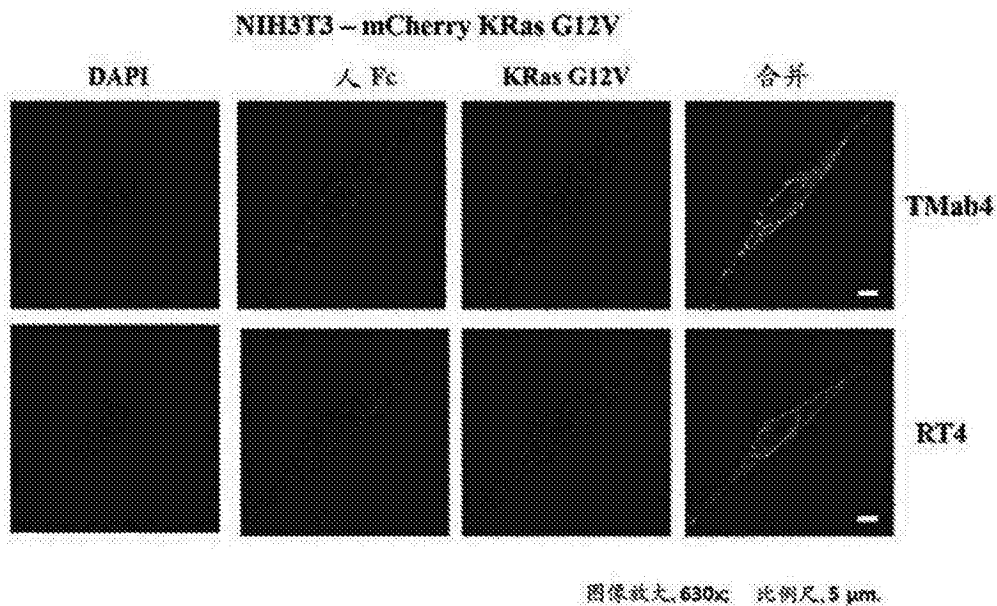


图18

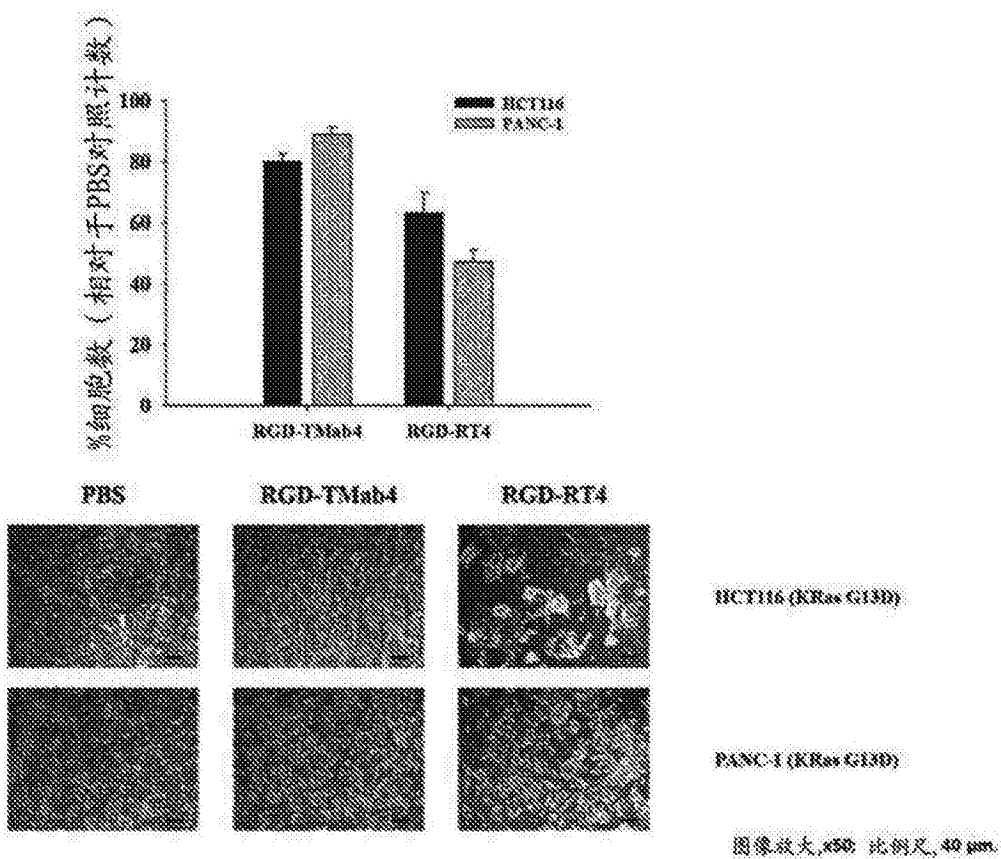


图19

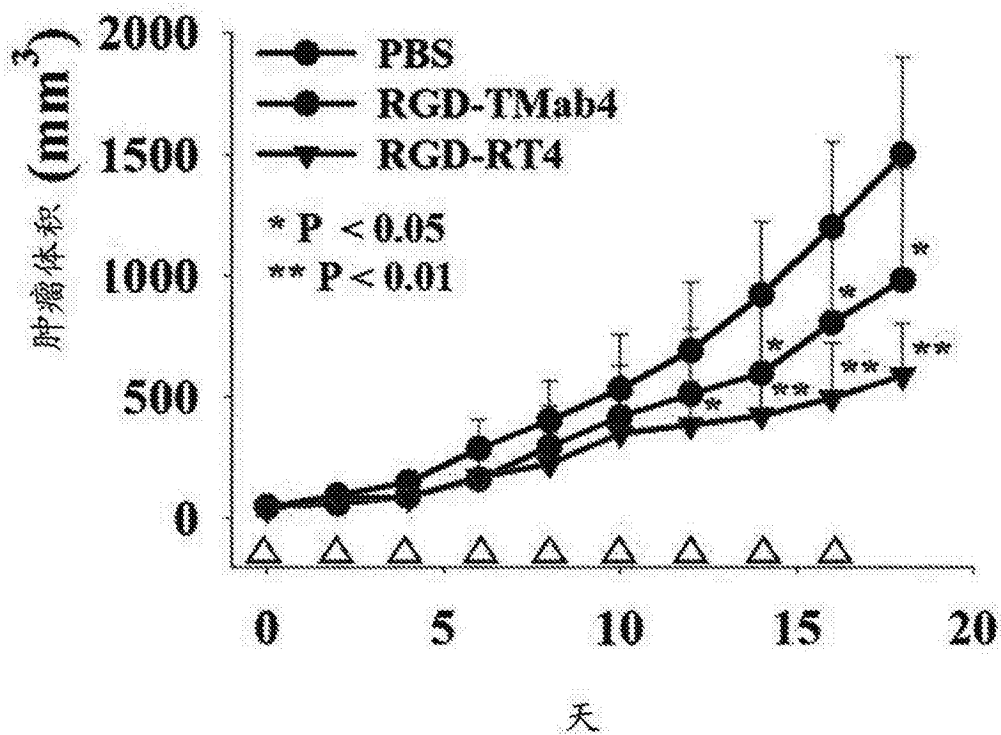


图20a

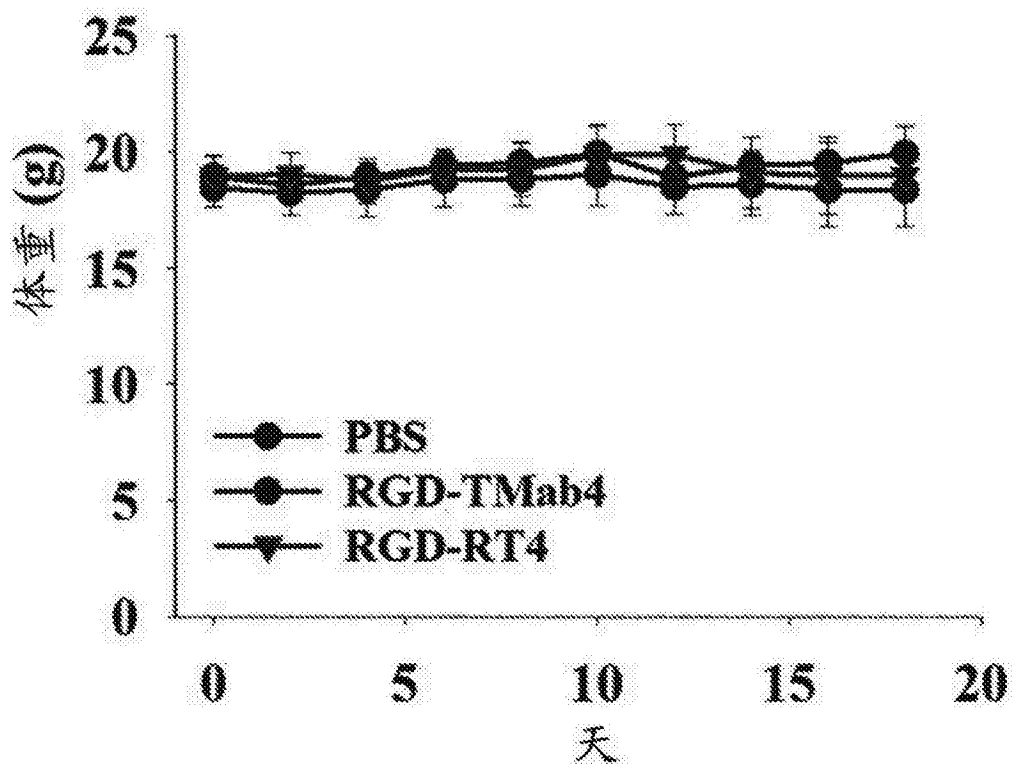


图20b

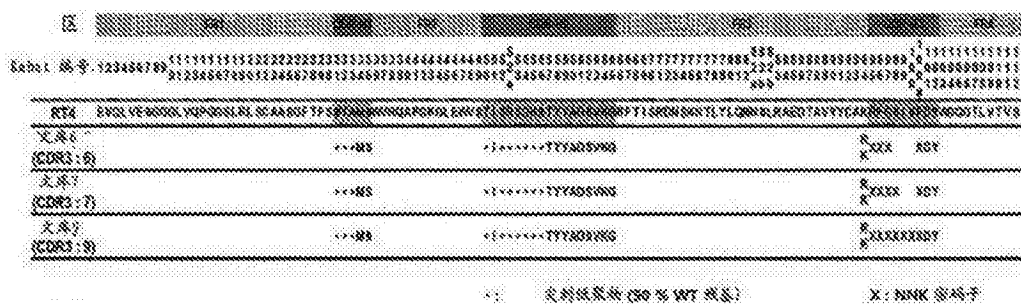


图21a

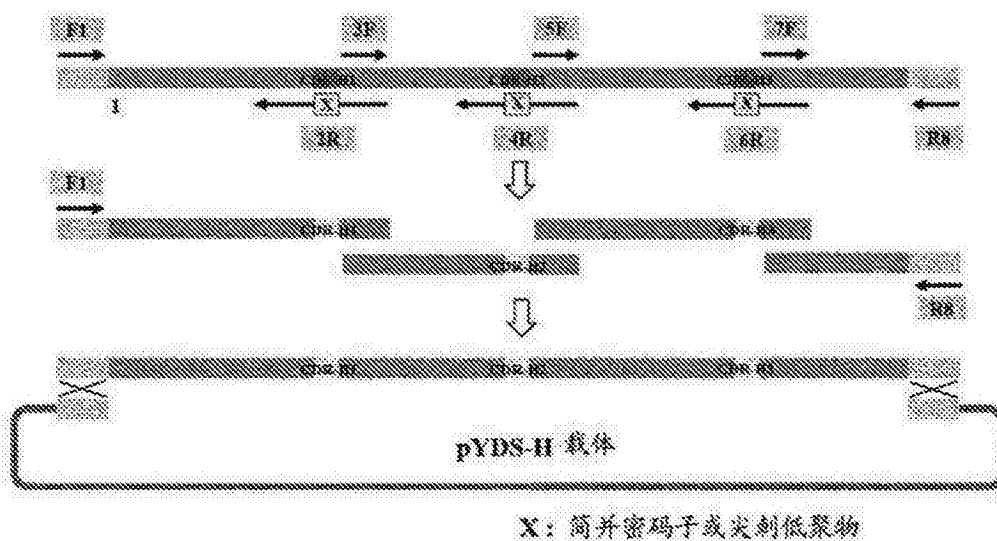


图21b

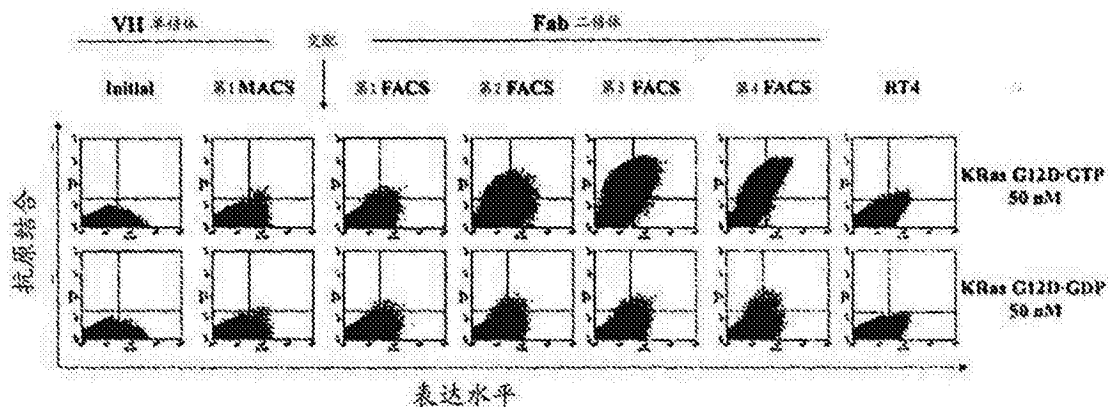


图22

		CDR1										CDR2									
Kabat VH																					
RT4 VH	氨基酸	IEYQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPQKLEWVSTISR...SQHSTYYADSVKGRF																			
RT11 VH		SYSMR.....										YISR...TSHTTTYADSVKQ..									
RT13 VH		TFSMR.....										YISR...TSHTTTYADSVKQ..									
RT14 VH		TFSMR.....										YISR...TSHTTTYADSVKQ..									
RT15 VH		TFSMR.....										YISR...TSHTTTYADSVKQ..									
RT16 VH		TFSMR.....										YISR...TSHTTTYADSVKQ..									
RT17 VH		TFSMR.....										YISR...TSHTTTYADSVKQ..									

		CDR3																			
Kabat VH																					
RT4 VH	氨基酸	ITISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVVTCANFQSIY...FDYHGGGLVTVSS																			
RT11 VH		SFF.....MDY.....																			
RT13 VH		STFG.....FDY.....																			
RT14 VH		PRGW.....FDY.....																			
RT15 VH		RFGS.....FDY.....																			
RT16 VH		SGRPFV.....FDY.....																			
RT17 VH		GRFGSV.....FDY.....																			

图23

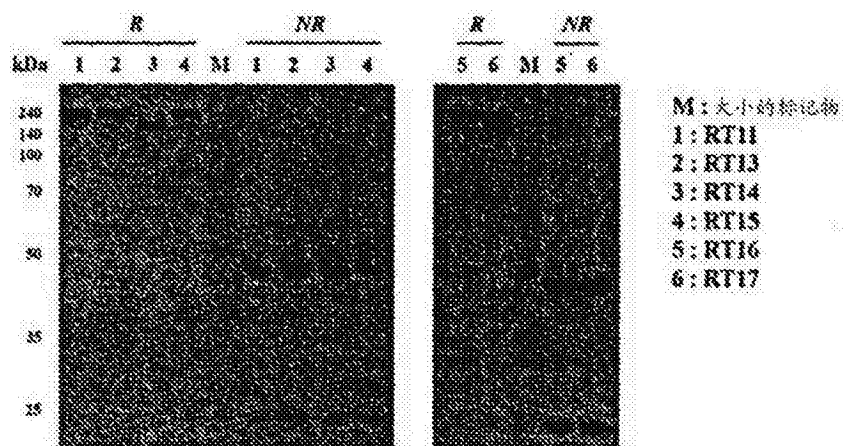


图24

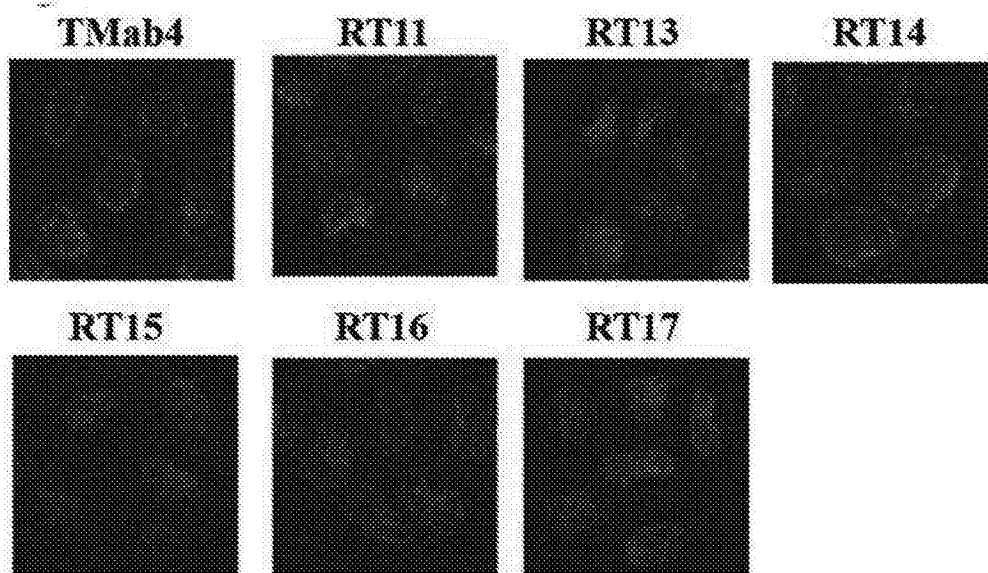


图25

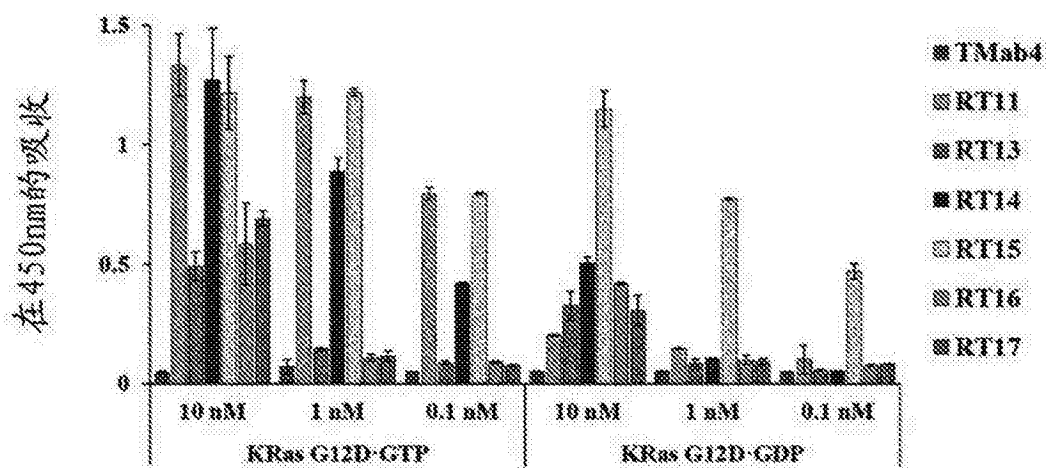


图26a

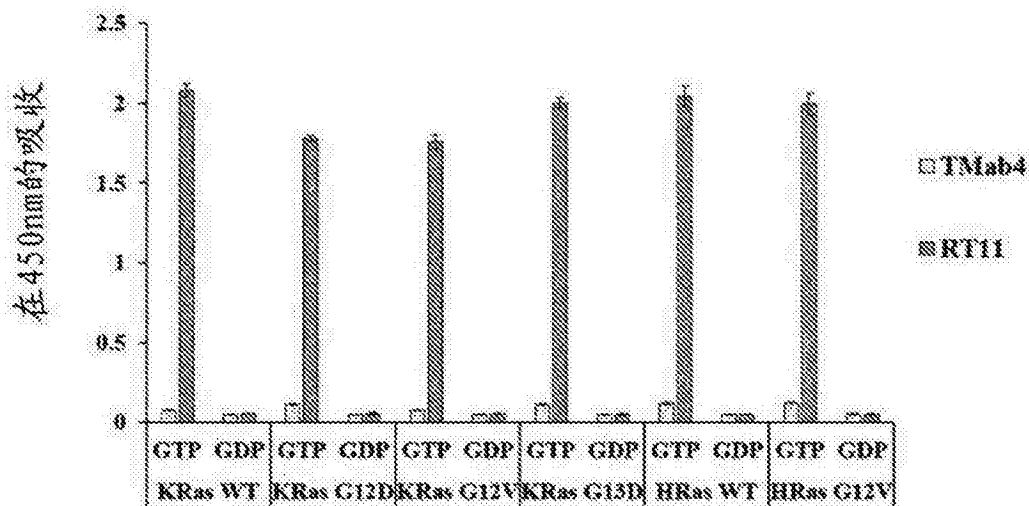
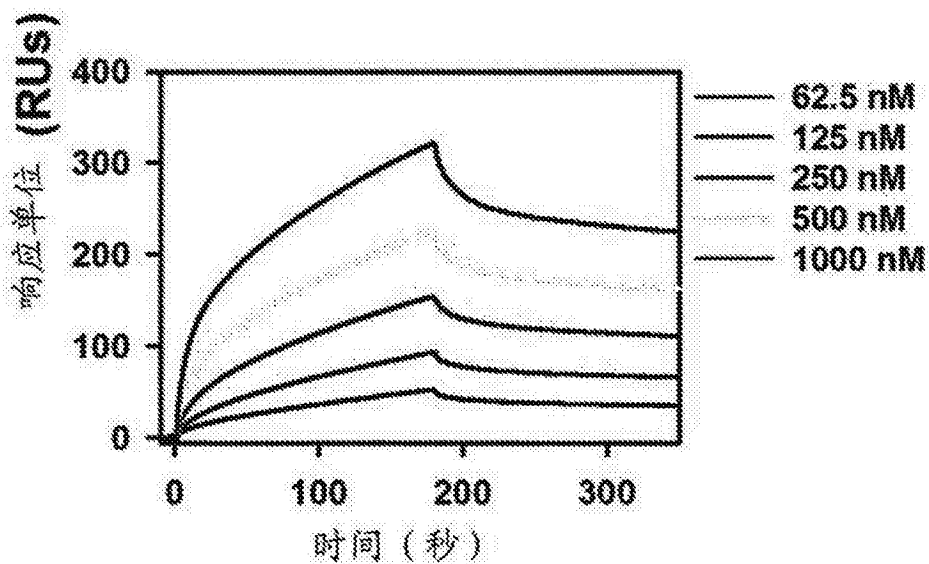


图26b



	k_a (M ⁻¹ S ⁻¹)	k_d (S ⁻¹)	K_D (M)
RT11	1.82×10^4	2.34×10^{-4}	1.29×10^{-8}

图27a

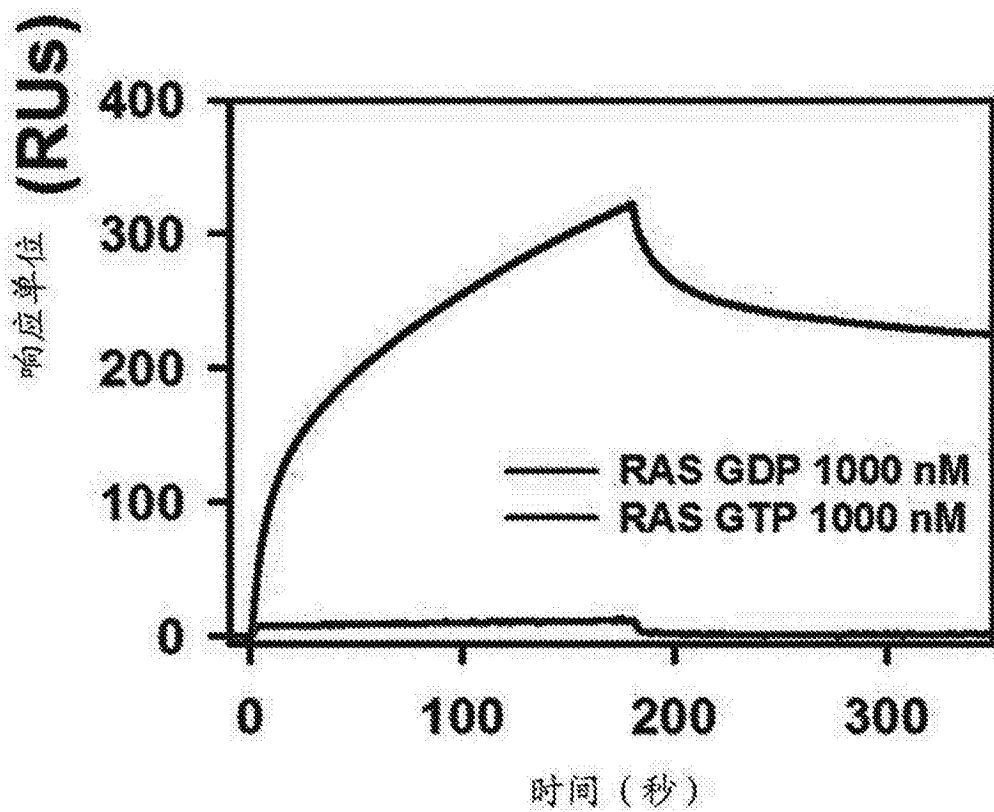


图27b

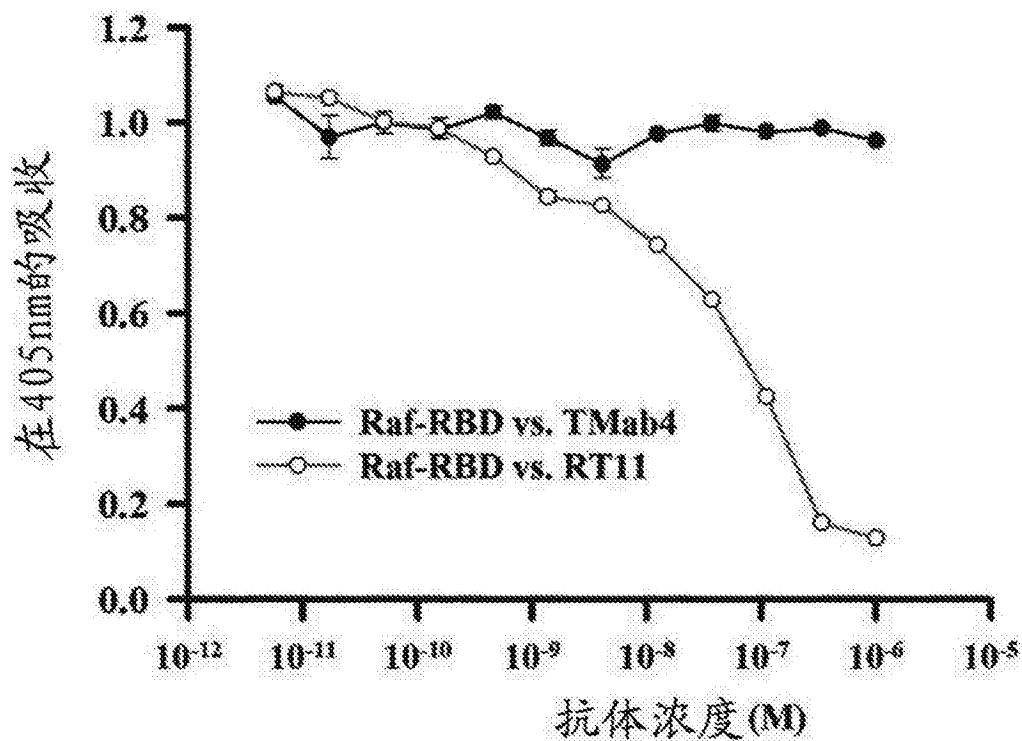


图28

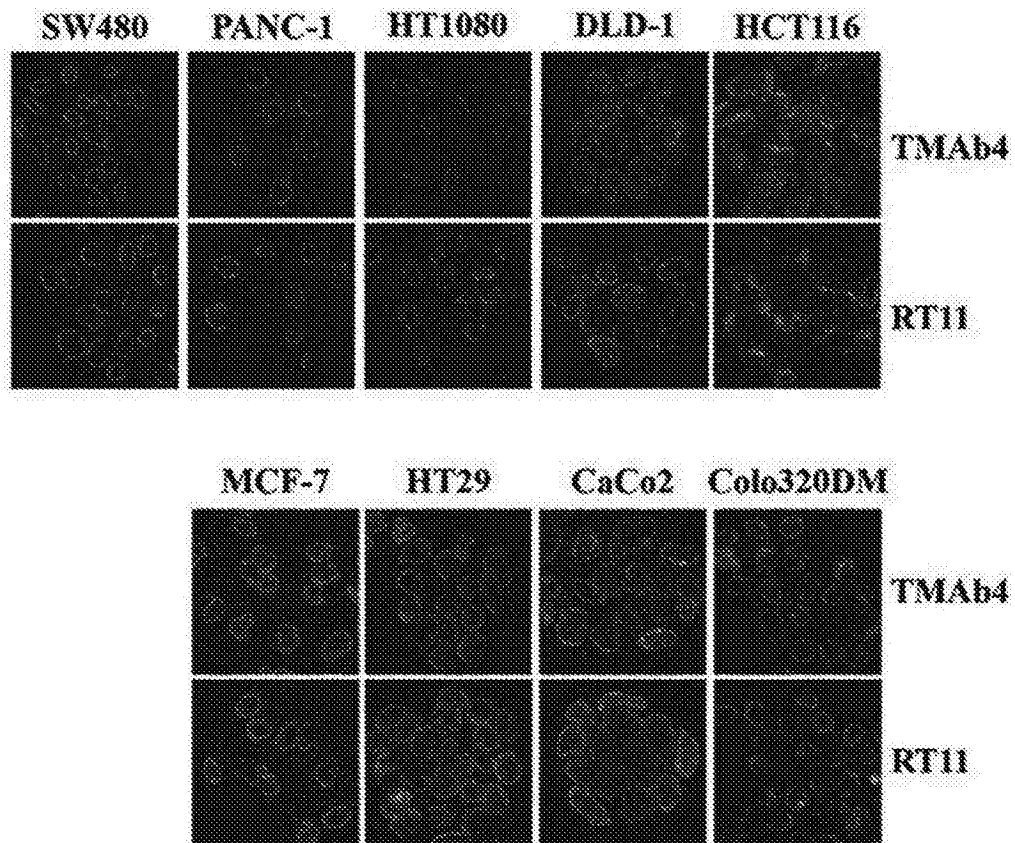


图29

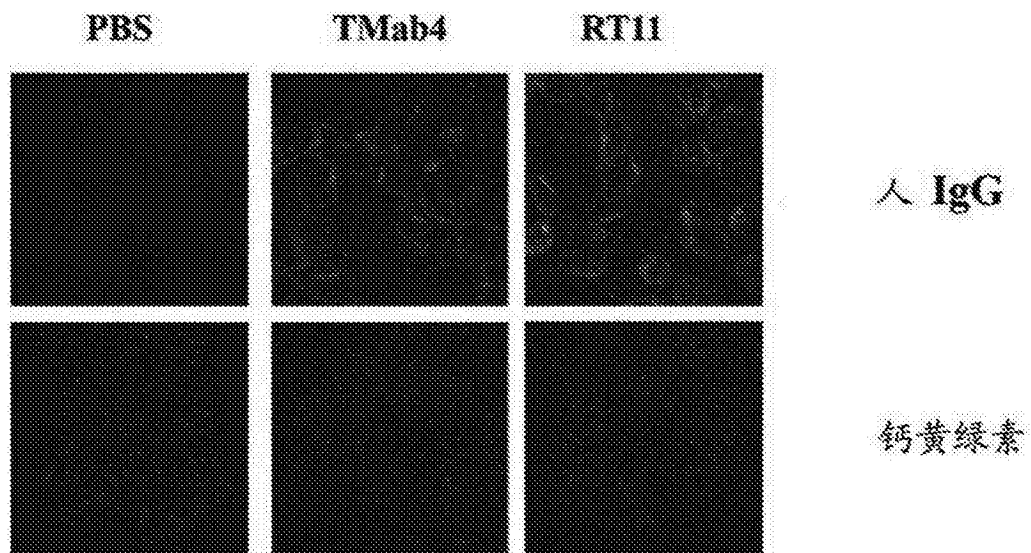


图30

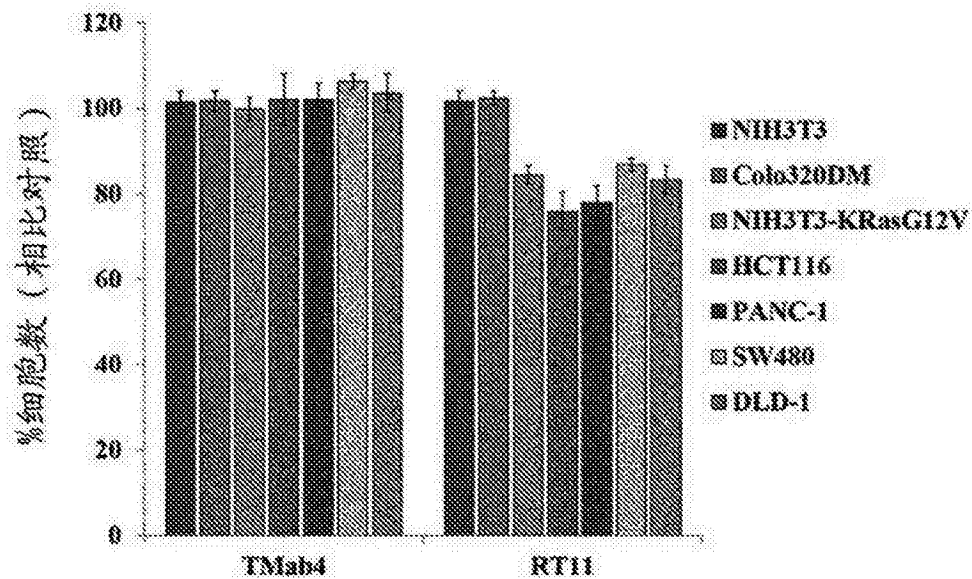


图31

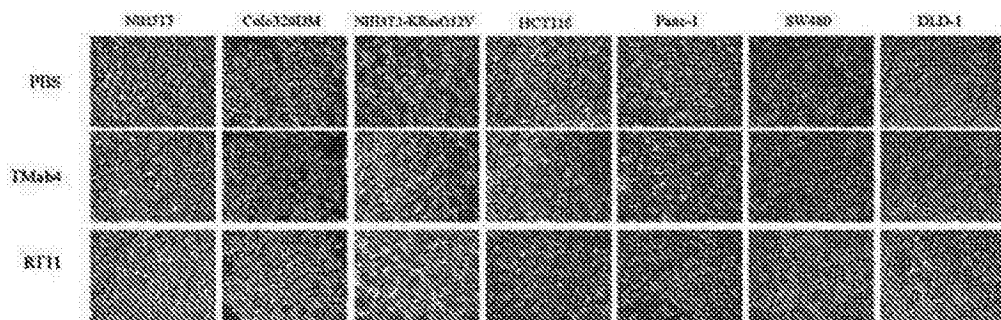


图32

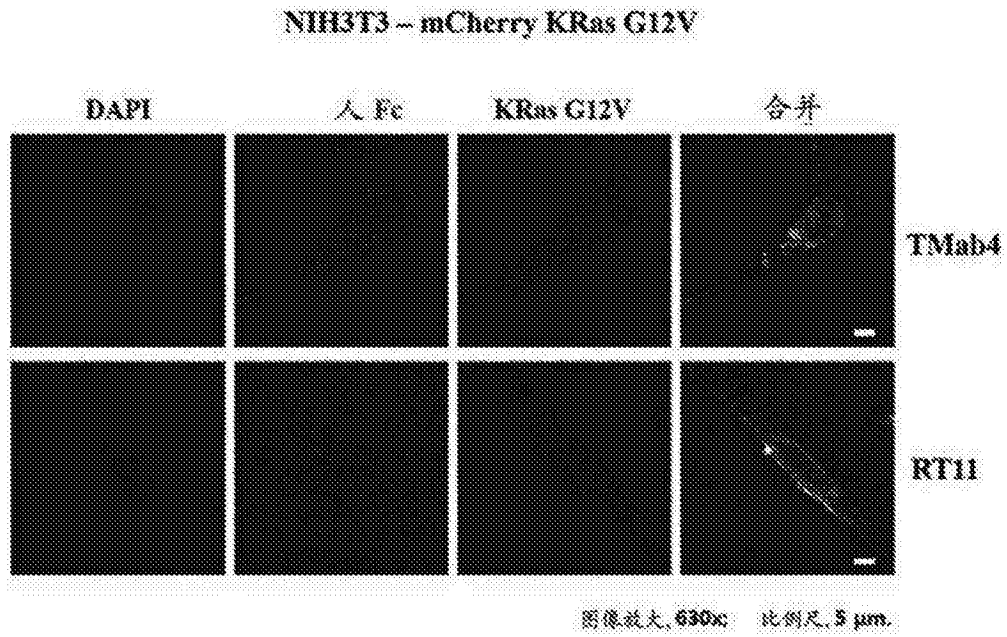


图33

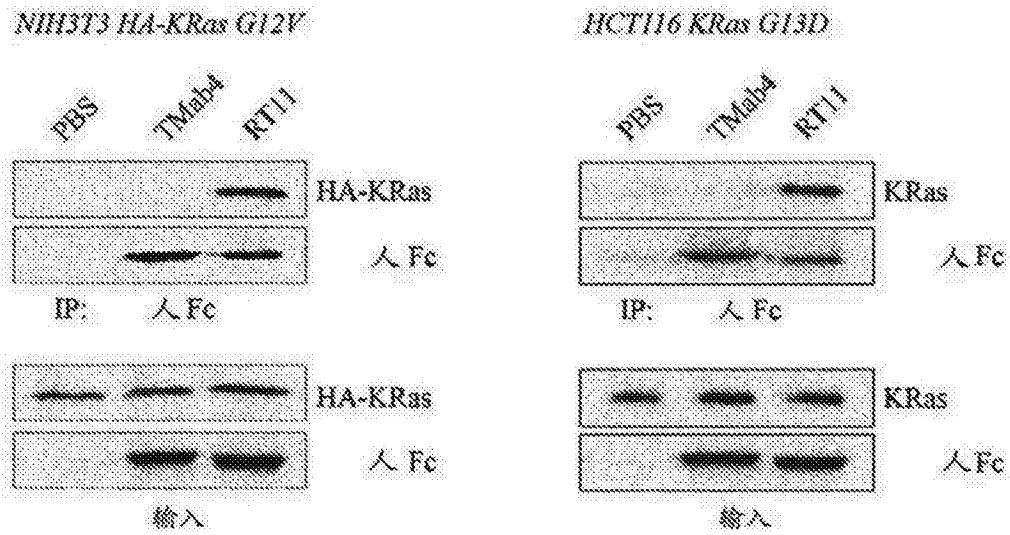


图34

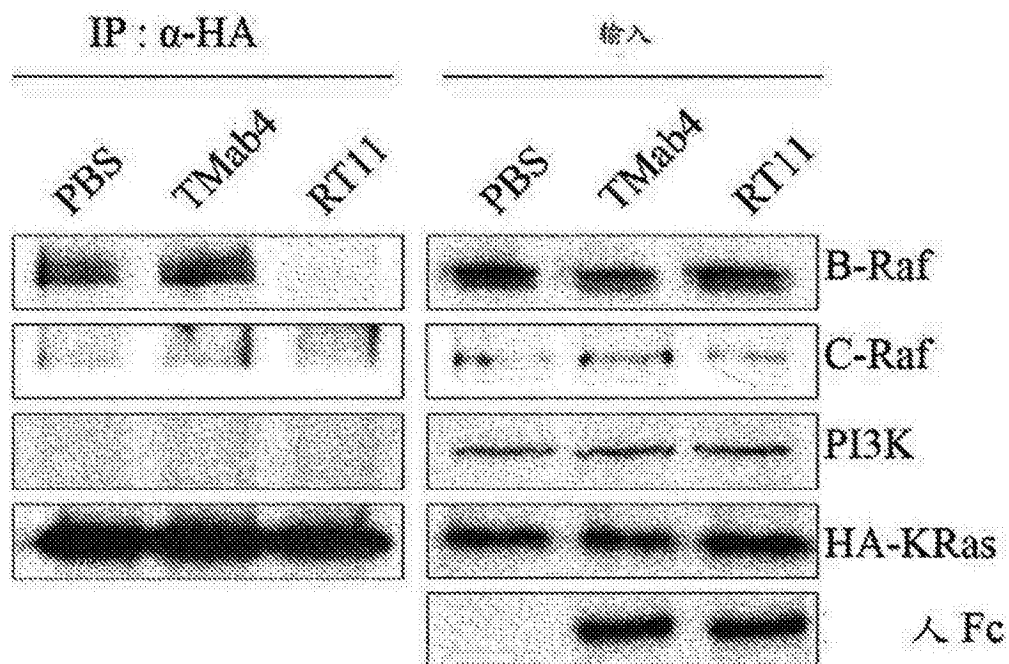


图35a

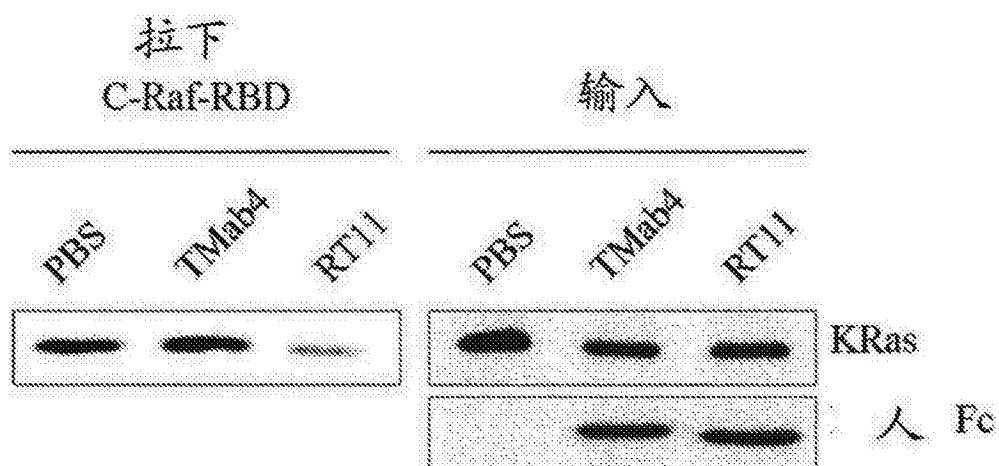


图35b

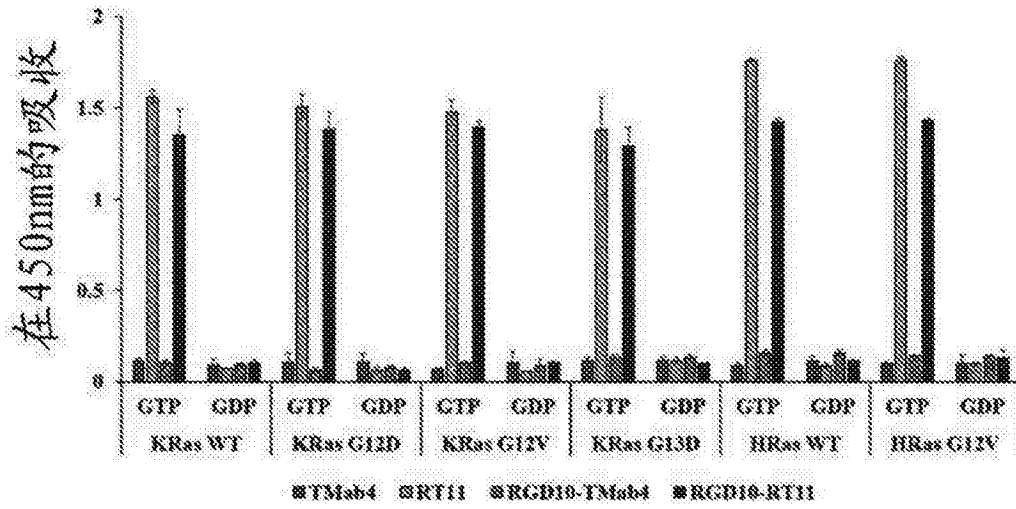


图36

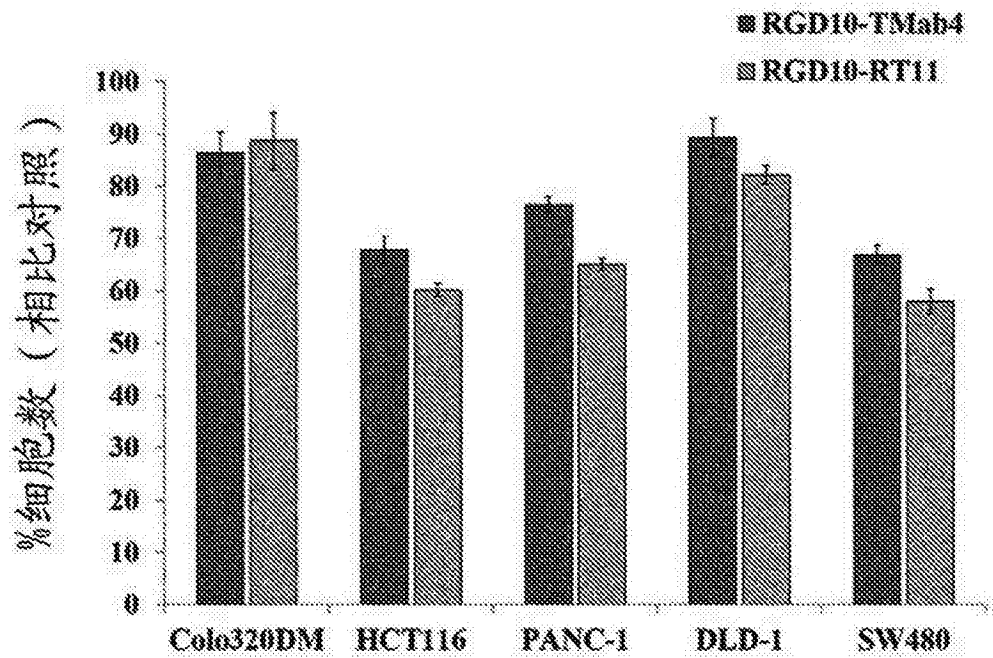


图37

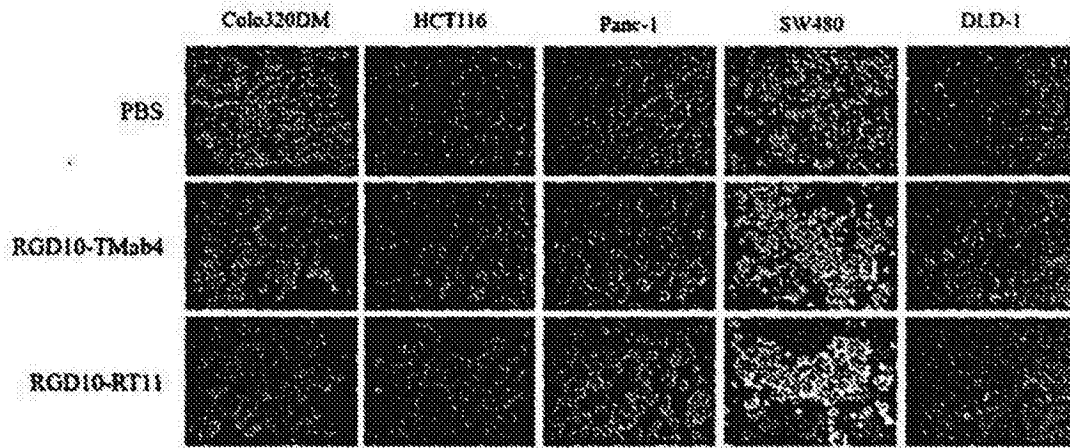


图38

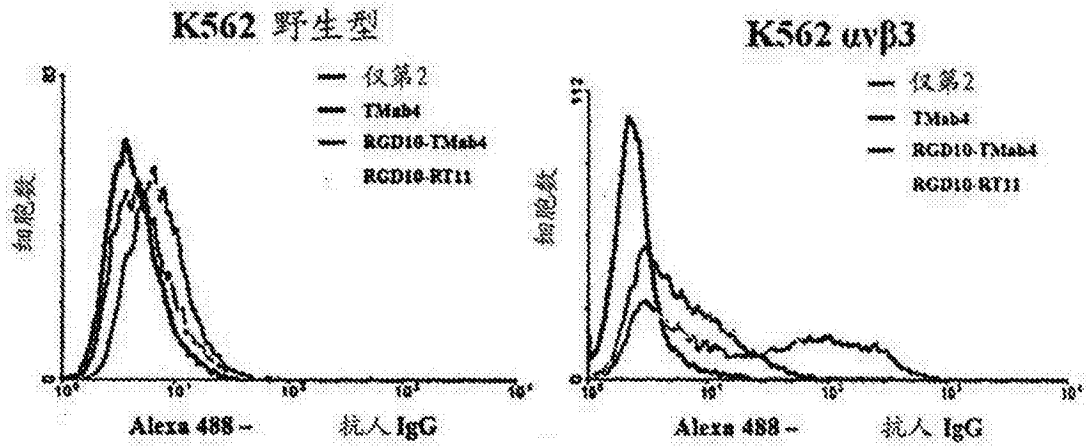


图39

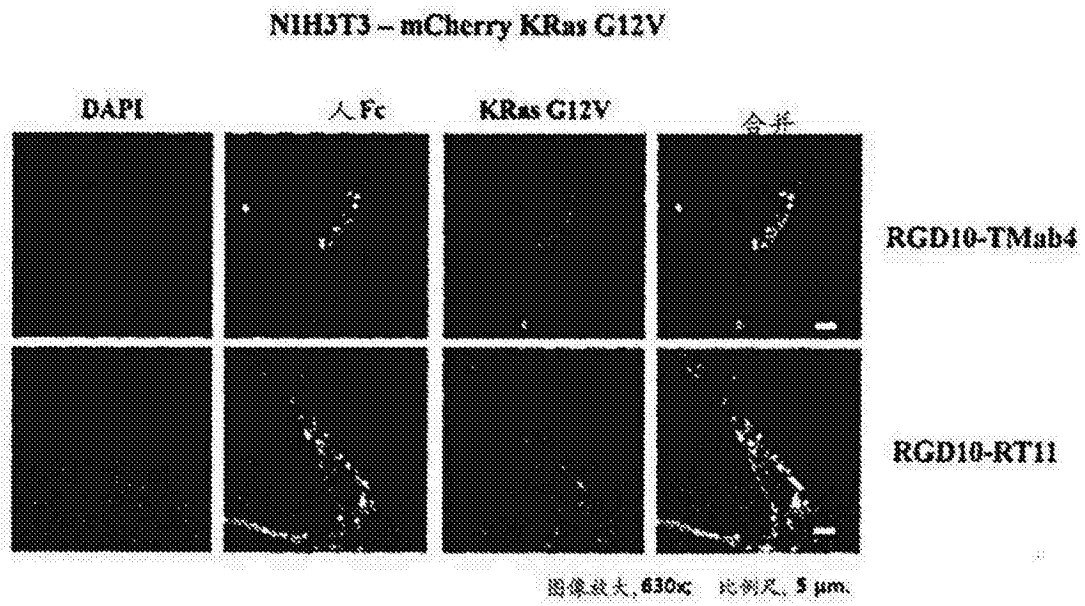


图40