

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480018185.3

[51] Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 39/44 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

[43] 公开日 2007年3月14日

[11] 公开号 CN 1930187A

[51] Int. Cl. (续)

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/552 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[22] 申请日 2004.6.25

[21] 申请号 200480018185.3

[30] 优先权

[32] 2003. 6. 27 [33] US [31] 60/483,145

[32] 2003. 11. 26 [33] US [31] 60/525,570

[32] 2004. 4. 15 [33] US [31] 60/562,453

[86] 国际申请 PCT/US2004/020564 2004.6.25

[87] 国际公布 WO2005/012479 英 2005.2.10

[85] 进入国家阶段日期 2005.12.27

[71] 申请人 艾伯吉尼斯公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 理查德·韦伯 冯 晓

奥里特·福德 拉里·格林

琼·古达斯 布鲁斯·基特 刘 颖

帕拉尼·拉塔纳斯瓦米

罗伯特·拉亚 杨晓东

乔斯·克尔瓦兰 伊恩·福尔茨

贾小池 贾斯帕·康

查德威克·T·金

斯科特·L·克拉坎普

巧娟·简·苏

[74] 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限责任公司

权利要求书9页 说明书98页 附图55页

代理人 王允方 刘国伟

[54] 发明名称

针对表皮生长因子受体的缺失突变体的抗体及其使用

[57] 摘要

本发明涉及新颖抗体，尤其涉及针对表皮生长因子受体的缺失突变体的抗体，而且尤其涉及 III 型缺失突变体 EGFRvIII。本发明也涉及针对表皮生长因子受体的缺失突变体的人类单克隆抗体，而且尤其为 EGFRvIII。本发明也提供这些抗体的诊断和治疗配方，及其免疫偶联物。

1. 一种经分离人类单克隆抗体，其特异性结合至 EGFRvIII 和包含 LEEKKGNYVVT DHC 序列 (SEQ ID NO: 56) 的肽。
2. 一种经分离人类单克隆抗体，其特异性结合至包含 LEEKKGNYVVT DHC (SEQ ID NO: 56) 的序列中所含的表位，其中用于结合至所述序列的残基选自 EEK、KKNYV、LEK、EKNY 和 EEKGN 组成的群组。
3. 一种经分离人类单克隆抗体，其包含由 VH3-33 基因编码的重链可变区氨基酸序列。
4. 根据权利要求 3 所述的抗体，其中所述重链可变区氨基酸序列进一步包含由 JH4b 基因编码的氨基酸序列。
5. 根据权利要求 3 所述的抗体，其中所述重链可变区氨基酸序列进一步包含由选自 D6-13 和 D3-9 组成的群组的 D 基因编码的氨基酸序列。
6. 一种经分离人类单克隆抗体，其包含由 A23(VK2)基因编码的轻链可变区氨基酸序列。
7. 根据权利要求 6 所述的抗体，其中所述轻链可变区氨基酸序列进一步包含由 JK1 基因编码的氨基酸序列。
8. 一种经分离抗体或其片段，其结合至 EGFRvIII，且其包含选自抗体 13.1.2 (SEQ ID NO: 138)、131 (SEQ ID NO: 2)、170 (SEQ ID NO: 4)、150 (SEQ ID NO: 5)、095 (SEQ ID NO: 7)、250 (SEQ ID NO: 9)、139 (SEQ ID NO: 10)、211 (SEQ ID NO: 12)、124 (SEQ ID NO: 13)、318 (SEQ ID NO: 15)、342 (SEQ ID NO: 16)和 333 (SEQ ID NO: 17) 的重链氨基酸序列组成的群组的重链氨基酸序列。
9. 根据权利要求 8 所述的抗体，其中所述抗体是单克隆抗体。
10. 根据权利要求 8 所述的抗体，其中所述抗体是嵌合抗体。
11. 根据权利要求 8 所述的抗体，其中所述抗体是人源化抗体。
12. 根据权利要求 8 所述的抗体，其中所述抗体是人类抗体。
13. 根据权利要求 8 所述的抗体或片段，其中所述抗体或片段与医药上可接受的载剂或稀释剂缔合。
14. 一种产生根据权利要求 8 所述抗体的杂交瘤细胞株。
15. 一种经转型细胞，其包含编码根据权利要求 8 所述抗体的基因。
16. 根据权利要求 14 所述的细胞，其中所述细胞是中国仓鼠卵巢细胞。
17. 一种抑制与 EGFRvIII 表达相关的细胞增殖的方法，其包含以有效量的抗体或其片

段处理表达 EGFRvIII 的细胞，其中所述抗体或其片段结合至 EGFRvIII，且其中所述抗体包含选自由抗体 13.1.2 (SEQ ID NO: 138)、131 (SEQ ID NO: 2)、170 (SEQ ID NO: 4)、150 (SEQ ID NO: 5)、095 (SEQ ID NO: 7)、250 (SEQ ID NO: 9)、139 (SEQ ID NO: 10)、211 (SEQ ID NO: 12)、124 (SEQ ID NO: 13)、318 (SEQ ID NO: 15)、342 (SEQ ID NO: 16)和 333 (SEQ ID NO: 17)的重链氨基酸序列组成的群组的重链氨基酸序列。

18. 根据权利要求 17 所述的方法，其中所述方法在活体内进行。
19. 根据权利要求 17 所述的方法，其中所述方法在哺乳动物体内进行。
20. 根据权利要求 19 所述的方法，其中所述哺乳动物是人类。
21. 根据权利要求 19 所述的方法，其中所述哺乳动物患有涉及上皮细胞增殖的癌症。
22. 根据权利要求 21 所述的方法，其中所述癌症包含肺癌、结肠癌、胃癌、肾癌、前列腺癌、乳腺癌、胶质母细胞瘤或卵巢癌。
23. 一种经分离抗体，其结合至 EGFRvIII 且其包含重链氨基酸序列，所述重链氨基酸序列包含以下互补决定区 (CDR):

(a)CDR1, 其由选自由以下抗体的 CDR1 区氨基酸序列组成的群组的序列组成: 13.1.2 (SEQ ID NO: 138)、131 (SEQ ID NO: 2)、170 (SEQ ID NO: 4)、150 (SEQ ID NO: 5)、095 (SEQ ID NO: 7)、250 (SEQ ID NO: 9)、139 (SEQ ID NO: 10)、211 (SEQ ID NO: 12)、124 (SEQ ID NO: 13)、318 (SEQ ID NO: 15)、342 (SEQ ID NO: 16)和 333 (SEQ ID NO: 17);

(b)CDR2, 其由选自由以下抗体的 CDR2 区氨基酸序列组成的群组的序列组成: 13.1.2 (SEQ ID NO: 138)、131 (SEQ ID NO: 2)、170 (SEQ ID NO: 4)、150 (SEQ ID NO: 5)、095 (SEQ ID NO: 7)、250 (SEQ ID NO: 9)、139 (SEQ ID NO: 10)、211 (SEQ ID NO: 12)、124 (SEQ ID NO: 13)、318 (SEQ ID NO: 15)、342 (SEQ ID NO: 16)和 333 (SEQ ID NO: 17); 和

(c)CDR3, 其由选自由以下抗体的 CDR3 区氨基酸序列组成的群组的序列组成: 13.1.2 (SEQ ID NO: 138)、131 (SEQ ID NO: 2)、170 (SEQ ID NO: 4)、150 (SEQ ID NO: 5)、095 (SEQ ID NO: 7)、250 (SEQ ID NO: 9)、139 (SEQ ID NO: 10)、211 (SEQ ID NO: 12)、124 (SEQ ID NO: 13)、318 (SEQ ID NO: 15)、342 (SEQ ID NO: 16)和 333 (SEQ ID NO: 17)。

24. 根据权利要求 23 所述的抗体，其中所述抗体是单克隆抗体。
25. 根据权利要求 23 所述的抗体，其中所述抗体是嵌合抗体。

26. 根据权利要求 23 所述的抗体，其中所述抗体是人源化抗体。
27. 根据权利要求 23 所述的抗体，其中所述抗体是人类抗体。
28. 根据权利要求 23 所述的抗体或片段，其中所述抗体或片段与医药上可接受的载剂或稀释剂缔合。
29. 一种产生根据权利要求 23 所述抗体的杂交瘤细胞株。
30. 一种经转型细胞，其包含编码根据权利要求 23 所述抗体的基因。
31. 根据权利要求 29 所述的细胞，其中所述细胞是中国仓鼠卵巢细胞。
32. 一种抑制与所述 EGFRvIII 表达相关的细胞增殖的方法，其包含以有效量的根据权利要求 23 所述的抗体或片段处理表达 EGFRvIII 的细胞。
33. 根据权利要求 32 所述的方法，其中所述方法在活体内进行。
34. 根据权利要求 32 所述的方法，其中所述方法在哺乳动物体内进行。
35. 根据权利要求 34 所述的方法，其中所述哺乳动物是人类。
36. 根据权利要求 34 所述的方法，其中所述哺乳动物患有涉及上皮细胞增殖的癌症。
37. 根据权利要求 36 所述的方法，其中所述癌症包含肺癌、结肠癌、胃癌、肾癌、前列腺癌、乳腺癌、胶质母细胞瘤或卵巢癌。
38. 一种经分离抗体，其结合至 EGFRvIII 且其包含轻链氨基酸序列，所述轻链氨基酸序列包含以下互补决定区（CDR）：
 - (a) CDR1，其由选自由标识为 SEQ ID NO: 140、19、20、21、29、23、25、26、28、33、31 和 32 的抗体 13.1.2、131、170、150、123、095、139、250、211、318、342 和 333 的 CDR1 区的氨基酸序列组成的群组的序列组成；
 - (b) CDR2，其由选自由标识为 SEQ ID NO: 140、19、20、21、29、23、25、26、28、33、31 和 32 的抗体 13.1.2、131、170、150、123、095、139、250、211、318、342 和 333 的 CDR1 区的氨基酸序列组成的群组的序列组成；和
 - (c) CDR3，其由选自由标识为 SEQ ID NO: 140、19、20、21、29、23、25、26、28、33、31 和 32 的抗体 13.1.2、131、170、150、123、095、139、250、211、318、342 和 333 的 CDR1 区的氨基酸序列组成的群组的序列组成。
39. 根据权利要求 38 所述的结合至 EGFRvIII 的经分离抗体，其进一步包含重链氨基酸序列，所述重链氨基酸序列包含以下互补决定区（CDR）：
 - (a) CDR1，其由选自由标识为 SEQ ID NO: 138、2、4、5、7、9、10、12、13、15、16 和 17 的抗体 13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342 和 333 的 CDR1 区的氨基酸序列组成的群组的序列组成；

- (b) CDR2, 由选自由标识为 SEQ ID NO: 138、2、4、5、7、9、10、12、13、15、16 和 17 的抗体 13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342 和 333 的 CDR2 区的氨基酸序列组成的群组的序列组成; 和
- (c) CDR3, 其由选自由标识为 SEQ ID NO: 138、2、4、5、7、9、10、12、13、15、16 和 17 的抗体 13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342 和 333 的 CDR3 区的氨基酸序列组成的群组的序列组成。
40. 一种抑制与所述 EGFRvIII 表达相关的细胞增殖的方法, 其包含以有效量的根据权利要求 38 所述的抗体或片段处理表达 EGFRvIII 的细胞。
 41. 根据权利要求 40 所述的方法, 其中所述方法在活体内进行。
 42. 根据权利要求 40 所述的方法, 其中所述方法在哺乳动物体内进行。
 43. 根据权利要求 42 所述的方法, 其中所述哺乳动物是人类。
 44. 根据权利要求 42 所述的方法, 其中所述哺乳动物患有涉及上皮细胞增殖的癌症。
 45. 根据权利要求 44 所述的方法, 其中所述癌症包含肺癌、乳腺癌、头颈癌、前列腺癌或胶质母细胞瘤。
 46. 一种经分离多聚核苷酸分子, 其包含编码重链氨基酸序列的核苷酸序列或其片段, 其选自由标识为 SEQ ID NO: 138、2、4、4、5、7、9、10、12、13、15、16 和 17 的抗体 13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342 和 333 的重链氨基酸序列组成的群组, 其中所述经分离多聚核苷酸分子将结合具有标识为 SEQ ID NO: 56 的序列的肽。
 47. 一种经分离多聚核苷酸分子, 其包含编码轻链氨基酸序列的核苷酸序列或其片段, 其选自由标识为 SEQ ID NO: 19、20、21、29、23、25、26、28、33、31 和 32 的抗体 13.1.2、131、170、150、123、095、139、250、211、342、333 和 318 的轻链氨基酸序列组成的群组, 其中所述经分离多聚核苷酸分子将结合具有标识为 SEQ ID NO: 56 的序列的肽。
 48. 一种制品, 其包含一容器, 含于其中的组合物和表明所述组合物可用于治疗以 EGFRvIII 的表达为特征的癌症的包装说明书或标签, 其中所述组合物包含根据权利要求 1 所述的抗体。
 49. 根据权利要求 48 所述的制品, 其中所述癌症为肺癌、乳腺癌、头颈癌、前列腺癌或胶质母细胞瘤。
 50. 一种检定试剂盒, 其用于检测哺乳动物组织或细胞中的 EGFRvIII 来筛选肺癌、结肠癌、胃癌、肾癌、前列腺癌或卵巢癌, 其中所述 EGFRvIII 为由上皮癌症表达的

- 抗原，所述试剂盒包含结合抗原蛋白质的抗体和若存在时，用于指示抗体与抗原的反应的构件。
51. 根据权利要求 50 所述的检定试剂盒，其中所述抗体是单克隆抗体。
 52. 根据权利要求 50 所述的检定试剂盒，其中所述结合抗原的抗体经标记。
 53. 根据权利要求 50 所述的检定试剂盒，其中所述抗体是未经标记的第一抗体且所述用于指示反应的构件包含为抗-免疫球蛋白的经标记第二抗体。
 54. 根据权利要求 50 所述的检定试剂盒，其中所述结合抗原的抗体可由选自由荧光染料、酶、放射性核素和不透辐射材料组成群组的标记物来标记。
 55. 根据权利要求 50 所述的检定试剂盒，其中所述结合抗原的抗体也结合至经过度表达的野生型 EGFR。
 56. 根据权利要求 50 所述的检定试剂盒，其中所述试剂盒用于供患者临床选择。
 57. 一种抗体，与缺少 Gly 残基的表位相比，其优先识别含有新颖 Gly 残基的 EGFRvIII 表位。
 58. 一种经纯化的 EGFRvIII 蛋白质变体。
 59. 根据权利要求 58 所述的变体，其中 EGFRvIII 蛋白质含有 pFLAG 插入物。
 60. 根据权利要求 58 所述的变体，其中所述蛋白质变体由 SEQ ID NO: 56 的所述氨基酸序列组成。
 61. 根据权利要求 58 所述的变体，其中所述蛋白质变体存在于计算机模拟中。
 62. 一种抗体或其变体，其结合至识别序列 EEKKGNYVVT (SEQ ID NO: 57)。
 63. 一种经分离的抗体变体，其特异性结合至 EGFRvIII。
 64. 根据权利要求 63 所述的经分离抗体变体，其进一步特异性结合至 EGFRvIII 和包含所述 EEKKGNYVVT 序列 (SEQ ID NO: 57) 的肽。
 65. 根据权利要求 63 所述的经分离抗体变体，其中所述形成所述表位的肽中的残基选自 EKNY 和 EEKGN 组成的群组。
 66. 根据权利要求 63 所述的经分离抗体变体，其中所述抗体结合至所述肽序列比其结合至野生型 EGFR 蛋白质紧密 10 倍。
 67. 一种经分离抗体变体，其特异性结合至 EGFRvIII 和包含所述 LEEKKGNYVVT DHC 序列 (SEQ ID NO: 56) 的肽。
 68. 根据权利要求 67 所述的经分离抗体或变体，其中所述互补决定区包含一深腔，其中所述腔由重链的 CDR2 和 CDR3、轻链的 CDR3 和轻链的 CDR1 的一小部分形成。
 69. 根据权利要求 67 所述的经分离抗体或变体，其中残基 31、37、95-101、143-147、

- 159、162-166、169-171、211-219、221 和 223 存在于 5 埃结合腔中。
70. 根据权利要求 67 所述的经分离抗体或变体，其中所述互补决定区包含一浅槽，其中所述槽由重链 CDR2 和 CDR3 与轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 形成。
71. 根据权利要求 67 所述的经分离抗体或变体，其中残基 31、33、35-39、51、54-56、58-61、94-101、144-148、160、163-166、172 和 211-221 存在于 5 埃结合槽中。
72. 根据权利要求 67 所述的经分离抗体或变体，其中残基 31-33、35、37、55、96-101、148、163、165、170、172、178、217 和 218 存在于 5 埃结合槽中。
73. 根据权利要求 67 所述的经分离抗体或变体，其中所述抗体的互补位经成型以使得当肽 EEKKN (SEQ ID NO 127)的所述表位结合至所述抗体的所述互补位时，在选自 E2 和 Y172、K3 和 H31、K4 和 H31、N6 和 D33、N6 和 Y37 及 N6 和 K55 组成的群组的两个残基之间形成至少一个键。
74. 根据权利要求 67 所述的经分离抗体或变体，其中所述抗体的所述互补位经成型以使得当肽 EEKKNY (SEQ ID NO 131)的所述表位结合至所述抗体的所述互补位时，在选自 K4 和 Q95、K4 和 Q95、N6 和 Q98、G5 和 H31、Y7 和 H31、Y7 和 W165 组成的群组的两个残基之间形成至少一个键。
75. 根据权利要求 68-74 中任一权利要求所述的抗体，其中所述结构或相互作用于计算机模拟中测定。
76. 一种用于选择针对 EGFRvIII 的抗体变体的方法，所述方法包含：
使用抗体分子结构的模型来测定互补位；
使用表位结构的模型来将所述表位置于所述互补位中；
使用所述互补位和所述表位之间的相互作用能来测定第一相互作用能；
使用互补位和表位变体之间的相互作用能来测定第二相互作用能；和
基于所述第一和第二相互作用能之间的差异选择变体。
77. 根据权利要求 76 所述的方法，其进一步包含以下步骤：
使用所述互补位和所述表位第二变体之间的相互作用能来测定第三相互作用能；
将所述第三相互作用能与所述第二相互作用能相比较来决定选择哪个变体。
78. 根据权利要求 76 所述的方法，其中随后形成所选择的变体且测试其结合至所述表位的能力。
79. 一种用于产生针对 EGFRvIII 的抗体变体的方法，所述方法包含：
分析与所述互补位相互作用的表位残基；
选择更重要的表位残基以形成识别序列；

- 使用所述识别序列以形成 EGFRvIII 变体；和
- 使用所述 EGFRvIII 变体来选择抗体变体。
80. 根据权利要求 79 所述的方法，其中通过使用所述 EGFRvIII 变体选择所述抗体是以计算机模拟进行的。
 81. 根据权利要求 79 所述的方法，其中通过使用所述 EGFRvIII 变体选择所述抗体是通过产生针对 EGFRvIII 变体的抗体来达到的。
 82. 一种抗体或变体，其结合至所述序列 EEKKGNYVVT (SEQ ID NO: 57)，其中所述抗体或变体具有次纳摩尔结合能力。
 83. 根据权利要求 82 所述的抗体或变体，其进一步包含点突变 Tyr172Arg。
 84. 根据权利要求 82 所述的抗体或变体，其进一步包含点突变 Leu99Glu。
 85. 根据权利要求 82 所述的抗体或变体，其进一步包含点突变 Arg101Glu。
 86. 根据权利要求 82 所述的抗体或变体，其进一步包含点突变 Leu217Glu。
 87. 根据权利要求 82 所述的抗体或变体，其进一步包含点突变 Leu99Asn。
 88. 根据权利要求 82 所述的抗体或变体，其进一步包含点突变 Leu99His。
 89. 根据权利要求 82 所述的抗体或变体，其进一步包含点突变 L99T。
 90. 根据权利要求 82 所述的抗体或变体，其进一步包含点突变 Arg101Asp。
 91. 根据权利要求 82 所述的抗体，其中所述抗体是单克隆抗体。
 92. 根据权利要求 82 所述的抗体，其中所述抗体是嵌合抗体。
 93. 根据权利要求 82 所述的抗体，其中所述抗体是人源化抗体。
 94. 根据权利要求 82 所述的抗体，其中所述抗体是人类抗体。
 95. 一种抗体，所述抗体结合至 EGFRvIII 且所述抗体具有结合至表位的互补位，所述表位具有一组与包含 E、K、N 和 Y 的所述互补位相互作用的残基。
 96. 根据权利要求 95 所述的抗体，其中所述抗体是 131。
 97. 一种抗体，所述抗体结合至 EGFRvIII 且所述抗体具有结合至表位的互补位，其中所述表位具有一组与包含 E、E、K、G 和 N 的所述互补位相互作用的残基。
 98. 根据权利要求 97 所述的抗体，其中所述表位的主要结构为 EEKKGNY (SEQ ID NO: 131)。
 99. 根据权利要求 98 所述的抗体，其中所述抗体是 13.1.2。
 100. 一种抗体，其结合至 EGFRvIII 且其具有小于 1.3×10^{-9} M 的 K_D 。
 101. 一种抗体，其结合至 EGFRvIII 且其具有小于 1.0×10^{-9} M 的 K_D 。
 102. 一种抗体，其结合至 EGFRvIII 且其具有小于 500 pM 的 K_D 。

103. 根据权利要求 100 所述的抗体,其中所述抗体与野生型 EGFR 肽相比,对 SEQ ID NO: 56 具有特异性。
104. 根据权利要求 103 所述的抗体,其中所述抗体与所述野生型 EGFR 肽(SEQ ID NO: 134)的非特异性结合低于所述抗体与 EGFRVIII (SEQ ID NO: 135)的特异性结合的 10%。
105. 根据权利要求 98 所述的抗体,其中所述抗体选自由 131 和 13.1.2 组成的群组。
106. 根据权利要求 105 所述的抗体,其中所述抗体经内在化。
107. 根据权利要求 106 所述的抗体,其中至少约 70%的所述抗体发生内在化。
108. 根据权利要求 107 所述的抗体,其中有效内在化是约 80%的所述抗体经内在化。
109. 一种变体人类单克隆抗体,其与野生型 EGFR 蛋白质或其变体(SEQ ID NO: 134)相比,优先结合至对 EGFRvIII 蛋白质大体上独特的表位。
110. 根据权利要求 109 所述的变体人类单克隆抗体,其中所述变体包含对应于典范类 1 的重链互补决定区(CDR1)。
111. 根据权利要求 109 所述的变体人类单克隆抗体,其中所述变体包含对应于典范类 3 的重链互补决定区(CDR2)。
112. 根据权利要求 109 所述的变体人类单克隆抗体,其中所述变体包含对应于典范类 4 的轻链互补决定区(CDR1)。
113. 根据权利要求 109 所述的变体人类单克隆抗体,其中所述变体包含对应于典范类 1 的轻链互补决定区(CDR2)。
114. 根据权利要求 109 所述的变体人类单克隆抗体,其中所述变体包含对应于典范类 1 的轻链互补决定区(CDR3)。
115. 根据权利要求 109 所述的变体人类单克隆抗体,其中所述变体包含:
对应于典范类 1 的第一重链互补决定区(CDR1);
对应于典范类 3 的第二重链互补决定区(CDR2);
对应于典范类 4 的第一轻链互补决定区(CDR1);
对应于典范类 1 的第二轻链互补决定区(CDR2); 和
对应于典范类 1 的第三轻链互补决定区(CDR3),其中所述互补决定区经成型以使得所述变体结合至与 EGFR 蛋白质相比,对 EGFRvIII 蛋白质大体上独特的表位。
116. 一种杀死靶细胞的方法,所述方法包含:
将所述靶细胞和与毒素缔合的抗体接触,其中所述抗体结合至所述肽 LEEKKGNV (SEQ ID NO:133),且其中所述靶细胞表达包含 LEEKKGNV 序列的肽。

117. 一种经分离抗体，其结合至 EGFRvIII 且其与治疗剂偶联，且包含重链氨基酸序列，所述重链氨基酸序列包含以下互补决定区（CDR）：

(a) CDR1, 其由选自由以下抗体的 CDR1 区氨基酸序列组成的群组的序列组成：
13.1.2 (SEQ ID NO: 138)、131 (SEQ ID NO: 2)、170 (SEQ ID NO: 4)、150 (SEQ ID NO: 5)、095 (SEQ ID NO: 7)、250 (SEQ ID NO: 9)、139 (SEQ ID NO: 10)、211 (SEQ ID NO: 12)、124 (SEQ ID NO: 13)、318 (SEQ ID NO: 15)、342 (SEQ ID NO: 16)和 333 (SEQ ID NO: 17)；

(b) CDR2, 其由选自由以下抗体的 CDR2 区氨基酸序列组成的群组的序列组成：
13.1.2 (SEQ ID NO: 138)、131 (SEQ ID NO: 2)、170 (SEQ ID NO: 4)、150 (SEQ ID NO: 5)、095 (SEQ ID NO: 7)、250 (SEQ ID NO: 9)、139 (SEQ ID NO: 10)、211 (SEQ ID NO: 12)、124 (SEQ ID NO: 13)、318 (SEQ ID NO: 15)、342 (SEQ ID NO: 16)和 333 (SEQ ID NO: 17)； 和

(c) CDR3, 其由选自由以下抗体的 CDR3 区氨基酸序列组成的群组的序列组成：
13.1.2 (SEQ ID NO: 138)、131 (SEQ ID NO: 2)、170 (SEQ ID NO: 4)、150 (SEQ ID NO: 5)、095 (SEQ ID NO: 7)、250 (SEQ ID NO: 9)、139 (SEQ ID NO: 10)、211 (SEQ ID NO: 12)、124 (SEQ ID NO: 13)、318 (SEQ ID NO: 15)、342 (SEQ ID NO: 16)和 333 (SEQ ID NO: 17)。

118. 根据权利要求 117 所述的抗体，其中所述治疗剂是毒素。

119. 一种经分离人类单克隆抗体，其特异性结合至 EGFRvIII 和包含所述 LEEKKGNYVVT DHC 序列（SEQ ID NO: 56）的肽，其中所述抗体进一步与治疗剂偶联。

120. 根据权利要求 119 所述的抗体，其中所述治疗剂是毒素。

针对表皮生长因子受体的缺失突变体的抗体及其使用

技术领域

本实施例涉及新颖抗体,尤其涉及针对表皮生长因子受体的缺失突变体的抗体,而且尤其涉及 III 型缺失突变体 EGFRvIII。本实施例也涉及针对表皮生长因子受体的缺失突变体的人类单克隆抗体,而且尤其为 EGFRvIII。本实施例也涉及这些抗体的变体。本发明也提供这些抗体的诊断和治疗配方,及其免疫偶联物。

背景技术

自上世纪以来,已寻求有助于更好诊断和治疗人类和动物癌症的肿瘤特异分子。除了那些基于病毒诱导癌症并包含由病毒基因规定的分子结构的癌症之外,在大多数类型的人类癌症中,很难提供对基于分子结构资料的肿瘤特异物质的确切证据。极少有关于基于新颖分子结构的肿瘤特异分子的实例。在恶性人类神经胶质瘤和其它与表皮生长因子受体分子的放大或变化潜在相关的肿瘤(诸如乳腺癌和其它人类癌症)的情况下,尚无关于具有独特序列的结构变化分子的确切论证。

表皮生长因子受体(EGFR)是原致癌基因 c-erb B 的 170 千道尔顿(kilodalton)膜糖蛋白产物。已知 EGFR 基因的序列(Ullrich 等人,1984)。“Human Epidermal Growth Factor Receptor cDNA Sequence and Aberrant Expression of the Amplified Gene in A431 Epidermoid Carcinoma Cells.” Nature 309:418-425)。EGFR 基因是最初在鸟类红细胞增多症病毒中识别的 erb B 致癌基因的细胞同源性(Downward 等人(1984))。“Close Similarity of Epidermal Growth Factor Receptor and v-erb B Oncogene Protein Sequence.” Nature 307:521-527, Ullrich 等人(1984)。已在各种人类肿瘤中观察到这种致癌基因通过基因放大的活化(Haley 等人(1987A))。“The Epidermal Growth Factor Receptor Gene in: Oncogenes, Genes, and Growth Factors”, Guroff, G 编,第 12 版,第 2 章,第 40-76 页, Wiley, N.Y.), 且尤其为神经胶质源性的那些表皮生长因子受体基因(Libermann 等人, (1985)。Amplification, Enhanced Expression and Possible Rearrangement of EGF Receptor Gene in Primary Human Brain Tumours of Glial Origin, Nature 313:144-147; Wong 等人, (1987)。Increased Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Malignant Gliomas is Invariably Associated

with Gene Amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6899-6903; Yamazaki 等人, (1988)。Amplification of the Structurally and Functionally Altered Epidermal Growth Factor Receptor Gene (c-erbB) in Human Brain Tumors. Molecular and Cellular Biology 8:1816-1820, Maiden 等人, (1988)。Selective Amplification of the Cytoplasmic Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Glioblastoma Multiforme. Cancer Research 4:2711-2714)。

已证实 EGF-r 在多种类型的人类固体肿瘤中过量表达。Mendelsohn Cancer Cells 7:359 (1989), Mendelsohn Cancer Biology 1:339-344 (1990), Modjtahedi and Dean Int'l J. Oncology 4:277-296 (1994)。例如, 已在某些肺癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌、脑癌、膀胱癌、头颈癌、卵巢癌、肾癌和前列腺癌中观察到 EGFR 过量表达。Modjtahedi and Dean Int'l J. Oncology 4:277-296 (1994)。已证实表皮生长因子 (EGF) 和转化生长因子- α (TGF- α) 都结合至 EGF-r, 而且导致细胞增殖和肿瘤生长。

v-erb B 致癌基因和正常 EGFR 基因之间的一个主要区别在于病毒致癌基因是正常受体截断氨基的变型; 它们缺少大部分细胞质外结构域, 但保留了跨膜和酪氨酸激酶结构域 (Fung 等人, (1984))。Activation of the Cellular Oncogene c-erb B by LTR Insertion: Molecular Basis for Induction of Erythroblastosis by Avian Leukosis Virus. Cell 33:357-368; Yamamoto 等人, (1983)。A New Avian Erythroblastosis Virus, AEV-H Carries erbB Gene Responsible for the Induction of Both Erythroblastosis and Sarcoma. Cell 34:225-232, Nilsen 等人, (1985)。c-erbB Activation in ALV-Induced Erythroblastosis: Novel RNA Processing and Promoter Insertion Results in Expression of an Amino-Truncated EGF Receptor. Cell 41:719-726; Gammatt 等人, (1986)。Differences in Sequences Encoding the Carboxy-Terminal Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Correlate with Differences in the Disease Potential of Viral erbB Genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6053-6057)。这导致了不可以结合表皮生长因子 (EGF), 但仍可以磷酸化其它物质的蛋白质 (Gilmore 的, (1985))。Protein Phosphorylation at Tyrosine is Induced by the v-erb B Gene Product in Vivo and In Vitro. Cell 40:609-618; Kris 等人, (1985)。Antibodies Against a Synthetic Peptide as a Probe for the Kinase Activity of the Avian EGF Receptor and v-erbB Protein. Cell 40:619-625), 且导致以下推测: v-erb B 蛋白质为致癌基因性的是因为激酶结构域未经调节且结构上为活性的 (Downward 等人, 1984)。

各种基因变化都可以发生于病毒性 erb B 致癌基因中, 例如, 基因的羧基末端

中发生氨基酸的取代和缺失。然而，可获得的证据表明氨基截断对于致癌作用尤为关键。氨基截断是所有 v-erb B 致癌基因的一个特征，包括由启动子的插入或逆转录病毒转导引起的那些氨基截断 (Nilsen 等人, (1985))。c-erbB Activation in ALV-Induced Erythroblastosis: Novel RNA Processing and Promoter Insertion Results in Expression of an Amino-Truncated EGF Receptor. *Cell* 41:719-726; Gammett 等人, (1986)。Differences in Sequences Encoding the Carboxy-Terminal Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Correlate with Differences in the Disease Potential of Viral erbB Genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6053-6057)。

相反，羧基-末端缺失似乎只与由逆转录病毒转导引起的肿瘤有关，而且似乎决定了宿主范围和肿瘤类型的特异性(Gammett 等人, 1986; Raines 等人, (1985))。c-erbB Activation in Avian Leukosis Virus-Induced Erythroblastosis: Clustered Integration Sites and the Arrangement of Provirus in the c-erbB Alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:2287-2291)。以氨基-截断鸟类 c-erb B 基因或感染性病毒致癌基因-人类 EGF 受体的转染实验表明该缺失单独即足以产生转化蛋白质 (Pelley 等人, (1988))。Proviral-Activated c-erbB is Leukemogenic but not Sarcomagenic: Characterization of a Replication-Competent Retrovirus Containing the Activated c-erbB. *Journal of Virology* 62: 1840-1844; Wells 等人, (1988)。Genetic Determinants of Neoplastic Transformation by the Retroviral Oncogene v-erbB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7597-7601)。

EGFR 基因的放大发生于 40%的恶性人类神经胶质瘤中(Libermann 等人, (1985))。Amplification, Enhanced Expression and Possible Rearrangement of EGF Receptor Gene in Primary Human Brain Tumours of Glial Origin, *Nature* 313:144-147; Wong 等人, (1987)。Increased Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Malignant Gliomas is Invariably Associated with Gene Amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6899-6903), 受体基因的重排在许多具有基因放大的肿瘤中较为明显。结构变化似乎优先影响基因的氨基末端一半(Yamazaki 等人, (1985))。Amplification, Enhanced Expression and Possible Rearrangement of EGF Receptor Gene in Primary Human Brain Tumours of Glial Origin, *Nature* 313:144-147; Maiden 等人, (1988)。Selective Amplification of the Cytoplasmic Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Glioblastoma Multiforme. *Cancer Research* 4:2711-2714), 但重排的性质当时并未在任何肿瘤中准确表征。

已报导在若干人类癌症中的大小变体 EGFR 基因和放大 (Humphrey 等人,

(1988)). Amplification and Expression of the,Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Human Glioma Xenografts. *Cancer Research* 48:2231-2238; Bigner 等人, (1988) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 47:191-205; Wong 等人, (1987). Increased Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Malignant Gliomas is Invariably Associated with Gene Amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6899-6903; 和 Humphrey 等人。表皮生长因子受体基因在人类神经胶质瘤异种移植中的放大和表达, *Cancer Res.* 48(8):2231-8 (1988)。然而, 尚无关于细胞中经改变 EGFR 分子的分子基的测定。1989 年, Drs. Bigner 和 Vogelstein 的著作说明已知为 III 型突变体的 EGF 受体突变体的序列 (也称为 δ -EGFr 或 EGFRvIII)。此著作描述于美国专利第 6,455,498 号、第 6,127,126 号、第 5,981,725 号、第 5,814,317 号、第 5,710,010 号、第 5,401,828 号和第 5,212,290 号中。

EGFR 变体是由基因重排伴随 EGFR 基因放大而引起的。存在八种主要的 EGFr 变体, 已知为: (i) EGFRvI 缺少 EGFR 的大部分细胞外结构域, (ii) EGFRvII 由 EGFR 的细胞外结构域中的 83 aa 框内缺失组成, (iii) EGFRvIII 由 EGFR 的细胞外结构域中的 267 aa 框内缺失组成, (iv) EGFRvIV 含有 EGFR 的细胞质结构域中的缺失, (v) EGFRvV 含有 EGFR 的细胞质结构域中的缺失, (vi) EGFR.TDM/2-7 含有 EGFR 的细胞外结构域中的外显子 2-7 的重复, (vii)EGFR.TDM/18-25 含有 EGFR 的酪氨酸激酶结构域中的外显子 18-26 的重复, 和(viii)EGFR.TDM/18-26 含有 EGFR 的酪氨酸激酶结构域中的外显子 18-26 的重复 (Kuan 等人, EGF 突变体受体 vIII 在治疗癌症中作为分子靶标, *Endocr Relat Cancer.* 8(2):83-96 (2001))。另外, 存在第二种更为罕见的具有第二种在外显子 11 和 14 之间的连接点引入新颖组氨酸残基的缺失的 EGFRvIII 突变体 (EGFRvIII/ Δ 12-13) (Kuan 等人, EGF 突变体受体 vIII 在治疗癌症中作为分子靶标, *Endocr Relat Cancer.* 8(2):83-96 (2001))。

EGFRvIII 是在人类癌症中表皮生长因子 (EGF) 受体最常见发生的变体 (Kuan 等人, EGF 突变体受体 vIII 在治疗癌症中作为分子靶标, *Endocr Relat Cancer.* 8(2):83-96 (2001))。在基因放大的过程中, 在细胞外结构域中发生 267 个氨基酸缺失, 产生肿瘤特异单克隆抗体可指向的新颖连接点。EGF 受体的这种变体以配位体独立的方式有助于肿瘤通过组成型信号发出而发展。已知 EGFrVIII 未表达于任何正常组织上 (Wikstrand, CJ.等人, "Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas malignant gliomas.", *Cancer*

Research 55(14): 3140-3148 (1995); Olapade-Olaopa, EO.等人, “Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. *Br J Cancer*. 82(1): 186-94 (2000)”。然而, EGFRvIII 显示在肿瘤细胞中的显著表达, 例如, 27-76%的乳腺癌活体检查表达 EGFRvIII (Wikstrand, CJ.等人, “Monoclonal antibodies against EGFRVIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas malignant gliomas.”, *Cancer Research* 55(14): 3140-3148 (1995); Ge H.等人, “Evidence of high incidence of EGFRvIII expression and coexpression with EGFR in human invasive breast cancer by laser capture microdissection and immunohistochemical analysis.”, *Int J Cancer*. 98(3):357-61 (2002)), 50~70%神经胶质癌表达 EGFRvIII (Wikstrand, CJ.等人, “Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas malignant gliomas.” *Cancer Research* 55(14): 3140-3148 (1995); Moscatello, G.等人, “Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors.” *Cancer Res*. 55(23):5536-9 (1,995)), 16% NSCL 癌症表达 EGFRvIII (Garcia de Palazzo, IE.等人, Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res*. 53(14):3217-20 (1993)), 75% 卵巢癌表达 EGFRvIII (Moscatello, G.等人, “Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors.”, *Cancer Res*. 55(23):5536-9 (1995)), 和 68%前列腺癌表达 EGFRvIII(Olapade-Olaopa, EO.等人, Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. *Br J Cancer*. 82(1): 186-94 (2000))。

缺失 267 个氨基酸并替换为甘氨酸产生可定靶抗体的独特连接。此外, 鉴于 EGFRvIII 在某些肿瘤中的表达及其在正常组织中的表达缺乏, EGFRvIII 在肿瘤治疗中可作为用于定靶药物的理想靶标。具体而言, EGFRvIII 似乎可作为肿瘤免疫偶联物治疗的理想候选物(例如, 与抗肿瘤剂或毒素偶联的抗体)。另一种治疗过量表达 EGFRvIII 的癌症的方法涉及使用特异性定靶至未分离正常 EGFR 的变体受体的肿瘤特异性核酶。发现核酶在无胸腺裸鼠中显著抑制乳腺癌生长(Luo 等人, *Int. J. Cancer*. 104(6):716-21 (2003))。已描述用于整个 EGFRvIII 蛋白质的通用抗体。

参见国际专利申请案第 WO 01/62931 号和 Kuan 等人, “EGF mutant receptor VIII as a molecular target in cancer therapy.” *Endocr Relat Cancer*. 8(2):83-96 (2001); Kuan

等人, “EGFRvIII as a promising target for antibody-based brain tumor therapy.” *Brain Tumor Pathol.* 17(2):71-78 (2000); Kuan 等人, “Increased binding affinity enhances targeting of glioma xenografts by EGFRvIII-specific scFv.” *International Journal of Cancer.* 88(6):962-969 (2000); Landry 等人, “Antibody recognition of a conformational epitope in a peptide antigen: Fv-peptide complex of an antibody fragment specific for the mutant EGF receptor, EGFRvIII.” *Journal of Molecular Biology.* 308(5):883-893 (2001); Reist 等人, “Astatine-211 labeling of internalizing anti-EGFRvIII monoclonal antibody using N-succinimidyl 5-[211At]astato-3-pyridinecarboxylate.” *Nuclear Medicine and Biology.* 26(4):405-411 (1999); Reist 等人, “In vitro and in vivo behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody: comparison with its murine parent.” *Nuclear Medicine and Biology.* 24(7):639-647 (1997); Wikstrand 等人, “Generation of anti-idiotypic reagents in the EGFRvIII tumor-associated antigen system.” *Cancer Immunology, Immunotherapy.* 50(12):639-652 (2002); Wikstrand 等人, “Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas malignant gliomas.” *Cancer Research.* 55(14):3140-3148 (1995); Wikstrand 等人, “The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target.” *J.Neurovirol.* 4(2):148-158 (1998); Wikstrand 等人, “The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target.” *J.Neurovirol.* 4(2):148-158 (1998); Jungbluth 等人, “A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor.” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(2):639-44 (2003); Mamot 等人, “Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-targeted Immunoliposomes Mediate Specific and Efficient Drug Delivery to EGFR- and EGFRvIII-overexpressing Tumor Cells.” *Cancer Research* 63:3154-3161 (2003)。

然而, 每一种上述抗体在变化和/或恒定区内都具有或含有鼠科序列。

这些鼠科衍生蛋白质的存在可导致抗体的快速清除或可导致抵抗患者体内抗体的免疫反应的产生。另外, 即使在亲和力成熟之后, 这些抗体仍具有 2.2×10^{-8} 至 1.5×10^{-9} 级别的相对低的亲和力。(Kuan 等人, “EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy.”, *Endocr Relat Cancer.* 8(2):83-96 (2001))。

为避免使用鼠科或大鼠衍生抗体，研究者已将人类抗体功能引入啮齿动物以使得啮齿动物可产生完全人类抗体，参见例如 Mendez 等人，“Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice.” *Nat Genet.* 15(2): 146-56 (1997)。这种方法已结合针对野生型 EGFR 的成功抗体的产生而使用，参见例如 Yang X 等人，“Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy.” *Crit Rev Oncol Hemato* 38(1): 17-23 (2001); Yang X-D 等人，Eradication of Established Tumors by a Fully Human Monoclonal Antibody to the Epidermal Growth Factor Receptor without Concomitant Chemotherapy, *Cancer Research* 59(6): 1236-1243 (1999); 和美国专利第 6,235,883 号。

发明内容

在一个实施例中，本发明包含特异性结合至 EGFR_{vIII} 的经分离人类单克隆抗体和包含序列 L E E K K G N Y V V T D H C 的肽 (SEQ ID NO: 56)。在一个实施例中，治疗剂可与抗体偶联。在一个实施例中，使用毒素。在另一个实施例中，本发明包含特异性结合至于包含 L E E K K G N Y V V T D H C 的序列 (SEQ ID NO: 56) 中含有的表位的经分离人类单克隆抗体，其中如由 SPOTs 排列中的丙氨酸扫描所测定，结合所需的残余物选自自由 EEK、KKNYV、LEK、EKNY 和 EEKGN 组成的群组。

另外的实施例包括包含由 VH3-33 基因编码的重链可变区氨基酸序列的经分离人类单克隆抗体。重链可变区氨基酸序列可包括由 JH4b 基因编码的氨基酸序列，或由选自自由 D6-13 和 D3-9 组成的群组的 D 基因编码的氨基酸序列。

其它实施例包括包含由 A23(VK2)基因编码的轻链可变区氨基酸序列的经分离人类单克隆抗体。轻链可变区氨基酸序列可包括由 JK1 基因编码的氨基酸序列。

其它实施例包括结合至 EGFR_{vIII} 的经分离抗体或其片段，而且其包含选自由标识为(SEQ ID) NO: 138、2、4、5、7、9、10、12、13、15、16 和 17 的抗体 13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342 和 333 的重链氨基酸序列组成的群组的重链氨基酸序列。抗体可为单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人类抗体。抗体或片段可与医药学上可接受的载剂或稀释剂缔合，而且可与治疗剂结合。治疗剂可为毒素。治疗剂可为诸如 DM-1、AEFP、AURISTATIN E 或 ZAP 的毒素。所述药剂可经连接剂与抗体缔合。所述毒素可经第二抗体与抗体缔合。另外的实施例包括产生抗体的杂交瘤细胞株和包含编码抗体基因的转型细胞。例如，所述细胞

可为中国地鼠卵巢细胞。

另外的实施例包括一种抑制与 EGFR ν III 的表达相关联的细胞增殖的方法，其包含以有效量的抗体或片段处理表达 EGFR ν III 的细胞。在一个实施例中，抗体包含选自由抗体 13.1.2 (SEQ ID NO: 138)、131 (SEQ ID NO: 2)、170 (SEQ ID NO: 4)、150 (SEQ ID NO: 5)、095 (SEQ ID NO: 7)、250 (SEQ ID NO: 9)、139 (SEQ ID NO: 10)、211 (SEQ ID NO: 12)、124 (SEQ ID NO: 13)、318 (SEQ ID NO: 15)、342 (SEQ ID NO: 16)和 333 (SEQ ID NO: 17)的重链氨基酸序列组成的群组的重链氨基酸序列。该方法在活体内进行，而且在哺乳动物（诸如人类）体内进行，所述哺乳动物经受涉及上皮细胞增殖的癌症，诸如肺癌、结肠癌、胃癌、肾癌、前列腺癌、乳腺癌、胶质母细胞瘤或卵巢癌。

另外的实施例包括杀死靶细胞的方法。这可以通过使靶细胞和与毒素缔合的抗体接触来达到。抗体结合至肽 LEEKKGNV (SEQ ID NO: 133)。在一个实施例中，抗体对于肽具有大于 $1.3 \times 10^{-9} \text{M}$ 的结合亲和力。在一个实施例中，毒素选自 AEFV、MMAE、DM-1 和 ZAP。在一个实施例中，抗体毒素化合物对靶细胞的毒性是对无肽细胞毒性的 10 倍多。在一个实施例中，抗体包含选自由抗体 13.1.2 (SEQ ID NO: 138)、131 (SEQ ID NO: 2)、170 (SEQ ID NO: 4)、150 (SEQ ID NO: 5)、095 (SEQ ID NO: 7)、250 (SEQ ID NO: 9)、139 (SEQ ID NO: 10)、211 (SEQ ID NO: 12)、124 (SEQ ID NO: 13)、318 (SEQ ID NO: 15)、342 (SEQ ID NO: 16)和 333 (SEQ ID NO: 17)的重链氨基酸序列组成的群组的重链氨基酸序列。在另一个实施例中，抗体经肽连接剂或第二抗体与毒素缔合。

本发明另外的实施例包括结合至 EGFR ν III 的经分离抗体，且其包含重链氨基酸序列，其包含以下互补决定区 (CDR)：

(a) CDR1，由选自由标识为 SEQ ID NO: 138、2、4、5、7、9、10、12、13、15、16 和 17 的抗体 13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342 和 333 的 CDR1 区的氨基酸序列组成的群组的序列组成；

(b) CDR2，由选自由标识为 SEQ ID NO: 138、2、4、5、7、9、10、12、13、15、16 和 17 的抗体 13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342 和 333 的 CDR2 区的氨基酸序列组成的群组的序列组成；和

(c) CDR3，由选自由标识为 SEQ ID NO: 138、2、4、5、7、9、10、12、13、15、16 和 17 的抗体 13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342

和 333 的 CDR3 区的氨基酸序列组成的群组的序列组成。

在一个实施例中，抗体为单克隆抗体、嵌合抗体、人类或人源化抗体。在一个实施例中，抗体与医药学上可接受的载剂、稀释剂和/或治疗剂缔合。在一个实施例中，所述治疗剂为毒素。

在一个实施例中，所述毒素为 DM-1 或 Auristatin E。

也包括结合至 EGFRvIII 的经分离抗体或其片段，而且其包含选自由标识为 (SEQ ID) NO: 140、19、20、21、29、23、25、26、28、33、31 和 32 的抗体 13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、123、318、342 和 333 的轻链氨基酸序列组成的群组的轻链氨基酸序列。抗体可为单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人类抗体。其可与医药学上可接受的载剂或稀释剂缔合，或与治疗剂（诸如毒素，例如 DM1 或 AURISTATIN E）结合。

在一个实施例中，涵盖产生抗体的杂交瘤细胞株或转型细胞，该抗体包含选自由标识为 (SEQ ID) NO: 140、19、20、21、29、23、25.26、26、28、33、31 和 32 的抗体 13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、123、318、342 和 333 的轻链氨基酸序列组成的群组的轻链氨基酸序列。另外的实施例包括产生该抗体的杂交瘤细胞株和包含编码抗体基因的转型细胞，诸如中国地鼠卵巢细胞。

另一个实施例包括一种抑制与 EGFRvIII 的表达相关联的细胞增殖的方法，其包含以有效量的上述抗体或片段处理表达 EGFRvIII 的细胞。该方法在活体内进行，而且在哺乳动物（诸如人类）体内进行，所述哺乳动物经受涉及上皮细胞增殖的癌症，诸如肺癌、结肠癌、胃癌、肾癌、前列腺癌、乳腺癌、胶质母细胞瘤或卵巢癌。

另一个实施例包括结合至 EGFRvIII 的经分离抗体，且其包含轻链氨基酸序列，其包含以下互补决定区（CDR）：

(a) CDR1，由选自由标识为 SEQ ID NO: 140、19、20、21、29、23、25、26、28、33、31 和 32 的抗体 13.1.2、131、170、150、123、095、139、250、211、318、342 和 333 的 CDR1 区的氨基酸序列组成的群组的序列组成；

(b) CDR2，由选自由标识为 SEQ ID NO: 140、19、20、21、29、23、25、26、28、33、31 和 32 的抗体 13.1.2、131、170、150、123、095、139、250、211、318、342 和 333 的 CDR1 区的氨基酸序列组成的群组的序列组成；和

(c) CDR3，由选自由标识为 SEQ ID NO: 140、19、20、21、29、23、25、26、28、33、31 和 32 的抗体 13.1.2、131、170、150、123、095、139、250、211、318、

342 和 333 的 CDR1 区的氨基酸序列组成的群组的序列组成。

上段所述的抗体也可包括重链氨基酸序列，其包含以下互补决定区（CDR）：

(a) CDR1，由选自由标识为 SEQ ID NO: 138、2、4、5、7、9、10、12、13、15、16 和 17 的抗体 13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342 和 333 的 CDR1 区的氨基酸序列组成的群组的序列组成；

(b) CDR2，由选自由标识为 SEQ ID NO: 138、2、4、5、7、9、10、12、13、15、16 和 17 的抗体 13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342 和 333 的 CDR2 区的氨基酸序列组成的群组的序列组成；和

(c) CDR3，由选自由标识为 SEQ ID NO: 138、2、4、5、7、9、10、12、13、15、16 和 17 的抗体 13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342 和 333 的 CDR3 区的氨基酸序列组成的群组的序列组成。

另外的实施例包括一种抑制与 EGFRvIII 的表达相关联的细胞增殖的方法，其包含以有效量上述抗体或片段处理表达 EGFRvIII 的细胞。该方法在活体内进行，而且在哺乳动物（诸如人类）体内进行，所述哺乳动物经受涉及上皮细胞增殖的癌症，诸如肺癌、乳腺癌、头颈癌、前列腺癌或胶质母细胞瘤。

另外的实施例包括经分离的多聚核苷酸分子，其包含编码重链氨基酸序列的多聚核苷酸序列或其片段，其选自由标识为 SEQ ID NO: 138、2、4、5、7、9、10、12、13、15、16 和 17 的抗体 13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342 和 333 的重链氨基酸序列组成的群组，或包含编码轻链氨基酸序列的多聚核苷酸序列或其片段，其选自由标识为 SEQ ID NO: 140、19、20、21、29、23、25、26、28、33、31 和 33 的抗体 13.1.2、131、170、150、095、139、250、211、318、342 和 333 的轻链氨基酸序列组成的群组。

另外的实施例包括包含容器，含于其中的组合物和表明所述组合物可用于治疗以 EGFRvIII 的表达为特征的癌症的包装说明书或标签的产品，其中所述组合物包含如上文所述的抗体。所述癌症包括肺癌、乳腺癌、头颈癌、前列腺癌或胶质母细胞瘤。也包括用于检测哺乳动物组织或细胞中的 EGFRvIII 来筛选肺癌、结肠癌、胃癌、肾癌、前列腺癌或卵巢癌的检定试剂盒，其中 EGFRvIII 为由上皮癌症表达的抗原，试剂盒包含结合抗原蛋白质的抗体和用于指示抗体与抗原的反应的构件（如果存在）。所述抗体可为经标记的单克隆抗体，或所述抗体可为未经标记的第一抗体，且用于指示反应的构件包含为抗免疫球蛋白的经标记第二抗体。结合抗原的抗体可

由选自由荧光染料、酶、放射性核素和不透射线材料组成的群组的标记物来标记。结合抗原的抗体也可结合至过量表达的 wtEGFR。该试剂盒可供患者选择临床使用。

另一个实施例包括特异性识别含有新颖 Gly 残基的 EGFRvIII 表位的抗体。

另一个实施例包括 EGFRvIII 的变体。所述变体可具有 pFLAG 插入物,可由 SEQ ID NO: 56 氨基酸组成,且可存在于计算机模拟中。

另一个实施例包括结合至识别序列 EEKKGNYVVT (SEQ ID NO: 57)的抗体或其变体。

另一个实施例包括特异性结合至 EGFRvIII 的抗体变体。所述抗体变体可进一步结合至包含 SEQ ID NO: 57 的肽。抗体变体可具有与肽中的残基 EKNY 或 EEKGN 相互作用的残基。在一个实施例中,抗体变体结合至肽序列比其结合至野生型的 EGFR 蛋白质紧 10 倍多。在一个实施例中,抗体变体特异性结合至 EGFRvIII 和 SEQ ID NO: 56 肽。在一个实施例中,经分离的抗体或变体具有包含深腔的互补决定区,其中所述腔由重链的 CDR2 和 CDR3、轻链的 CDR3 和轻链 CDR1 的一小部分形成。在一个实施例中,经分离的抗体或变体在 5 埃结合腔中具有残基 31、37、95-101、143-147、159、162-166、169-171、211-219、221 和 223。在一个实施例中,经分离的抗体或变体具有包含浅槽的互补决定区,其中所述槽由重链 CDR2 和 CDR3 与轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 形成。在一个实施例中,经分离的抗体或变体在 5 埃结合沟槽中具有残基 31、33、35-39、51、54-56、58-61、94-101、144-148、160、163-166、172 和 211-221。在一个实施例中,经分离的抗体或变体在 5 埃结合沟槽中具有残基 31-33、35、37、55、96-101、148、163、165、170、172、178、217 和 218。在一个实施例中,经分离的抗体或变体具有一成型互补位,以使得当肽 EEKKN (SEQ ID NO 127)的抗体决定基结合至抗体的互补位时,在选自由 E2 和 Y172、K3 和 H31、K4 和 H31、N6 和 D33、N6 和 Y37 及 N6 和 K55 组成的群组的两个残基之间形成至少一个键。在一个实施例中,经分离的抗体或变体具有一成型互补位,以使得当肽 EEKKGNY (SEQ ID NO 131)的抗体决定基结合至抗体的互补位时,在选自由 K4 和 Q95、K4 和 Q95、N6 和 Q98、G5 和 H31、Y7 和 H31 及 Y7 和 W165 组成的群组的两个残基之间形成至少一个键。在一个实施例中,抗体具有一结构或与计算机模拟中测定的结构相互作用。

另一个实施例提供一种用于选择以特定结合特征结合至 EGFRvIII 的变体的方法,所述方法包含使用分子结构以形成互补位,使用分子结构以形成表位,计算二

者之间的相互作用能并将所述能级与 mAb 变体的表位和第二互补位的能级相比较，和基于能级差异选择变体。所述方法可进一步包括使用互补位的第二变体与表位之间的相互作用能来测定第三相互作用能并比较第三相互作用能和第二相互作用能来决定选择哪个变体。在一个实施例中变体形成并进行结合测试。

另一个实施例提供一种选择以特定结合特征结合至 EGFRvIII 的变体的方法，所述方法检验与互补位相互作用的表位的残基，选择重要残基以形成识别序列，使用所述序列以形成 EGFRvIII 变体，并使用所述 EGFRvIII 变体来选择 mAb 变体。

另一个实施例提供一种使抗体变体形成 EGFRvIII 的方法，所述方法包含分析与互补位相互作用的表位的残基，选择表位的较重要残基以形成识别序列，使用所述识别序列以形成 EGFRvIII 变体，并使用所述 EGFRvIII 变体来选择抗体变体。在一个实施例中，在计算机模拟中达成抗体的选择。在一个实施例中，通过产生抵抗 EGFRvIII 变体的抗体来达到经使用 EGFRvIII 变体来选择抗体。

在一个实施例中，其中经分离的抗体变体结合至 EGFRvIII 和 SEQ ID NO: 57 肽，抗体可进一步包含以下点突变：Tyr172Arg、Leu99Glu、Arg101Glu、Leu217Glu、Leu99Asn、Leu99His、L99T、Arg101Asp 或其某些组合。在一个实施例中，抗体为单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人类抗体。

在一个实施例中，抗体或其变体结合至序列 EEKKGNYVVT (SEQ ID NO: 57)，且所述抗体或变体具有次纳摩尔结合能力。

在又一个实施例中，抗体结合至 EGFRvIII 且抗体具有结合至表位的互补位，且表位具有一组与包括 E、K、N 和 Y 的互补位相互作用的残基。在一个实施例中，所述抗体为抗体 131。

在又一个实施例中，抗体结合至 EGFRvIII 且抗体具有结合至具有一组与包含 E、E、K、G 和 N 的互补位相互作用的残基的表位的互补位。在一个实施例中，表位的主要结构为 EEKKGNY (SEQ ID NO: 131)。在一个实施例中，抗体为 13.1.2。

在又一个实施例中，抗体结合至 EGFRvIII 且具有小于 1.3×10^{-9} M、小于 1.0×10^{-9} M 或小于 500 pM 的 K_D 。在一个实施例中，与野生型的 EGFR 肽相比，抗体对于 SEQ ID NO: 56 具有特异性。在一个实施例中，抗体对野生型的 EGFR 肽 (SEQ ID NO: 134) 的非特异性结合低于抗体对 EGFRvIII (SEQ ID NO: 135) 的特异性结合的 10%。在一个实施例中，抗体选自由 131、139 和 13.1.2 组成的群组。在一个实施例中，抗体经内在化。在一个实施例中，至少约 70% 或至少约 80% 的抗体都发生内在化。

在一个实施例中，与对于野生型的 EGFR 蛋白质或其变体(SEQ ID NO: 134)相比，变体人类单克隆抗体优先结合至对于 EGFRvIII 蛋白质实质上独特的表位。

在一个实施例中，变体包含对应于典范类 1 的重链互补决定区 (CDR1)。在一个实施例中，变体包含对应于典范类 3 的重链互补决定区 (CDR2)。

在一个实施例中，变体包含对应于典范类 4 的轻链互补决定区 (CDR1)。

在一个实施例中，变体包含对应于典范类 1 的轻链互补决定区 (CDR2)。在一个实施例中，变体包含对应于典范类 1 的轻链互补决定区 (CDR3)。在一个实施例中，变体包含对应于典范类 1 的第一重链互补决定区 (CDR1)、对应于典范类 3 的第二重链互补决定区 (CDR2)、对应于典范类 4 的第一轻链互补决定区 (CDR1)、对应于典范类 1 的第二轻链互补决定区 (CDR2) 和对应于典范类 1 的第三轻链互补决定区 (CDR3)，其中形成这些互补决定区以使得变体可结合至与对于 EGFR 蛋白质相比，对于 EGFRvIII 蛋白质实质上独特的表位。

附图说明

图 1 为野生型的 EGFR 和 EGFRvIII 之间的显示 267 氨基酸缺失和 G 替换的序列比对。

图 2 为 EGFRvIII PEP3 14-mer 肽的设计图。在图 2A 中，具有氨基酸 LEEKK 的 EGFRvIII 的 N-末端序列。(SEQ ID NO: 58) (1-5)与 EGFR 的 N-末端序列相同，继而为独特甘氨酸残基，继而为与 EGFR 中的残基 273 至 280 相同的氨基酸。图 2B 代表 EGFRvIII (6-272)中缺失的 EGFR 的氨基酸。

图 3A-L 提供本发明抗体的序列。对于每一种所提供的抗体，对于重链和轻链可变区均提供多聚核苷酸和氨基酸序列。因此，对于每一种所列抗体提供四个序列。

图 4 为 13.1.2 抗体重链区与特定种系重链区比较的表格，“-”表示杂交瘤重链区的氨基酸残基与那个特定位置处的种系相同。自种系的偏移由合适的氨基酸残基来表示。

图 5 为 13.1.2 抗体轻链区与特定种系轻链区比较的表格，“-”表示杂交瘤轻链区的氨基酸残基与那个特定位置处的种系相同。自种系的偏移由合适的氨基酸残基来表示。

图 6 为各种杂交瘤衍生抗体重链区与特定种系重链区比较的表格，“-”表示杂交瘤重链区的氨基酸残基与那个特定位置处的种系相同。自种系的偏移由合适的氨基酸残基来表示。

图 7 为各种杂交瘤衍生抗体轻链区与特定种系轻链区比较的表格，“-”表示杂交瘤轻链区的氨基酸残基与那个特定位置处的种系相同。自种系的偏移由合适的氨基酸残基来表示。

图 8 为显示重组 EGFRvIII mAb 与表达 EGFRvIII 的细胞 (NR6 细胞) 的结合的代表图。菱形代表 95, 三角形代表 133, 正方形代表 139, “x”代表 150, 星号代表 170, 圆形代表 221, 直线代表 230, 和长方形代表 250。

图 9A 显示对于人类抗-EGFR 抗体 (ABX-EGF) 至 H80 的染色分析。

图 9B 显示对于抗体 131 至 H80 的 FACS 染色分析。

图 9C 显示对于抗体 139 至 H80 的 FACS 染色分析。

图 9D 显示对于抗体 13.1.2 至 H80 的 FACS 染色分析。

图 9E 显示对于 ABX-EGF 至 H1477 的 FACS 染色分析。

图 9F 显示对于抗体 131 至 H1477 的 FACS 染色分析。

图 9G 显示对于抗体 139 至 H1477 的 FACS 染色分析。

图 9H 显示对于抗体 13.1.2 至 H1477 的 FACS 染色分析。

图 9I 显示对于 ABX-EGF 至 A549 的 FACS 染色分析。

图 9J 显示对于抗体 131 至 A549 的 FACS 染色分析。

图 9K 显示对于抗体 139 至 A549 的 FACS 染色分析。

图 9L 显示对于抗体 13.1.2 至 A549 的 FACS 染色分析。

图 9M 为展示 EGFRvIII mAb 与胶质母细胞瘤细胞的结合的曲线图。

实心三角形代表结合至 H1477 的抗体 131。实心正方形代表结合至 H1477 的抗体 13.1.2。空心三角形代表结合至 H80 的抗体 131。空心正方形代表结合至 H80 的抗体 13.1.2。

图 9N 为展示 EGFRvIII mAb 至人类表皮样癌细胞株 A431 的结合的曲线图。实心正方形代表抗体 13.1.2。实心三角形代表抗体 131。

图 9O 为展示抗体 13.1.2 至 NR6 鼠科成纤维细胞细胞株的结合的曲线图。正方形代表 NR6。三角形代表具有野生型 EGFR 的 NR6。圆形代表具有 EGFRvIII 的 NR6。

图 9P 为展示抗体 131 至鼠科成纤维细胞细胞株的结合的曲线图。正方形代表 NR6。三角形代表具有野生型 EGFR 的 NR6。圆形代表具有 EGFRvIII 的 NR6。

图 10A 显示对于人类抗-EGFR 抗体 (ABX-EGF) 结合至表达 EGFR 细胞 (A431) 的 FACS 染色分析。

图 10B 显示对于抗体 131 至表达 EGFR 细胞 (A431) 的 FACS 染色分析。

图 10C 显示对于抗体 139 至表达 EGFR 细胞 (A431) 的 FACS 染色分析。

图 10D 显示对于抗体 13.1.2 至表达 EGFR 细胞 (A431) 的 FACS 染色分析。

图 11 显示抗体 131 分子表面的结构模型。将六个 CDR 遮蔽为不同的阴影以标记它们的边缘。结合腔位于接近中心处。

图 12 显示抗体 13.1.2 分子表面的结构模型。遮蔽六个 CDR 且由数字加以识别。长槽大概沿垂直中心线分布。

图 13A 是 13.1.2 抗体和肽 EEKKN (SEQ ID NO: 127) 错合物的可能扩展模型。CDR 区遮蔽为阴影以指示边界。

图 13B 显示 13.1.2 抗体和肽 EEKKN (SEQ ID NO: 127) 错合物可能扩展模型中的氢键。CDR 圈和残基的阴影与图 12 中的相同。将肽残基自图顶端的 N-末端至 C-末端编号为 1 至 6。六个氢键由虚线指示。形成氢键的六对氨基酸为: E2...Y172、K3...H31、K4...H31、N6...D33、N6...Y37 和 N6...K55。

图 14 显示对于所选扩展模型之一的表位-抗体结合能与 K_d 的对数之间的关联的曲线图。

图 15 描绘肽-13.1.2 抗体错合物的精确扩展模型。肽以空格实心形式呈现。

图 16 描绘精确扩展模型中的氢键。

图 17 为描绘抗体-抗原结合能相对于相对亲和力的对数的线性拟合的曲线图。

具体实施方式

如上文所述, EGFRvIII 为 EGFR 的缺失突变体, 其中 EGFR 的细胞外结构域中的 267 氨基酸缺失, 且于连接处以甘氨酸进行单一氨基酸替换。这些特征显示于图 1 中野生型 EGFR 与 EGFRvIII 之间的序列比对中。鉴于在缺失的连接处的甘氨酸的氨基酸替换, 理论上可能产生针对存在于 EGFRvIII 中而不存在于野生型的 EGFR 中的新颖表位的抗体。因此, 如图 2 中所示, 设计用于免疫和筛选的肽, 称为 PEP3(Kuan 等人, EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy, *Endocr Relat Cancer*. 8(2):83-96(2001))。这种 14-mer 肽具有对于 EGFRvIII 和野生型的 EGFR 常见的 5 个 n-末端氨基酸, 独特甘氨酸连接位点和野生型的 EGFR (对应于残基 273-280) 与 EGFRvIII (对应于残基 7-14) 之间的保守序列中所含的 8 个氨基酸残基。此外, 胶质母细胞瘤细胞和以基因编码的 EGFRvIII 转染的细胞 (B300.19 细胞) 也可用于免疫和筛选 (在本文有时称为 B300.19/EGFRvIII 转染子)。

为产生抵抗 EGFRvIII 的人类抗体，将转基因 XenoMouse®小鼠以胶质母细胞瘤细胞/EGFRvIII、B300.19/EGFRvIII 细胞和针对在与野生型的 EGFR 相比的 EGFRvIII 中表示的新颖细胞外结构域中的连接区的肽(PEP3)的组合进行免疫。将来自经免疫小鼠中的 B 细胞分离并用于产生胶质母细胞瘤，继而筛选以结合至 EGFRvIII 或使用 XenoMax™/SLAM™技术直接用于筛选以结合至 EGFRvIII (Babcook 等人, A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities, Proc Natl Acad Sci U S A.93(15):7843-8 (1996)和美国专利第 5,627,052 号)。经识别结合至 EGFRvIII 的抗体经一系列检定筛选以确定 EGFRvIII 的特异性识别。经过这个过程来产生、分离并表征结合至 EGFRvIII 且对 EGFRvIII 具有特异性的人类单克隆抗体群体。随后独特表明表位定位，但重叠了特异性。在活体外进一步评估所有抗体以评估其为了将细胞毒素药物传递到细胞而通过细胞进行内在化的能力。表明有效传递药物的抗体与细胞毒素药物直接结合，并检测其杀死活体外和活体内表达 EGFRvIII 的肿瘤细胞的能力。这些研究为用于治疗患者癌症的抗体药物偶联物的下一次产生提供了基础，这些患者的肿瘤隐藏有特异性基因病变。

通过上述过程产生完全人类抗-EGFRvIII 抗体的群体。使用杂交瘤方式，产生对于野生型的 EGFR 具有有限交叉反应性的几种抗体，包括对用于与 PEP3 结合的 ELISA 呈阳性的抗体 13.1、13.2、13.3 和 13.4。除了这些，选择抗体 13.1 (和尤其为它的亚克隆 13.1.2) 以供进一步研究和发展。使用 XenoMax 方式，产生抗体群体，包括抗体 131、139、250 和 095，其对于与 pep3 寡核苷酸的结合具有高度特异性，且与野生型的 EGFR 具有有限的交叉反应性。其中，131 抗体具有最令人感兴趣的特性。在图 4-7 中展示每一种抗体的序列 (SEQ ID NO: 1-33 和 141-144)。对各种抗体的序列和结合能力进行比较并将结果展示于图 4-10 中。如图 9A-9L 和图 10A-10D 中可见，与 ABX-EGF 相比，抗体 131、139 和 13.1.2 都表现出对于 EGFRvIII 表达细胞(H1477)的较佳选择性。某些结果显示于图 9M-9P 中的曲线图中，其表明简单与 EGFRvIII 细胞相比，至少两种抗体 13.1.2 和 131 表现出对于 EGFRvIII 表达细胞的较佳选择性。最后，基于预测的结构模型，形成抗体的变体以获得具有变化结合特征的抗体。

另外，本发明抗体对于结合至相同或类似表位的其它抗体的筛选极为有用。本发明抗体可用于阐明其它抗体的交叉竞争研究中，预期其它抗体对于形成的抗原-

抗体错合物的特征具有相同或经改良的影响。

每一种对于 EGFRvIII 具有极高亲和力 131 抗体和 13.1.2 都通过细胞良好内在化，且当结合至毒素时表现出可高效杀死细胞。令人感兴趣的是，不管是否产生于 XenoMouse 小鼠的不同免疫中，且不管是否使用不同的技术，两种抗体都衍生于极为类似的种系基因。然而，基于表位定位操作，每一种抗体似乎结合至 EGFRvIII 分子上稍微不同的表位，且具有对于结合必要的 EGFRvIII 上稍微不同的残基。这些结果表明使用种系基因对于定靶 EGFRvIII 的抗体疗法的产生尤为重要，且小变化可通过基于这些结构发现进一步设计抗体和其它疗法来改良抗体的结合和影响。

高度需要结合至相同表位，或竞争与 13.1.2 和 131 抗体结合的抗体。如下文更详细讨论，已通过 SPOTs 排列的丙氨酸扫描阐明对于特定抗体结合重要的残基。因此，也高度需要共享重要结合残基的抗体。

定义

除非另外定义，本文所用的科学和技术术语将具有所属领域的一般技术人员通常了解的含义。另外，除非本文另外要求，单数术语包括复数形式且复数术语包括单数形式。一般而言，本文所述的结合细胞和组织培养、分子生物学及蛋白质和寡核苷酸或多聚核苷酸化学及杂交的术语及其技术是此项技术中已熟知且通常使用的那些术语。标准技术用于重组 DNA、寡核苷酸合成及组织培养和转型（例如，电击、脂质转染）。根据生产者的说明或此项技术中通常实现的或如本文所述进行酶反应和纯化技术。通常根据此项技术中熟知的常规方法和如本说明书通篇所引用和讨论的各种通用和更详尽参考文献中所述来进行前述技术和程序。参见，例如 Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)。本文所述的关于分析化学、合成有机化学和药物及医药化学而使用的术语及其试验程序和技术在此项技术中已熟知且通常使用。

标准技术用于化学合成，化学分析，医药制备、调配和传递以及治疗患者。

如本文所用的术语“经分离多聚核苷酸”意思是染色体组、cDNA 或合成源的多聚核苷酸或其某种组合，由于其来源，“经分离多聚核苷酸”（1）与所有或一部分其中“经分离多聚核苷酸”在自然界中发现的多聚核苷酸无关，（2）可操作性地连接至多聚核苷酸，在自然界中并未连接，或（3）在自然界中并未作为较大序列的部分而发生。本文中提到的术语“经分离蛋白质”是指 cDNA、重组 RNA 或合成源的蛋白质

或其某种组合，由于其来源或衍生源，“经分离蛋白质”（1）与自然界中发现的蛋白质无关，（2）不含来自相同源的其它蛋白质，例如，不含鼠科蛋白质，（3）由来自不同物种的细胞来表达，或（4）在自然界中并未发生。

术语“多肽”在本文中用作一般术语，是指多肽序列的天然蛋白质、片段或类似物。因此，天然蛋白质、片段或类似物是多肽类物质。根据本发明的较佳多肽包含人类重链免疫球蛋白分子和人类 κ 轻链免疫球蛋白分子，以及由包含重链免疫球蛋白分子和轻链免疫球蛋白分子（诸如 κ 轻链免疫球蛋白分子或 λ 轻链免疫球蛋白分子）的组合形成的抗体分子，且反之亦然，以及其片段和类似物。

如本文所用的应用于一种物体上的术语“天然发生”是指在自然界中可发现一种物体的这个事实。例如，存在于可自天然源分离的有机体（包括病毒）中，而且未经在实验室中人为或以其它方式有意改质的多肽或多聚核苷酸序列是天然发生的。

如本文所用的术语“可操作性连接”是指所述组分的位置处于可允许它们以其所预期的方式发挥功能的关系中。对照序列“可操作性连接”至编码序列是以在与对照序列相容的条件下可达到表达编码序列的方式加以连接。

本文所用的术语“对照序列”是指对于实现多聚核苷酸序列所连接的编码序列的表达和处理有必要的多聚核苷酸序列。这些对照序列的本质视其宿主有机体而不同，在原核生物中，这些对照序列通常包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列；在真核生物中，这些对照序列通常包括启动子和转录终止序列。术语“对照序列”意味着包括至少其存在对于例如先导序列和融合伙伴序列的表达和处理所必需的所有组分，而且也包括其存在对于例如先导序列和融合伙伴序列有利的其它组分。

本文所提及的术语“多聚核苷酸”意思是长度至少为 10 个基的核苷酸的聚合形式，核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或任一种核苷酸的改质形式。术语包括 DNA 的单链和双链形式。

本文提及的术语“寡核苷酸”包括天然发生的和由天然发生与非天然发生的寡核苷酸连接子连接在一起的改质核苷酸。寡核苷酸是通常包含 200 个基或更少的长度的多聚核苷酸亚组。寡核苷酸优选长度为 10 到 60 个基，且最优长度为 12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 到 40 个基。寡核苷酸通常为单链，例如用于探测；尽管寡核苷酸可为双链，例如用于构造基因突变体。本发明的寡核苷酸可为正义或反义寡核苷酸。

本文提及的术语“天然发生的核苷酸”包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。本文提

及的术语“改质核苷酸”包括含有改质或取代糖基的核苷酸及其类似物。本文提及的术语“寡核苷酸连接子”包括寡核苷酸连接子，诸如，硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺硫代磷酸酯、苯胺磷酸酯、磷酰胺酯及其类似物。参见，例如 LaPlanche 等人，Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec 等人，J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein 等人，Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon 等人，Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon 等人，Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, 第 87-108 页(F. Eckstein 编，Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec 等人，美国专利第 5,151,510 号; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990)。如果需要，寡核苷酸可包括用于检测的标记。如本文所用的术语“变体”为不同于所列举的多肽和多聚核苷酸的多肽、多聚核苷酸或分子，但只是为了不对蛋白质活性造成不利改变。可存在表位的变体。可存在抗体的变体。在优选实施例中，蛋白质变体结合至表位的能力未不利改变。在一个实施例中，蛋白质变体可以野生型 mAb 能力的 10-500% 结合。例如，蛋白质变体可以野生型 mAb 能力的 10%、50%、110%、500% 或大于 500% 结合。在一个实施例中，包括在 10-500% 范围之间的结合能力。结合能力可通过多种方式反映，包括（但不限于）变体对表位的 k_a 、 k_d 或 K_D 。在一优选实施例中，表位是本说明书中所述的表位。

在一个实施例中，变体抗体可通过替换、缺失或添加 5 个或更少氨基酸而不同于野生型的序列。这些变体通常可通过改质所揭示多肽序列之一，并使用例如本文所述的代表性程序评估经改质多肽的结合特性来识别。在另一个实施例中，多肽变体优选展示与经识别多肽至少约 70%、更优至少约 90% 且最优至少约 95% 的同源性。优选地，变体只在保守替换和/或改质上不同。变体蛋白质包括那些与本说明书所述的蛋白质结构在结构上类似和功能相当的蛋白质。在另一个实施例中，如果蛋白质与本说明书中所述蛋白质功能上相当，那么这种蛋白质可以是变体，只要变体的互补位与本说明书中所述的互补位类似。在一个实施例中，任何具有与图 11 中所述互补位类似形状的物质都是变体。在一个实施例中，任何具有与图 12 中所述互补位类似形状的物质都是变体。在一个实施例中，任何具有与图 13A 和 13B 中所述相互作用表面类似形状的物质都是变体。

在一个实施例中，如果核酸序列在严格条件下可选择性地与野生型的序列杂交，那么抗体为变体。在一个实施例中，合适的适度严格条件包括在 5xSSC 溶液中预洗，0.5% SDS、1.0 mM EDTA (pH 8.0); 在 50°C-65°C 下杂交，5xSSC，隔夜或如果为种

间同源物,则在 45°C 下, 0.5xSSC; 继而在 65°C 下以每次含有 0.1% SDS 的 2x、0.5x 和 0.2xSSC 洗涤两次, 历时 20 分钟。这些杂交 DNA 序列也属于本发明的范畴中, 由于编码的简并性, 如核苷酸序列编码的抗体多肽也由杂交 DNA 序列所编码。本文提及的术语“选择性杂交”意思是可检测地且特异性地结合。根据本发明的多聚核苷酸、寡核苷酸及其片段在将可侦测结合至非特异性核酸最小化为合适量的杂交和洗涤条件下选择性与核酸杂交。高度严格条件可用于达到如此项技术中已知且于本文中讨论的选择性杂交条件。一般而言, 本发明的多聚核苷酸、寡核苷酸和片段与令人感兴趣的核酸序列之间的核酸序列同源性至少为 80%, 且更一般的为优选至少 85%、90%、95%、99% 和 100% 的增加了的同源性。如果在两种氨基酸序列之间存在部分或完全同一性, 那么这两种氨基酸序列即为同源。例如, 85% 同源性意思是当两种序列进行最大匹配比对时, 85% 的氨基酸一致。在最大化匹配中允许存在间隙(两种序列的任一种相匹配); 优选为 5 或更少的间隙长度, 2 或更少更优。或者或优选地, 如本文所用的这个术语, 如果使用含有突变数据矩阵和 6 或更多间隙代价的 ALIGN 程序, 两种蛋白质序列(或自长度为至少 30 个氨基酸的蛋白质中衍生的多肽序列)具有多于 5 的比对分值, 那么它们同源。参见 Dayhoff, M.O., in Atlas of Protein Sequence and Structure, 第 101-110 页(第 5 卷, National Biomedical Research Foundation (1972)) 和此卷的第 2 期增刊, 第 1-10 页。如果两种序列或其部分的氨基酸当使用 ALIGN 程序最佳比对时大于或等于 50% 一致, 那么这两种序列或其部分更优同源。本文所用的术语“对应于”意思是多聚核苷酸序列与参考多聚核苷酸序列同源(即, 一致, 但非严格演化相关), 或多聚核苷酸序列与参考多聚核苷酸序列一致。对比而言, 本文所用术语“互补”意思是互补序列与参考多聚核苷酸序列的全部或部分同源。例如, 核苷酸序列“TATAC”对应于参考序列“TATAC”且与参考序列“GTATA”互补。

以下术语用于描述两种或两种以上多聚核苷酸或氨基酸序列之间的序列关系: “参考序列”、“比较窗口”、“序列一致性”、“序列一致性百分率”和“实质上一致”。“参考序列”为已确定的序列, 用作序列比较的基准; 参考序列可为更大序列的亚组, 例如, 如序列列表中给定的全长 cDNA 或基因序列的片段, 或可包含完整 cDNA 或基因序列。一般而言, 参考序列长度至少为 18 个核苷酸或 6 个氨基酸, 长度通常为至少 24 个核苷酸或 8 个氨基酸, 且长度通常为至少 48 个核苷酸或 16 个氨基酸。由于两个多聚核苷酸或氨基酸序列可能每一个(1)包含在两个分子之间类似的序列(即,

完整多聚核苷酸或氨基酸序列的一部分), 和(2)可能进一步包含在两个多聚核苷酸或氨基酸序列之间不同的序列, 一般通过经“比较窗口”比较两个分子的序列以识别和比较序列类似的局部区域来进行两个(或更多)分子之间的序列比较。如本文所用的“比较窗口”是指至少 18 个邻接核苷酸位置或 6 个氨基酸的概念片段, 其中多聚核苷酸序列或氨基酸序列可与至少 18 个邻接核苷酸或 6 个氨基酸序列的参考序列相比较, 且其中多聚核苷酸序列在比较窗口中的位置与参考序列(其不包含添加或缺失)相比, 可包含 20%或更少的添加、缺失、替换及其类似物(即, 间隙), 以供两个序列的最优序列比对。可通过 Smith 和 Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981)的局部同源性算法, 通过 Needleman 和 Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)的同源性比对算法, 通过用于 Pearson 和 Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85:2444 (1988)的类似方法的研究, 通过这些算法的计算机执行过程(GAP, BESTFIT, FASTA 和 Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0 中的 TFASTA, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks 或 Mac Vector 软件封装), 或通过观测来进行用于比对比较窗口的序列的最优序列比对, 且选择由各种方法产生的最佳序列比对(即, 导致同源性于比较窗口上的最高百分比)。

术语“序列一致性”意思是两个多聚核苷酸或氨基酸序列于比较窗口上一致(即, 在核苷酸×核苷酸或残基×残基的基础上)。术语“序列一致性百分比”通过比较两个在比较窗口上最优比对的序列, 测定于两个序列中发生一致核酸基(例如, A、T、C、G、U 或 I)或残基以产生匹配位置编号的所在位置的编号, 将匹配位置的编号除以比较窗口中的位置总数(即, 窗口大小), 且将所得结果乘以 100, 以产生序列一致性百分比。如本文所用的术语“实质上一致”表示多聚核苷酸或氨基酸序列的特征, 其中与至少 18 个核苷酸(6 个氨基酸)位置的比较窗口上, 经常于至少 24-48 个核苷酸(8-16 个氨基酸)位置的窗口上的参考序列相比, 多聚核苷酸或氨基酸包含至少 85%序列一致, 优选至少 90%至 95%序列一致, 更通常至少 99%序列一致的序列, 其中通过将参考序列与可能包括比较窗口上总计 20%或更少参考序列的缺失或添加的序列相比较来计算序列一致性百分比。参考序列可为更大序列的亚组。与野生型的蛋白质或核酸实质上一致的氨基酸或核酸为野生型的蛋白质或核酸的变体实例。

如本文所用的 20 种常规氨基酸及其缩写遵循常规用法。参见 *Immunology-A Synthesis* (第 2 版, E.S. Golub and D.R. Gren 编, Sinauer Associates, Sunderland, Mass.

(1991))。20种常规氨基酸(例如, D-氨基酸), 非天然氨基酸(诸如 α -氨基酸、 α -双取代氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸)及其它非常规氨基酸的立体异构体也可以作为用于本发明多肽的合适组分。非常规氨基酸的实例包括: 4-羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、 ϵ -N,N,N-三甲基赖氨酸、 ϵ -N-乙酰基赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰基丝氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、 σ -N-甲基精氨酸及其它类似氨基酸和亚氨基酸(例如 4-羟基脯氨酸)。在本文所用的多肽符号中, 根据标准用途和常规, 左手方向为氨基末端方向, 且右手方向为羧基末端方向。

类似地, 除非另外指明, 单链多聚核苷酸序列的左手端为 5'端, 双链多聚核苷酸序列的左手端称为 5'方向。初生 RNA 转录的 5'至 3'添加的方向称为转录方向, 具有与 RNA 相同的序列且为 RNA 转录的 5'至 5'端的 DNA 链上的序列区域称为“上游序列”, 具有与 RNA 相同的序列且为 RNA 转录的 3'至 3'端的 DNA 链上的序列区域称为“下游序列”。

如应用于多肽的术语“实质上一致”意思是当两个肽序列诸如通过使用默认间隙重量的 GAP 或 BESTFIT 程序最优比对时, 两个肽序列共享至少 80%的序列一致性, 优选为至少 90%的序列一致性, 更优为至少 95%的序列一致性, 且最佳为至少 99%的序列一致性。优选地, 非一致的残基位置通过保守氨基酸替换而不同。保守氨基酸替换是指具有类似侧链的残基的互换性。例如, 具有脂肪族侧链的氨基酸群组为甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸; 具有脂肪族-羟基侧链的氨基酸群组为丝氨酸和苏氨酸; 具有含氮化物侧链的氨基酸群组为天冬酰胺和谷酰胺; 具有芳香族侧链的氨基酸群组为苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸; 具有碱性侧链的氨基酸群组为赖氨酸、精氨酸和组氨酸; 且具有含硫侧链的氨基酸群组为半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸替换基团为: 缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷酰胺。实质上一致的多肽可为变体。

变体蛋白质也包括具有微小变化的蛋白质。如本文所讨论, 考虑到了本发明所包含的抗体或免疫球蛋白分子的氨基酸序列中的微小变化, 只要氨基酸序列中的变化保持在至少 75%, 更优至少 80%、90%、95%, 且最优为 99%。尤其而言, 也考虑到了保守氨基酸的置换。

保守置换为那些发生于与其侧链相关的氨基酸家族中的置换。经基因编码的氨基酸通常分为以下家族: (1) 酸性=天冬氨酸、谷氨酸; (2) 碱性=赖氨酸、精氨酸、

组氨酸；(3) 非极性=丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸和(4) 不带电极性=甘氨酸、天冬酰胺、谷酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。更优的家族为：丝氨酸和苏氨酸为脂肪族-羟基家族；天冬酰胺和谷酰胺为含氮化物家族；丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸为脂肪族家族，且苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸为脂肪族家族。例如，可合理预期以异亮氨酸或缬氨酸经分离置换亮氨酸，以谷氨酸经分离置换天冬氨酸，以丝氨酸经分离置换苏氨酸或以结构相关的氨基酸经分离置换氨基酸的类似置换将不会对所得分子的结合或特性具有重要影响，尤其如果置换不涉及框架位点内部的氨基酸时。氨基酸变化是否导致功能肽可易于通过检定多肽衍生物的特异性活性来测定。检定于下文中加以详述。所属领域的一般技术人员可易于制备抗体或免疫球蛋白分子的片段或类似物。优选片段或类似物的氨基和羧基-末端发生于功能结构域的边缘附近。可通过将核苷酸和/或氨基酸序列数据与公开或专有序列数据库相比较来识别结构和功能结构域。优选地，使用计算机比较方法来识别发生于其它已知结构和/或功能地蛋白质中的序列基元或预测蛋白质构型结构域。已知用于识别折叠为已知的三维结构的蛋白质序列的方法。Bowie 等人，*Science* 253:164 (1991)。因此，前述实例表明，所属领域的技术人员可识别可用于根据本发明的抗体界定结构和功能结构域的序列基元和结构构型。

优选氨基酸替换为以下替换：(1) 减少对蛋白水解作用的敏感性，(2) 减少对氧化作用的敏感性，(3) 改变供形成蛋白质错合物的结合亲和力，(4) 改变结合亲和力且(5) 授予或改质这些类似物的其它物理化学或功能特性。类似物可包括除天然发生的肽序列之外的序列的各种突变蛋白质。例如，可在天然发生的序列（优选为形成分子间接触的结构域外部的多肽部分）中进行单一或多重氨基酸替换（优选为保守氨基酸替换）。保守氨基酸替换不应实质上改变亲本序列的结构特征（例如，置换氨基酸不应破坏发生于亲本序列中的螺旋体，或干扰表征亲本序列的二级结构的其它类型）。在 *Proteins, Structures and Molecular Principles*(Creighton 编，W. H. Freeman and Company, New York (1984))、*Introduction to Protein Structure* (C. Branden 和 J. Tooze 编，Garland Publishing, New York, N.Y. (1991))和 Thornton 等人，*Nature* 354:105 (1991)中描述此项技术识别的多肽二级和三级结构的实例。

如本文所用的术语“多肽片段”是指具有氨基-末端和/或羧基-末端缺失的多肽，但其中残留的氨基酸序列与自（例如）全长 cDNA 序列引出的天然发生的序列中的

对应位置一致。片段一般为至少 5、6、8 或 10 个氨基酸长，优选为 14 个氨基酸长，更优为至少 20 个氨基酸长，通常为至少 50 个氨基酸长，且甚至更优为至少 70 个氨基酸长。如本文所用的术语“类似物”是指包含与引出的氨基酸序列的一部分实质上一致的至少 25 个氨基酸片段的多肽。类似物一般为至少 20 个氨基酸长，优选为至少 50 个氨基酸长且可经常长至全长的天然发生多肽。片段和类似物都是变体形式。

肽类似物通常以类似于模板肽的特性而作为非肽药物用于医药工业中。这些类型的非肽化合物称为“肽的模拟物”和“肽模拟物”，Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber and Freidinger TINS, 第 392 页(1985)和 Evans 等人, J. Med. Chem. 30:1229 (1987)。通常借助于计算机分子模型来研发这些化合物。结构类似于治疗用肽的肽模拟物可用于产生相当的治疗或预防效果。一般而言，肽模拟物在结构上与样式多肽类似（即，具有生物化学特性或药理学活性的多肽），诸如人类抗体，但其中一个或一个以上肽连接子通过此项技术中熟知的方法视情况由选自 $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ （顺式和反式）、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 组成的群组的连接子所置换。以相同类型的 D-氨基酸系统替换一个或一个以上统一序列的氨基酸（例如，以 D-赖氨酸代替 L-赖氨酸）可用于产生更稳定的肽。此外，可由此项技术中已知的方法产生包含统一序列或实质上一致的统一序列变化的限定肽（Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)）；例如，通过添加可形成环化肽的分子内双硫桥的内部半胱氨酸残基。肽的模拟物和肽模拟物都是变体形式。

“抗体”或“抗体肽”是指完整抗体或其与供特异性结合的完整抗体竞争的结合片段。通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶分解或化学分解来产生结合片段。结合片段包括 Fab、Fab'、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 、Fv 和单链抗体。除“双特异性”或“双功能”抗体之外的抗体应理解为其每一个结合位点一致。当过量抗体将结合至反受体的受体量减少至少约 20%、40%、60% 或 80%，且更通常大于约 85%（如由活体外竞争性结合检定所测量）时，抗体实质上抑制受体粘合至反受体。

术语“表位”包括任何可特异性结合至免疫球蛋白或 T-细胞受体或否则与分子相互作用的蛋白质决定簇。表位簇通常由诸如氨基酸或碳水化合物或糖侧链分子的化学活性表面群组组成，且通常具有特异性三维结构特征以及特异性电荷特征。表位可为“线性”或“构型”。在线性表位中，蛋白质与相互作用的分子（诸如抗体）之间的所有相互作用点沿蛋白质的第一氨基酸序列线性发生。在构型表位，相互作用点

于彼此分离的蛋白质上的氨基酸上交叉发生。据说当解离常数 $\leq 1 \mu\text{M}$ ，优选 $\leq 100 \text{ nM}$ 且更优 $\leq 10 \text{ nM}$ ，且甚至更优 $\leq 1 \text{ nM}$ 时，抗体特异性结合抗原。一旦确定抗原上需要的表位，就可能例如使用本发明所述技术产生对于那个表位的抗体。或者，在发现过程中，抗体的产生和特征可阐明所需表位的信息。基于这些信息，随后可能竞争性地筛选用于结合至相同表位的抗体。一种达到此目的的方式是进行寻找彼此竞争性结合的抗体（例如，竞争结合至抗原的抗体）的交叉竞争研究。一种基于其交叉竞争的用于“结合”抗体的高产量处理描述于国际专利申请案第 WO 03/48731 号。如由所属领域的技术人员所了解的，抗体可特异性结合至的任何特定物质都可以是表位。表位可包含抗体结合至的那些残基。在一个实施例中，表位为 EGFRvIII 表位。在一更优实施例中，表位为本说明书实例 4 中所述的表位。在一个实施例中，表位为实例 14 中所述的表位。在一个实施例中，表位包含序列 LEEKKGNVVT (SEQ ID NO: 59)。在一个实施例中，表位包含序列 EEKKGNYVVT (SEQ ID NO: 57)。在一个实施例中，表位包含序列 EKNY (SEQ ID NO: 60)。在一个实施例中，表位包含序列 EEKGN (SEQ ID NO: 61)。所属领域的技术人员将了解到这些实际上不必在单肽上以此顺序组合，而这些是形成与互补位相互作用的表位的残基。如所属领域的技术人员所了解的，由产生分子形状的残基或侧链占据的空间有助于测定表位为何。同样，与表位相关的任何官能基、范德华相互作用、侧链的移动度等都可测定表位实际上为何。因此，表位也可以包括能量互动。

术语“互补位”意味着描述测定对于表位的结合的结合区的通用结构。这个结构影响结合区是否结合至表位及其结合的方式。互补位可指负责抗体或其片段结合至表位簇的抗体的抗原位点。互补位也指抗体的独特位，和结合至表位的互补决定区 (CDR)。在一个实施例中，互补位是图 11 中的 L1 10、L2 30、L3 50、H1 20、H2 40 和 H3 60 的抗体区。在一个实施例中，互补位是包含实例 16 中用于 L1、L2、L3、H1、H2 和 H3 的 CDR 序列的抗体区。在一个实施例中，互补位是图 12 中的 L1,110、L2,130、L3,150、H1 120、H2 140 和 H3 160 的抗体区。在一个实施例中，互补位是包含实例 18 中用于 L1、L2、L3、H1、H2 和 H3 的 CDR 序列的抗体区。在一个实施例中，互补位包含实例 18 中所列的序列。在一个实施例中，互补位包含与表位相互作用的残基，如图 13A 和图 13B 中所示。实体黑色结构为肽结构。在一个实施例中，互补位包含 13.1.2 mAb 的残基 Tyr172Arg。在一个实施例中，13.1.2 mAb 的互补位包含选自以下各残基组成的群组的至少一个残基：Tyr 172Arg、Arg101Glu、

Leu99Asn、Leu99His、Arg101Asp、Leu217Gln、Leu99Thr、Leu217Asn、Arg101Gln 和 Asn35Gly。如所属领域的技术人员所将了解的，任何抗体的互补位或其变体都可由本申请案所陈述的方式来测定。如果残基预测可贡献 10% 的结合能，就认为残基“重要”。在一个实施例中，如果残基预测可贡献 2% 的结合能，就认为残基“重要”。在一个实施例中，如果残基预测可贡献 50% 的结合能，就认为残基“重要”。在一个实施例中，如果残基预测与表位表面或互补位表面相互作用，就认为残基“重要”。在一个实施例中，如果改变残基导致结合损失，就认为残基“重要”。

术语“特异性”或“优先”结合至，或类似措辞并不意味着表示抗体只可结合至那个表位。相反，意思是抗体或其变体可结合至那个表位，其程度比抗体结合至抗体所暴露的至少一种其它物质的程度更高。在一个实施例中，特异性结合抗体将以比其至 EGFR 蛋白质更大的亲和力结合至 EGFRvIII 蛋白质（更紧，或较低的 K_D ）。例如，特异性结合抗体的结合将更紧至少增加 1%、1-2%、2-5%、5-10%、10-20%、20-30%、30-50%、50-70%、70-90%、90-120%、120-150%、150-200%、200-300%、300-500%、500-1000% 或更多。

氨基酸，编号，氨基酸的缩写形式，例如 Leu217Gln 表示编号氨基酸从第一种氨基酸到第二种氨基酸的突变。因此，Tyr172Arg 意思是当野生型的蛋白质具有 172 位置的酪氨酸时，突变具有 172 位置的精氨酸。

本文所用的术语“药剂”表示化合物、化合物的混合物、生物高分子或从生物物质形成的萃取物。

本文所用的“哺乳动物”指认为是哺乳动物的任何动物。哺乳动物优选人类。

含有酶（木瓜蛋白酶）的抗体的消化导致两种一致的抗原结合片段，也称为“Fab”片段和“Fc”片段，其不具有抗原结合活性，但具有结晶能力。含有酶（胃蛋白酶）的抗体的消化导致 $F(ab')_2$ 片段，其中抗体分子的两臂保持连接，且包含两个抗原结合位点。 $F(ab')_2$ 片段具有交联抗原的能力。

本文所用的“Fv”指保持抗原识别和抗原结合位点的抗体的最小片段。这些片段也可认为是抗体的变体。

本文所用的“Fab”指包含轻链的恒定结构域和重链的 CH1 结构域的抗体片段。

术语“mAb”指单克隆抗体。

对于 XenoMax 方法产生的抗体序列的描述编码如下：“AB”-指抗体，“EGFRvIII”-指抗体的结合特异性，“X”指衍生自小鼠的 XenoMouse，“G1”-指 IgG1

同位型或“G2”-指 IgG2 同位型, 最后三个数字指抗体自其衍生的单细胞编号, 例如: AB-EGFRvIII-XG1-095 为具有 IgG1 同位型 XenoMouse 小鼠对 EGFRvIII 的结合特异性的抗体, 且细胞编号为 95。

术语“SC”指单细胞, 且特定 XenoMax 方法衍生的抗体可称为 SC, 其后紧跟三个数字, 或只有三个数字, 在本文中指抗体衍生的单细胞编号。

对于杂交瘤衍生的抗体序列的描述编码如下: “AB”-指抗体, “EGFRvIII”-指抗体的结合特异性, “X”指衍生自小鼠的 XenoMouse, “G1”-指 IgG1 同位型或“G2”-指 IgG2 同位型, “K”指 κ , “L”指 λ 。最后三个数字指抗体衍生的纯系, 例如: AB-EGFRvIII-XG1K-13.1.2。

本文所用的“标记”或“经标记”指对多肽添加的可检测部分, 例如, 放射性同位素标记、荧光标记、酶标记、化学发光标记或生物素基。放射性同位素或放射性核素可包括 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I , 荧光标记可包括罗丹明 (rhodamine)、镧系磷或 FITC, 且酶标记可包括辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶。

如本文所用的术语“医药剂或药物”指当适当施与患者时可产生理想治疗效果的化合物或组合物。如由 The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S.编, McGraw-Hill, San Francisco (1985))所例示, 根据此项技术中的常规用法在本文中使用的其它化学术语。

如本文所用的“实质上纯”意思是靶物质为主要存在的物质 (即, 以摩尔量计, 组合物中比任何其它个别物质都大量存在), 且优选地, 实质上经纯化的部分为其中靶物质占存在的所有高分子物质至少约 50% (以摩尔量计) 的组合物。一般而言, 实质上纯的组合物将占组合物中存在的所有高分子物质的多于约 80%, 更优多于约 85%、90%、95%、99% 和 99.9%。最优地, 将靶物质纯化至基本上为均质 (通过常规检测方法检测不到组合物中的污染物质), 其中组合物基本上由单高分子物质组成。

术语“患者”包括人类和兽医受检者。

术语“SLAM® Technology”指“Selected Lymphocyte Antibody Method”(Babcock 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, i93:7843-7848 (1996)和 Schrader, 美国专利第 5,627,052 号)。

术语“XenoMax™”指 SLAM Technology 与 XenoMouse®小鼠的使用 (如下文所

述)。

抗体结构

已知基本抗体结构单位包含四聚物。每一四聚物由两对一致的多肽链组成，每一对具有一个“轻链”（约 25 kDa）和一个“重链”（约 50-70 kDa）。每一个链的氨基-末端部分包括主要负责抗原识别的约 100 至 110 或更多个氨基酸的可变区。每一个链的羧基-末端部分界定主要负责效应子功能的恒定区。人类轻链分类为 κ 和 λ 轻链。重链分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，且将抗体的同位型分别界定为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链种可变区和恒定区通过约 12 个或更多个氨基酸的“J”区来连接，其中重链也包括约 10 个或更多个氨基酸的“D”区。一般参见，Fundamental Immunology 第 7 章（Paul, W.编，第 2 版，Raven Press, N.Y. (1989)）。每一轻/重链对的可变区形成抗体结合位点。

因此，完整抗体具有两个结合位点。除了双功能或双特异性抗体之外，两个结合位点相同。

这些链都展示由三个高变区连接的相对保守的框架区（FR）相同的通用结构，也称为互补决定区或 CDR。每一对两个链的 CDR 通过框架区比对，使得可结合至特异性表位。从 N-末端到 C-末端，轻链和重链都包含 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 结构域。每一结构域的氨基酸分配是根据 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 和 1991))或 Chothia & Lesk J. Mol. Biol 196:901-917 (1987); Chothia 等人，Nature 342:878-883 (1989)中的定义。

双特异性或双功能抗体是具有两个不同重链/轻链对和两个不同结合位点的人造杂交抗体。双特异性抗体可通过多种包括杂交瘤的融合和 Fab'片段的连接的方法来产生。参见例如 Songsivilai & Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny 等人，J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)。双特异性抗体的产生与常规抗体的产生相比可为相对劳动密集型的工艺，而且双特异性抗体的产量和纯度通常较低。双特异性抗体不以具有单结合位点片段的形式存在（例如，Fab、Fab'和 Fv）。除了抗体的通用结构方面之外，互补位和表位之间的更特异相互作用可通过结构方式来检验。在一个实施例中，CDR 结构形成互补位，抗体经其可结合至表位。这种互补位的结构可通过多种方式来测定。可使用传统的结构检验方法，诸如 NMR 或 x-射线晶体学。这些方法可检验单独互补位，或当其结合至表位时的结构。或者，分子

模型可在计算机模拟中产生。结构可借助于市售的封装，诸如 Accelrys (San Diego, CA)的 InsightII 模型封装，通过同源模型产生。简而言之，可利用检验抗体序列来寻求已知结构蛋白质的数据库，诸如，蛋白质结构数据库 (Protein Data Bank)。在识别具有已知结构的同源蛋白质之后，这些同源蛋白质可用作模型模板。每一种可能模板可经比对，由此产生这些模板中基于结构的序列比对。随后可将具有未知结构的抗体序列与这些模板比对以产生具有未知结构抗体的分子模型。如所属领域的技术人员将了解的，存在多种在计算机模拟中产生所述结构的替代方法，可使用其中任何一种。例如，可使用类似于 Hardman 等人，颁布的采用 QUANTA (Polygen Corp., Waltham, Mass.)和 CHARM (Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S.和 Karplus, M., 1983, J. Comp. Chem., 4:187)的美国专利第 U.S. Pat. No. 5,958,708 号中所述工艺的工艺。

不但互补位的形状对于测定可能互补位是否结合至表位及其良好程度很重要，而且表位和互补位之间的相互作用本身是设计变体抗体的大量信息来源。如所属领域的技术人员将了解的，存在多种研究这种相互作用的方式。一种方式是使用可能如上文所述产生的结构模型，且随后使用诸如 InsightII (Accelrys, San Diego, CA)的程序，其具有一个可对互补位和其表位之间的构型和定位空间进行 Monte Carlo 研究的扩展模块。结果是可评估表位和互补位相互作用的地点和方式。在一个实施例中，只有表位的片段或变体用于协助测定相关的相互作用。在一个实施例中，整个表位用于互补位和表位之间相互作用的建模。如所属领域的技术人员将了解的，这两种不同方法具有不同的优点和不足。例如，仅使用表位片段使得可对每一侧链的可能变体进行更为详尽的检验，而无需耗费大量时间。另一方面，通过仅使用表位片段，或仅使用表位代替整个蛋白质，表位片的特征与整个表位的特征可能不同，因此可能增加在计算建模过程中误导的风险。在一个实施例中，以有限程度使用两种方法以交叉检查结果。在一优选实施例中，如果使用表位变体，可最优化以便表位变体包含表位的最重要残基。最重要残基的一致性可通过多种方式测定，例如如本发明实例 4 和 14 中所述。

通过使用这些产生的结构，可测定哪些残基在表位和互补位之间的相互作用中最重要。因此，在一个实施例中，可易于选择改变哪些残基来改变抗体的结合特征。例如，从扩展模型显而易见，表位中某些残基的侧链可在空间上阻止表位的结合，由此将这些残基改变为具有较小侧链一致的残基。

这可以多种方式来测定。例如，只需观察两个模型来评估基于官能基和邻近基团的相互作用。或者，如上文所述，可进行表位和互补位的重复组对，以获得更为有利的能量相互作用。也可测定多种抗体变体的这些相互作用来测定其中抗体可结合至表位的替代方式。也可将各种模型组合来测定如何改变抗体结构来获得具有所需特定特征的抗体。

上述测定的模型可通过各种技术来测试。例如，相互作用能可由上文讨论的程序来测定以决定需进一步检验哪种变体。又，使用库仑和范德华相互作用来测定表位和变体互补位的相互作用能。也使用针对突变的位点来观察抗体结构中的预定变化实际上是否可导致结合特征的所需变化。或者，可改变表位来证实模型正确或用于测定可能在互补位和表位之间发生的一般结合主题。

上述用于建模结构的方法可用于测定蛋白质结构中的何种变化将导致抗体的特定所需特征。这些方法可用于测定蛋白质结构中的何种变化不会导致抗体的所需特征。

如所属领域的技术人员将了解的，尽管这些模型将为形成本发明的抗体及其变体提供必要的向导，但仍需要进行计算机模拟模型中的常规测试，可能通过活体外研究。此外，如所属领域的技术人员将了解的，任何改质也会对抗体活性具有另外的副效应。例如，尽管预期导致更大结合的改变可引起更大的结合，也可引起其它会减少或改变抗体活性的结构变化。对于是否为这种情况的测定在所属领域中很常见，而且可通过多种方式进行测定。例如，如实例 21 中，活性可通过 ELISA 测试来测试。或者，可以通过使用表面等离子体共振装置来测试样品。

抗体结合和供优良结合的变体抗体

在一个实施例中，上述模型用于增加抗体对其表位的结合能力。抗体可更易于结合至表位，且因此具有较高的缔合常数 (k_a)。或者，抗体可较慢自表位离解，且因此具有较低的离解常数 (K_D)，或表位-互补位的 K_D 值较小，因此使得表位和互补位之间的结合程度更高。

在某些实施例中，设计变体抗体以相反特征结合。即，抗体不紧密结合或可能不快速结合。

在其它实施例中，变体抗体的 K_D 与野生型的抗体不同，但变体抗体对于特定表位更具特异性。这意味着经设计抗体的互补位具有较低结合至其它表位的风险。抗体可具有已改变的其它特征。例如，变体对非特异性抗体结合更具免疫性，或即

使当抗体以高浓度存在时，在溶液中仍保持溶剂化。这种变体可存在于所讨论的抗体中。例如，尽管下文检验的某些变体抗体的较高浓度导致了 Biacore 实验中较慢的结合组分（例如，13.1.2 mAb），但某些变体即使在相同浓度下仍不展示所述较慢组分，例如 L217N-2.1。可形成由上文测定的模型预测的变体，且随后经测试来测定其实际上是否以所需特征结合。可选择与表位具有较大总相互作用能的突变体以供进一步测试。相互作用能可以多种方式测定，其中之一如上文所述。

这些变体可以多种方式测试。示范性的选择包括，而且不限于 KinExA（例如，Lackie 颁布的专利第 5,372,783 号，1994 年 12 月 13 日）(Sapidyne Instruments Inc., ID, Boise)、表面等离子体共振 (SPR) (e.g., BIACORE™ Biacore, Inc., Piscataway, N.J.)、停流荧光、共振镜和荧光偏振。许多这些选择不但可以记录数据，而且可以提供用于将数据拟合为各种理论曲线并由此测定 k_a 、 k_d 和 K_D 以及其它特性的现成构件。重要的是，应注意到这些曲线拟合为结果数据并不排除存在一些偏差的可能性。因此，相关的缔合、离解和平衡常数不但可以通过这些曲线拟合机理来观察，也可以根据所属领域的技术人员知识直接相互比较。

人类抗体和抗体的人源化 人类抗体避免了与具有鼠科或大鼠可变和/或恒定区的抗体相关的问题。这些鼠科或大鼠衍生蛋白质的存在可导致抗体的快速清除或可导致抵抗患者体内抗体的免疫反应的产生。为避免使用鼠科或大鼠衍生抗体，可通过将人类抗体功能引入啮齿动物以便于啮齿动物产生完全人类抗体来产生完全人类抗体。

克隆和重构 YAC 中兆碱基尺寸的人类基因座及其引入小鼠种系的能力为说明极大或经原始映射的基因座的功能组分以及产生人类疾病的有用模型提供了有力途径。此外，使用这种技术将小鼠基因座替换为其人类等效物可为发育期间的人类基因产物的表达和调节、它们与其它系统的信息传递及其在疾病诱发和进展中的关联提供独特见解。

这种策略的重要实际应用是小鼠体液免疫系统的“人源化”。将人类免疫球蛋白 (Ig) 基因座引入内源 Ig 基因已失活的小鼠中提供机会来研究抗体的程序化表达和组合及其在 B-细胞发育中的作用中的潜在机理。此外，这种策略可为产生完全人类单克隆抗体 (mAb) - 一种在人类疾病种实现抗体治疗前景的重要里程碑提供理想来源。预期完全人类抗体可将免疫和过敏反应本质最小化为小鼠或小鼠衍生 mAb，且因此增加了经授予抗体的功效和安全性。使用完全人类抗体预期可为治疗慢性和复

发性人类疾病提供实质好处，诸如炎症、自身免疫力和癌症，这些都需要反复授予抗体。

一种针对这个目的的方法是设计不足以用于具有人类 Ig 基因座大片段的小鼠抗体生产的小鼠品系，以预期这些小鼠可在无小鼠抗体的情况下产生人类抗体的大指令系统。大的人类 Ig 片段可保持大的可变基因多样性以及对抗体生产和表达的合适调节。通过采用用于抗体多样化和选择的小鼠工具和对于人类蛋白质免疫耐受性的缺乏，这些小鼠品系中再现的人类抗体指令系统应产生对于任何感兴趣的抗原（包括人类抗原）都具有高亲和力的抗体。使用杂交瘤技术，可易于生产和选择具有所需特异性的抗原-特异性人类 mAb。如 1994 年所公开的，结合第一代 XenoMouse 品系表明这种一般策略（参见 Green 等人，*Nature Genetics* 7:13-21 (1994)）。XenoMouse 品系设计为具有分别含有人类重链基因座和 κ 轻链基因座的 245 kb 和 190 kb 大小的种系构型片段的酵母人工染色体（YAC），其含有核可变核恒定区序列 Id。含有 YAC 的人类 Ig 经证明与供抗体重排和表达的小鼠系统相容且可替换为失活的小鼠 Ig 基因。这可由其诱发 B-细胞发育、产生完全人类抗体的类似成人的人类指令系统和产生抗原-特异性人类 mAb 能力来证实。这些结果也表明，引入含有较大编号 V 基因的人类 Ig 基因座的较大部分、另外的调节元素和人类 Ig 恒定区可实质上概括完整指令系统，其以对于感染和免疫的人类体液反应为特征。Green 等人的著作最近由引入大于约 80% 的人类抗体指令系统扩展至分别引入兆碱基大小的人类重链基因座和 κ 轻链基因座的种系构型 YAC 片段。参见 Mendez 等人，*Nature Genetics* 15:146-156 (1997) 和美国专利申请案第 08/759,620 号，申请于 1996 年 12 月 3 日。

XenoMouse 小鼠的产生于以下专利中进一步讨论和叙述：美国专利申请案第 07/466,008 号，申请于 1990 年 1 月 12 日；第 07/610,515 号，申请于 1990 年 11 月 8 日；第 07/919,297 号，申请于 1992 年 7 月 24 日，第 07/922,649 号，申请于 1992 年 7 月 30 日；第 08/031,801 号，申请于 1993 年 3 月 15 日；第 08/112,848 号，申请于 1993 年 8 月 27 日；第 08/234,145 号，申请于 1994 年 4 月 28 日；第 08/376,279 号，申请于 1995 年 1 月 20 日；第 08/430,938 号，申请于 1995 年 4 月 27 日；第 08/464,584 号，申请于 1995 年 6 月 5 日；第 08/464,582 号，申请于 1995 年 6 月 5 日；第 08/463,191 号，申请于 1995 年 6 月 5 日；第 08/462,837 号，申请于 1995 年 6 月 5 日；第 08/486,853 号，申请于 1995 年 6 月 5 日；第 08/486,857 号，申请于

1995年6月5日；第08/486,859号，申请于1995年6月5日；第08/462,513号，申请于1995年6月5日；第08/724,752号，申请于1996年10月2日和第08/759,620号，申请于1996年12月3日和美国专利第6,162,963号、第6,150,584号、第6,114,598号、第6,075,181号和第5,939,598号和日本专利第3 068 180 B2号、第3 068 506 B2号和第3 068 507 B2号。也可参见Mendez等人，Nature Genetics 15:146-156 (1997)和Green and Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998)。

也可参见欧洲专利第EP 0 463 151 B1号，于1996年6月12日授权公开，国际专利申请案第WO 94/02602号，于1994年2月3日公开，国际专利申请案第WO 96/34096号，于1996年10月31日公开，第WO 98/24893号，于1998年6月11日公开，第WO 00/76310号，于2000年12月21日公开，第WO 03/47336号。在另一种方法中，其它公司，包括GenPharm International公司已使用“微基因座”方法。在微基因座方法中，外源Ig基因座通过包含来自Ig基因座的物质（个别基因）来模仿。因此，一种或一种以上V_H基因、一种或一种以上D_H基因、一种或一种以上J_H基因、 μ 恒定区和第二恒定区（优选为 γ 恒定区）形成为用于插入动物体内的构造。这种方法描述于以下专利中：Surani等人的美国专利第5,545,807号和每一专利都属于Lonberg和Kay的美国专利第5,545,806号、第5,625,825号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,661,016号、第5,770,429号、第5,789,650号、第5,814,318号、第5,877,397号、第5,874,299号和第6,255,458号，Krimpenfort和Berns的美国专利第5,591,669号和第6,023,010号，Berns等人的美国专利第5,612,205号、第5,721,367号和5,789,215号，及Choi和Dunnand的美国专利第5,643,763号，以及GenPharm International美国专利申请案第07/574,748号，申请于1990年8月29日、第07/575,962号，申请于1990年8月31日、第07/810,279号，申请于1991年12月17日、第07/853,408号，申请于1992年3月18日、第07/904,068号，申请于1992年6月23日、第07/990,860号，申请于1992年12月16日、第08/053,131号，申请于1993年4月26日、第08/096,762号，申请于1993年7月22日、第08/155,301号，申请于1993年11月18日、第08/161,739号，申请于1993年12月3日、第08/165,699号，申请于1993年12月10日、第08/209,741号，申请于1994年3月9日。也可参见欧洲专利第0 546 073 B1号，国际专利申请案WO 92/03918、WO 92/22645、WO 92/22647、WO 92/22670、WO 93/12227、WO 94/00569、WO 94/25585、WO 96/14436、WO 97/13852和WO 98/24884及美国专利第5,981,175号。进一步参

见 Taylor 等人, 1992 年; Chen 等人, 1993 年; Tuailon 等人, 1993 年; Choi 等人, 1993 年; Lonberg 等人, (1994); Taylor 等人, (1994)和 Tuailon 等人, (1995); Fishwild 等人, (1996)。

Kirin 也已表明自小鼠中产生人类抗体, 其中已通过微细胞融合引入大片染色体或整个染色体。参见欧洲专利申请案第 773 288 号和第 843 961 号。Xenerex Biosciences 正在研发一种用于潜在产生人类抗体的技术。在这种技术中, 以人类淋巴细胞(例如, B 和/或 T 细胞)重新构成 SCID 小鼠。小鼠随后经抗原免疫, 且可产生对抗抗原的免疫反应。参见美国专利第 5,476,996 号、第 5,698,767 号和第 5,958,765 号。

人类抗-小鼠抗体(HAMA)反应已将工业生产导向制备嵌合或其它人源化抗体。尽管嵌合抗体具有人类恒定区和鼠科可变区, 仍希望可观察到某些人类抗-嵌合抗体(HACA)反应, 尤其在抗体的慢性或多-剂量使用中。因此, 为了使 HAMA 或 HACA 反应的考虑和/或影响失效, 仍希望提供对抗 EGFRvIII 的完整人类抗体。抗体治疗

如本文所述, EGFRvIII 抗体的功能似乎对其操作模式的至少一部分很重要。例如, 就功能而言, 意思是 EGFRvIII 抗体在以 EGFRvIII 操作中的活性。因此, 在某些方面, 希望结合作为对抗 EGFRvIII 的治疗候选物的抗体的产生, 抗体可固定补充物并补充细胞毒性淋巴细胞, 由此参与到 CDC 和 ADCC 中。存在多种具有相同功能的抗体同位型, 包括(但不限于)以下: 鼠科 IgM、鼠科 IgG2a、鼠科 IgG2b、鼠科 IgG3、人类 IgM、人类 IgG1、人类 IgG3 和人类 IgA。又, 希望结合作为对抗 EGFRvIII 的治疗候选物的抗体的产生, 抗体可通过 Fc 受体接合于诸如自然杀手(NK)细胞的效应细胞来活化依赖抗体介导的细胞毒反应(ADCC)。存在多种可 ADCC 的抗体同位型, 包括(但不限于)以下: 鼠科 IgG2a、鼠科 IgG2b、鼠科 IgG3、人类 IgG1 和人类 IgG3。应了解, 产生的抗体不必一开始就具有这种同位型, 但是相反地, 产生的抗体可具有任何同位型且抗体可为随后使用此项技术中熟知的常规技术转换的同位型。这些技术包括使用直接重组技术(例如, 参见美国专利第 4,816,397 号)和细胞-细胞融合技术(例如, 参见美国专利第 5,916,771 号和第 6,207,418 号)。

在细胞-细胞技术中, 制备具有含有任何所需同位型的重链的骨髓瘤或其它细胞株和另一种具有轻链的骨髓瘤或其它细胞株。随后这些细胞可经融合, 且可分离表达细胞株的完整抗体。

例如，本文讨论的某些抗-EGFRvIII 抗体为人类抗-EGFRvIII IgG1 抗体。如果这种抗体具有对 EGFRvIII 分子的所需结合，同位型应易于转换以产生人类 IgM、人类 IgG3 或人类 IgGA，尽管仍具有相同的可变区（其界定了抗体的特异性及其某些亲和力）。这些分子（包括 IgG1）随后将可固定补充物并参与 CDC，且如果包含 IgG1 或 IgG3 恒定区，这些分子也将可通过补充细胞毒性淋巴细胞参与依赖抗体介导的细胞毒反应（ADCC）。

因此，由于产生了达到上文所述所需“结构”属性的抗体候选物，因此，其通常通过同位型转换可具有至少某些所需“功能”属性。其它治疗的设计和产生

基于本文中关于 EGFRvIII 产生和表征的抗体活性，促进了除抗体部分之外的其它治疗形态的设计。

这些形态包括（但不限于）高级抗体疗法（诸如双特异性抗体、免疫毒素和放射性同位素标记的疗法）、肽疗法的产生、基因疗法，尤其为内抗体、抗致敏疗法和小分子。

例如，结合高级抗体疗法的产生，其中补充物固定和细胞毒性淋巴细胞的补充为理想属性，可能通过使用双特异性、免疫毒素或放射性同位素标记来增强细胞杀死。

例如，结合双特异性抗体，可产生包含以下的双特异性抗体：（i）两种抗体，一种具有对 EGFRvIII 的特异性且另一种具有对结合在一起的第二种分子的特异性；（ii）一条链对 EGFRvIII 具有特异性且第二条链对第二种分子具有特异性的单抗体；或（iii）对于 EGFRvIII 和另一种分子具有特异性的单链抗体。这些双特异性抗体可使用熟知技术产生，例如，结合（i）和（ii），例如参见 *Immunol Methods* 4:72-81 (1994) 和上述的 Wright and Harris，及结合（iii），例如参见 Trauneker 等人，*Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992)。在每一种情况下，第二种特异性可赋予 Fc 链活化受体，包括（但不限于）CD16 或 CD64（例如参见，Deo 等人，18:127 (1997)）、CD3（Micromet's BiTE 技术）或 CD89（例如参见，Valerius 等人，*Blood* 90:4485-4492 (1997)）。根据前述制备的双特异性抗体可能杀死表达 EGFRvIII 的细胞，且尤其是其中本发明的 EGFRvIII 抗体有效的那些细胞。

结合免疫毒素，抗体可使用此项技术中熟知的技术改质而作为免疫毒素。

例如参见 Vitetta *Immunol Today* 14:252 (1993)。也例如参见美国专利第 5,194,594 号。结合制备放射性同位素标记的抗体，这些经改质抗体也可易于使用此

项技术中熟知的技术来制备。例如参见 Junghans 等人, *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 中(第 2 版, Chafner and Longo 编, Lippincott Raven (1996))。也参见美国专利第 4,681,581 号、第 4,735,210 号、第 5,101,827 号、第 5,102,990 号(RE 35,500)、第 5,648,471 号和第 5,697,902 号。每一种免疫毒素和放射性同位素标记的分子都可能杀死表达 EGFRvIII 的细胞,且尤其是其中本文所述抗体有效的那些细胞。

可设计抗体更快速结合,或更慢自表位离解,且因此可将抗体本身设计为治疗剂。例如,抗体的经改变特征可用于对患者授予治疗剂。治疗免疫偶联物

如所了解的,与药物、毒素或其它分子(免疫偶联物或免疫毒素)结合的抗体在定靶杀死表达可通过特异性结合分子(诸如抗体)特异性结合的分子的细胞中极为有用。如上文所述,尚未已知在任何正常组织上表达过 EGFRvIII。此外,EGFRvIII 显示显著表达于多种人类肿瘤中。因此,EGFRvIII 是用于以免疫毒素定靶的最受瞩目的分子。

已出现许多关于试图特异性定靶具有单克隆抗体-药物偶联物的肿瘤细胞的报导(Sela 等人, *Immunoconjugates* 189-216 中(C. Vogel, ed. 1987); Ghose 等人, *Targeted Drugs* 1-22 中(E. Goldberg 编, 1983 年); Diener 等人, *Antibody Mediated Delivery Systems* 1-23 中(J. Rodwell 编, 1988 年); Pietersz 等人, *Antibody Mediated Delivery Systems* 25-53 中(J. Rodwell 编, 1988 年); Bumol 等人, *Antibody Mediated Delivery Systems* 55-79 中(J. Rodwell 编, 1988 年)。细胞毒素药物,诸如氨甲喋呤、柔红霉素、阿霉素、长春新碱、长春碱、美法仑(melphalan)、丝裂霉素 C 和苯丁酸氮芥已与多种鼠科单克隆抗体结合。在某些情况下,通过中间体载剂分子将药物分子连接至抗体分子,这些中间体载剂分子诸如血白蛋白(Garnett 等人, *Cancer Res.* 46:2407-2412 (1986); Ohkawa 等人, *Cancer Immunol. Immunother.* 23:81-86 (1986); Endo 等人, *Cancer Res.* 47:1076-1080 (1980)、右旋糖酐(Hurwitz 等人, *Appl. Biochem.* 2:25-35 (1980); Manabi 等人, *Biochem. Pharmacol.* 34:289-291 (1985); Dillman 等人, *Cancer Res.* 46:4886-4891 (1986); Shoval 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 8276-8280 (1988))或多聚谷氨酸(Tsukada 等人, *J. Natl. Canc. Inst.* 73:721-729 (1984); Kato 等人, *J. Med. Chem.* 27:1602-1607 (1984); Tsukada 等人, *Br. J. Cancer* 52:111-116 (1985))。

已采用多种连接子技术以用于制备这些免疫偶联物,且已研究了可离解和不可

离解连接子。然而，在大部分情况下，如果药物分子可从在定靶位点为非改质形式的偶联物释放出来，就只能观察到药物的完全细胞毒性潜能。

已用于制备抗体-药物偶联物的可离解连接子之一为基于顺-丙烯三羧酸的酸-不稳定连接子，其利用不同细胞内间隔的酸性环境，诸如在受体调节的内吞作用中遇到的内体和溶酶体。Shen 和 Ryser 引入这种方法来制备柔红霉素与大分子载剂的偶联物 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 102:1048-1054 (1981))。Yang 和 Reisfeld 使用相同技术将柔红霉素偶联至抗-黑素瘤抗体 (J. Natl. Canc. Inst. 80:1154-1159 (1988))。近来，Dillman 等人也使用酸不稳定连接子以类似方式制备柔红霉素与抗-T 细胞抗体的偶联物 (Cancer Res. 48:6097-6102 (1988))。

由 Trouet 等人研究的另一种方法涉及将柔红霉素经肽空间臂连接至抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci. 79:626-629 (1982))。这是在通过溶菌酶肽酶的作用无药物从这种偶联物中释放出来的前提下进行的。

然而，在活体外细胞毒性测试中已揭示，抗体-药物偶联物很少达到与自由非偶联药物相同的细胞毒性效能。这表明，药物分子从抗体释放出来的机理效率很差。在免疫毒素的范围内，经单克隆抗体与催化活性蛋白质毒素之间的双硫桥形成的偶联物显示比含有其它连接子的偶联物更具细胞毒性。参见，Lambert 等人，J. Biol. Chem. 260:12035-12041 (1985)；Lambert 等人，Immunotoxins 175-209 中(A. Frankel 编，1988)；Ghetie 等人，Cancer Res. 48:2610-2617 (1988)。这归因于对抗体分子与毒素之间的双硫键的有效离解有利的谷胱甘肽的高细胞内浓度。尽管如此，仅有少量关于使用双硫桥制备药物和大分子之间的偶联物的报导实例。Shen 等人描述了氨甲喋呤转化为巯乙基酰胺衍生物，继而经双硫键与聚-D-赖氨酸偶联 (J. Biol. Chem. 260:10905-10908 (1985))。此外，一报导描述了含三硫化物的毒素药物刺孢霉素与抗体的偶联物的制备 (Menendez 等人，Fourth International Conference on Monoclonal Antibody Immunoconjugates for Cancer, San Diego, Abstract 81 (1989))。另一报导描述了含三硫化物的毒素药物刺孢霉素与抗体的偶联物的制备 (Hinman 等人，53 Cancer Res. 3336-3342 (1993))。

缺少二硫化物连接的抗体-药物偶联物的一个原因是带有含有可易于用于将药物经二硫化物桥连接至抗体的部分的硫原子的细胞毒素药物的不可利用性。此外，现存药物在其细胞毒性潜能不减少的情况下，其难于进行化学改质。

现存抗体-药物偶联物的另一主要不足在于因为有限数目的定靶抗原及静止癌

药物（如氨甲喋呤、柔红霉素和长春新碱）的相对适度细胞毒性，其不能将足够浓度的药物传递到靶位点。为了达到显著的细胞毒性，有必要将大量的药物分子直接或通过聚合载体分子连接至抗体。然而，这些高度改质的抗体通常展示出对于靶抗原削弱的结合且快速从血流中活体内清除。

Maytansinoid 为高度细胞毒素药物。美登素首先由 Kupchan 等人自东非灌木齿叶美登木中分离，且其显示比常规癌症化学治疗剂（如氨甲喋呤、柔红霉素和长春新碱）大 100 到 1000 倍的细胞毒性（美国专利第 3,896,111 号）。后来发现某些微生物也产生 maytansinoid，诸如异戊酸美登素酯和异戊酸美登素酯的 C-3 酯（美国专利第 4,151,042 号）。也已报导异戊酸美登素酯的合成 C-3 酯和异戊酸美登素酯的类似物（Kupchan 等人，*J. Med. Chem.* 21:31-37 (1978)；Higashide 等人，*Nature* 270:721-722 (1977)；Kawai 等人，*Chem. Pharm. Bull.* 32:3441-3451 (1984)）。C-3 酯由其制备的异戊酸美登素酯的类似物的实例包括芳族环上（例如，脱氯）或在 C-9、C-14（例如，羟基化甲基）、C-15、C-18、C-20 和 C-4,5 处经改质的异戊酸美登素酯。

天然发生和合成 C-3 酯可分为两个群组：

(a) 具有简单羧酸的 C-3 酯（美国专利第 4,248,870 号、第 4,265,814 号、第 4,308,268 号、第 4,308,269 号、第 4,309,428 号、第 4,317,821 号、第 4,322,348 号和第 4,331,598 号）和

(b) 具有 N-甲基-L-丙氨酸的衍生物的 C-3 酯（美国专利第 4,137,230 号、第 4,260,608 号、第 5,208,020 号和 *Chem. Pharm. Bull.* 12:3441 (1984)）。

发现群组 (b) 的酯的细胞毒性比群组 (a) 的酯的细胞毒性大得多。

美登素为有丝分裂抑制剂。已报导以美登素活体内处理 L1210 细胞导致 67% 的细胞聚集于有丝分裂中。已报导未经处理的比对细胞显示 3.2% 至 5.8% 之间的有丝分裂指数（Sieber 等人，43 *Comparative Leukemia Research* 1975, *Bibl. Haemat.* 495-500 (1976)）。海胆卵和蛤蜊卵的实验已表明，美登素通过抑制微管蛋白质（微管蛋白）的聚合干扰微管形成来抑制有丝分裂（Remillard 等人，*Science* 189:1002-1005 (1975)）。

活体外，已发现以 10^{-3} 至 10^{-1} $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 剂量的美登素即可抑制 P388、L1210 和 LY5178 鼠科白血病细胞悬浮液，其中 P388 细胞株最敏感。也已显示美登素是人类鼻咽癌细胞活体外生长的活性抑制剂，且报导人类急性淋巴母细胞白血病细胞株 CEM 可由低至 10^{-7} mg/ml 的浓度抑制（Wolpert-DeFillippes 等人，*Biochem.*

Pharmacol. 24:1735-1738 (1975))。

活体内，美登素也显示具有活性。显示在 50 至 100 倍剂量范围内抑制 P388 淋巴瘤细胞白血病系统的肿瘤生长，这表明具有高治疗指数；L1210 小鼠白血病系统、人类 Lewis 肺癌系统和人类 B-16 黑素瘤系统也显示显著抑制活性 (Kupchan, *Ped. Proc.* 33:2288-2295 (1974))。

目前偶联 maytansinoids 和细胞结合剂 (诸如抗体) 的方法包括两个反应步骤。首先将细胞结合剂 (例如抗体) 以交联试剂 (诸如 N-琥珀酰亚胺基吡啶基二硫代丙酸酯 (SPDP)) 改质以将二硫代吡啶基引入抗体 (Carlsson 等人, *Biochem. J.* 173:723-737 (1978); 美国专利第 5,208,020 号)。在第二个步骤中, 将具有硫醇基的反应性 maytansinoid (诸如 DM1 (形式上称为 N²-去乙酰基-N²-(3-巯基-1-氧代丙基))-美登素) 作为起始试剂添加至经改质抗体中, 导致改质抗体中硫代吡啶基的置换, 及由二硫化物连接的细胞毒性 maytansinoid/抗体偶联物的产生 (美国专利第 5,208,020 号)。在美国专利第 6,441,163 号中描述用于偶联 maytansinoids 的一步骤工艺。

由 ImmUnogen Corporation (Cambridge, MA) 可获得基于 Maytansinoid 的免疫毒素技术。另一种重要的毒素技术是基于 auristatin 毒素。Auristatins 衍生自由印度洋海的海兔获得的海兔毒素 Dolastatin 10, 作为有效的细胞生长抑制物质。参见美国专利第 4,816,444 号和第 4,978,744 号。关于其它的海兔毒素, 也参见美国专利第 4,414,205 号 (Dolastatin-1、2 和 3)、第 5,076,973 号 (Dolastatin-3)、第 4,486,414 号 (Dolastatin-A 和 B)、第 4,986,988 号 (Dolastatin-13)、第 5,138,036 号 (Dolastatin-14) 和第 4,879,278 号 (dolastatin-15)。由 Dr. Pettit 和亚利桑那州大学的同事分离和合成的各种 auristatine 衍生物已经测试且显示出对细胞的高度毒性。参见 Pettit 等人, 抗肿瘤剂 337. 海兔毒素 10 结构改质的合成。Anticancer Drug Des. 10(7):529-44 (1995), Woyke 等人。有效海兔毒素 10 结构改质 auristatin PHE 的细胞外活性和后抗真菌作用。Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45:3580-3584 (2001), Pettit 等人。海兔毒素 10 和肽衍生物对抗新生隐球菌的特异性活性。Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 42:2961-2965 (1998), Woyke。新生隐球菌细胞周期期间微管的三维显影和 auristatin PHE 对微管整体性和核位置的影响。Submitted, Antimicrobial Agents and Chemotherapy。

近来, 已研发在作为有效负载在抗体上传递时似乎相当有效的其它 auristatin 衍

生物。例如，已显示单甲基 auristatin E (MMAE) 在与肿瘤特异性抗体偶联时作为对于肿瘤细胞的有效毒素。Doronina 等人, Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. Nature Biotechnology. (2003) (在线可得); Francisco 等人, cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. Blood. (2003) May 8 [E 印刷前公开]. Epub 2003 Apr 24 (在线可得)。除 auristatin 分子的毒性之外, 研究已显示经肽连接的偶联物更稳定, 且因此在缓冲剂和血浆中比其它连接子技术对正常组织的特异性更大且毒性更小。Doronina 等人, Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. Nature Biotechnology. (2003) (在线可得); Francisco 等人, cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. Blood. (2003) May 8 [E 印刷前公开]. Epub 2003 Apr 24 (在线可得)。

这些连接子基于支链肽设计且包括例如 mAb-缬氨酸-瓜氨酸-MMAE 和 mAb-苯丙氨酸-赖氨酸-MMAE 偶联物。Doronina 等人, Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. Nature Biotechnology. (2003) (在线可得); Francisco 等人, cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. Blood. (2003) May 8 [E 印刷前公开]. Epub 2003 Apr 24 (在线可得)。这些设计和偶联技术由以下所述, 例如 King 等人的 Monoclonal antibody conjugates of doxorubicin prepared with branched peptide linkers: inhibition of aggregation by rnetoxytriethyleneglycol chains. J Med Chem. 45(19):4336-43 (2002)和 Dubowchik 等人的 Cathepsin B-sensitive dipeptide prodrugs. 2. Models of anticancer drugs paclitaxel (Taxol), mitomycin C and doxorubicin. Bioorg Med Chem Lett. 8(23):3347-52 (1998)。基于前述的 Auristatin E-基免疫毒素技术由 Seattle Genetics Corporation (Seattle, WA)可得。

存在大量由自然源萃取物及半合成和合成类似物获得的影响微管的新颖化合物, 其似乎具有作为用于产生免疫偶联物的毒素的潜能。(参见 newmedinc.com 网站)。这些分子及使用这些分子的药物实例包括以下: 秋水仙碱-位点结合剂 (Curacin)、风车子素(AVE806, 风车子素 A-4 前药(CA4P), Oxi-4503)、隐藻素 (LY355703)、Discodermolide、Dolastatin 和 Analogs (Auristatin PHE、Dolastatin 10、ILX-651、Symplostatin 1、TZT-1027)、埃博霉素(BMS-247550、BMS-310705、EPO906、

KOS-862、ZK-EPO)、榴塞洛素 (Eleutherobin)、FR182877、Halichondrin B(E7389)、月苻三甲氯铵 (Halimide) (NPI-2352 和 NPI-2358)、Hemiasterlins(HTI-286)、Laulimalide、Maytansinoids ("DM1")(Bivatuzumab 美登素、Cantuzumab 美登素、huN901-DM1/BB-10901TAP、MLN591DM1、My9-6-DM1、曲妥珠单抗 (Trastuzumab)-DM1)、PC-SPEs、Peloruside A、白藜芦醇 (Resveratrol)、S-烯丙基巯基半胱氨酸 (SAMC)、海绵素 (Spongistatin)、维提岛酰胺 (Vitilevuamide)、分子发动机-驱动蛋白 (Molecular Motor-Kinesins) (SB-715992)、设计的秋水仙碱-位点结合剂 (A-289099, A-293620/A-318315, ABT-751/E7010, D-24851/D-64131, ZD6126)、其它新颖纺锤体毒素(2-甲氧雌二醇(2-ME2), 苯并咪唑氨基甲酸酯(ANG 600 系列, 甲苯咪唑), CP248/CP461, HMN-214, R440, SDX-103, T67/T607)。此外, 在 1998 年的 Mayer, A.M.S. Marine Pharmacology: Antitumor and Cytotoxic Compounds. The Pharmacologist. 41(4): 159-164 (1999)中评论了其它的鼠科衍生毒素。

治疗投予和配方

延长的作用时间可以通过交替的非经肠途径 (诸如, 静脉内、皮下或肌肉内注射) 使得给药进程较不频繁且更为便利。

当用于活体内投予时, 本文所述的抗体配方应该是无菌的。例如, 这可易于通过在冻干和重组之前或之后经无菌过滤膜过滤来实现。抗体通常以冻干形式储存或储存在溶液中。治疗抗体组合物通常放置在具有无菌存取入口的容器中, 例如, 具有可回收配方的接合器 (诸如皮下注射针可穿过的塞子) 的静脉内溶液袋或小瓶。

抗体投予的路径是根据已知方法, 例如通过静脉内、腹膜内、脑内、肌肉内、眼内、动脉内、鞘内、吸入或病灶内途径, 或通过如下文所述的缓释系统注射或灌输。抗体优选通过灌输或通过大丸剂注射连续投予。

治疗学上采用的抗体的有效量取决于 (例如) 治疗对象, 投药途径和患者的病况。因此, 对于治疗学家而言, 优选视需要滴定剂量并改良投药路径以获得最优的治疗效果。理论上, 临床医师将投予抗体, 直到达到理想效果的剂量。这种疗法的进程易于通过常规的检定或通过本文所述的检定来控制。

如本文所述的抗体可在含有医药学上可接受的载剂的混合物中制备。治疗组合物可优选以液体或粉末气溶胶 (经冻干) 的形式经静脉内或经鼻或肺投予。组合物也可以视需要非经肠或经皮下投予。当进行全身性投予时, 治疗组合物应该是无菌, 无热源且在非经肠可接受的具有应有 pH 值、等渗性和稳定性的溶液中。这些条件

为所属领域的技术人员所已知。简而言之，通过将具有所需纯度的化合物与生理学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂混合来制备化合物剂量配方以供储存和投予。这些材料在所采用的剂量和浓度时对于接受者是无毒性的，且其包括缓冲剂，诸如 TRIS HCl、磷酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐和其它有机酸盐；抗氧化剂，诸如抗坏血酸；低分子量(小于约十个残基)肽，诸如聚精氨酸；蛋白质，诸如血白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，诸如甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸或精氨酸；单糖、二糖及其它碳水化合物，包括纤维素或其衍生物、葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，诸如 EDTA；糖醇，诸如甘露糖醇或山梨糖醇；平衡离子，诸如钠和/或非离子表面活性剂，诸如 TWEEN PLURONICS 或聚乙二醇。

用于注射的无菌组合物可根据 Remington's Pharmaceutical Sciences (第 18 版, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1990) 中所述的常规医药实践来调配。例如，可能需要活性化合物在诸如水或天然发生的植物油，如芝麻油、花生油或棉籽油的媒介物，或如油酸乙酯或其类似物的合成脂肪媒介物中的溶解液或悬浮液。可根据可接受的医药实践并入缓冲剂、防腐剂、抗氧化剂及其类似物。

缓释制剂的合适实例包括含有多肽的固体疏水性聚合物的半透性基质，所述基质为成形物件、膜或微胶囊的形式。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如，由 Langer 等人的 *J. Biomed Mater. Res.*, (1981) 15:167-277 和 Langer 的 *Chem. Tech.*, (1982) 12:98-105 所述的聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸(美国专利第 3,773,919 号、EP 58,481)、L-谷氨酸和 γ 乙基-L-谷氨酸酯的共聚物(Sidman 等人的 *Biopolymers*, (1983) 22:547-556)、非降解伸乙基-乙酸乙烯酯(Langer 等人，上述)、降解乳酸-乙醇酸共聚物，诸如 LUPRON Depot™ (由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林组成的可注射微球体)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸(EP 133,988)。

尽管诸如伸乙基-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸的聚合物使得可释放分子 100 天，但某些水凝胶仍持续较短时间释放蛋白质。当包胶蛋白质在体内长时间保留时，它们可能因为暴露于 37°C 的湿气下而变性或聚集，导致生物活性的丧失且可能改变免疫原性。可根据所涉及的机理设计合理的策略以供稳定蛋白质。例如，如果发现聚集机理为经二硫化物互换形成分子间 S-S 键，就可以通过改质硫氢基残基、自酸性溶液中冻干、控制湿气含量、使用合适的添加剂和研发特异性聚合物基质组合物来达到稳定。

缓释组合物也包括悬浮于可将晶体保持在悬浮液中的合适配方中抗体晶体的制

剂。当通过皮下或腹膜内注射时，这些制剂可产生缓释效应。其它组合物也包括脂质体截留的抗体。含有这些抗体的脂质体由本身已知的方法来制备：美国专利第 DE 3,218,121 号、Epstein 等人的 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985) 82:3688-3692、Hwang 等人的 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1980) 77:4030-4034、EP 52,322、EP 36,676、EP 88,046、EP 143,949、142,641、日本专利申请案第 83-118008 号、美国专利第 4,485,045 号和第 4,544,545 号及 EP 102,324。

用于给定患者的抗体配方的剂量可由主治医师结合考虑已知的各种因素来测定以改质药物的作用，包括疾病的严重程度和类型、体重、性别、饮食、投药时间和路径、其它药剂和其它相关临床因素。治疗有效剂量可通过活体外或活体内方法来测定。

治疗学上采用的抗体的有效量取决于（例如）治疗对象，投药途径和患者的病况。因此，治疗学家优选视需要滴定剂量并改良投药路径以获得最优的治疗效果。根据上文提及的因素，一般的日剂量可在约 0.001mg/kg 到多至 100 mg/kg 或更多之间。理论上，临床医师将授予治疗抗体，直到达到理想效果的剂量。这种疗法的进程易于通过常规的检定或如本文所述来控制。

应了解，根据本文的组合物和方法进行的治疗实体的授予应与并入配方中的合适载剂、赋形剂及其它试剂一起授予，以提供经改良的转移、传递、耐受性及其类似性质。在所有药剂化学师已知的配方中可发现多种合适配方：Remington's Pharmaceutical Sciences (第 18 版，Mack Publishing Company, Easton, PA (1990))，尤其为其文中的 Block, Lawrence 的第 87 章。例如，这些配方包括粉末、浆料、软膏、胶质物、蜡、油、脂质、含脂质（阳离子或阴离子）气泡（诸如 Lipofectin™）、DNA 偶联物、无水吸收浆料、水中油和油中水乳液、乳液聚乙二醇（各种分子量的聚乙二醇）、半固凝胶和含有聚乙二醇的半固混合物。根据本发明，任何前述混合物可适于治疗和疗法中，只要配方中的活性成分不会被配方钝化，且所述配方生理学上相容且可容忍所述投药路径。也参见 Baldrick P. 的“Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance.”，Regul. Toxicol. Pharmacol. 32(2):210-8 (2000)；Wang W. 的“Lyophilization and development of solid protein Pharmaceuticals.”，Int. J. Pharm. 203(1-2): 1-60 (2000)；Charman WN 的“Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts.” J Pharm Sci .89(8):967-78 (2000)；Powell 等人的“Compendium of excipients for parenteral

formulations”，PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998)且其中引用的与配方、赋形剂和载剂相关的额外信息已为药剂化学师所熟知。

抗体的制备

如本文所述，抗体可通过使用如下文所述的 XenoMouse®技术来制备。所述小鼠随后即可产生人类免疫球蛋白分子和抗体，但不足以产生鼠科免疫球蛋白分子和抗体。用于达到相同目的的技术揭示于本文所揭示的专利、申请案和参考案中。然而，尤其为关于转基因生产小鼠及由其产生的抗体的一个实施例揭示于申请于 1996 年 12 月 3 日的美国专利申请案第 08/759,620 号和 1998 年 6 月 11 日公开的国际专利申请案 WO 98/24893 和 2000 年 12 月 21 日公开的 WO 00/76310 中，其揭示内容以引入的方式并入本文。也参见 Mendez 等人的 Nature Genetics 15:146-156 (1997)。

通过使用这种技术，可生产针对多种抗体的完全人类单克隆抗体。在一个实施例中，将小鼠的 XenoMouse®细胞株以令人感兴趣的抗原（例如，EGFRvIII）免疫，自表达抗体的小鼠中回收淋巴细胞（诸如 B-细胞），且将所述细胞与骨髓型细胞株融合以制备永生化杂交瘤细胞株，且筛选并选择这些杂交瘤细胞株以识别产生对于令人感兴趣的抗原具有特异性的抗体的杂交瘤细胞株。本文提供用于产生可产生对 EGFRvIII 具有特异性的抗体的多种杂交瘤细胞株的方法。此外，本发明提供由这些细胞株产生的抗体的表征，包括这些抗体的重链和轻链的核苷酸和氨基酸序列。

或者，代替与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤，根据对初始抗原（优选为 EGFRvIII 蛋白质）的反应活性进一步筛选由所回收的细胞产生、自经免疫小鼠 XenoMouse®细胞株分离的抗体。所述筛选包括以 EGFRvIII 蛋白质进行 ELISA，活体外结合至稳定表达全长 EGFRvIII 的 NR6 M 细胞且由 NR6 M 细胞中的抗体内在化 EGFRvIII 受体。随后使用 EGFRvIII-特异性溶血性平板检定分离分泌令人感兴趣的抗体的单 B 细胞（Babcock 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:7843-7848 (1996)）。定靶用于溶菌的细胞优选为以 EGFRvIII 抗原涂敷的绵羊红细胞（SRBC）。在分泌令人感兴趣的免疫球蛋白的 B 细胞培养基和补充物的存在下，平板的形成表明定靶细胞的特异性 EGFRvIII 介导溶菌作用。可分离平板中心处的单抗原-特异性血浆细胞，且编码抗体特异性的遗传信息可自单血浆细胞分离。使用反转录酶 PCR 可克隆编码所分泌抗体的可变区的 DNA。所述经克隆 DNA 随后可进一步插入合适表达载体中，优选为载体盒，诸如 pcDNA，更优为含有免疫球蛋白重链和轻链的恒定结构域的 pcDNA 载体。随后，所产生的载体可转染为宿主细胞，优选为 CHO 细胞，且培养

于经合适改质的常规营养培养基中以供诱发启动子、选择转化体或放大编码基因的所需序列。本文中描述产生对 EGFRvIII 具有特异性的抗体的多个单血浆细胞的分离。此外，将编码抗-EGFRvIII 抗体特异性的遗传物质分离、引入随后转染为宿主细胞的合适表达载体中。

来自 XenoMouse 小鼠的 B 细胞也可用作遗传物质的来源，自其可产生抗体展示文库。所述文库可使用所述领域的一般技术经由核糖体展示在噬菌体、酵母或活体外发生。经超免疫的 XenoMouse 小鼠可作为一种富有来源，自其可分离具有高亲和力的抗原-反应性抗体。因此，经对抗 EGFRvIII 超免疫的 XenoMouse 小鼠可用于产生抗体展示文库，自其可分离对抗 EGFRvIII 的高亲和力抗体。所述文库可针对 pep3 寡肽进行筛选，且所得衍生抗体针对表达 EGFRvIII 的细胞进行筛选以确定对于自然展示抗原的特异性。完全 IgG 抗体随后可使用重组 DNA 技术来表达。例如参见 WO 99/53049。

一般而言，由上述细胞株产生的抗体具有完全人类 IgG1 或 IgG2 重链和人类 κ 轻链。在一个实施例中，抗体具有高亲和力，当通过固相和溶液相测量时，其一般具有约 10^{-9} M 至约 10^{-13} M 的 Kd 值。在其它实施例中，抗体具有较低的亲和力，自约 10^{-6} M 至约 10^{-8} M。

如所属领域的技术人员所了解的，根据本实施例的抗体可在除杂交瘤细胞株之外的细胞株中表达。编码特定抗体的序列可用于合适哺乳动物宿主细胞的转型。可通过任何已知方法进行转型以将多聚核苷酸引入宿主细胞，例如包括将多聚核苷酸封装于病毒（或病毒载体）中且以病毒（或载体）或通过此项技术中已知的转染程序转换宿主细胞，如由美国专利第 4,399,216 号、第 4,912,040 号、第 4,740,461 号和第 4,959,455 号中所例示。所使用的转型程序取决于待转型的宿主。此项技术中已熟知将异种多聚核苷酸引入哺乳动物细胞中的方法，且其包括右旋糖酐调节转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺调节转染、原生质体融合、电击、多聚核苷酸封装于脂质体中和 DNA 直接微注射于胞核中。

此项技术中已熟知可用作供表达宿主的哺乳动物细胞株，且其包括由多种由美国菌种保藏中心（American Type Culture Collection (ATCC)）获得的永生化细胞株，包括（但不限于）中国仓鼠卵巢细胞（CHO）、HeLa 细胞、幼仓鼠肾细胞（BHK）、猴肾脏细胞（COS）、肝细胞癌细胞（例如，Hep G2）和许多其它细胞株。通过测定哪些细胞株具有高表达水平且产生具有组成型 EGFRvIII 结合特性的抗体来选择

尤其较优的细胞株。

实例

提供以下实例，包括进行的实验和得到的结果仅为了达到说明的目的而并不解释为对本发明的限制。

最初产生 EGFRvIII-特异抗体的策略涉及用复合抗原（肽、多种可溶性蛋白质和抗原表达细胞）免疫 XenoMouse 小鼠，随后通过融合产生杂种细胞或通过 XenoMax™/SLAM™ 技术分离 B 细胞而分离抗体产生细胞。抗体产生细胞通过 ELISA 为特异性而呈递到一级筛选，通过 FMAT 和/或 FACS 为细胞表面结合而呈递到二级筛选。随后进行内在化检定以识别可能对药物输送有用的抗体。测量这些抗体的亲和力。选择特定抗体进行表位定位。此外，选择特定抗体进行体内及体外测试以分析这些抗体对治疗癌症的功效。

实例 1' 抗原制备

A. EGFRvIII PEP3-KLH 抗原制备

连同实例 2，14-mer 人类 EGFRvIII PEP3 (L E E K K G N Y V V T D H C (SEQ ID NO: 56)) 肽通过 R&D 系统常规合成。随后 PEP3 肽与匙孔血蓝蛋白 (KLH) 结合，如下：EGFRvIII PEP3 (200 mcg) (R&D) 与 50mcg 的匙孔血蓝蛋白 (KLH; Pierce, Rockford, IL) 混合并用蒸馏水定容到 165mcl。加入 250mcl 结合缓冲液 (0.1M MES, 0.9M NaCl, pH 4.7) 并通过加入 25mcl 的 10mg/ml 的 1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳化二酰亚氨氯化物的储存液 (EDC, Pierce, Rockford, IL) 使 EGFRvIII PEP3 和 KLH 交联。在室温下孵育结合 2 小时，使用 pH7.4 的 PBS 通过 1kDa 滤膜 (离心滤膜, Millipore, Bedford, MA) 将未反应的 EDC 离心除去。

连同实例 3，14-mer 人类 EGFRvIII PEP3 (L E E K K G N Y V V T D H C (SEQ ID NO: 56)) 肽通过 R&D 系统常规合成。随后 PEP3 肽与 KLH 结合，如下：EGFRvIII PEP3 (200 mcg) 与 50mcg 的匙孔血蓝蛋白 (KLH; Pierce, Rockford, IL) 混合并用蒸馏水定容到 165mcl。加入 250mcl 结合缓冲液 (0.1M MES, 0.9M NaCl, pH 4.7) 并通过加入 25mcl 的 10mg/ml 的 1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳化二酰亚氨氯化物的储存液 (EDC, Pierce, Rockford, IL) 使 EGFRvIII PEP3 和 KLH 交联。在室温下孵育结合 2 小时，使用 pH7.4 的 PBS 通过 1kDa 滤膜 (离心滤膜, Millipore, Bedford, MA) 将未反应的 EDC 离心除去。

B. B300.19/EGFRvIII 转染子

为了制备 B300.19/EGFRvIII 转染子, 从 A431 细胞初始克隆出野生型 EGFR, 且用于编码 EGFRvIII 的 EGFR 基因被更改从而缺失编码残基 6-273 的密码子, 而在缺失的连接处产生编码甘氨酸残基的密码子。该缺失发生在缺失 GTT (缬氨酸) 和 CGT (精氨酸) 周围的密码子内, 而得到的缺失后密码子为 GGT (甘氨酸)。(Wikstrand et al. J Neurovirol. 4(2):148-58 (1998))

1. 野生型 EGFR 构建的克隆:

使用 Micro-fast RNA 试剂盒 (Invitrogen, Burlington, ON) 从 A431 (ATCC) 中提取聚 A+mRNA。用随机 pdN6 引物和 M-MuLV 逆转录酶 (NEB, New England Biolabs, Beverly, Mass.) 从 polyA+ mRNA 合成总 cDNA。用下列引物由 A431cDNA 扩增 2.3kb 的 PCR 产物:

正义 5'-GGATCTCGAGCCAGACCGGAACGACAGGCCACCTC-3'; (SEQ ID NO:62)

反义 5'-CGGATCTCGAGCCGAGCCCAGCACTTTGATCTT-3' (SEQ ID NO:63)

使用 Pfu DNA 聚合酶。

将 PCR 产物用 XhoI 消化, 凝胶纯化, 并连接到被 XhoI 线性化的质粒 pWBFNP (见国际专利申请案第 WO 99/45031 号) 中, 以产生质粒 Wt-EGFR/pWBFNP。

2. EGFRvIII 构建的产生:

用引物对 C13659/C29538 和 C29539/C14288 (BioSource International) 由质粒 Wt-EGFR/pWBFNP 扩增出 PCR 产物, 其中 C29538 和 C29539 被 T4 多核苷酸激酶 (NEB, New England Biolabs, Beverly, Mass.) 磷酸化:

C13659: 5'-CGGATGAATTCCCAGACCGGACGACAGGCCACCTC-3' (正义)
(SEQ ID NO:64)

C29538: 5'-CTTTCTTTTCCTCCAGAGCC-3' (反义) (SEQ ID NO:65);

C29539: 5'-GTAATTATGTGGTGACAGATC-3' (正义) (SEQ ID NO:66);

C14288: 5'-CGGATCTCGAGCTCAAGAGAGCTTGGTTGGGAGCT-3' (反义)
(SEQ ID NO:67)。

被连接以在编码 EGFR 细胞外结构域的 6 至 273 氨基酸的序列中引入缺失, 并亚克隆到表达载体 pWBDHFR2 中 (见国际专利申请案第 WO 99/45031 号)。

用引物对 C13659/C29538 由 Wt-EGFR/pWBFNP 模板用 Pfu 聚合酶 (NEB, New England Biolabs, Beverly, Mass.) 扩增产生代表缺失的 5'端的 232bp 的片段。用 EcoRI

(NEB, New England Biolabs, Beverly, Mass.) 消化并凝胶纯化 PCR 产物。用引物对 C29539/C14288 从 Wt-EGFR/pWBFNP 产生代表缺失的 3'端的 1273bp 的片段, 且用 Pfu 聚合酶扩增模板。用 XhoI (NEB, New England Biolabs, Beverly, Mass.) 消化 PCR 产物。用 T4DNA 连接酶 (NEB, New England Biolabs, Beverly, Mass.) 将片段连接到用 EcoRI/XhoI 消化的 pWBDHFR2 以产生构建 EGFRvIII/pWBDHFR。

EGFR 的细胞内结构域被引入下列获得的构建中: 从质粒 Wt-EGFR/pWBFNP 中分离出 1566bp 的片段并连接到用 DraIII/XhoI 消化的 EGFRvIII/pWBDHFR 以产生 EGFRvIII-FL/pWBDHFR。

3.用 EGFRvIII-FL/pWBDHFR 转染 B300.19 细胞:

B300.19 细胞 (8×10^6) 被用于每 700 μ l DMEM/HI 介质中的转染。加入 20 μ g EGFRvIII-FL/pWBDHFR 和 2 μ g CMV-Puro 质粒 DNA。用 Bio-Rad Gene Pulser 在 300 volts/960uF 下将细胞电击。电击后, 在冰上冷却细胞 10 分钟, 随后加入 10 非选择性介质 (DMEM/HI 葡萄糖, 10% FBS, 50 μ M BME, 2mM L-谷氨酰胺, 100 单位青霉素-G/ml, 100 单位 MCG 链霉素/ml)。在 37°C、7.5% CO₂ 下孵育细胞 48 小时。

孵育后, 细胞被 split 入选择性介质 (DMEM/HI 葡萄糖, 10% FBS, 2 mM L-谷氨酰胺, 50 μ M BME, 100 单位青霉素-G/ml, 100 单位 MCG 链霉素/ml, 2ug/ml 嘌呤霉素) 中, 在 96 孔板中以 2×10^4 、 0.4×10^4 和 0.08×10^4 细胞/孔的浓度, 在选择性介质中被选择 14 天以产生稳定的克隆。将 Puro 抗性克隆用 E752 mAb (抗-EGFR 抗体, 在 Yang et al., Crit Rev Oncol Hematol., 38(1):17-23 (2001)中有所描述)和山羊抗人类 IgG PE 染色, 随后在 FACS Vantage (Becton Dickinson)上分析。

C.构建 EGFRvIII-RbFc 表达构建

为产生 EGFRvIII 兔融合蛋白, 我们首先构建含有编码兔 Fc 的 DNA 的载体。这与编码 EGFRvIII 的 DNA 连接。下面将详细描述此方法:

1.RbFc/pcDNA3.1 Hygro 的构建:

(下列)引物 1322/867 用于扩增编码兔 IgG 的 Hinge-CH2-CH3 结构域的 721bp 的片段。

#1322 (正义): 5'-GGTGGCGGTACCTGGACAAGACCGTTGCG-3' (SEQ ID NO:68)

#867 (反义): 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCATTTACCCGGAGAGCGGGA-3' (SEQ ID NO:69)

将得到的 PCR 产物用 KpnI 和 NotI 消化，凝胶纯化并连接到用 KpnI/NotI 消化的 pcDNA3.1 (+)/Hygro (Invitrogen, Burlington, ON)，以产生质粒 RbFc/pcDNA3.1 Hygro。

2. EGFRvIII-RbFc/pCEP4 的构建：

(下列) 引物 1290/1293 用于用 Pfu 聚合酶扩增自 EGFRvIII-FL/pWBDHFR 质粒模板的 1165bp 的产物。

#1290 (正义): 5'-CTACTAGCTAGCCACCATGCGACCCTCCGGGA-3' (SEQ ID NO:70)

#1293 (反义): 5'-CGGGGTACCCGGCGATGGACGGGATC-3' (SEQ ID NO:71)

将 PCR 产物用 NheI 和 KpnI 消化，凝胶纯化并连接到用 NheI/KpnI 消化的 RbFc/pcDNA3.1 以产生质粒 EGFRvIII-RbFc/pcDNA3.1 Hygro。

2170bp 的 SnaBI/XhoI 片段被从 EGFRvIII-RbFc/pcDNA3.1 Hygro 中分离出来并亚克隆入 SnaBI/XhoI 消化的 pCEP4 (Invitrogen, Burlington, ON) 中，以产生质粒 EGFRvIII-RbFc/pCEP4。

3. 产生 293F EGFRvIII-RbFc 稳定细胞系：

用如下方法将质粒 EGFRvIII-RbFc/pCEP4 通过磷酸钙转染引入 293F 细胞 (Gibco, Grand Island, NY)：转染前一天， 1×10^6 293F 细胞被平板接种到明胶覆盖的 100mm 组织培养基培养皿中，并在 5% CO₂、37°C 下孵育。转染前，用 10ml 新鲜非选择性介质 (DMEM/F12, 10% FBS, 2mM L-谷氨酰胺, 100U/ml 青霉素 G, 100U/ml MCG 链霉素) 培养细胞 2-3 小时。在微离心管中制备转染试剂，如下：10μg 的 DNA (EGFRvIII-RbFc/pCEP4) 与 62 μl 的 2M 磷酸钙混合，并用去离子水定容到 500 μl。用另一移液管吸取 500ul 的 2XHBS 用于转移所述转染试剂。

逐滴将移液管中的溶液加入细胞，同时为保持合适的 pH 值，将细胞置于 5%CO₂ 孵育箱中直至进行转染。转染后 15-20 小时，用 PBS 洗涤细胞并用 10ml 新鲜 293F 非选择性介质喂养细胞。用胰蛋白酶 48-72 后转染收获表达的细胞，并将细胞以 0.08×10^4 细胞/孔平板接种到 96 孔板，置于 293F 选择性介质 (DMEM/F12, 10% FBS, 2mM L-谷氨酰胺, 100U/ml 青霉素 G, 100U/ml MCG 链霉素, 250ug/ml 湿霉素) 中 14 天。

使用 1ug/ml 的抗-EGFR 抗体 E763(美国专利 No. 6,235,883) 作捕捉抗体并用 1:100 稀释的山羊抗-兔 IgG HRPO (CalTag) 检测，通过 ELISA 筛选湿霉素抗性克隆。

用如下方法制作用于抗体滴定（实例 3）的 EGFRvIII 肽-OVA：

使用来自 Pierce (#20291)的经预称量的 DTT 还原 207 μg EGFRvIII PEP3。使用 100 μL 去离子水溶解小瓶 7.7mg 的经预称量的 DTT。将 DTT 贮存液加入 EGFRvIII PEP3。使用 pH 7.4 的 PBS 将反应液定容到 600 μL 。室温下旋转反应液 30 分钟。

通过称量 5 克 G10 葡聚糖凝胶珠子并加入 40ml PBS，混合并在室温下静置 10 分钟，然后以 1000rpm 离心珠子 10 分钟制成 G10 管柱。除去上清液，并再加入 20ml 的 PBS。将珠子在 1000rpm 下离心 10 分钟。除去上清液，加入足够量的 PBS 以产生 50%G10 葡聚糖凝胶珠子的悬浮液。在 5ml 旋转柱中加入 5ml 所述 50%悬浮混合物，随后将该柱置于 14ml 聚丙烯管中。将柱子在 1000rpm 下离心 3 分钟。另外再加入 3ml 的 PBS，然后再将柱子在 1000rpm 下离心 3 分钟。更换新的聚丙烯管，这样所述柱子就可以使用了。

从还原肽中移除 DTT。在将肽还原的 30 分钟反应之后，向每个柱子中加入 300 μL 的还原肽。将柱子在 1000rpm 下离心 3 分钟。另外再向每个柱子中加入 250 μL 的 PBS，然后再在 1000rpm 下离心 3 分钟。将还原肽收集到 14ml 的聚丙烯管中。

将所述还原肽与用马来酰亚胺激活的 OVA 连接，并收集到微量离心管中。将 2mg 的马来酰亚胺激活的 OVA 用马来酰亚胺结合缓冲液溶解（Pierce:77126, Rockford IL）以制成 10mg/ml 的贮存液。将 414 μg 的马来酰亚胺激活的 OVA 加入微量离心管中的还原肽中。向反应中加入 500 μL 马来酰亚胺结合缓冲液。将反应液在室温下孵育 2 小时并随后加入 2mg 的半胱氨酸以猝灭可能存在的任何活性马来酰亚胺基团。室温下允许所述半胱氨酸再反应 30 分钟。将所述偶联物使用 pH 7.4 的 1X PBS 洗涤并用 10K 离心柱离心 3 次。这去除了没有与 OVA 结合的所有自由肽和自由的半胱氨酸。使用凝胶加样吸头将所述结合物从离心柱上取下并加入微量离心管中。最后，使用 pH 7.4 的 1X PBS 将结合物定容到期望浓度。所述结合物的摩尔比为 14.5: 1（肽：OVA）。

实例 2

通过杂种细胞产生制造抗-EGFRvIII 抗体

将产生具有 γ -1 恒定区的抗体的八只小鼠（XenoMouse G1 小鼠）在第 0 天免疫，然后对于此方案要在第 11、21、32、44 和 54 天加强，然后在第 58 天进行融合。所有免疫均通过在尾根部皮下给药和腹腔给药的方式注射。第 0 天免疫是用 1.5×10^7 B300.19/EGFRvIII 转染的细胞（Example 1A）悬浮在与完全 Freund's 佐剂（CFA）

(Sigma, St. Louis, MO) 1: 1v/v 混合的无致热原的 DPBS 中完成的。第 11、21 和 32 天加强是用 1.5×10^7 B300.19/EGFRvIII 转染的细胞在与不完全 Freund's 佐剂(IFA)

(Sigma, St. Louis, MO) 1: 1v/v 混合的 DPBS 中完成的。第 44 天加强是用与 IFA 1: 1v/v 混合的 $5 \mu\text{g}$ 的 PEP3 (EGFRvIII 肽) -KLH 结合 (实例 1) 完成的, 且最后的加强是用没有佐剂的 DPBS 中 $5 \mu\text{g}$ PEP3 (EGFRvIII 肽) -KLH 结合完成的。

在第 58 天, 对小鼠实施安乐死, 随后回收其腹股沟和腰椎淋巴结。使用组织粉碎机通过机械破坏从淋巴结中释放出淋巴细胞, 随后通过 CD90 阴性选择除去 T 细胞。通过将洗涤并富集的 B 细胞和购自 ATCC, cat # CRL 1580 (Kearney et al, J. Immunol. 123:1548-1550 (1979)) 的非分泌型骨髓瘤 P3X63Ag8.653 细胞以 1: 1 的比例混合而进行融合。此细胞混合物通过以 800g 离心被轻轻地沉淀。彻底去除上清液后, 用 2-4ml 链霉蛋白酶溶液 (CalBiochem, cat.# 53702, 0.5 mg/ml 在 PBS 中) 处理不超过 2 分钟。随后, 加入 3-5ml FBS 终止酶活性, 用电细胞融合溶液 ECFS (0.3M 蔗糖, Sigma, Cat# S7903, 0.1mM 醋酸镁, Sigma, Cat# M2545, 0.1 mM 醋酸钙, Sigma, Cat# C4705 (St. Louis, MO)) 定容至 40ml。

离心后除去上清液, 通过在 40ml ECFS 中再次悬浮洗涤细胞。重复洗涤步骤, 再次用 ECFS 悬浮细胞以达到 2×10^6 细胞/ml 的浓度。使用融合产生器 (型号 ECM2001, Genetronic, Inc., San Diego, CA) 进行电-细胞融合。所用的融合室大小为 2.0ml, 并使用下列仪器设置: 比对条件: 电压: 50V, 时间: 50s, 膜破裂条件: 电压: 3000V, 时间: 30 μs , 融合后固定时间: 3s。融合后, 在 DMEM (JRH Biosciences)、15% FCS (Hyclone) 并含有 HAT 的溶液中悬浮细胞, 并加入 L-谷氨酰胺、青霉素-链霉素、OPI (草酰乙酸、丙酮酸、牛胰岛素) (均购自 Sigma, St. Louis, MO) 和 IL-6 (Boehringer Mannheim) 在 37 °C 及 10% CO_2 空气中培养。

将细胞以 4×10^4 细胞/孔平板接种到平底 96 孔组织培养板上。在转移到 HT (次黄嘌呤和胸腺嘧啶脱氧核苷) 补料介质前, 培养被保存在 HAT (次黄嘌呤、氨喋呤和胸腺嘧啶脱氧核苷) 补料介质中 2 星期。通过在 HAT 介质的存活选择杂种细胞, 并用 ELISA 筛选上清液的抗原活性。ELISA 格式需要在抗原涂覆平板 (作为计数筛选的 EGFRvIII 肽-OVA 涂覆平板和野生型 EGFR peptide-OVA 涂覆平板) 上的孵育上清液并使用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的小鼠抗人类 IgG 检测 EGFRvIII 特异结合 (见表 2.1)。

表 2.1

板/孔	杂种细胞	第二 OD		
		第一 OD 融合板	muEGFr	EGFr
13.2 D10	13.1	4.034	2.653	0.051
13.3 C12	13.2	3.829	2.443	0.049
13.3 F II	13.3	3.874	1.081	0.049
13.6B11	13.4	3.322	1.311	0.052

克隆	板	OD#2		
		OD#1 克隆板	muEGFr	EGFr
13.1.1	0.5c/wD2	2.614	2.586	0.042
13.1.2	0.5c/wF5	2.248	1.272	0.041

应注意到，检测到至少四个抗原特异杂种细胞：13.1、13.2、13.3 和 13.4。这些在 ELISA 检测中 EGFRvIII 特异性呈阳性的这些杂种细胞通过在表达 EGFRvIII 的稳定转染的 300.19 细胞与 300.19 未转染母细胞的对比得到验证。

使用有限稀释平板接种在选择的抗原阴性孔上进行克隆。通过观察板检查单克隆抗体生长的存在，通过抗原特异性 ELISA 筛选来自单克隆孔的上清液并用上文描述的 FACS 验证。使用 Luminex 仪器通过多元 ELISA 检定高活性克隆从而检验人类 γ 和 ϵ 链的纯度。基于 ELISA 和 FACS 检定中 EGFRvIII 的特异性，选择克隆 13.1.2 为进一步筛选和分析最有希望的候选。图 3L 中展示了 13.1.2 抗体的重链和轻链的核苷酸序列和氨基酸序列，且 SEQ ID NO 137 和 139 是重链和轻链核酸的而 138 和 140 为重链和轻链氨基酸序列的。此外，在图 4 和 5 中展示 13.1.2 重链和轻链序列和其所来自的生殖细胞系的序列的一个比较。

实例 3

通过使用 XenoMax 技术产生抗体

XenoMouse 动物的免疫

抗人类 EGFRvIII 的人类单克隆抗体是通过逐步免疫产生具有 γ -1 恒定区抗体的 XenoMouse 小鼠 (XenoMouse G1 小鼠)、产生具有 γ -2 恒定区抗体的 XenoMouse 小鼠 (XenoMouse XMG2 小鼠) 和产生具有 γ -4 恒定区抗体的 (XenoMouse G4 小鼠)。

为通过 XenoMax 技术产生 mAb, XenoMouse G1 组和 XMG2 组小鼠被用 EGFRvIII PEP3(实例 1A)和表达 EGFRvIII 的 300.19 细胞(实例 1B)、或用 EGFRvIII 蛋白 (EGFRvIII-ECD) (Dr. Bigner, Duke University) 的细菌表达的细胞外结构域和表达的 EGFRvIII300.19 细胞、或用 EGFRvIII 兔 Fc 融合蛋白(EGFRvIII-RbFc) (实

例 1C) 和表达 EGFRvIII 的 300.19 细胞、或通过爪垫 (FP) 仅用 EGFRvIII-RbFc、或通过通过皮下注射在尾基部和腹腔 (BIP) 免疫。

对于爪垫免疫, 初始免疫每只小鼠使用或不使用 10×10^6 表达 EGFRvIII 的 300.19 细胞且使用或不使用与 Titermax 金 (Sigma, Oakville, ON) 以 1: 1 混合的 $10 \mu\text{g}$ 的 EGFRvIII PEP3 或 EGFRvIII-ECD 或 EGFRvIII-RbFc。随后的加强使用初始免疫所用免疫原剂量的一半。前 4 次加强是通过将免疫原与明矾 (Sigma, Oakville, ON) 混合注入小鼠, 过夜吸收, 每只小鼠如下表 3.1 所示。然后注入 Titermax 中的相应反应原, 再注入明矾, 随后在 PBS 中的免疫原的最后一次加强如下表 3.1 所示。特别地, 在第 0、3、7、10、14、17、21 和 24 天免疫动物。在第 19 天对动物取血以获得免疫血清并确定收获选择的效价。在第 28 天收获动物。

表 3.1 爪垫免疫时间表

分组#		1	2	3	4	5	6	7	8
#动物		5	5	5	5	5	5	5	5
小鼠品系		XMG2	XM3C-3	XMG2	XM3C-3	XMG2	XM3C-3	XMG2	XM3C-3
加强#	佐剂	免疫原		免疫原		免疫原		免疫原	
第一次	Titermax 金	EGFRvIII-300.19 细胞 + PEP3-KLH		EGFRvIII-300.19 细胞 + EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-300.19 细胞 + EGFRvIII-RbFc		EGFRvIII-RbFc	
	明矾	EGFRvIII-300.19 细胞		EGFRvIII-300.19 细胞		EGFRvIII-300.1 细胞		EGFRvIII-RbFc	
第三次	明矾	PEP3-KLH		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-RbFc	
第四次	明矾	EGFRvIII-300.19 细胞		EGFRvIII-300.19 细胞		EGFRvIII-300.19 细胞		EGFRvIII-RbFc	
第五次	明矾	PEP3-KLH		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-RbFc	
第六次	Titermax 金	EGFRvIII-300.19 细胞		EGFRvIII-300.19 细胞		EGFRvIII-300.19 细胞		EGFRvIII-RbFc	
第七次	明矾	PEP3-KLH		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-RbFc	
第八次	PBS	EGFRvIII-300.19 细胞 + PEP3-KLH		EGFRvIII-300.19 细胞 + EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-300.19 细胞 + EGFRvIII-RbFc		EGFRvIII-RbFc	
收获									

如在爪垫免疫中描述的, 初始 BIP 免疫每只小鼠用相应的免疫原以 1: 1v/v 与完全 Freund's 佐剂 (CFA, Sigma, Oakville, ON) 混合。随后的加强首先每只小鼠使用相应的免疫原 1: 1 与不完全 Freund's 佐剂 (IFA, Sigma, Oakville, ON) 混合进行,

随后是每只小鼠用 PBS 的最后加强。如下表 3.2 所示，在第 0、14、28、42、56 和 75（最后加强）天免疫动物。在第 63 天对动物取血以获得免疫血清并确定收获选择的效价。在第 78 天收获动物。

表 3.2 Bip 免疫时间表

分组	9	10	11	12	13	14	15	16
#动物	5	5	5	5	5	5	5	5
小鼠品系	XMG2	XM3C-3	XMG2	XM3C-3	XMG2	XM3C-3	XMG2	XM3C-3
加强 #	佐剂	免疫原	免疫原	免疫原	免疫原	免疫原	免疫原	免疫原
第一次	CFA	EGFRvIII-300.19 细胞+ PEP3-KLH	EGFRvIII-300.19 细胞 + EGFRvIII-ECD	EGFRvIII-300.19 细胞 +	EGFRvIII-300.19 细胞 +	EGFRvIII-RbFc	EGFRvIII-RbFc	EGFRvIII-RbFc
第二次	IFA	EGFRvIII-300.19 细胞	EGFRvIII-300.19 细胞	EGFRvIII-300.19 细胞	EGFRvIII-300.19 细胞	EGFRvIII-RbFc	EGFRvIII-RbFc	EGFRvIII-RbFc
第三次	IFA	PEP3-KLH	EGFRvIII-ECD	EGFRvIII-ECD	EGFRvIII-ECD	EGFRvIII-RbFc	EGFRvIII-RbFc	EGFRvIII-RbFc
第四次	IFA	EGFRvIII-300.19 细胞	EGFRvIII-300.19 细胞	EGFRvIII-300.19 细胞	EGFRvIII-300.19 细胞	EGFRvIII-RbFc	EGFRvIII-RbFc	EGFRvIII-RbFc
第五次	IFA	PEP3-KLH	EGFRvIII-ECD	EGFRvIII-ECD	EGFRvIII-ECD	EGFRvIII-RbFc	EGFRvIII-RbFc	EGFRvIII-RbFc
第六次	PBS	EGFRvIII-300.19 细胞+ PEP3-KLH	EGFRvIII-300.19 细胞 + EGFRvIII-ECD	EGFRvIII-300.19 细胞 +	EGFRvIII-300.19 细胞 +	EGFRvIII-RbFc	EGFRvIII-RbFc	EGFRvIII-RbFc
收获								

通过效能确定选择收获的动物

通过 ELISA 确定抗-hEGFRvIII 抗体的效价将 EGFRvIII-RbFc (2.5 μ g/ml)或对照 RbFc (2 μ g/ml)或 EGFRvIII 肽-OVA (2 μ g/ml)(实例 1)或对照 OVA (4 μ g/ml)涂到 Costar Labcoat Universal Binding Polystyrene 96 孔板(Corning, Acton, MA)上四度过夜。除去包含游离抗原的溶液并对所述板用紫外光 (365nm) 处理 4 分钟 (4000 微焦耳)。用蒸馏水洗涤所述板五次。双份 1:100 最初稀释的从 EGFRvIII 免疫的 XenoMouse® 动物或首次用于实验的 XenoMouse® 动物获得的血清 1:2 稀释后用 2% milk/PBS 滴定。最后一个孔留空。用蒸馏水洗涤所述板五次。室温下以 1 μ g/ml 的终浓度加入山羊抗人类 IgG Fc 特异辣根过氧化物酶(HRP, Pierce, Rockford, EL)结合的抗体 1 小时。

用蒸馏水洗涤所述板五次。加入 TMB 显色底物 (Gaithersburg, MD) 30 分钟将板显色, 加入 1M 磷酸终止 ELISA。XenoMouse®动物个体的特异效价由 450nm 时的光密度确定并在表 3.3 和 3.4 中展示。该效价表示免疫血清的倒数稀释, 因此该数值越大则体液免疫对 hEGFRvIII 的反应越强烈。

对于通过在尾基部皮下注射和腹腔注射的小鼠, 效价的确定正如上文所述, 除了涂有 EGFRvIII-RbFc (2.0 µg/ml)或对照 RbFc (2.5µg/ml)的平板。

表 3.3

分组 #	免疫(位点和免疫原)	小鼠品系和性别	小鼠 I.D	EGFRvIII -RbFc @ 2.5ug/ml.	对 照 -RbFc @ 2.0ug/ml.	EGFRvIII peptide-OVA 以 2.0µg/ml 涂覆	OVA 以 4.0µg/ml 涂覆
1	FP EGFRvIII-300. 19 细胞 +EGFRvIII PEP3-KLH (见 Imm.Sched.)	XMG2	0748-1	330		13549	<100
			0748-2	237		7635	<100
			0748-3	109		9824	<100
			0748-4	714		8014	<100
			0748-5	165		9421	<100
			首次用于实验的	<100		n/a	n/a
2	FP EGFRvIII-300. 19 细胞 +EGFRvIII PEP3-KLH (见 Imm.Sched.)	XM3C-3	0741-1	388		347	<100
			0741-2	327		240	<100
			0741-3	385		330	<100
			0741-4	589		227	<100
			0741-5	273		626	<100
			首次用于实验的	<100		n/a	n/a
3	FP EGFRvIII-300. 19 细胞 +EGFRvIII-EC D(见 Imm.Sched.)	XMG2	0749-1	552		<100	<100
			0749-2	477		<100	<100
			0749-3	100		<100	<100
			0749-4	100		<100	<100
			0749-5	1631		<100	<100
			首次用于实验的	100		n/a	n/a
4	FP EGFRvIII-300. 19 细胞 +EGFRvIII-EC	XM3C-3	0742-1	372		<100	<100
			0742-2	745		<100	<100
			0742-3	484		<100	<100
			0742-4	530		<100	<100

			0742-5	270		<100	<100
			首次用于实验的	100		n/a	n/a
5	FP EGFRvIII-300.19 细胞 +EGFRvIII-RbFc(见 Imm.Sched.)		0750-1	5399	175	<100	<100
			0750-2	3072	151	<100	<100
			0750-3	>6400	358	<100	<100
			0750-4	5845	196	<100	<100
			0750-5	5770	196	<100	<100
			首次用于实验的	100	100	n/a	n/a
6	FP EGFRvIII-300.19 细胞 +EGFRvIII-RbFc(见 Imm.Sched.)	XM3C-3	0743-1	1220	<100	<100	<100
			0743-2	1183	<100	<100	<100
			0743-3	645	<100	<100	<100
			0743-4	759	<100	<100	<100
			0743-5	1260	<100	<100	<100
			首次用	100	<100	n/a	n/a
分组 #	免疫 (位点和免疫原)	小鼠品系和性别	小鼠 I.D	EGFRvIII-RbFc @ 2.5ug/ml.	对 照 RbFc@ 2.0ug/ml.	EGFRvIII peptide-OVA 以 2.0µg/ml 涂覆	OVA 以 4.0µg/ml 涂覆
7	FP EGFRvIII-RbFc(见 Imm.Sched.)		0745-1	1897	<100	<100	<100
			0745-2	>6400	323	<100	<100
			0745-3	1225	<100	<100	<100
			0745-4	4047	<100	<100	<100
			0745-5	852	<100	<100	<100
			首次用于实验的	100	<100	n/a	n/a
8	FP EGFRvIII-RbFc (见 Imm.Sched.)	XM 3C-3	0744-1	362	<100	<100	<100
			0744-2	807	<100	<100	<100
			0744-3	479	<100	<100	<100
			0744-4	631	<100	<100	<100
			0744-5	1112	<100	<100	<100
			首次用于实验的	100	<100	n/a	n/a

基于血清学, 表 3.3 中所有第 5 组的 XenoMouse 动物和自第 6 组的 XenoMouse 的动物 0743-5 被选择做 XenoMax 收获。

表 3.4

分组 #	免疫 (位点和免疫原)	小鼠品系和性别	小鼠 I.D	EGFRvIII -RbFc @ 2.0ug/ml.	对 照 RbFc@ 2.5ug/ml.	以 2.0µg/ml 涂 覆 EGFRvIII 肽-OVA	OVA 以 4.0µg/ml 涂覆
9	BIP EGFRvIII-30 0.19 细胞 +EGFRvIII PEP3-KLH(见 Imm.Sched.)	XMG2	0695-1	2921		>128000	472
			0695-2	2219		30504	379
			0695-3	4609		>128000	608
			0695-4	>6400		>128000	368
			0695-5	1580		19757	269
			首次用于实验的	<100		n/a	242
10	BIP EGFRvIII-30 0.19 细胞 +EGFRvIII PEP3-KLH(见 Imm.Sched.)	XM3C-3	O700-1	<100			
			O700-2	<100			
			O700-3	>6400			
			O700-4	5342			
			O700-5	>6400			
			首次用于实验的	<100			
11	BIP EGFRvIII-30 0.19 细胞 +EGFRvIII-E CD(见 Imm.Sched.)		0696-1	<100		561	240'
			0696-2	<100		788	326
			0696-3	<100		604	266
			0696-4	143		444	263
			0696-5	<100		303	254
			首次用于实验的	<100			242
12	BIP EGFRvIII-30 0.19 细胞 +EGFRvIII-E CD(见 Imm.Sched.)	XM3C-3	O700-1	358			
			O702-2	469			
			O702-3	401			
			O702-4	>6400			
			O702-5	>6400			
			首次用于实验的	<100			

分组 #	免疫 (位点和免疫原)	小鼠品系和性别	小鼠 I.D	EGFRvIII -RbFc @ 2.0ug/ml.	对 照 RbFc@ 2.5ug/ml.	以 2.0 μ g/ml 涂 覆 EGFRvIII 肽-OVA	OVA 以 4.0 μ g/ml 涂覆
13	BIP EGFRvIII-300. 19 细胞 + EGFRvIII-RbFc (见 Imm.Sched.)	XMG2	0694-1	>6400	>6400	250	243
			0694-2	>6400	>6400	296	309
			0694-3	>6400	>6400	736	605
			0694-4	>6400	>6400	739	1111
			0694-5	3710	>6400	517	465
			首次用于实验的	<100	>6400		242
14	BIP EGFRvIII-300. 19 细胞 + EGFRvIII-RbFc (见 Imm.Sched.)	XM3C-3	O703-1	2740	>6400		
			O703-2	408	>6400		
			O703-3	1406	>6400		
			O703-4	1017	>6400		
			O703-5	403	>6400		
			首次用于实验的	<100	>6400		
15	BIP EGFRvIII-RbFc (见 Imm.Sched.)	XMG2	O697-1	>6400	>6400	340	348
			O697-2	>6400	>6400	642	1793
			O697-3	6242	>6400	319	246
			O697-4	1766	>6400	133	<100
			O697-5	>6400	>6400	685	448
			首次用于实验的	<100	>6400	243	242
16 10	BIP EGFRvIII-RbFc (见 Imm.Sched.)	XM3C-3	O701-1	592	>6400		
			O701-2	1118	>6400		
			O701-3	>6400	>6400		
			O701-4	<100	<100		
			O701-5	n/a	n/a		
			首次用于实验的	<100	>6400		

基于表 3.4 中的血清学数据, XenoMouse 动物(0695-1、0695-3 和 0695-4)被选做收获。

B 细胞的选择

来自上述动物的 B 细胞被收获并培养。分离出分泌型 EGFRvIII-肽特异性抗体, 如在 Babcook 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:7843-7848 (1996)中的描述。ELISA 被用于识别第一 EGFRvIII-肽-OVA-特异的孔。来自 XenoMouse 动物以 500 或 150 或 50 细胞

/孔的密度在 245 96 孔板中培养出了约 5 百万个 B 细胞，这些细胞在 EGFRvIII-肽-OVA 上被筛选以识别抗原特异性孔。大约有 515 个孔在背景上显示出明显的 OD，在表 3.5 中展示了一代表样品。

表 3.5

	总 #平板	截断 OD 上的正值:															
		0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
Cansera 500 细胞 /孔	12	115 2	634	81	56	49	45	38	32	29	26	25	18	11	4	1	0
Σ500 细 胞/孔	13	124 8	773	195	139	117	99	80	73	58	53	49	21	9	5	1	0
Σ500 细 胞/孔	20	192 0	130 4	478	178	91	67	55	47	45	36	33	19	9	5	2	0
总	45	432 0	271 1	754	373	257	211	173	152	132	115	107	58	29	14	4	0

OD>0.5 的 244 个 EGFRvIII-肽-OVA-Elisa 阳性孔再次在 ofEGFRvIII-肽-OVA 上并在 OVA 上筛选以验证它们的 EGFRvIII-特异性。在表 3.6 中展示这些结果的一个代表性实例。

表 3.6

平板	孔		1'EGFRvIII peptide-OVA OD	2' EGFRvIII peptide-OVA OD	OVA OD
121	G	1	0.7534	1.4065	0.135 5
121	A	7	1.3472	2.1491	0.126 8
121	D	8	0.6743	0.4179	0.153 1
121	E	8	2.0415	2.6965	0.149 8
121	H	10	0.8611	0.4288	0.159 5
121	C	12	2.1455	2.6443	0.140 4
122	H	1	1.8890	2.5987	0.116 4

122	H	5	0.5943	0.8321	0.1572
122	F	8	0.6834	0.7715	0.1450

有限抗原检定和分析

有限抗原分析是一种将 B 细胞培养基上清液中抗原特异的抗体与所有其它抗原特异抗体亲和力分级的方法。当所涂的抗原很少时，仅仅最高亲和力的抗体能够在平衡状态下与任何可检测水平相结合。（见（例如）国际专利申请案 No. WO 03/48730）

EGFRvIII 肽-OVA 被以三个浓度 7.5 ng/ml, 1.5 ng/ml 和 0.03 ng/ml 涂到平板上，并在 96 孔板上 4°C 过夜。在向平板中加入含有 0.05% 叠氮化钠的 50ul 的 1% 牛奶溶于 PBS 的溶液前，每个平板用蒸馏水洗涤 5 次，然后向每个孔中加入 4μl 的 B 细胞上清液。室温下置于摇床中 18 小时后，再次用蒸馏水洗涤平板 5 次。每孔中加入 50ul 的 1μg/ml 的山羊抗人类 (Fc) -HRP。室温下 1 小时后，再次用蒸馏水洗涤平板 5 次，并向每孔中加入 50ul 的 TMB。通过向每孔中加入 50uL 1M 的磷酸终止反应，并在波长 451nm 下阅读平板，结果在表 3.7 中展示。

表 3.7

培养基 平板	孔		有限抗原						高抗原 (1.0μg/ml)
			0.03ng/ml		1.5ng/ml		7.5ng/ml		
			OD	级别	OD	级别	OD	级别	
133	B	2	0.7670	1	1.189	54	1.871	95	2.050
124	G	12	0.7400	2	1.895	1	3.101	1	3.463
145	C	1	0.715	3	1.552	7	2.671	10	3.194
129	G	10	0.6720	4	1.367	22	2.692	8	2.977
186	B	6	0.657	5	1.842	2	2.859	3	3.411
143	F	12	0.653	6	1.677	3	2.741	6	3.156
136	E	3	0.6340	7	1.468	15	2.683	9	3.280
137	C	11	0.595	8	1.582	5	2.94	2	3.444
139	A	11	0.582	9	1.374	19	2.282	47	2.255
174	F	1	0.573	10	1.577	6	2.775	4	2.364

将有限抗原分析产生的结果与在高抗原检定中获得的总 OD 值作比较。通过将有限抗原检定中获得的 OD 值比上在高抗原检定中获得的 OD 值，完成亲和力的相对分级。具有高比率的抗体将具有高的亲和力。表 3.7 展示基于有限抗原检定 OD 值与高抗原检定 OD 值之比分级的 B 细胞培养基上清液的样品。

通过 FMAT 的幼稚细胞结合检定

分析 EGFRvIII 肽-OVA-Elisa 阳性孔上清液与 NR6 细胞 (NR6 M 细胞) 上稳定表达的 EGFRvIII 的天然形式结合的能力 (见 Batra 等人 *Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. Cell Growth Differ.*6(10):1251-9 (1995))。NR6 M 细胞以每孔 8000 细胞的密度播种, 并在 96 孔 FMAT 板中过夜孵育。然后除去并在孔中剩余 15 μ l 的介质。在孔中加入 15 μ l 的 B 细胞培养基上清液, 然后以终浓度为 1 μ g/ml 加入 15 μ l 抗人类 IgG Fc Cy5。然后将其放在 4 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时。用 150 μ l PBS 洗涤细胞, 并在 FMAT 上阅读之前进行固定。以总荧光密度表示结果 (表 3.8)。人类抗-EGFRvIII mAb 13.1.2 被用作阳性对照, 其起始浓度为终浓度 1 μ g/ml, 阴性对照为相同浓度的 PK 16.3.1。244 个样本中有 134 个被测试为与 NR6M 细胞结合, 其中 62 具有大于 8000 的总荧光值, 这 134 结合中有 6 个假阳性。

在 NR6 Wt 细胞 (NR6 细胞表达 EGF 受体) 上做相同的天然结合检定 (见 Batra 等人 *Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. Cell Growth Differ.*6(10):1251-9 (1995)) 以排除因结合到 Wt 受体的结合 (表 3.8)。ABX-EGF 被用作阳性对照且相同浓度的 PK 16.3.1 被用作阴性对照抗体。134 个 NR6 M 结合体中有 3 个与 NR6 Wt 细胞紧密结合。244 个与 Elisa 中的 EGFRvIII 肽结合的孔中有 190 个孔也结合到细胞上的天然形式。表 3.8 中给出了实例。

表 3.8

平板			1 ^{VIII} -pep-O VA OD	2 ^{VIII} -pep-O VA OD	OVA OD	天然结合 到 NR6 M 细胞的 FMAT	天然结合 到 NR6 Wt 细胞的 FMAT
174	F	1	2.4945	3.0308	0.1900	138373	1668
187	A	4	1.5337	1.2085	0.1920	128626	202459.8
132	D	8	0.8555	1.2070	0.1649	109379	0
142	C	11	2.2889	2.8194	0.2239	94944	0
129	A	7	2.1501	2.8208	0.1515	84024	0
127	E	1	2.6923	3.1986	0.1219	82031	0
124	G	12	3.2929	3.5634	0.1455	73080	0
141	C	6	0.7512	1.2567	0.1547	60816	814.5
173	C	1	2.5728	2.5714	0.2134	58702	2523.4
128	G	9	0.6293	0.7483	0.1520	49631	0

129	H	6	2.9370	3.0952	0.2582	0	0
183	E	11	2.3450	2.7717	0.1050	0	0

在表 3.8 种, 来自孔 187A4 中的上清液被识别为 Wt 结合体且 141C6 与 NR6 M 细胞结合是假阳性。孔 129H6 和 183E11 是没有天然结合的强肽结合体。

内在化检定

进一步检定前 60 个天然结合 B 细胞培养基上清液的内在化受体的能力。NR6 M 细胞被以 8000 细胞/孔的密度接种到 96 孔 FMAT 板上并过夜孵育。除去介质, 并双份地在总体积 30 μ l 介质中加入 10-15 μ l B 细胞培养基上清液。然后, 加入 15 μ l 的第二抗体(终浓度为 1.5 μ g/ml 的 SS Alexa 647 抗人类 IgG Fab) 并将该混合物在冰上孵育 1 小时。使用无关 B 细胞培养基缓冲液以了解培养基介质的效果。人类抗-EGFRvIII mAb 13.2.1 被用作阳性对照, 其起始浓度为终浓度 1 μ g/ml, 阴性对照为相同浓度的 PK 16.3.1 (人类抗 KLH IgG2 抗体)。孵育后, 用冷 PBS 洗涤细胞, 在所有孔中加入 50 μ l 介质, 一个复本在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, 而另一复本仍在冰上孵育。除去孵育介质后, 在 37 $^{\circ}$ C 孵育组加入 100 μ l 冷的 50mM 谷胱甘肽而在另一组加入 100 μ l 冷的介质, 两组均放置冰上 1 小时。然后用 100 μ l 冷的 PBS 洗涤细胞, 随后与 1% 多聚甲醛混合并在 FMAT 中阅读。结果以 % 内在化表示, 以谷胱甘肽/没有谷胱甘肽时的总荧光值 $\times 100$ 计算总荧光值。在表 3.9 中给出代表性信息。

表 3.9

孔号	无谷胱甘肽 FL1x 计数	有谷胱甘肽 FL1x 计数	% 内在化, (glut+/glut-) X 100
124 C9	1877	1394	74.3%
124 G12	26465	9959	37.6%
125 H1	14608	3686	25.2%
125 D10	2342	1236	52.8%
127 E1	15059	1318	8.7%
127 B9	12444	7109	57.1%
127 E11	6623	0	0.0%
128 G9	10071	1851	18.4%
129 A7	27648	8708	31.5%
130 B4	4558	4354	95.5%
131 H5	9258	2656	28.7%
132 D8	35820	13293	37.1%
133 F9	9773	3621	37.0%

136 F10	2392	0	0.0%
137 G6	5104	1021	20.0%
137 G10	3451	0	0.0%

EGFRvIII-特异性溶血蚀斑试验

进行本试验需要许多专用试剂。用如下方法制配这些试剂。

1. 绵羊红血细胞的生物素酰化 (SRBC)。SRBC 被贮存在 RPMI 介质中作为 25% 的贮存液。通过将 1.0ml 的 SRBC 等分到新微量离心管中获得装满 250 μ l SRBC 的细胞小球。在微离心机中用 8000rpm (6800 rcf) 的脉冲旋转沉淀 SRBC, 吸去上清, 用 1.0ml pH 8.6 的 PBS 将沉淀重新悬起, 再重复离心。重复洗涤循环 2 次, 然后将 SRBC 沉淀转移到 15ml 塑料管并用 pH 8.6 的 PBS 定容至 5ml。在单独的 50ml 塑料管中, 向 45 ml pH 8.6 的 PBS 中加入 2.5mg 的 Sulfo-NHS 生物素。一旦生物素完全溶解, 就加入 5ml 的 SRBC, 并在常温下旋转该管 1 小时。以 3000rpm 离心 SRBC 5 分钟, 并吸掉上清。将生物素酰化的 SRBC 转移到微量离心管中, 并用上述方法用 pH7.4 的 PBS 洗涤 3 次, 然后在 15ml 塑料管中用免疫细胞介质 (RPMI 1640) 定容至 5ml (5% B-SRBC 贮存液)。需使用前, 将贮存液在 4 $^{\circ}$ C 保存。

1. 用链霉抗生物素蛋白 (SA) 涂覆 B-SRBC。将 1 ml 的 5% 的 B-SRBC 贮存液转移到新微量离心管中。The B-SRBC cells were washed 3 times as above and resuspended in 1.0 ml of PBS at pH 7.4 to give a final concentration of 5% (v/v). 加入 10 μ l 10mg/ml 的链霉抗生物素蛋白 (CalBiochem, San Diego, CA) 贮存溶液, 在管内混合并在常温下旋转 20 分钟。重复洗涤步骤并用 pH7.4 1ml 的 PBS 将 SA-SRBC 再悬浮 (5% (v/v))。

3. 用 EGFRvIII 涂覆 SA-SRBC。用生物素酰化的 10 μ g/ml 的 EGFRvIII 肽-OVA 涂覆 SA-SRBC, 混合并在常温下旋转 20 分钟。用上述方法用 1.0ml 的 pH7.4 的 PBS 洗涤 SRBC 两次。用 RPMI (+10%FCS) 再悬浮 EGFRvIII 涂覆的 SRBC 并定容至终浓度 5% (v/v)。

4. 通过免疫荧光 (IF) 确定 EGFRvIII 肽-SRBC 的质量。10 μ l 的 5% SA-SRBC 和 10 μ l 的 5% EGFRvIII 肽涂覆的 SRBC 被分别加入独立的含有 40 μ l 的 PBS 的新 1.5ml 微离心管中。以 45 μ g/ml 的浓度将对照人类抗 EGFRvIII 抗体加入每个 SRBC 样品中。将这些管在常温下旋转 25 分钟, 随后用 100 μ l 的 PBS 洗涤细胞三次。用 50 μ l 的 PBS 将细胞再悬浮, 并与 40mcg/mL 的与 Alexa488 (Molecular Probes, Eugene, OR) 连接的人类 IgG Fc 抗体一起孵育。这些管在常温下旋转 25 分钟, 并随后用 100 μ l 的 PBS 洗涤, 并用 10 μ l 的 PBS 将细胞再悬浮。将 10 μ l 染色的细胞点到干净的玻璃显微镜载玻片上, 盖以玻璃盖玻片, 在荧光下观察并在任意 0-4 的范围计数。

5. 浆细胞的制备。收获先前经多种试验确定含有分泌感兴趣的免疫球蛋白的 B 细胞克隆的单个微量培养孔的内容物。使用 100-1000 μ l 的自动移液器通过加入 37C RPMI(10% FCS)收集所述孔的内容物。用移液管将细胞再悬浮, 然后转移到新的 1.5ml 微量离心管中 (最终体积约 500-700 μ l)。室温下在微量离心机中以 2500 rpm(660 rcf)的转速离心细胞 1 分钟, 并随后以 180 度旋转该管并以 2500rpm 的转速再次离心。吸取冰冻介质并用 100 μ l RPMI(10%FCS)再悬浮细胞, 并离心。重复用 RPMI(10% FCS)洗涤, 并用 60 μ l RPMI(10%FCS)再悬浮细胞并在使用前置于冰上保存。

6. 浆细胞的显微操作。提前用硅树脂边缘准备玻璃载玻片(2x3 英寸)并允许在常温下过夜保存。使用前, 用约 5ul 的 SigmaCoat (Sigma, Oakville, ON)均匀擦拭玻片的表面, 干燥后剧烈地擦拭。向每个 60 μ l 的细胞样品中加入 60 μ l 的 EGFRvIII 肽涂覆的 SRBC(5% v/v 贮存液), 在 RPMI(10%FCS)中制备的 4x 豚鼠补体(Sigma, Oakville, ON)贮存液和 4x 增强免疫血清贮存液 (用 10%FCS 在 RPMI 中 1:150 配制的)。将混合物 (10-15 μ l) 滴到准备好的玻片上并用未稀释的石蜡油覆盖液滴。将玻片在 37 $^{\circ}$ C 下至少孵育 45 分钟。The 从蚀斑识别 EGFRvIII 特异性浆细胞并通过显微操作回收(见表 3.10)。

表 3.10

孔 ID			单个细胞编号	收获的单个细胞的总量
124	G	12	EGFRvIII-SCX-105-116 (LL)	12
129	A	7	EGFRvIII -SCX-117-128 (DM)	12
174	F	1	EGFRvIII -SCX-129-137 (DM)	9
182	A	5	EGFRvIII -SCX-138-149 (LL); 162-169 (OP)	20
125	D	10	EGFRvIII-SCX-170-181 (DM); 194-201 (LL)	20
127	B	9	EGFRvIII -SCX-182-193 (LL); 202-209 (OP)	20
190	D	7	EGFRvIII -SCX-210-229 (LL)	20
130	B	4	EGFRvIII -SCX-230-249 (LL)	20
138	D	2	EGFRvIII -SCX-250-269 (LL)	20
145	C	1	EGFRvIII -SCX-80-92 (DM)	13
172	B	12	EGFRvIII -SCX-93-104 (LL)	12
187	A	4	EGFRvIII -SCX-270-281 (LL)	12
173	C	1	EGFRvIII -SCX-282-293 (BC)	12
127	E	1	EGFRvIII -SCX-294-305 (LL)	12
142	C	11	EGFRvIII -SCX-306-317 (LL)	12
孔 ID			单个细胞编号	收获的单个细胞总量
141	A	10	EGFRvIII -SCX-318-329 (BC)	12
132	D	8	EGFRvIII -SCX-330-341 (LL)	12
124	D	4	EGFRvIII -SCX-342-349 (BC)	8

单细胞 PCR、克隆、表达、纯化并鉴定重组抗 EGFRvIII 抗体。

The genes encoding the variable regions were rescued by on the 通过在单显微操作浆细胞上进行 RT-PCR 回收编码可变区域的基因。提取 mRNA 并进行逆转录 PCR 以产生 cDNA。编码可变重链和轻链的 cDNA 被用聚合酶链反应特异地扩增。将人类可变重链区克隆到 IgG1 表达载体中。通过将人类 IgG1 的恒定结构域克隆到 pcDNA3.1+/Hygro (Invitrogen, Burlington, ON) 的多个克隆位点中产生此载体。将人类可变重链区克隆到 IgK 表达载体中。通过将人类 IgK 的恒定结构域克隆到 pcDNA3.1+/Neo(Invitrogen, Burlington, ON) 的多个克隆位点中产生此载体。The heavy chain and the light chain expression vectors were then co-lipofected into a 60 mm dish of 70% confluent human embryonal kidney 293 cells and the transfected cells were allowed to secrete a recombinant antibody with the identical specificity as the original plasma cell for 24-72 hours.从 HEK293 细胞收获上清液(3mL)并用夹心 ELISA 特异地检测人类 IgG 的方法证明完整抗体的分泌(表 3.11)。使用 ELISA 通过重组抗体与 EGFRvIII 的结合评定特异性(表 3.11)。

表 3.11

mAb ID	细胞#	滴定	
		总抗体	抗原结合
129A7	SC- EGFRvIII -XG1-123/124	>1:64	>1:64
138D2	SC-EGFRvIII-XG1-250	>1:64	>1:64
174F1	SC- EGFRvIII -XG1 -131	>1:64	>1:64
182A5	SC- EGFRvIII -XG1-139	>1:64	>1:64
190D7	SC-EGFRvIII-XG1-211	>1:64	>1:64
125D10	SC-EGFRvIII-XG2-170	>1:64	>1:64
182D5	SC-EGFRvIII-XG2-150	>1:64	>1:64
141A10	SC-EGFRvIII-XG1-318	1:64	1:64
132D8	SC- EGFRvIII -XG1-333	>1:64	>1:64
124D4	SC- EGFRvIII -XG1-342	>1:64	>1:64

分泌 ELISA 测试如下进行。对于抗体分泌，将 2 μ g/mL 的山羊抗人类 IgG H+L 和用于抗原结合的 1.5 μ g/ml 的 EGFRvIII-Rab Ig Fc 融合蛋白涂覆到 Costar Labcoat Universal Binding Polystyrene 96 孔板上并保持在四度过夜。用蒸馏水洗涤所述板五次。从未稀释的小型脂质转染上清液对 7 个孔 1: 2 滴定重组抗体。用蒸馏水洗涤所述板五次。向用 1 μ g/ml Rb 抗 Hu Fc 在室温下 1 小时检测的分泌平板和结合平板以 1 μ g/mL 的终浓度加入山羊抗人类 IgG Fc 特异 HRP 结合抗体常温保持 1 小时。用蒸馏水洗涤所述板五次。加入 TMB 30 分钟将板显色，加入 1M 磷酸终止 ELISA。分析每个 ELISA 平板以确定每孔

在 450nm 时的光密度。

测序和序列分析

在两个方向对克隆的重链进行测序，并分析以确定抗体的生殖细胞系序列来源并识别与生殖细胞系序列的改变。在附图中提供了这些序列。3A-3K 和(SEQ ID NO:34-55). 在附图 4-7 中提供了每个重链和轻链序列与其来源的生殖细胞系序列的比较。另外，在附图中对来源于杂种细胞的 13.1.2 抗体的序列和其生殖细胞系序列进行了比较。4 和 5。

从本文的讨论应了解，每个 131 抗体和 13.1.2 抗体均具有对 EGFRvIII 很高的亲和性，其被细胞内在化，且当与毒素结合时表现出很高的细胞杀伤效率。有趣的是，每个抗体，即使其产生自 XenoMouse 小鼠的不同的免疫或使用不同的技术，均来源于非常相似的生殖细胞系基因。然而基于表位的定位(本文中有所讨论)，每个抗体看来与 EGFRvIII 分子上明显不同的表位结合且在对结合必要的 EGFRvIII 上具有显著不同的残基。这些结果指示，生殖细胞系基因的运用针对 EGFRvIII 的抗体治疗学很重要，且微小的改变可以更改抗体的结合和效果的事实允许了对抗体和其他基于这些结构发现的抗体治疗学的进一步设计。抗-EGFRvIII mAbs 与细胞上表达的天然 EGFRvIII 结合

在这个事例中，测量抗-EGFRvIII 抗体与 NR6 M 细胞的结合。特别地，检定来源于 XenoMax 的未定量的 IgG1 上清液与 NR6 M 和 NR6 WT 的结合能力。以 10000/孔的密度接种细胞并在 37°C 下 FMAT 96 孔板中孵育过夜。除去介质并加入 40 μ l 小型脂上清液滴定，将细胞在冰上孵育 1 小时。人类 13.1.2 EGFRvIII 抗体和 ABX EGF (E7.6.3,美国专利 No. 6,235,883)抗体作为阳性对照加入。PK 16.3.1 抗体用作阴性对照。用冷的 PBS 洗涤细胞，以 1 μ g/ml、40 μ l/孔的密度加入第二抗体 (SS Alexa 抗人类 IgG Fc) 并在冰上孵育 1 小时。然后用冷 PBS 洗涤细胞，再固定然后用 FMAT 阅读。通过计数对 NR6 WT 的筛选检测所有抗体的结合特异性。

重组抗-EGFRvIII 抗体的纯化。

为了大规模的生产，重链和轻链表达载体 (2.5 μ g 每链/平皿) 被脂质转染到十个 100mm 平皿中 70%铺满的 HEK293 细胞中。转染细胞在 37°C 下孵育 4 天，收获上清液 (6mL) 并用 6ml 的新鲜介质替代。在第 7 天，除去上清液并用初始收获合并 (自 10 个平板共 120ml)。使用蛋白质-A 琼脂糖 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 亲和层析(1mL)从上清液中纯化每个抗体。用 500mcL pH2.5 的 0.1M 甘氨酸将抗体从蛋白质-A 柱上洗涤。洗涤液在 pH7.4 的 PBS 中透析，并进行滤膜灭菌。用非还原 SDS-PAGE 分析抗体以评定其纯度和产量。也用 OD250 的紫外线分析测量浓度。

通过重组抗-EGFRvIII mAb 的 EGFRvIII 受体内在化

如前所述，表达、纯化并定量 XenoMax 来源的 IgG1 重组抗体。进一步检定抗体在 NR6 M 细胞内在化 EGFRvIII 受体的能力。250,000 NR6 M 细胞与第一抗体 (SC95、SC131、SC133、SC139、SC150、SC170、SC211、SC230、SC250 和作为对照的人类 13.1.2) 一起以 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度在 96 孔 v 底平板上在冰上孵育 7 分钟，有这样的三个复本。用冷的 10% FCS 的 PBS 洗涤细胞并加入 3 $\mu\text{g/ml}$ Fab 的第二抗体 (SS Alexa 抗人类 IgG Fab) 并在冰上孵育 7 分钟。用冷的含有 10% FCS 的 PBS 洗涤细胞一次并随后用冷介质再悬浮。然后，三个复本中的两组在 37°C 孵育而剩下的一组在 4°C 孵育 1 小时。此后，在 4°C 孵育的细胞和在 37°C 孵育的一组细胞在冰上用谷胱甘肽处理 (如前文所提及) 1 小时。然后用 100 μl 冷的含有 1% FCS 的 PBS 洗涤并再悬浮细胞，并用 FACS 分析。从自 FACS 分析获得的几何均数计算 % 内在化 $[(37^\circ\text{C}$ 用谷胱甘肽处理的平均数 - 4°C 用谷胱甘肽处理的平均数) / (37°C 不用谷胱甘肽处理的平均数 - 4°C 用谷胱甘肽处理的平均数)]。NA 意味着进行了 FACS 分析但数据并不在表 3.12 中提供。

表 3.12

mAb	FACS 几何平均值			%内在化
	没用谷胱甘肽 37°C	用谷胱甘肽 37°C	用谷胱甘肽 4°C	
13.1.2	22.12	19.19	5.38	82.5%
sc95	22.56	17.75	5.13	72.4%
sc131	NA	NA	NA	72%
sc133	23.39	18.63	6.24	72.2%
sc139	22.64	19.23	4.88	80.8%
sc150	20.29	7.78	4.66	20.0%
sc170	19.97	7.75	4.67	20.1%
sc211	20.76	8.23	4.78	21.6%
sc230	20.68	7.97	5.02	18.8%
sc250	24.13	8.07	4.84	16.7%

13.1.2 是一个通过先前针对 EGFRvIII 表位的杂种细胞产生 (实例 2) 而产生的抗体并作为本试验中的一个阴性对照。表 3.12 的这些结果显示了两亚组抗体：有效地内在化的那些 (70-80%) 和没有内在化的那些 (22% 或更少)。

实例 4 人类抗 EGFRvIII 抗体的表位的定位

为了确定本发明的特定抗体结合的表位，抗 EGFRvIII 的 6 个人类的和 3 个鼠科动

物的单克隆抗体 (mAb) 使用来自特异 EGFRvIII 的肽序列的合成肽进行定位。定位的抗体为来源于人类杂种细胞的抗 EGFRvIII 13.1.2 抗体、来源于人类 XenoMax 的抗 EGFRvIII 131、139、250、095 和 211 抗体以及鼠科动物抗 EGFRvIII H10、Y10 和 B9 抗体。

使用的方法为常规 SPOT 肽阵列(Sigma Genosys)以研究人类抗 EGFRvIII 抗体与其肽表位间的分子相互作用。SPOTs 技术是基于以适合抗体表位系统分析的肽固相合成。常规阵列寡肽的合成可从 Sigma-Genosys 购得。从 Sigma-Genosys 订购来自 EGFRvIII 可变氨基酸序列的重叠寡肽的一肽阵列。

一系列九个 12-mer 肽作为聚丙烯膜上的蚀斑合成。肽阵列跨 EGFRvIII 序列的残基 1-20, 代表胞外 wtEGFR 结构域的氨基酸 6-273 的缺失, 和在连接点甘氨酸 (G) 的产生。每个连续肽用一个残基衍生自前一个肽, 产生一阵列寡肽的嵌套的、重叠的库。带有 9 个肽的膜与 9 个不同抗 EGFRvIII 抗体 (1µg/ml) 反应。通过酶连接免疫吸附试验使用结合的 HRP 第二抗体然后用增强的化学发光 (ECL) 评定 mAb 与膜结合肽的结合。在表 4.1 中展示所用的阵列。

表 4.1 蚀斑阵列序列:

1.	ALEKKKGNVVT (SEQ ID NO:72)
2.	LEEKKKGNVVT (SEQ ID NO: 59)
3.	EEKKKGNVWTDH (SEQ ID NO: 73)
4.	EKKKGNVWTDHG (SEQ ID NO: 74)
5.	KKKGNVWTDHGS (SEQ ID NO: 75)
6.	KGNVWTDHGSC (SEQ ID NO: 76)
7.	GNVWTDHGSCV (SEQ ID NO: 77)
8.	NVVWTDHGSCVR (SEQ ID NO: 78)
9.	VVWTDHGSCVRA (SEQ ID NO: 79)

此外, 通过组和丙氨酸筛选定位功能性表位。I 在这一过程中, 使用一组合丙氨酸筛选方法识别 EGFRvIII 肽中对与抗 EGFRvIII mAb 相互作用必需的氨基酸。为达到这目标, 订购第二组 SPOT 阵列用于丙氨酸筛选。如上述扫描 12 个残基中的有丙氨酸取代的可变肽的面板。蚀斑#1, 未变异的序列, 为抗体结合的一个阳性对照。在表 4.2 中展示所用的阵列。

Table 4.2 丙氨酸筛选阵列:

1.	LEEKKKGNVVT (SEQ ID NO: 59)
2.	AEEKKKGNVVT (SEQ ID NO: 80)

3.	LAEKKGNYVVTD (SEQ ID NO: 81)
4.	LEAKKGNYVVTD (SEQ ID NO: 82)
5.	LEEAKGNYVVTD (SEQ ID NO: 83)
6.	LEEKAGNYWTD (SEQ ID NO: 84)
7.	LEEKKANYVVTD (SEQ ID NO: 85)
8.	LEEKKGAYWTD (SEQ ID NO: 86)
9.	LEEKKGNAVVD (SEQ ID NO: 87)
10.	LEEKKGNYAVTD (SEQ ID NO: 88)
11.	LEEKKGNYVATD (SEQ ID NO: 89)
12.	LEEKKGNYVVAD (SEQ ID NO: 90)
13.	LEEKKGNYWTA (SEQ ID NO: 91)

所有 9 个 mAb 对人类 EGFRvIII 的表位通过 SPOT 程序定位识别。所有 9 个抗体均可与所述肽反应。在表 4.3 中显示了用 3 个鼠科动物抗体和 6 个来源于 XenoMouse 小鼠的人类抗体获得的结果。突出显示的残基为我们变异成丙氨酸且通过测试的抗体取消结合的残基。因此这些为结合到抗体上的相关残基。

表 4.3

EGFR	A	T	C	V	K	K	C	P	R	N	Y	V	V	T	D	H	G	S	C	V	R	A	SEQ ID NO: 92
EGFRvIII				L	E	E	K	K	G	N	Y	V	V	T	D	H	G	S	C	V	R	A	{SEQ ID NO: 93}
13.1.2					E	E	K	K	G	N	Y	V	V	T									(SEQ ID NO: 94)
131					E	E	K	K	G	N	Y	V	V	T									(SEQ ID NO: 94)
139				L	E	E	K	K	G	N	Y	V	V	T	D								(SEQ ID NO: 95)
250				L	E	E	K	K	G	N	Y	V	V	T	D								(SEQ ID NO: 95)
095											Y	V	V	T	D	H						(SEQ ID NO: 96)	
211											Y	V	V	T	D								(SEQ ID NO: 97)
H10											Y	V	V	T	D								(SEQ ID NO: 97)
Y10					E	E	K	K	G	N	Y	V	V	T									(SEQ ID NO: 98)
B9									G	N	Y	V	V	T									(SEQ ID NO: 99)

表 4.3 中展示的有阴影的氨基酸为对抗体识别最相关的抗原识别位点的残基。使用重叠序列的肽精确定位所有十个 mAb 的表位的最短长度，且通过用丙氨酸系统地取代表位中的每个残基确定 mAb 与变异表位结合的容许度。

在表 4.4 中，总结了抗体的附加特征。特别地，非还原或还原条件下在聚丙烯酰胺凝胶电泳的 Western 平板中测试一亚组抗体对肿瘤细胞系裂解液的结合。还包括纯化的重组蛋白。在还原和非还原条件下结合的抗体表明表位为线性的。样品识别：

EGFRvIII-兔 Fc 融合蛋白

H1477-用 EGFRvIII 表达构建转染的 H80 人类肿瘤细胞系。这些细胞表达 EGFR 和

EGFRvIII。

EGFR-纯化的野生型 EGFR 蛋白。

A431—仅表达野生型 EGFR 的人类肿瘤细胞系

A459—仅表达野生型 EGFR 的人类肿瘤细胞系

H80—仅表达野生型 EGFR 的人类肿瘤细胞系

EGFR Biacore-作为一对特异性的高敏感测试，在 Biacore 中测试 mAb 与纯化的 EGFR 的结合

表 4.4

mAb	EGFRvII I Western (幼稚)	rEGFRvIII Western (还原)	EGFRvII I FACS	H1477 Western (幼稚)	H1477 Western (还原)	pep3 Kin'ExA	EGFR Western (幼稚)	EGFR Western (还原)
13.1.2	+	+	+	+	+	25 pM	-	-
131	+	+	+	+	+	0.05 pM	-	-
139	?	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
095	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
211	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
250	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND

MAb	EGFR Biacore	A431 FACS	A431 Western (幼稚)	A431 Western (还原)	A549 FACS	A549 Western (幼稚)	A549 Western (还原)	H80 FACS	H80 Western (幼稚)	H80 Western (还原)
13.1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
131	-	++	-	-	+	-	-	-	-	-
139	N.D.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
095	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
211	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
250	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

结果显示大多数 mAb 具有本质上相同的结合特异性，七个 mAb 显示与可变 EGFRvIII 的结合特异性，同时在纯化蛋白的 Western 印迹和 A431 细胞的裂解液中 2 个 mAb 与野生型 EGFR (鼠类 H10 和人类 211)交叉反应。注意，然而，尽管在 Western 印迹中抗体 211 与幼稚及还原的纯化 EGFRvIII 均结合，其与非还原蛋白的结合稍强。在对 A431 细胞裂解液的测试中，抗体 211 在非还原样品中与一群野生型 EGFR 强烈结合，但在还原样品中没有信号。这表明抗体 211 的结合是由于在野生型 EGFR 中的构象表位，且在 EGFRvIII 中表现不同。5 个 mAb 的表位在跨 EGFRvIII 可变特异性甘氨酸残基的残

基 2-12 内，然而 4 个 mAb（包括 H10 和 211）跨 EGFRvIII 和野生型 EGFR 共有的残基 7-16。在 FACS 中抗体 131 与 A431 和 A549 细胞结合。这些细胞对 EGFRvIII 表达呈阴性而对 EGFR 表达呈阳性。在 Western 中抗体 131 不与非还原或非还原纯化的 EGFR 或还原或非还原 A43 及 A549 细胞裂解液结合表明抗体 131 可能与在一些人类肿瘤细胞系的细胞表面表达的可变 EGFR 结合。这些变体对变性敏感。

实例 5

体外抗 EGFRvIII 抗体的特异性

通过对用野生型或变异 EGFR 转染的 NR6 细胞进行 FACS 分析确定纯化抗体的特异性。用 5 μ g/ml 对应抗体将细胞在冰上孵育 1 小时，用 FACS 缓冲液洗涤，并随后用 PE 结合的山羊抗人类 IgG 孵育。

实例 6

与扩增的 EGFR 的交叉反应性

显示针对可变 EGF 受体的抗体在发生基因扩增的细胞上与野生型 EGF 受体的亚组交叉反应 (Johns et al., Int. J. Cancer. 98:398, 2002)。为确定人类 EGFRvIII 抗体识别是否具有相似的特性，在培养基中对其识别多种细胞上的野生型 EGF 受体的能力进行测试。用指定细胞系与抗体在 4 $^{\circ}$ C 下孵育。用 FACS 缓冲液洗涤后，加入结合有 phycoerythrin 的第二抗体，并继续孵育。所有分析的细胞系都表达野生型 EGFR。通过抗体在 A431 和 SF-539 细胞上而不在 A498 或 SKRC-52 细胞上的的抗体 XG1-131 识别野生型 EGFR 的亚组。另一 EGFRvIII 的抗体 13.1.2 并不识别野生型 EGFR 的亚组。综合考虑这些数据，表明仅针对变异 EGFRvIII 的抗体的亚组能够识别细胞表面的野生型 EGRF。特定的针对变异 EGFRvIII 的抗体识别野生型 EGF 受体的亚群的能力并不依赖于总 EGFR 密度但可能表示对肿瘤细胞特异的新构象表位。针对 EGFRvIII 的抗体与野生型受体的亚群交叉反应的能力可能由变异受体结点内的特异表位和对此独特决定基的抗体的亲和力共同决定（见本文中表位定位和亲和力确定部分的结果）。

实例 7 体内抗 EGFRvIII 抗体的特异性

抗体与细胞系的结合

这些纯化抗体的特异性通过在细胞系的面板上进行 FACS 分析确定。细胞系使用的是：H80-人类胶质母细胞瘤细胞系、表达高水平 EGFRvIII 的 H1477 (H80-EGFRvIII)、A431-人类表皮肿瘤细胞系和 A549-人类肺肿瘤细胞系。所有细胞系均来自 Dr. Bigner 除了来自 ATCC (Rockville, MD, U.S.A) 的 A431 和 A549。用 10 μ g/ml 对应抗体将细胞在冰上孵育 30 小时，用 FACS 缓冲液洗涤，并随后用来自 Jackson ImmunoResearch (West

Grove, PA, U.S.A.) 的 PE 结合的山羊抗人类 IgG 孵育。在图 9A-9L 和 10A-10D 中, 暗的柱状图显示用无关 IgG 染色的细胞, 轮廓图或白色柱状图表示相关抗体的染色。

抗 EGFRvIII 抗体 13.1.2、131 和 139 与转染细胞系上的 EGFRvIII 蛋白结合。在图 9M-9P 中显示总结一些结果的图。

显示针对可变 EGF 受体的抗体在发生基因扩增的细胞上与野生型 EGF 受体的亚组交叉反应 (Johns et al., *Int. J. Cancer.* 98:398, 2002)。在这个实例中, 用 XG1-131 和 XG1-139 对 A431 和 A549 染色。图 10B 和图 10C 展示 131 和 139 具有与野生型 EGFR 特定的交叉反应性, 而不是仅识别 H80、A431 和 A549 细胞系的亚群。然而, 此交叉反应性仅在这些细胞系上染色的 ABX-EGF(E7.6.3) 的水平 10%。结果在图 9A-9P 和 10A-10D 中提供。

针对细胞表面抗原的抗体可被用作将药物或毒素特异地输送到细胞的输送载体。如果此抗体刺激抗原的内化, 也许在药物或毒素从抗体断裂后, 药物或毒素可导致细胞的死亡。这一机制可用于在动物或患者体内特异地杀伤肿瘤细胞。选择可以将药物输送到细胞的抗体的方法是通过二级细胞毒性试验。在这些试验中, 第一抗体与细胞表面结合并加入与药物或毒素结合的第二抗体。如果第一抗体刺激抗原内化, 第二抗体将共内化, 一旦药物或毒素断裂便导致细胞杀伤。

实例 8 二级细胞毒性试验

在下列研究中, EGFRvIII-特异抗体被用来将与第二抗体结合的毒素导向胶质母细胞瘤细胞系 (H80) 和 EGFRvIII 转染的胶质母细胞瘤细胞系 (H1477)。来自 Pharmingen (BD Biosciences Pharmingen) 小鼠抗人类 IgG (cat#555784) 与毒素 AEFP (Seattle Genetics, Inc.) 和美登素 (DM1, Immunogen Inc.) 结合以产生 mah-AEFP (鼠类抗人类 IgG-AEFP) 和 mah-DM1 (鼠类抗人类 IgG-DM1)。结合由皂草素蛋白的山羊抗人类 IgG, Hum-ZAP (TM, cat # IT-22-250, 亲和纯化的山羊抗人类 IgG-皂草素蛋白) 是来自 Advanced Targeting Systems (San Diego, CA, U.S.A.)。H80 和 H1477 细胞以每孔 100 μ l 生长介质中 1000 细胞的浓度平板接种在 96 孔板上。24 小时后, 将第一抗体与第二抗体 1:3 混合, 连续地在 6 个空中 1:5 稀释。100 μ l 稀释的第一抗体和毒素第二抗体混合物以第一抗体的最终初始浓度 0.1 μ g/ml、第二抗体的最终初始浓度 0.3 μ g/ml 加入细胞的孔中。允许这些平板继续培养 3 天。在第四天, 加入购自 Promega (Madison, WI, U.S.A.) 的 CellTiter-Glo 试剂 (cat #G7571) 并用荧光阅读。图 11A-11I、12A-12I 和 13A-13I 显示这个实验的结果。在大多数 EGFRvIII 特异 mAb 测试中比较在 H1477 (填圆圈) 与在 H80 (填方块) 的 Hum-ZAP 为介质的抗原特异杀伤。MAb XG1-131 和 XG1-139 用 mah-AEFP

产生抗原特异二级杀伤，在较小范围用 mab-DM1。在测试的抗体中，XG1-131 至少在一个记录中比 13.1.2、XG1-095、XG1-139、XG1-150、XG1-170、XG1-250 和 XG1-211 有更好的表现。IgG1 被用作阴性对照且将抗原阳性细胞（H1477）与抗原阴性细胞（H80）进行比较。

需要的特异杀伤的量可视特定的使用而改变。在一个实施例中，任何可能的癌细胞的减少都是足够的。例如，0-1、1-5、5-10、10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90、90-95、95-99 或 100% 目标细胞的减少将是足够的。在另一个实施例中，期望的目标细胞数量的减少还是抗体组合的非特异性破坏的一个功能。例如，如果有很少的抗体的非特异性目标和破坏，仅具有 10% 目标细胞数目减少的抗体/毒素组合可能就足够了。例如，抗体/毒素混合物杀伤低于非目标群的 10%。同样，特定的量将取决于特定需要和情况。特别有用的抗体是那些对目标细胞（例如 H1477）具有高选择性并与目标细胞良好结合的。在一个实施例中，目标为 EGFRvIII 蛋白或其片段。在一个实施例中，展示了人类或人源化的、可有效内在化的、对 EGFRvIII 蛋白或其片段特异的、与 EGFRvIII 蛋白或片段紧密相连且与有效的毒素相连的抗体。

实例 9 二级细胞毒性试验

除了细胞毒性试验之外，还在产克隆试验中测试了 EGFRvIII 特异性抗体。特异 EGFRvIII 抗体将与毒素结合的第二抗体导向 EGFRvIII 转染胶质母细胞瘤细胞系（H1477），毒素在细胞内被释放，且最终降低了细胞增殖形成克隆的能力。因此，当细胞在第一和二级毒素抗体处理后被再次平板接种时，这些 EGFRvIII 抗体-毒素的应用产生克隆数量的减少。在这个实例中，H80 和 H1477 细胞被以每孔 30,000 细胞的密度再次平板接种到 6 个平板上并过夜孵育。第一抗体和二级毒素抗体以 1:3 的比例混合。将此抗体混合物以第一抗体 0.5 μ g/ml、第二抗体 1.5 μ g/ml 的终浓度加入合适的孔中。在 37 $^{\circ}$ C 过夜孵育。孵育后，合适地处理该毒素混合物，且用 1x 胰蛋白酶将细胞从中分离。细胞被计数并以每板 200 细胞的密度平板接种到新的 6 孔板中。平板接种对应每个处理组的三个复本。在 37 $^{\circ}$ C 孵育这些平板 2-3 周，直至形成克隆且可以用肉眼或显微镜下识别。吸出介质并加入 5M 亚甲基蓝 1 小时。用水洗涤平板并计数克隆。图 14A 和图 14B 展示这个实验的结果。可见，就测试的三种 EGFRvIII 抗体，mab-AEFP 二级毒素抗体抑制了克隆形成。

实例 10 抗 EGFRvIII 抗体(13.1.2)

细胞毒性试验中的直接结合

通过抗体与细胞毒药物的直接结合提供了一个抗体能够将一个药物输送到一个肿

瘤细胞的进一步证据。在下列实例中，EGFRvIII 抗体 13.1.2 直接与 auristatin E MMAE，与 AEFPP 通过肽键结合（MMAE 和 AEFPP 均购自 Seattle Genetics 且在上文中有所描述），且与美登素（DMI）以硫醇键结合（DMI 购自 Immunogen 且在上文中有所描述）。一旦向表达 EGFRvIII 抗原 H1477 的细胞中加入结合物，便观察到特异的细胞毒性。不表达抗原 H80 的细胞仅在当暴露于非常高浓度的抗体时才被杀伤。在图 15A-15C 中展示此试验的结果。

EGFRvIII 抗体与药物或毒素的直接结合是用于治疗特别有优势的方法。因此，最初的试验显示这样的结合确实导致表达 EGFRvIII 的细胞的特异杀伤。

实例 11 体内抗 EGFRvIII 抗体特性。

一种确定抗体是否能够将细胞毒性药物输送到细胞的可选方法是评价结合抗体在体内的人类肿瘤的生长效果。本实例提供了这样一个方法。在体外培养 H1477 成神经胶质瘤细胞，通过胰蛋白酶收获，并如下文所解释埋在基质胶中。向雌性裸鼠体内皮下注射五百万细胞，并允许肿瘤发展直至其达到约 0.5cm³ 的大小。此时将动物随机分组，并开始用指示浓度的结合抗体每 4 天一次皮下注射的处理。图 16 中的结果显示抗体 13.1.2 当与美登素（dEGFR-DM1）或 auristatin E(dEGFR-MMAE)结合时可导致胶质母细胞瘤的退化。如果与相等的未结合的药物一同给药时，（组 2），对肿瘤生长没有影响，说明体内定向肿瘤细胞需要抗体与毒素的结合。

上文使用的动物模型由将 H1477 细胞异种移植物注入裸鼠获得。将不同量的细胞单独或与 MATRIGEL 一同注入 8 周 nu/nu 雌性小鼠中，几天后分析肿瘤植入。从这个分析中，识别允许大约尺寸肿瘤的细胞数量为在 MATRIGEL 中约 22 天的五百万细胞。组 G8 作为对照被包括，用于展示杀伤是抗体特异的。组 G7 作为阴性对照被包括。

因此发展出下列用于毒素研究的一个方案：

第 1 天：在 MATRIGEL 中的 5 百万个肿瘤细胞被植入 8 周大雌性小鼠。第 22 天：如表 11.1 所展示，通过 I.V. 每四天用抗体前药处理。

表 11.1

组	小鼠编号	处理
G1	8	13.1.2-DM1 250 μg 每 4 天，通过 IV。
G2	8	13.1.2-DM1 75 μg 每 4 天，通过 IV。
G3	9	13.1.2-MMAE 75 μg 每 4 天，通过 IV。
G4	8	13.1.2-MMAE 250 μg 每 4 天，通过 IV。
G5	9	13.1.2-AEFP 75 μg 每 4 天，通过 IV。

G6	8	13.1.2-AEFP 250 µg 每 4 天, 通过 IV。
G7	8	PBS 每 4 天, 通过 IV。
G8	9	13.1.2 (未结合) 250µg +美登素 4µg

结果在图 16 中展示, 箭头指示药物的添加。组 G1、G6 和 G4 展示了有效的杀伤。组 G3 展示较少量的杀伤。组 G8 和 G7 未展示出杀伤。在高剂量的 vc-AEFP 组-组 G8 中可能观察到一定的毒性。这些动物接受两次 250 µg 的处理和一次 125 µg 的处理。

实例 12 在癌症患者/人类肿瘤中的 EGFRvIII

EGFRvIII 在人类肿瘤上的表达通过从多个癌症患者和已知特异结合 EGFRvIII 的 2 个鼠类单克隆抗体 (B9, IgG1 和 Y10, IgG2 (Dr. Bigner, Duke University)) 的结合的冰冻组织部分的染色确定。相同部分用同型匹配的对照抗体染色。表 12.1 中展示了从患者样品中获得的染色结果的总结。

表 12.1

肿瘤类型	样品大小(N)	EGFRvIII>+	EGFRvIII>++
成神经细胞胶质瘤	8	100%	100%
乳癌	100	31%	24%
NSCL 癌	51	47%	39%
头颈癌	21	42%	38%
前列腺癌	22	4.5%	4.5%

EGFRvIII>+:包括所有表达 EGFRvIII 的肿瘤

EGFRvIII>++:包括至少表达 10%或更多 EGFRvIII 的肿瘤表达主要在细胞膜及/或细胞质上发现。显著数量的乳(31%)、NSCL (47%)和头颈(42%)癌样本染色呈 EGFRvIII 阳性。在特定例子中, 为了获得高质量的 IHC 染色, 两个抗体的使用可能比用一个抗体更好。冰冻组织样本比固定组织更好。

所述领域的技术人员应了解, 在使用治疗的抗体之前测试患者以确保持处理的肿瘤表达 EGFRvIII 是有利的。

实例 13 体内抗 EGFRvIII 抗体特性

实例 11 的方法将被用来处理肺癌和神经胶质瘤。这将通过制作动物模型广泛检测。用于成神经胶质瘤和肺癌的动物模型如下形成: 将表达 wt-EGFR 的肺癌细胞用 EGRFvIII 转染。将细胞注入 nu/nu 小鼠的肺中, 允许肿瘤发展到与上文可比较对阶段。抗 EGFRvIII 结合物随后每 1 至 10 天 (视需要) 被皮下注入。将对这些癌细胞继续生长的大小、阻

碍或压抑进行监控，以确定这些抗 EGFRvIII 抗体和抗体-毒素结合物的效果。所述领域的技术人员应了解，本文揭示的任何抗体都可以这么做。

实例 14 通过取代分析分析肽的功能特性

为了进一步解决这些对 EGFRvIII 表位不可缺少的氨基酸残基的识别，进行对表位肽的氨基酸残基的取代分析。起始位点为来自实例 4 的序列 LEEKKGNVYVTD (SEQ ID NO 59)。在这个实例中，定位的表位的每个氨基酸被逐个由 20 个 L 型氨基酸取代，因此，合成所有可能的单位点类似物，并进行筛选以提供肽结合模式的详细信息。离散取代模式被用于 mAb 131 and 13.1.2 的识别。结果在表 14.1 中总结。

表 14.1

mAb	识别序列
131	EEKKG NYVVT (SEQ ID NO: 57)
13.1.2	EEKKG NYVVT (SEQ ID NO: 57)

其显示，mAb 13.1.2, 5 残基对结合(粗体)很重要，尽管只有 4 个残基对于 mAb 131 的结合是必须的。剩下的残基被多种氨基酸取代而没有显著的结合的丢失。尽管在序列和长度上 131 和 13.1.2 是相同的，但其结合模式不同。MAb 131 的结合对残基 EKNY (SEQ ID NO: 60)有很强的依赖性。另一方面，数据显示残基 EEKGN (SEQ ID NO: 61)涉及在 mAb13.1.2 的结合。

实例 15 mAb 链改组

改组 MAb131 和 13.1.2 的重链和轻链，并将其瞬间转染到 293T 细胞。七十二小时后，收集上清液并用 ELISA 进行分泌及 EGFRvIII 结合试验。

结果显示抗体来源于有 13.1.2 κ 链的 131 重链的表达，反之亦良好地表达，但由于两种 EGFRvIII 抗原的抗体不同的结合模式结合活性下降了 75% (数据未显示)。这显示了 131 和 13.1.2 mAb 互补位的不同，再次暗示在两种 mAb 选择的表位的结构特征是不同的。

实例 16 131 及其互补位的分子模型化

本实例表明如何可以产生实施例蛋白的三维结构。抗体 131 的可变区的三维结构模型通过一个同源模型化方法产生，所述方法使用 Accelrys (San Diego, CA) 的 InsightII 模型化包装。根据以下所描述的表 16.1 的可变区的序列构建模型。残基的编号方式从轻链氨基酸开始，并延续至重链氨基酸。

表 16.1

轻链可变区

DTVMTQTPLSSHVTLGQPASISC	(SEQ ID NO: 100)
RSSQSLVHSDGNTYLS (CDR1)	(SEQ ID NO: 101)
WLQQRPGPPRLLIY	(SEQ ID NO: 102)
RISRRFS (CDR2)	(SEQ ID NO: 103)
GVPDRFSGSGAGTDFLTLEISRVEAEDVGVYYC	(SEQ ID NO: 104)
MQSTHVPWT (CDR3)	(SEQ ID NO: 105)
FGQTKVEIK	(SEQ ID NO: 106)

重链可变区

QVQLVESGGGVVQSGRSLRSLCAASGFTFR	(SEQ ID NO: 107)
NYGMH (CDR1)	(SEQ ID NO: 108)
WVRQAPGKGLEWVA	(SEQ ID NO: 109)
VIWYDGSDKYYADSVRG (CDR2)	(SEQ ID NO: 110)
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 111)
DGYDILTGNPRDFDY (CDR 3)	(SEQ ID NO: 112)
WGQGTLVTVSS	(SEQ ID NO: 113)

使用抗体 131 的序列在蛋白数据库 (Protein Data Bank) 中搜索, 以识别出同源抗体及其结构。在相似与 131 抗体的同源抗体序列的基础上, 选择了一些结构。从蛋白数据库中选到的用于模型化样品的结构具有蛋白数据库识别号: 1HEZ、2H1P、1AQK、1DQL、1MF2 和 1FLR。随后重叠比对这些模板结构并用于产生这些模板的基于结构的序列比对。随后将抗体 131 可变区的序列与模板序列比对。使用结构与序列的比对结果用于产生 131 抗体可变区的分子模型。CDR1 序列的轻链是: RSSQSLVHSDGNTYLS (SEQ ID NO 103)。CDR2 序列的轻链是: RISRRFS (SEQ ID NO 103)。CDR3 序列的轻链是: MQSTHVPWT (SEQ ID NO 105)。CDR1 序列的重链是: NYGMH (SEQ ID NO 108)。CDR2 序列的重链是: VIWYDGSDKYYADSVRG (SEQ ID NO 110)。CDR3 序列的重链是: DGYDILTGNPRDFDY (SEQ ID NO 112)。

抗体 131 的互作表面是根据结构模型计算的并在图 11 中显示。不同 CDR 识别如下: L1 (轻 CDR1) 10、H1 (重 CDR1) 20、L2 30、H2 40、L3 50 和 H3 60。所预测的抗体 131 互作表面的一个显著特征是一个深洞。深洞主要由重链 CDR2、CDR3 和轻链 CDR3 所环绕, 并且其一小部分归因于轻链 CDR1。所述洞可能是结合凹穴。在 5 埃的结合洞内是残基 31、37、95-101、143-147、159、162-166、169-171、211-219、221 和 223。

这些残基可能包含互补位并在结合 EGFRvIII 互补位时起到关键接触的作用。这些残基通常还可能提供结合位点的主要结构特征。

实例 17 证实抗体 131 的模型的位点定向突变发生

本实例证明了一个方法，通过这个方法可以测试认为残基在结合中是重要的模型。本实例还引出一些抗体变体。通过引入至 mAb 131 重与轻链的单独残基突变产生了 131 克隆的抗体变体。随后分析这些变体以确定点突变的所替换侧链怎样影响抗原结合。

在 mAb 131 重与轻链进行了改变。在重链上，通过位点定向突变发生使 L216 改变成 R。在轻链上，V99 改变成 F。影响了变体抗体表达与分泌的两种突变与野生型序列进行了比较。两种突变都引起了 mAb 变体结合 EGFRvIII 抗原的损耗。因为这些残基分别替换成 R 和 F 引起了活性的降低，所以这证明了 L216 和 V99 可能与 EGFRvIII 抗原显著的接触。当然，这些替换破坏抗体的普通结构，因此其一直是一个选择。

实例 18

13.1.2 及其互补位的分子模型化

13.1.2 抗体可变区的三维结构模型通过一个同源模型化方法产生，所述方法使用 Accelrys (San Diego, CA) 的 InsightII 模型化包装。使用已发表的 x 光晶体结构作为模板，根据下表 18.1 所示的可变区序列构建模型。

表 18.1

轻链可变区 (1-113)	
DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISC	(SEQ ID NO:114)
RSSQSLVHSDGNTYLS (CDR1)	(SEQ ID NO:101)
WLHQRPGQPPRLLIY	(SEQ ID NO:115)
KISNRFS (CDR2)	(SEQ ID NO:116)
GVPDRFSGSGAGTAFTLKISRVEAEDVGVYYC	(SEQ ID NO:117)
MQATQLPRT (CDR3)	(SEQ ID NO:118)
FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:119)
重链可变区 (114-234)	
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	(SEQ ID NO:120)
SYGMH (CDR1)	(SEQ ID NO:121)
WVRQAPGKGLEWVA	(SEQ ID NO:122)
VIWYDGSNKYYVDSVKG (CDR2)	(SEQ ID NO:123)
RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:124)
DGWQQLAPFDY (CDR3)	(SEQ ID NO:125)

WGQGTLVTVSSA

(SEQ ID NO:126)

CDR1 序列的轻链是: RSSQSLVHSDGNTYLS (SEQ ID NO:101)。CDR2 序列的轻链是: KISNRFS (SEQ ID NO:116)。CDR3 序列的轻链是: MQATQLPRT (SEQ ID NO:118)。CDR1 序列的重链是: SYGMH (SEQ ID NO:121)。CDR2 序列的重链是: VIWYDGSNKYYVDSVKG (SEQ ID NO:123)。CDR3 序列的重链是: DGWQQLAPFDY (SEQ ID NO:125)。

使用抗体 13.1.2 的序列在蛋白数据库中搜索, 以识别出同源抗体。根据其序列与抗体 13.1.2 的相似性, 选择了具有蛋白数据库识别号 1HEZ、2H1P、8FAB 和 1AQK 的结构作为模型化模板。重叠比对这些模板结构并用于产生这些模板的基于结构的序列比对。随后将 13.1.2 抗体可变区的序列与模板序列比对。使用结构与序列的比对结果用于产生抗体 13.1.2 可变区的分子模型。

计算模型的互作表面并在图 12 中显示。13.1.2 模型的一个主要特征是在 CDR 区的表面上具有一个长且窄的沟槽。所述沟槽由重链 CDR2 140、CDR3 160 和轻链 CDR1 110、CDR2 130 和 CDR3 150 所勾画。沟槽的一段接触轻链 CDR3 150 的剩余部分, 并且另外一段在靠近重链-轻链界面处打开重链 CDR3 160 的较宽区域。所述沟槽可能是抗原的结合凹穴。在 5 埃的结合洞内是残基 31、33、35-39、51、54-56、58-61、94-101、144-148、160、163-166、172 和 211-221。这些残基可能包含结合 EGFRvIII 表位的互补位。这些残基通常还可能提供结合位点的主要结构特征。

实例 19 肽与抗体的对接模型

实例 14 中的表位作图研究显示了需要用于结合表位至 13.2.1 mAb 抗体接合部位的相关氨基酸位于 6-残基肽中 EEKKN (SEQ ID.NO: 127)。因此, 产生了这 6-残基肽复合体与 13.1.2 结构 CDR 区的对接模型。首先, 产生了肽 EEKKN (SEQ ID NO: 127) 的模型。除了这次使用 118I X 光晶体结构之外, 与前述相似使用这个作为模板, 所述晶体结构是在蛋白数据库中识别出的。然后, 这个肽结构手工放置于长沟槽内以形成起始组装复合体。使用 InsightII 中 Docking 模块随后在构像和定向空间中自动进行 Monte Carlo 搜索。通过给予每个 Phi、Psi 和 Chi 角完全旋转自由度, 以允许肽构像的可弯曲性。在对接过程中, 允许 5 埃结合沟槽内的残基在其它抗体残基被固定的同时移动。Monte Carlo 搜索发现的似是而非的构造经刺激退火和能量最小化以达到最终复合体结构模型。对于所获的每一个对接模型, 使用 InsightII 包装的 Discover_3 模块计算抗体与肽之间的互作能量。评估所有对接模型的互作能量, 并测验具有最强全部抗体-肽互作的模型且其在图

13A 与 13B 中显示。在本对接模型中,如图 13B 所示,存在 6 个肽 EEKKN(SAQ ID NO: 127) 与抗体 13.1.2 间的氢键。从 N 末端向 C 末端对肽残基编号 1 至 6。绿色虚线指示 6 个氢键。形成氢键的 6 对氨基酸是: E2...Y172、K3...H31、K4...H31、N6...D33、N6...Y37 和 N6...K55。在本对接模型中,在延伸 α -链构造中肽束缚与于沟槽。肽中残基替换地面向溶剂和抗体表面。面向结合沟槽的残基是 E2、K4 和 N6,所述结合沟槽最显著接触抗体。这指示这 3 个残基可能对于肽结合与表位作图结果一致是重要的。使用 Discover_3 模块计算每个 6 肽残基与 13.1.2 抗体接合部位的互作能量,并在表 19.1 中显示。表 19.1 显示每个 6 肽残基与 13.1.2 抗体接合部位的互作能量。所有的能量以 kcal/mol 的单位表示。

具有最强互作能量的残基依次是 N6、K4 和 E2,再一次与实验数据一致证实这些残基在抗体-抗原互作中是抗原边的重要贡献者。这些数据提供支持对接模型的有力证据。在本实施例中,抗体接合部位定义为 5 埃对接肽内的残基。包含如此定义的互补位的 20 个残基是残基 31-33、35、37、55、96-101、148、163、165、170、172、178 和 217-218。在一个单独残基的基础上,为了评估抗体-抗原互作中抗体的每个这些残基的贡献,计算了每个上述 20 个残基的互补位与肽 EEKKN(SAQ ID NO: 127) 间的互作能量。结果列在表 19.2 中。表 19.2 显示每个 20 互补位残基与肽 EEKKN(SAQ ID NO: 127) 的互作能量。所有的能量以 kcal/mol 的单位表示。与肽具有最强互作能量的残基是 Lys55 和 His31,接着是 Tyr172、Ala96、Asp33、Tyr37、Leu99、Thr97、Gln98、Lys178 和 Asn170。

表 19.1

肽残基	库仑	VdW	总计
E1	-2.013	-3.738	-5.751
E2	-10.661	-0.617	-11.278
K3	-9.816	-0.493	-10.309
K4	-11.123	-0.968	-12.091
G5	-1.241	-1.468	-2.709
N6	-16.504	-0.181	-16.685

表 19.2

13.1.2 残基	库仑	VdW	总计
His31	-12.835	3.033	-9.801
Ser32	2.857	-1.062	1.794
Asp33	-4.181	-0.698	-4.879
Asn35	0.253	-1.009	-0.756
Tyr37	-2.058	-2.463	-4.521
Lys55	-14.363	1.568	-12.794
Ala96	-6.077	0.896	-5.182

Thr97	-2.739	-1.431	-4.171
Gln98	-2.542	-1.548	-4.09
Leu99	-1.507	-2.779	-4.286
Pro100	0.439	-0.379	0.061
Arg101	3.992	-0.549	3.443
His148	0.101	-0.083	0.018
Val163	-0.104	-0.237	-0.342
Trp165	1.358	-1.122	0.236
Asn170	-2.102	-0.487	-2.589
Tyr172	-8.7	0.896	-7.804
Lys178	-3.614	-0.03	-3.644
Leu217	0.761	-1.426	-0.664
Ala218	-0.071	-0.281	-0.352

实例 20

改进亲和力抗体的合理设计

本实例证明通过位点定向突变发生，对接模型怎样可以用作改进亲和力抗体合理设计的根据。计算机模拟 (in silico) 使每个 13.1.2 互补位残基突变成所有 19 个其它氨基酸，中引出了总计 19×20 或 380 个虚拟突变体。突变通过残基替换完成，其后接着 50 步能量最小化步骤，这解决了可由侧链改变所诱导的任何局部构像改变。计算每个突变体的全部肽与全部互补位间的互作能量。具有较野生型 13.1.2 强的总共相互反应能量的突变体可以潜在地具有与肽 EEKKN (SEQ ID NO: 127) 的较高亲和力，并且，甚至可能是与全部的 EGFRvIII 蛋白。与野生型 13.1.2 相比，这些突变体大部分具有较高的库仑互作，但是其中的一些与野生型抗体相比具有较低的 van der Waals (VdW) 互作。野生型 13.1.2 抗体的 VdW 互作能量是 -9.689 kcal/mol，淘汰掉小于 -8.5 kcal/mol VdW 互作能量的突变体。表 20.1 中列出了剩余具有较野生型 13.1.2 强的总共互作能量的突变体。表的底部列出了野生型数据用于比较。所有的能量以 kcal/mol 的单位表示。

表 20.1

突变体	库仑	VdW	总计
Tyr172Arg	-93.004	-8.702	-101.706
Leu99Glu	-79.897	-8.506	-88.403
Arg101Glu	-77.984	-8.833	-86.817
Leu217Glu	-75.124	-8.998	-84.123
Leu99Asn	-73.337	-9.894	-83.231
Leu99His	-73.631	-9.008	-82.639
Arg101Asp	-71.983	-9.877	-81.861
Leu217Gln	-70.263	-9.795	-80.058
Leu99Thr	-69.882	-10.153	-80.035
Gln98Glu	-70.651	-9.257	-79.908
Leu217Asn	-70.989	-8.769	-79.758
Arg101Gln	-69.432	-10.164	-79.596

Leu217Asp	-69.934	-9.643	-79.578
Asn35Gly	-69.016	-10.191	-79.207
Tyr172His	-69.312	-9.509	-78.820
Val163Asn	-68.841	-9.944	-78.784
Tyr172Asn	-68.896	-9.871	-78.767
Aia218Lys	-70.024	-8.570	-78.594
Asn35Arg	-68.989	-9.604	-78.593
Trp165Lys	-69.578	-8.766	-78.344
Trp165Arg	-68.814	-9.216	-78.030
Leu99Tyr	-67.052	-10.464	-77.517
Tyr172Thr	-68.146	-9.225	-77.371
Aia96Thr	-67.534	-9.623	-77.158
Aia96Ser	-67.222	-9.822	-77.045
Pro100Trp	-67.399	-9.496	-76.894
Leu217Ser	-66.676	-10.133	-76.810
Ser32Ile	-66.700	-10.077	-76.777
Tyr172Ser	-67.588	-9.146	-76.734
His31Glu	-67.070	-9.461	-76.531
Leu217Tyr	-65.605	-10.726	-76.331
Val163His	-67.236	-9.064	-76.300
His148Ser	-66.780	-9.495	-76.274
His148Val	-66.634	-9.629	-76.263
His148Ala	-66.770	-9.473	-76.243
His148Gly	-66.762	-9.456	-76.217
His148Thr	-66.700	-9.508	-76.209
Leu99Ser	-66.126	-10.006	-76.132
Pro100Asp	-66.153	-9.787	-75.940
Trp165Glu	-66.665	-9.267	-75.932
His148Asn	-66.010	-9.889	-75.899
Pro100Gln	-65.873	-9.871	-75.745
Leu217Thr	-66.045	-9.672	-75.717
Ser32Val	-65.845	-9.854	-75.699
Ser32Pro	-65.807	-9.813	-75.620
Pro100Gly	-65.841	-9.774	-75.615
Pro100Ala	-65.889	-9.712	-75.601
Ser32Ala	-65.497	-10.089	-75.586
Ser32Thr	-65.723	-9.861	-75.584
突变体	库仑	VdW	总计
Ala218Thr	-66.054	-9.505	-75.560
Pro100Ser	-65.831	-9.699	-75.530
Val163Gly	-65.993	-9.536	-75.529
Gln98Thr	-66.162	-9.277	-75.438
Pro100Met	-65.811	-9.602	-75.412
Ser32Met	-66.252	-9.153	-75.406
Ser32Gly	-65.509	-9.891	-75.399
Pro100Asn	-65.729	-9.655	-75.384
Tyr37Phe	-66.253	-9.020	-75.272
Val163Ala	-65.713	-9.543	-75.255
Leu217Ile	-65.479	-9.759	-75.238
野生型 13.1.2	-65.517	-9.689	-75.205

表 20.1 列出的突变体可以是工程化改进亲和力抗体的候选。对于列表中顶部的 14 个候选，进一步分析抗原边与抗体边每残基的贡献，以检测所提议修饰的影响。用于活

体外位点定向突变发生的 10 个突变体是 Tyr172Arg、Arg101Glu、Leu99Asn、Leu99His、Arg101Asp、Leu217Gln、Leu99Thr、Leu217Asn、Arg101Gln 和 Asn35Gly。结果可见于实例 21。

实例 21 证实 13.1.2 模型的位点定向突变发生

本实例证明了一个方法，通过这个方法可以测试认为残基在结合中是重要的上述模型。本实例还引出一些抗体变体。通过单独残基突变产生了 13.1.2 抗体变体，单独残基突变是引入 13.1.2 mAb 的重和轻链。分析变体以确定抗原结合中许多侧链的贡献。通过位点定向突变发生引入的一系列突变总结在表 21.1 中。

表 21.1

	链	突变
1	轻链(CDR3)	Arg101Asp
2	轻链(CDR3)	Arg101Gln
3	轻链(CDR3)	Arg101Glu
4	轻链(CDR1)	Asn35Gly
5	重链(CDR3)	Leu217Asn
6	重链(CDR3)	Leu217Gln
7	轻链(CDR3)	Leu99Asn
8	轻链(CDR3)	Leu99His
9	轻链(CDR3)	leu99Thr
10	重链(CDR2)	Tyr172Arg

表 21.1 中的 10 突变中的每一个都引入至 13.1.2 mAb 的重或轻链。每个经突变链随后以 293 个细胞中的互补野生型链转染。随后测试上清液的人类 IgG 抗体的表达和分泌，以及结合 EGF_RVIII 抗原。通过 ELISA 确定的结果总结在表 21.2 中。

表 21.2

	突变	结合能量	表达	结合
1	Arg101Asp	-81.861	是	否
2	Arg101Gln	-79.596	是	否
3	Arg101Glu	-86.817	是	否
4	Asn35Gly	-79.207	是	是
5	Leu217Asn	-79.758	是	是
6	Leu217Gln	-80.058	是	是

7	Leu99Asn	-83.231	是	是
8	Leu99His	-82.639	是	是
9	Leu99Thr	-80.035	是	是
10	Tyr172Arq	-101.706	是	是
11	WT	-75.205	是	是

实例 22

EGFRvIII/pFLAG 变体构建体的准备

本实例证明作用制造 EGFRvIII 的变体。引物对 9712 和 9713 (Qiagen, Valencia, CA) 产生一段 1092 bp 编码的片段 EGFRvIII 的胞外域。

Primer # 9712: 5'-ataaaagcttctggaggaaaagaaagtaatta-3' (正义) (SEQ ID NO:128);
Primer # 9713: 5'-TTATTGGTACCTCAGGCGATGGACGGGATCTTA- 3' (反义) (SEQ ID NO 129)用 Pfu DNA 聚合酶(Stratagene, La Jolle, CA)从质粒模板 EGFRvIII-rbIgG/pCEP4 (如上述) 扩增。引物#9712 引入 HindIII 位点且引物#9713 引入 KpnI 位点。PCR 产物经过柱纯化 (Qiagen column purification kit, Valencia, CA), HindIII 和 KpnI (NEB, New England Biolabs, Beverly, Mass.) 消化并胶纯化(Qiagen gel purification kit, Valencia, CA)。T4 DNA 连接酶 (NEB, New England Biolabs, Beverly, Mass.) 连接片段至 HindIII 与 KpnI (NEB, New England Biolabs, Beverly, Mass.) 线性化的 pFLAG-CMV-1 (Sigma, St. Louis, MO)。引出的载体被命名为 EGFRvIII/pFLAG-CMV-1 # 1。

实例 23

EGFRvIII/pFLAG 重组蛋白的准备

本实例证明怎样可以制得变体 EGFRvIII。首先, 500 μ g EGFRvIII/pFLAG-CMV-1# 1 质粒 DNA 再悬浮于 25 ml Opti-MEMI (Invitrogen, Burlington, ON), 并且与再悬浮于 25 ml Opti-MEMI 的 500 μ l 293fectin (Invitrogen, Burlington, ON) 结合。混合物在室温下温育 20 min, 并随后与准备在 1L 293 FreeStyle 培养基 (Invitrogen, Burlington, ON) 中的 293T cells (1×10^9) 混合, 所述培养基补充有 2% FBS 和 50 μ g/ml G418 (Invitrogen, Burlington, ON)。细胞在 37°C、8% CO₂ 及 125 rpm 转速下生长 7 天。

根据厂商的实验方案, 使用 Anti-FLAG M2 Affinity Chromatography 试剂盒 (Sigma, St. Louis, MO) 纯化融合蛋白。

如下制备单体融合蛋白。首先, 纯化蛋白 (1508 μ g) 以终浓度 10 mM 的 DTT 55 °C 还原 30 分钟。然后, 加入 IAA (碘乙酸) (Sigma, St. Louis, MO) 至 22 mM, 并在室

温暗处温育 15 分钟，接着在 4 °C 的 7k MWCO 透析盒（Pierce, Rockford, Ill）中抗 PBS 透析。

Examples 24-30 抗体变体的结合研究

以下实例包含 Biacore 实验（表面等离子共振）和 KinExA 实验。这些实例证明怎样测试由上述实例制得的许多抗体及其变体，以确定它们是否具有所需结合特征。所有经测验的变体都是 13.1.2 背景的变体。

实验仪器

所有的表面等离子共振实验都是使用 Biacore 2000 光学生物传感器（Biacore, Inc., Piscataway, NJ）进行。所有的动力排斥测定（Kinetic Exclusion Assay）都是使用 KinExA 3000 仪器（Sapidyne Instruments, Inc., Boise, ID）进行。试剂

从 Anatech, Inc. (San Jose, CA) 定制合成并购得 Pep-3, NH₂-LEEKKGNYWTDHG-OH (MW = 1590 Da) (SEQ ID NO: 130)。室内准备所有的 mAbs。室内准备 MW 39,907 的抗原 EGFRvIIIpflag（反应碘乙酸以阻止游离羟硫基（sulfhdryl）基团的聚合）。从 Fisher Scientific (Pittsburgh, PA) 购得牛血清白蛋白（BSA）部分 V (#BP1605-100)。其它所有普通试剂均购自 Sigma-Aldrich, Inc (St. Louis, MO)。

所有用于 Biacore 和 KinExA 分析的抗原和 mAb 样品在含有 100 µg/mL BSA 的 (0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.005% 表面活性剂 P-20, Biacore Inc., Uppsala, Sweden) 真空除气 HBS-P 缓冲液中准备。Biacore 耦胺剂、1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺盐酸盐（EDC）、N-羟基丁二酰亚胺（NHS）和乙醇胺购自 Biacore, Inc.。对于 pep-3/mAb 131 实验，Biacore 表面活性剂再生具有 26 mM NaOH 的 12 秒脉冲。所有其它 mAb 在 20 分钟内解离至基线。研究级 CM5 生物学感测器芯片购自 Biacore, Inc.

KinExA 检测抗体是 Fcγ 特异 Cy5-标记的羊抗人类 IgG () 并从 0.5 mg/mL 储液 (1×PBS, pH 7.4) 以 HEPES 缓冲液 (0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, pH 7.2) 稀释 1000 倍。用于 KinExA 实验的固相粒子是 NHS 激活的 Sepharose 4 Fast Flow 珠 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden, #17-0906-01)。在琼脂糖珠与抗原反应之前，微离心管内 1.5 ml 的珠储液等分量经离心并以冷的去离子 H₂O 水至少水洗 6 次。一旦用碳酸钠缓冲液 (0.05 M, pH 9.3) 冲洗珠子之后，碳酸钠缓冲液中的抗原 (~40 µg) 就添加到琼脂糖珠上。琼脂糖/抗原管 4°C 过夜摇晃。摇晃之后，摇动琼脂糖并以 1 M Tris 缓冲液, pH 8.3 冲洗两次。抗原包被的珠子随后在含有 2% BSA 的 1 M Tris 缓冲液中室温下摇晃 1 小时。

Biacore 测量

使用标准 EDC/NHS 和碳水化合物耦联以共价固定 mAb 至 CM5 感测器芯片。为了

最小化大量的传输与拥挤，将 mAb 固定在一定水平上，此时给予不超过 50 - 100 RU 的最大抗原结合应答 (R_{max})。每个芯片上的参照流动细胞以无 mAb 的固定来激活或阻止，使其当作对照。

在 23°C 下进行所有的 Biacore 动力学实验。对于每个实验，用 2 倍稀释液准备一组连续的 6 至 8 个抗原浓度（从 1.01 μ M pep-3 开始）。在三个重复中在室温感测器的表面以 100 μ L/min 任意的注射的抗原样品。每个 pep-3 浓度和空白都注射 90 秒。接着解离 13 至 180 分钟。通过以三个额外空白注射替换三个额外 251 nM pep-3 注射以及接着 3-4 小时的解离时期获得了结合至 mAb 131 的 pep-3 解离数据。

使用 Scrubber 软件 (Version 1.1f, BioLogic Software, Australia) 处理所有的 Biacore 感测谱。首先在 y 轴上调零感测谱，并且随后在注射开始时 x 排列。通过减去参照流动细胞的应答而移除大量折射指数的改变。从所有的被分析物和空白感应谱中减去所有空白注射的平均应答以移除实验与参照流动细胞间的系统人工因素。使用 CLAMP 生物感测器数据分析软件 (Version 3.40, BioLogic Software, Australia) 确定经处理数据组的 k_a 和 k_d 。所有流动细胞的数据都全部适合包括大量传输的条件的 1:1 双分子结合模型。对于一些 mAb，对应于 pep-3 连续浓度的第一或第二浓度的注射被排除在非线性的动力适合之外，在适合非线性动力中感应谱不能通过 1:1 互作模型很好的描述是明显的。从 k_d/k_a 的商计算 K_D 。

KinExA 平衡测量

在室温下 ($\sim 23^\circ\text{C}$) 进行所有的 KinExA 实验。对于所有的平衡实验，抗原被连续地稀释成具有恒定 mAb 结合位点浓度的溶液。对于第一 10 滴定点，稀释液是 2 倍的并且第 11 和第 12 连续稀释液是 10 倍的。所有实验的样品流动速率是 0.25 mL/min，并且标记抗体流动速率是 0.5 mL/min。抗原/抗体样品随后允许达到平衡，此过程需要花费 $\sim 48-72$ hr。对于 pep-3/mAb 131 KinExA 实验， K_D -控制滴定中 pep-3 的起始浓度是 352 nM，并且恒定 [mAb binding site] = 219 pM；对于 mAb-控制滴定，起始 [pep-3] = 251 nM，且 [mAb binding site] = 11 nM。在 pep-3/mAb 131 的 K_D -控制实验期间，流动细胞中每个样品提出 1.25 mL。抗体控制实验中分析了 250 μ L 的样品体积。对于所有平衡实验，测量每个样品的两个或三个重复。使用 KinExA 软件 (Version 2.4, Sapidyne Instruments)，平衡滴定数据适合 1:1 结合模型的双曲线分析。

仅在 K_D -控制条件下研究了 EGFRvIIIpflag/mAb 131 复合体的 KinExA。起始 [EGFRvIIIpflag] 是 198 nM，并且 [mAb binding site] 是 150 pM。流动细胞中提出 1 mL 体积的样品。收集所有样品的重复测试数据。使用 KinExA 软件 (Version 2.4, Sapidyne

Instruments), 平衡滴定数据适合 1:1 结合模型的双曲线分析。参看以下实例 28 的结果和预测平衡常数。

对于 EGFRvIIIpflag/mAb 13.1.2 复合体的 KinExA 滴定, EGFRvIII 的起始浓度是 5.26 μM (mAb-控制)、230.1 nM (K_D -控制), 并且 [mAb binding site] = 9.59 nM (mAb-控制)、498 pM (K_D -控制)。在 K_D -控制实验期间, 流动细胞中每个样品提出 1.30 mL。抗体控制实验中分析了 250 μL 的样品体积。对于所有平衡实验, 测量每个样品的两个或三个重复。使用 KinExA 软件 (Version 2.4, Sapidyne Instruments), 平衡滴定数据适合 1:1 结合模型的双曲线分析。

实例 24 抗体结合常数的活体外确定

通过使用 Biacore 的 Surface Plasmon Resonance (SPR) 仪器观测野生型 mAb 131 的结合动力学特征。归因于极低的 k_d 和快速 k_a , 因此 K_D 是极低的, 仅为 380 pM。从曲线装置中分离到的其它动力学参数估计 $k_a=2.246*10^6$ 和 $k_d=8.502*10^{-4}$ 。

在一个实施例中, 展示了改进的或具有改进动力学的变体抗体。通过改进的动力学, 意为结合表位的一个抗体动力元件好于先前已知用同样表位的抗体的同样元件。举例而言, 具有大于 (结合能力) $1.3*10^{-9}$ M K_D 结合 pep-3 的抗体可为改进抗体。涵盖如此具有小于 500 nM、500-300 nM、300-100nM、100-1nM、1.3 nM、1.3 nM 至 1000 pM、1000 pM 至 900 pM、900-500pM、500-400 pM、400-300 pM、300-100 pM、100-50 pM、50-1 pM 的 K_D 或更小 K_D 的抗体。

实例 25

抗体结合常数的活体外确定

与实例 24 相似, 测验了 mAb13.1.2 至 Pep-3 (EGFRvIII 表位) 的结合动力。估计 K_D 的是 67nM, 但是实验之间有较小的偏差。从曲线装置中分离到的其它动力学参数估计 $k_a=2.835*10^5$ 和 $k_d=0.01922$ 。

实例 26

抗体结合常数的活体外确定

与实例 24 相似, 测验了 mAb 095 至 Pep-3 (EGFRvIII 表位) 的结合动力。估计的 K_D 是 66nM。从曲线装置中分离到的其它动力学参数估计 $k_a=1.491*10^5$ 和 $k_d=9.927*10^{-3}$ 。

实例 27

抗体结合常数的活体外确定

与实例 24 相似, 测验了 mAb 139 结合 Pep-3 (EGFRvIII 表位) 的动力。估计的 K_D 是 290nM。从曲线装置中分离到的其它动力学参数估计 $k_a=10328$ 和 $k_d=2.981*10^{-3}$ 。

实例 28抗体结合常数的活体外确定

为了更完全的分析抗体的结合特征,进行 KinExA 实验以确定 mAb 131 的结合特征。根据双曲线分析确定的 K_D 是 1.74×10^{-10} 。在一个 KinExA 实验中, EGFRvIIIpflag 至 mAb 131 的 K_D 是 6.266×10^{-11} 。

实例 29变体抗体结合常数的活体外确定

为了更完全的分析 13.1.2 抗体的结合特征,进行 KinExA 实验以确定 mAb 13.1.2 的结合特征。根据双曲线分析确定的 K_D 是 7.538×10^{-10} 。此外,本实例中的抗原是 EGFRvIIIpflag, 并且其与碘乙酸 (IAA) 反应。

实例 30Biacore 结果与 KinExA 结果的比较

下表 30.1 中展示了先前实例和 KinExA 测试的结果。表 30.1 中括号内的数字是 95% 的置信区间。“ND”是未确定, 以及“*”代表结合 EGFRvIIIpflag (反应的碘乙酸), 而不是 pep-3。

如速率常数所显示的, mAb 131 展示具有最大的缔合常数并具有最小的解离常数, 因此使得 mAb 131 有最小的 K_D 。

表 30.1

MAb	$K_a (M^{-1}S^{-1})$	$K_d (s^{-1})$	$K_D (nM)$	KinExA $K_D (nM)$
131	2.25×10^6	8.50×10^{-4}	0.380	0.174 (0.0627 on EGFRvIIIpflag)
13.1.2	$2.10(0.58) \times 10^5$	0.016(0.003)	75 (14)	0.75 (on EGFRvIIIpflag (IAA reacted))
095	1.49×10^5	9.90×10^{-3}	66	ND
139	1.03×10^4	2.98×10^{-3}	290	ND

实例 31L99T-5.3 变体抗体结合常数的活体外确定

测验了 mAb L99T-5.3 至 Pep-3 (EGFRvIII 表位) 的结合动力。第一步骤是使用标准 EDC/NHS 耦联化学, 将 5,600 个共振单元 (RU) 固定在 CM5 感测器芯片两个流动细胞 (Fc) 的 mAb L99T-5.3 的 8,000 个 RU 上, 以及将 5,600 个共振单元 (RU) 固定至一个 Fc 的 mAb 13.1.2 的 8,000 个 RU 上。这个表面密度产生小于 100 个 RU 的具有 pep-3 的

结合信号。总共使用了两个 CM5 感测器芯片以固定两个 mAb。使用先前收集的数据，产生了两个抗体允许待计算 95%置信区间的总共 5 个独立实验。所有研究都使用 Biacore 2000 光学生物感测器。

接着，pep-3 流经 mAb 固定的生物感测器表面。pep-3 起始浓度为 1.25 μM ，此接在任意三重复注射中 8 个两倍连续稀释液之后。为达到双参照的目的，贯穿连续注射中每第六个样品进行空白注射。

最后，用 Scrubber 处理生物感测器数据，且数据适合采用具有包括大量传输条件的 1: 1 互作模型的 Clamp 的曲线。1.25 μM 的高浓度注射排除出动力适合，因为数据明显的不符合 1: 1 互作模型。这个偏离最有可能是由发生在高浓度 pep-3 的非特异互作引起的。所有的动力数据满意地适合 1: 1 互作模型。

所估计的 K_D 为 54-70 nM。估计的其它动力参数 $k_a=2.238*10^5$ 和 $k_d=0.01217$ ，此在各个运行之间液由轻微差异。

实例 32-38

实例 32-38 进一步测验通过使用 Biacore 装置，变体 mAb 的结合动力。这些实例中的第一步骤是使用标准 EDC/NHS 耦联化学，将 5,600 个共振单元 (RU) 固定在 CM5 感测器芯片的一个流动细胞 (Fc) 的每个经测试的 mAb L99T-5.3 的 8,000 个 RU 上。这个表面密度产生小于 100 个 RU 的具有 pep-3 的结合信号。总共使用 3 个 CM5 感测器芯片以一个固定在每个流动细胞上的同一 mAb 固定所有的突变体 mAb。MAb 13.1.2 包括在 3 个感测器芯片中两个的一个流动细胞上。所有研究都使用 Biacore 2000 光学生物感测器。

接着，pep-3 运行经过 mAb 固定的生物感测器表面。pep-3 起始浓度为 4.98 μM ，此接在任意两重复或三重复注射中 8 至 11 个两倍连续稀释液之后。为达到双参照的目的，贯穿连续注射中每第六个样品进行空白注射。

最后，用 Scrubber 处理生物感测器数据，且数据适合采用具有包括大量传输条件的 1: 1 互作模型的 Clamp。取决于 mAb 及其亲和力，当数据明显的不符合 1: 1 互作模型时，一些高浓度注射 (4.98 - 1.25 μM) 排除出动力适合。这个偏离最有可能是由发生在高浓度 pep-3 的非特异互作引起的。所有的动力数据适合 1: 1 互作模型。

实例 32

L217Q-10.1 变体抗体活体外结合常数确定 测验了 mAb L217Q-10.1 至 Pep-3 (EGFRvIII 表位) 的结合动力。估计的 K_D 是 92 nM。从曲线装置中分离到的其它动力学参数估计 $k_a=2.04*10^5$ 和 $k_d=0.01885$ 。

实例 33

L217N-2.1 变体抗体活体外结合常数确定 相似于实例 32，测验了 mAb L217N-2.1 至 Pep-3 (EGFRvIII 表位) 的结合动力。估计的 K_D 是 185 nM。从曲线装置中分离到的其它动力学参数估计 $k_a=2.198*10^5$ 和 $k_d=0.04069$ 。

实例 34

N35G-3.1 变体抗体活体外结合常数确定 相似于实例 32，测验了 mAb N35G-3.1 至 Pep-3 (EGFRvIII 表位) 的结合动力。估计的 K_D 是 204 nM。从曲线装置中分离到的其它动力学参数估计 $k_a=1.497*10^5$ 和 $k_d=0.03057$ 。

实例 35

变体抗体结合常数的活体外确定

与实例 32 相似，测验了 mAb L99H-9.2 至 Pep-3 (EGFRvIII 表位) 的结合动力。估计 K_D 为 395 nM。从曲线装置中分离到的其它动力学参数估计 $k_a=83390$ 和 $k_d=0.03293$ 。

实例 36

变体抗体结合常数的活体外确定

与实例 32 相似，测验了 mAb Y172R-1.2 至 Pep-3 (EGFRvIII 表位) 的结合动力。估计的 K_D 是 927 nM。从曲线装置中分离到的其它动力学参数估计 $k_a=82237$ 和 $k_d=0.07622$ 。

实例 37

变体抗体结合常数的活体外确定

与实例 32 相似，测验了 mAb L99N-4.1 至 Pep-3 (EGFRvIII 表位) 的结合动力。估计的 K_D 是 1.4 μ M。为了确定 K_D ，因为动力是极快而难以适合的，因此 MAb L99N-4.1 适合使用稳定状态（平衡）结合模型。

实例 38

13.1.2 与被设计变体的比较

如可见于表 38.1，开发了具有改进结合特征的 mAb。括号内显示了 95% 的置信区间。L99T-5.3 展示增加的 k_a ，减少的 k_d ，并且因此全部较低的 K_D 。尽管如果 Pep-3 结合 mAb 13.1.2 和 L99T-5.3（在 95% 的置信区间）的平衡解离常数与动力速率常数间显示统计上小的显著差异，但是似乎仍然存在 Pep-3 结合 L99T-5.3 亲和力的边际增量具有直觉偏差。此外，当使用相同的生物感测器芯片时，L99T-5.3 似乎总具有较 13.1.2 高的亲和力。

表 38.1

MAB	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$K_D(nM)$
13.1.2	$2.10(0.58) \times 10^5$	0.016(0.003)	75(14)
L99T-5.3	$2.16(0.12) \times 10^5$	0.013(0.001)	60(10)
L217Q-10.1	2.04×10^5	0.019	92
L217N-2.1	2.20×10^5	0.040	185
N35G-3.1	1.50×10^5	0.030	204
L99H-9.2	8.34×10^4	0.033	395
Y172R-1.2	8.22×10^4	0.076	927
L99N-4.1	ND	ND	1,400*

额外对接模型与选择模型级预测结合亲和力的方法

在其它实施例中，上述实例可以与不同长度肽一起进行而不仅仅时 6 氨基酸长度的肽，只要肽中包括关键结合残基即可。举例而言，代替 EEKKN (SEQ ID NO: 127) 的 6 氨基酸肽，可以使用 EEKKNY (SEQ ID NO: 131) 的 7 氨基酸肽。可以使用任何大小肽的表位。在其它实施例中，肽是选自以下肽： LEEKKNYVVDHC (SEQ ID NO:56)、 LEEKKNYVVD (SEQ ID NO:59)、 LEEKKNYVVD (SEQ ID NO:132) 和 EEKKNYVVD (SEQ ID NO:57)。可以使用介于这里揭示的段片段至全长肽之间的任何大小的肽或其变体。

如所述领域技术人员应了解的，存在额外氨基酸可以改变肽结合抗体的方式。不仅额外氨基酸的存在允许形成在肽与抗体间替换及额外的键合，而且额外的氨基酸可以改变肽的结构以及抗体结合肽的抗体结构。因此，在一个实施例中，可以测验不同长度表位肽，例如 EEKKN (SEQ ID NO: 127) 和 EEKKNY (SEQ ID NO: 131) 的结合特性与结合最佳化。不仅肽的较长片段精确描绘对肽较长节段的肽-抗体互作，而且结合强度和包含在结合内的残基的改变测验允许关于较长肽，由数据推导的额外信息。

此外，并且可能是与测试所互补的较长肽片段，可以进行额外的过滤步骤以选择精确的对接模型。额外的过滤步骤可以允许在许多对接模型中过滤以寻找与可用实验数据一致的模型。

在一个实施例中，过滤是基于良好离析的表位制图数据，例如实验特征的单独残基结合概况，所述制图数据联系于肽中每个氨基酸的计算结合能量概况。举例而言，7 氨基酸肽的结合能量概况可以用于选择含有相似结合能量概况的对接模型。结合能量概况是肽中每个氨基酸与特定氨基酸的结合能量的赋值，氨基酸的结合创建肽的概况，其是根据在所述模型中的每个氨基酸结合能量。举例而言，在一个对接模型中给定一个包含氨基酸 A 与 B 的肽，其中 A 具有 -5 的结合能量且 B 具有 -20 的结合能量，可以具有 A1 (-5 时) 与 B2 (-20 时) 的概况。这个概况可以用作选择其它对接模型的过滤。举例而

言，使用这个结合能量概况作为过滤或“模板”可以导致其它对接模型的选择，如果候选模型中的肽具有贡献于位置 A 的相对低的值，并且具有贡献于位置 B 的相对高的值（较大负值，较高绝对值）。在一个另外实施例中，模板需要额外的限制，例如位置 B 的值比位置 A 的值高 4 倍。

可以以许多方式将结合能量概况模板与其它对接模型内肽的概况比较。如果结合能量概况模板与所需结合能量概况相似，那么随后过滤可以用作选出有利对接模型用于进一步测验。如果结合能量概况模板与所需结合能量概况不相似，那么随后过滤可以用作消除不利对接模型。在一个实施例中，过滤过程包括具有有利和不利结合能量的模板，并且过滤用于选择和排除对接模型。如所述领域技术人员以了解的，存在许多可能的不同结合能量概况，并且因此取决于不同情况，可以使用许多不同结合能量概况。在一个实施例中，可以定义结合能量概况为在肽内特定位置具有一系列相对高结合能量的模板。在一个优选实施例中，结合能量高空模板和模板所选择的结合能量概况将在肽 EEKKGNY (SEQ ID NO: 131) 的位置 2、4 或 6 处具有相对高的结合能量。在另一个实施例中，结合能量概况模板在肽 EEKKGNY (SEQ ID NO: 131) 的位置 2、4 或 6 处具有相对高的结合能量。在另一个实施例中，结合能量概况模板在肽 EEKKGNY (SEQ ID NO: 131) 的位置 3 处具有相对的结合能量。在以上讨论中，所述位置被指派如下：E1、E2、K3、K4、G5、N6、Y7。

在一个实施例中，过滤处理首先包含在 K3 和 K4 处结合能量的对比。选择引起 K4 对比于 K3 相对较高结合能量的对接模型，同时筛除引起 K4 对比于 K3 相对较低结合能量的对接模型。因此，“相对高”意为 K4 的结合能量大于（负值更大，更大绝对值）K3。然后，再一次在结合能量概况模板中过滤对接模型，这一次，选择在位置 2、4 或 6 处具有相对较高能量的结合模型，同时可以移除其它模型。因此，“相对高”意为在肽中在位置 2、4 或 6 处的结合能量比最低结合能量高（更大负值，更大绝对值）。因此，在这个实施例中，可以如下总结结合能量特征模板：E1 可以为任何值，E2 应该比最低值大，K3 应该小于 K4，K4 应该大于最低值，G5 可以为任何值，N6 应该大于最低值，Y7 可以为任何值。因此，只要至少一个（或 K3）小于至少 E2、K4 和 N6 中一个，E1、G5 和 Y7 可以为任何值。在另一个实施例中，“相对高”可以设定为如模型化或实验确定的标准值。在一个实施例中，对接模型通过第一过滤比对接模型通过第二过滤更佳重要。如所属领域技术人员应了解的，不需要相继地进行这两个步骤，且这两个步骤可以同时进行。

此外，取决于肽、抗体和结合条件，过滤结果的这些概况模板可以不同。给予本揭

示案，所属领域技术人员尤其参看实例 14 后，可以确定合适的结合能量概况模板。举例而言，如表 14.1 所示，肽结合 131 和 13.1.2 抗体，存在一些可能的重要残基。在 131 mAb 中，位置 E2、K4、N6 和 Y7 对于特定经测试的肽是重要的。在 13.1.2 mAb 中，位置 E1、E2、K4、G5 和 N6 对于特定经测试的肽是重要的。这些重要的残基可以是包含于创建结合能量概况模板中的残基。如从以下讨论可以清楚的知道，实例 39 中的结合能量概况模板显示出与实例 14 分析所认为的不同。

实例 39 是模板严谨性较低版本，其允许更多的模型通过筛选步骤。如果向减小通过筛选步骤的模型的树木，那么可以进一步添加关于 E1 和 G5 的需要。

以下实例证明使用较长肽怎样可以改变以上证明的结果及这些改变可以意为什么，以及证明使用上述用于选择特定对接模型的过滤。

实例 39 7 氨基酸肽的表位-抗体对接模型

本实例证明产生一组对接模型，所述模型是对于 7 残基肽在 13.1.2 的 CDR 区复杂的结构模型。此外，本实例证明在另一对接模型上选择一个对接模型的方法。

首先，7 残基肽 EEKKNY (SEQ ID NO: 131) 结构模型在延伸构造内建成，且用 InsightII 模型化包装内的 Discover_3 模块最小化能量。然后，这个肽结构手工放置于连接位点内以形成起始组装。使用 InsightII 中 Docking 模块随后在平移和旋转空间中自动进行 Monte Carlo 搜索。在对接过程中，允许 5 埃结合沟槽内的残基在其它抗体残基被固定的同时移动。肽被限制在 5 埃起始位置内。Monte Carlo 搜索发现的似是而非的构造接着经刺激退火和能量最小化以达到最终复合体结构模型。获得总共 63 个对接模型。

对于每个对接模型，肽中抗体与单独残基间的互作能量用 Discover_3 计算。表位-抗体结合中的单独残基贡献概况被检查以选择与良好离析表位制图数据一致的对接模型，意即“结合能量概况模板”。63 个对接模型中的 19 个通过了这个检查。表 39.1 中显示了一个典型的单独残基结合能量概况。与实例 14 中表位制图数据一致的，K4 的结合能量是显著的，且 N6 和 E2 是大的。这个结合能量概况模板特别强调 K4 大于 K3 的实事。这个结合能量概况也特别强调需要 E2、K4 和 N6 相对大。换句话说，E2、K4 和 N6 的结合能量并不是肽中结合能量最低的（最少负值或最小绝对值）。表 39.17 残基肽内单独残基与抗体 13.1.2 的结合能量概况与实例 14 的表位制图数据一致。

E1	E2	K3	K4	G5	N6	Y7	总计
-10.97	-19.34	-13.46	-24.26	-10.1	-18.19	-15.15	-111.45

对于基于结合能量概况上通过过滤的 19 个模型，在具有亲和力数据的 7 个突变体 (Tyr172Arg, 实例 36; Leu217Asn, 实例 33; Leu217Gln, 实例 32; Asn35Gly, 实例 34; Leu99Asn, 实例 37; Leu99His, 实例 35 和 Leu99Thr, 实例 31) 的每一个上进行表位-抗体结合热力学仿真。因为本复合体内的静电交感的程度已经接近, 所有在一系列的仿真中使用许多不同的静电常数。突变通过残基替换完成, 其后接着 30-100 步能量最小化步骤, 这解决了可由侧链改变所诱导的任何局部构象改变。对于每个对接模型, 对每个突变体的所选参数, 计算 7 残基肽与整个抗体间的互作能量。对于每组 8 个结合能量 (7 个突变体加野生型), 与 Kd 算法对比进行每组结合数据的线性适合过程。计算每个线性适合的相关系数。获得一个模型的最佳相关性, 所述模型具有表 39.1 中所述的数据, 所述最佳相关性具有静电常数 $1/r$ 和 50 步的能量最小化。表 39.2 中显示了这个模型的表位-抗体结合能量。所有数据的相关系数为 0.80。参看以上实例 37, 因为没有测量 Leu99Asn 的高精度 K_D , 所以进行了除 Leu99Asn 数据之外的单独线性适合。如图 14 所示, 获得了一个极好的相关系数 0.91。因此以上所选的模型很好地代表精确的对接模型。图 15 显示了具有空格填充肽的模型, 且图 16 显示了氢键。图 16 中 L3 150 是较低部分且 H3 160 是较高部分。H2 140 在肽结合区域的右边。肽自身位于结合位点内, 结合位点内 E1 位于亮遮光内的页顶部, 其下是依次变暗的 K3、K4、G5、N6 和 Y7。图 16 显示了包含于氢键合的抗体残基。本实例制得的模型证明存在 7 个氢键。K4...Q95, K4...Q95, N6...Q98, G5...H31, Y7...H31 和 Y7...W165。

表 39.2.

与 Kd 对数对比, 仿真表位-抗体结合热力学

突变体	库仑	vdw	总计	Ln(Kd)
172Arg	-19.103	-27.962	-47.065	-13.891
217Asn	-19.003	-28.715	-47.718	-15.503
217Gln	-18.977	-28.73	-47.707	-16.201
35Gly	-19.095	-28.431	-47.526	-15.405
99Asn	-18.719	-28.778	-47.497	(-13.479)
99His	-18.837	-28.719	-47.556	-14.744
-99Thr	-19.155	-28.704	-47.859	-16.475
WT	-18.981	-28.728	-47.708	-16.269

如可见于实例 39 中所选模型, 图 15 中代表, 对接模型显示了一些非预测结果。一个有趣的结果是尽管残基 E2、K4 和 N6 在结合作为整体的肽中是重要的, 但是并不是所有的这些氨基酸模型化作为包含于与抗体形成 H-键。显示 K4 包含于都与 Q95 形成两

个 H-键，这与 K4 在结合能量概况与概况模板中的重要性一致。也显示 N6 模拟以键合 Q98；然而，在这个特别模型中，E2 并步显示在模型中形成 H-键。一个一致的有趣趋势是来源于结合能量概况模板的每个关键残基（例如 E2、K4 和 N6）大部分被埋藏，并因此与抗体结合沟槽紧密接触。因此，对接模型选择可以说明这些关键残基是重要的实事，因为其与抗体的紧密互作。此外，E1 可能与 W214 形成氢键。

实例 39 也证明上述方法引起结合能量与 K_D 间的高相关，这认为本方法所创建的模型也允许抗体-肽复合体的 K_D 的最佳化或至少预测。

如可见于实例 39 与实例 19 的对比，存在一些是两个模型间重要的残基，一些残基仅在 7 氨基酸对接模型中显示，以及一些残基在 7 氨基酸对接模型中步显示是重要的。举例而言，7 肽表位显示在 K4...Q95、K4...Q95、N6...Q98、G5...H31、Y7...H31、和 Y7...W165 间创造 H 键。另一方面，6 肽表位显示在 E2...Y172、K3...H31、K4...H31、N6...D33、N6...Y37 和 N6...K55 间创造 H 键。如可从上述数据看出，6 与 7 氨基酸肽模型都强调 H31 的重要性，因为两个模型都包含与肽形成两个氢键的 H31。尽管存在两个数据组之间的其它可能趋势，但是其也显示许多结合互作已经从 6 氨基酸模型改变成 7 氨基酸模型。然而，这些实例证明可以用这些模型检测出归因于表位大小的变化，并因此从较短至较长表位肽的缩放并步应该是按照本揭示案的问题。存在氨基酸连续证明其在许多结合模型内的重要性允许因此偏离许多互作的重要性，因此较短肽模型可以是较长肽互作的更典型代表。

如所属技术领域技术人员应了解的，关于 6 氨基酸肽 EEKKN (SEQ ID NO: 127) 的以上讨论或实例也可以应用于 7 氨基酸肽 EEKKNY (SEQ ID NO: 131)，或任何更长的肽。举例而言，实例 20 可以重复实例 39 的信息，其是通过位点定向突变发生合理设计亲和力改进的抗体。此外，使用实例 39 的结果可以重复实例 21，接着是通过位点定向突变发生尝试合理设计亲和力改进抗体以测试从实例 20 分离的任何新的抗体。

在一个实施例中，使用实例 39 的结果以重新定义抗体与肽之间的互作区域。举例而言，EEKKNY (SEQ ID NO: 131) 的互补位可以定义为包括抗体上预测为与肽互作（例如，残基 95）的其它残基。或者，如实例 19，互补位可以定义为 5 埃对接肽内的所有残基。不同蛋白的计算机模拟亲和力成熟。

在许多不同研究中已经在活体外成功的得到抗体亲和力成熟。通常，任意突变文库需要通过分子生物学方法构建，并且需要开发选择/筛选测定以丰富具有良好结合能力的克隆。所选变体随后需要经纯化以确定亲和力。这个过程需要进行一系列长且艰苦的实验。以下实例证明了通过单独利用抗体-抗原复合体结构的选择可能精确预测亲和力成

熟。

实例 40 通过抗体-抗原结合热力学仿真的计算机模拟亲和力成熟

本实例证明可以使用计算机模拟抗体-抗原结合热力学仿真用于亲和力成熟。本实例特别证明 Fab-12 (IgG 形式, 已知为 rhuMAb VEGF) 与 VEGF (维管内皮生长因子) 的结合动力可以通过上述计算机模拟过程预测。

使用的 VEGF-Fab 复合体晶体结构在 PDB 数据库中, 并具有登录号 1BJ1, 其在 2.4 埃解析。使用抗 VEGF Fab 的一系列突变体的发表实验亲和力数据用于测试观点。VEGF-Fab 结构的 3-D 相配物用于以下突变体的计算机模拟突变: H97Y、S100aT、T28D、28D31H、28D31H97Y100aT、N31H、Y53W、71I73K、71V73V。所述亲和力数据从 Chen, Y 等人 (J Mol Biol., 293(4):865-81 (1999)) 获得。如实例 39 所描述的在许多 VEGF-Fab 突变体间进行热力学仿真。结果列在表 40.1 中。本实例的结果证明通过这个过程获得了结合能量与亲和力列间的显著相关。图 17 显示结合能量的详细适合对相对亲和力的对数。-0.91 的相关系数阐明计算机模拟仿真在原子水平精确地捕获详细互作。

表 40.1 抗体-抗原结合能量仿真对比亲和力数据。

Kabat 数	序列相对数亲和力	Ln(相对亲和力)	结合能量	
H97Y	101Y	14	2.639	-59.065
S100aT	105T	1.9	0.642	-57.465
T28D	28D	1.4	0.336	-57.647
28D31H	28D31H	3.1	1.131	-57.699
28D31H97Y100a				
T	28D31H101Y105T	20	2.996	-59.518
N31H	31H	3.6	1.281	-57.724
Y53W	54W	1.3	0.262	-57.504
71I73K	72I74K	0.9	-0.105	-57.158
71V73V	72V74V	0.3	-1.204	-57.314
WT	WT	1	0.000	-57.404

如可从以上实例清楚的了解, 可以推断仿真鉴定不使用活体外实验的较高亲和力突变。此外, 本方法对于不同抗体和不同肽明显是有用的。仅使用高解析抗体-抗原复合体结构, 本方法可以通常应用于执行亲和力成熟计算机模拟。在一个实施例中, 这个使用计算机模拟亲和力成熟将节省极大量的时间和资源。

实例 41 规范类抗体确定

Chothia 等人已经描述每个免疫球蛋白链的超变区的根据“规范类”的抗体结构 (J. Mol. Biol. 1987 Aug 20;196(4):901-17)。分析多种免疫球蛋白的 Fab 和 VL 片段的原子结

构，以确定氨基酸序列与其抗原结合位点的三维结构的关系。Chothia 等人发现在其包装中，存在主要负责超变区主链构造的相对极少的残基，其氢键或能力呈现不平常的 ϕ 、 ψ 或 ω 构造。发现这些残基发生在超变区内的位点并在保守 β -薄片框内。通过测验具有未知结构的免疫球蛋白序列，Chothia 等人显示许多免疫球蛋白具有超变区，这些超变区与已知结构具有相似的大小，并额外在负载所观察构造的位点处含有同一残基。

其发现暗示这些超变区具有与已知结构相近的构造。对于 5 个超变区，构造的所有组成部分显示限制于相对小数目离散结构类。这些通常发生超变区的主链构造的是术语“规范结构”。Chothia 等人(Nature.1989 Dec 21-28;342(6252):877-83)和其它 (Martin, 等人 J Mol Biol.1996 Nov 15;263(5):800-15) 的进一步工作证实至少抗体 6 个超变区的 5 个存在一小部分所有组成部分的主链构造。

分析一些上述抗体以确定每个抗体互补决定区 (CDR) 的规范类。如所知的，仅将规范类分配给抗体重链的 CDR1 和 CDR2，以及抗体轻链的 CDR1、CDR2 和 CDR3。下表 (41.1) 总结了分析结果。规范类数据是以 *HCDR1-HCDR2-LCDR1-LCDR2-LCDR3 的形式，其中“HCDR”指重链 CDR 且“LCDR”指轻链 CDR。因此，例如，一类规范 1-3-2-1-5 指具有 HCDR1 落入规范类 1、HCDR2 落入规范类 3、LCDR1 落入规范类 2、LCDR2 落入规范类 1、LCDR3 落入规范类 5 的抗体。

表 41.1

mAb	H1-H2-L1-L2-L3
139	1-3-2-1-1
250	1-3-2-1-1
123	1-3-4-1-1
131	1-3-4-1-1
13 1 2	1-3-4-1-1
211	1-3-4-1-1
318	1-3-4-1-1
333	1-3-4-1-1
342	1-3-4-1-1
95	3-1-4-1-1
150	3-Y-4-1-1
170	3-Y-4-1-1

如果其满足长度需要并符合规范类中所定义的关键残基，那么每个 CDR (除了 H3 之外) 都分配至规范结构。可以发现每个抗体所定义的氨基酸，例如在参看以上 Chothia 等人的文章中。

等效物

先前描述和实例详述了本发明的特定优选实施例，并描述发明者所涵盖的最佳模式。然而，应了解不管内容出现多详细的先前描述，本发明可以以许多方式实现，并且本发明应该根据附加权利要求书和其任何等同物构建。

<110> 艾伯吉尼斯公司

<120> 针对表皮生长因子受体的缺失突变体的抗体及其使用

<130> ABGENIX.087VPC2

<150> US 60/483,145

<151> 2003-06-27

<150> US 60/525,570

<151> 2003-11-26

<150> US 60/562,453

<151> 2004-04-15

<160> 144

<170> 用于Windows4.0版的快速序列

<210> 1

<211> 109

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	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	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
			100					105							

<210> 2
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Ser Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Arg 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 Asp Gly Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asn Pro Arg Asp Phe Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 4
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Asn Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ala Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Val

```

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

```

<210> 5
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 智人

```

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

```

<210> 6
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 智人

```

<400> 6
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Phe Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1                      5                      10                      15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
      20                      25                      30
Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35                      40                      45
Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50                      55                      60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65                      70                      75                      80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85                      90                      95
Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      100                      105                      110

```

<210> 7
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 7

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

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

Glu Val Gln Leu Leu 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 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly 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 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105

<210> 9

<211> 116

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

Glu Gly Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Pro Gly Glu
 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 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asn 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 Val Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Gly Ser Ser Gly Trp Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

Thr Val Ser Ser 100
 115
 105
 110
 <210> 10
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 10
 Glu Val Gln Val Leu 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 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Asn 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 Gly Ser Ser Gly Trp Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 11
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 11
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105

<210> 12
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 12
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Thr Ser Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Ala
 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
 Val Ser Glu Gly Tyr Cys Ser Ser Ser Ser Cys Tyr Lys Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 13

<211> 128

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

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

<210> 14

<211> 109

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105

<210> 15

<211> 128
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 15

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr
 20          25          30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35          40          45
Ala Val Thr Ser Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Asp 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
Val Ser Glu Gly Tyr Cys Asp Ser Ser Ser Cys Tyr Lys Tyr Tyr Tyr
 100         105         110
Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115         120         125

```

<210> 16
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 16

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr
 20          25          30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35          40          45
Ala Val Thr Ser Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Asp 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
Val Ser Glu Gly Tyr Cys Asp Ser Thr Ser Cys Tyr Lys Tyr Tyr Tyr
 100         105         110
Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115         120         125

```

<210> 17
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 17

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr
 20          25          30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35          40          45
Ala Val Thr Ser Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Asp 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
 Val Ser Glu Gly Tyr Cys Asp Ser Thr Ser Cys Tyr Lys Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 18
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 18
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Thr Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 19
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 19
 Asp Thr Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser His Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ile Ser Arg Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 20
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 20
 Ala Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly

```

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

```

<210> 21
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人

```

<400> 21
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1           5           10           15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
                20                25                30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
                35                40                45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
                50                55                60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                70                75                80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Phe Cys Met His Thr
                85                90                95
Thr Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys
                100                105                110

```

<210> 22
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人

```

<400> 22
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1           5           10           15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
                20                25                30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
                35                40                45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
                50                55                60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                70                75                80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
                85                90                95
Thr Gln Phe Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
                100                105                110

```

<210> 23
 <211> 112

<212> PRT
<213> 智人

<400> 23

```

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

```

<210> 24
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

```

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

```

<210> 25
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

```

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

```

100

105

<210> 26
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 26

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

<210> 27
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 27

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

<210> 28
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 28

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

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

<210> 29
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 29
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg
 20 25 30
 Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly His Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Leu Gln Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 30
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人

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

<210> 31
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 31
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg

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

<210> 32
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人

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

<210> 33
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人

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

<210> 34
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 34
gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcata cacactgatg gaaacatcta tttgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcttaattt ataagatttc taatcggttc 180
tctggggctcc cagacagatt cagtggcagt ggggcagga cagatttcac actgaagatc 240
agcaggggtgg aagctgagga tgtgggggtt tattactgca tgcaaggtag acaatttctc 300
atcaccttcg gcccaaggac acgactggag attaaa 336

<210> 35
<211> 375
<212> DNA
<213> 智人

<400> 35
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctgggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agtgggtggtt actactggag ctggatccgc 120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt gggttcatct attacagagg gaacacctac 180
tacaaccctg ccctcaagag tctgagttacc atatcagttg acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgag gacacggccg tgtattactg tgcgagagac 300
ggatattgta gtagaaccgg ctgctatggc ggctgggttcg acccctgggg ccagggaacc 360
ctggtcacgt ctctc 375

<210> 36
<211> 335
<212> DNA
<213> 智人

<400> 36
atattgtgat gactcagtct ccaactctccc tgcccgtcac ccctggagag ccggcctcca 60
tctcctgcag gtctagtcag agcctcctgt atagaaatgg aaacaactat ttggattggg 120
atctgcagaa gccagggcag tctccacagc tctgatcta tttgggttct aatcgggctc 180
ccgggggtccc tgacagggtc agtggcagtg gatcgggcac agattttaca ctgaacatca 240
gcagagtggg ggctgaggat gttgggcatt attactgcat gcaggctcta caaactcctc 300
ggacgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaa 335

<210> 37
<211> 384
<212> DNA
<213> 智人

<400> 37
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccctcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atgtcatatg atggaagtaa agaagactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tctagagaca attccgagaa catgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtat attactgtgt gagcgaagga 300
tattgtagta gtctagctg ctataagtag tactactacg gcatggacgt ctggggccaa 360
gggaccacgg tcaccgtctc ctca 384

<210> 38
<211> 336
<212> DNA
<213> 智人

<400> 38
gatactgtga tgaccagac tccactctcc tcacatgtaa cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca acctccaaga ctcttaattt ataggatttc taggcggttc 180
tctggggctcc cagacagatt cagtggcagt ggggcagga cagatttcac actggaaatc 240
agcaggggtgg aggtgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaatctac acacgttctc 300

cggacgttcg gccaaagggac caaggtggag atcaaa 336

<210> 39
<211> 372
<212> DNA
<213> 智人

<400> 39
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagt ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcaga aactatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtga taaatactat 180
gcagactccg tgaggggccc attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatggc 300
tacgatattt tgactggtaa tcctagggac tttgactact ggggcccagg aaccctggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 40
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 40
gaggtgcagg tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcggct attagtggta gtggtggtag taaaaactac 180
gcagactccg tgaagggccc gtccaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtct attactgtgc tgggagcagt 300
ggctgggtccg agtactgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tctcctcg 348

<210> 41
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 41
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcactgcc gggctagtca gggcattaga aataatttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcctccaatt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttaccg gcagtgatc tgggacagaa ttcactctca tagtcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg cgacttatta ctgtctacag catcacagt acccgctcac ttccggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 42
<211> 336
<212> DNA
<213> 智人

<400> 42
gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttgaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagggatg gaaataccta cttgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcttaattt ataagatttc taaccggttc 180
tctgggggcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatt 240
agcagggtag aagctgagga tgtcgggatt tatttctgca tgcatactac acaatttcct 300
tggacgttcg gccaaagggac caggggtggaa atcaaa 336

<210> 43
<211> 354
<212> DNA
<213> 智人

<400> 43

```

caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60
acctgtgcc a tctccgggga cagtgtctct agctacagtt ctgcttgga ctggatcagg 120
cagtccccat cgagaggcct tgagtggctg ggaagggcat atcacaggtc caggtgggat 180
tacgagtatg cagtatcggg gaaaagtcca ataacatca cccagacac atccaagaac 240
cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 300
agaggcagtc gctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

```

<210> 44
<211> 354
<212> DNA
<213> 智人

```

<400> 44
caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60
acctgtgcc a tctccgggga cagtgtctct agcaacaatg ctgcttgga ctggatcagg 120
cagtccccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtgggat 180
aatgattatg tagtatctgt gaaaagtcca ataaccatca accagacac atccaagaac 240
cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgta 300
agaggcagtc gctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

```

<210> 45
<211> 336
<212> DNA
<213> 智人

```

<400> 45
gctattgtgt tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttgga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgtt cacaggatg gaaacaccta cttgagttgg 120
cttcagcaga gggcaggcca gcctccaaga ctccatatt ataagatttc taaccgggtc 180
tctggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcaggggtg aacctgacga tgtcggggtt tattactgca tgcatactac acaacttctc 300
tggacgttcg gcccaaggac caaggtgaa atcaaa 336

```

<210> 46
<211> 336
<212> DNA
<213> 智人

```

<400> 46
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttgga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gagcctccta tatagaaatg gaaacaacta tttggattgg 120
tatctgcaga gggcaggcca gtctccaca ctccgatct atttgggttc taatcggggc 180
tccggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac attgaaaatc 240
ggcagagtgg aggtgagga tgttggggtt tattactgca tgcaggctct acaacttctc 300
cggacgttcg gcccaaggac caaggtgaa atcaaa 336

```

<210> 47
<211> 384
<212> DNA
<213> 智人

```

<400> 47
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgtag cctctggatt caccctcagt agctatggca tgcactgggt cgcggcaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtg acatcatatg atggaagtaa aaaagactat 180
gcagactccg cgaaggggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgt gagcgaagga 300
tattgtagta gtagtagctg ctataagtac tactattacg gtatggacgt ctggggccaa 360
gggaccacgg tcaccgtctc ttca 384

```

<210> 48

<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 48
gaggggcagc tgttggagtc tgggggaggc tgggtacagc ctggggagtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcggtc attagtggta gtgggtggtag cacaaattac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaagtga acagcctgag agtcgaggac acggccgtat attactgtgc tgggagcagt 300
ggctggtccg agtactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210> 49
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 49
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagcgtcacc 60
atcacttgcc ggacaagtca gggcattaga aaaaatttag gctggatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcattccagtt taaaagtgg ggtcccataca 180
aggttcagcg gcagtgatc tgggacagaa ttcactctca caatccgcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctccag catcatagtt acccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaggg tggagatcag a 321

<210> 50
<211> 336
<212> DNA
<213> 智人

<400> 50
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca ccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gagcctccta tatagaaatg gaaacaacta tttggattgg 120
tatctgcaga ggccagggca gtctccacaa ctctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
tccggggctc ctgacagggt cagtggcagc ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaggctct acaaactcct 300
cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 51
<211> 384
<212> DNA
<213> 智人

<400> 51
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgtag cctctggatt caccctcagc agctatggca tgacttgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtg acatcatatg atggaagtaa aaaagactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgt gagcgaagga 300
tattgtgata gtagtagctg ctataagtac tactactacg gtatggacgt ctggggccaa 360
gggaccacgg tcaccgtctc ttca 384

<210> 52
<211> 336
<212> DNA
<213> 智人

<400> 52
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca ccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gagcctccta tatagaaatg gaaacaacta tttggattgg 120
tatctgcaga ggccagggca gtctccacaa ctctgatct atttgggttc taatcgggcc 180

tccggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagatTTTtac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgTTgggggt tattactgca tgcaggctct acaaactcct 300
 cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 53
 <211> 384
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 53
 caggtgcagc tggTggagtc tgggggaggc gtggTccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgtag cctctggatt caccctcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ctaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtg acatcatatg atggaagtaa aaaagactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgt gagcgaagga 300
 tattgtgata gtactagttg ctataagtac tactactacg gtatggacgt ctggggccaa 360
 gggaccacgg tcaccgtctc ttca 384

<210> 54
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 54
 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca gagcctccta tatagaaatg gaaacaacta tttggattgg 120
 tatctgcaga ggccagggca gtctccacaa ctccctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
 tccggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagatTTTtac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgTTgggggt tattactgca tgcaggctct acaaactcct 300
 cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 55
 <211> 384
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 55
 caggtgcagc tggTggagtc tgggggaggc gtggTccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgtag cctctggatt caccctcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtg acatcatatg atggaagtaa aaaagactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgt gagcgaagga 300
 tattgtgata gtactagctg ctataagtac tactactacg gtatggacgt ctggggccaa 360
 gggaccacgg tcaccgtctc ttca 384

<210> 56
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽序列

<400> 56
 Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Cys
 1 5 10

<210> 57
 <211> 10
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 57

Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr
1 5 10

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 58

Leu Glu Glu Lys Lys
1 5

<210> 59

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 59

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp
1 5 10

<210> 60

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 60

Glu Lys Asn Tyr
1

<210> 61

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 61

Glu Glu Lys Gly Asn
1 5

<210> 62
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成寡核苷酸引子序列

 <400> 62
 ggatctcgag ccagaccgga acgacaggcc acctc 35

<210> 63
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成寡核苷酸引子序列

 <400> 63
 cggatctcga gccggagccc agcactttga tctt 34

<210> 64
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成寡核苷酸引子序列

 <400> 64
 cggatgaatt cccagaccgg acgacaggcc acctc 35

<210> 65
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成寡核苷酸引子序列

 <400> 65
 ctttcttttc ctccagagcc 20

<210> 66
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成寡核苷酸引子序列

 <400> 66
 gtaattatgt ggtgacagat c 21

<210> 67
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<210> 73
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 73
Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His
1 5 10

<210> 74
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 74
Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly
1 5 10

<210> 75
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 75
Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser
1 5 10

<210> 76
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 76
Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys
1 5 10

<210> 77
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 77
Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val
1 5 10

<210> 78
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 78
Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg
1 5 10

<210> 79
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 79
Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala
1 5 10

<210> 80
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 80
Ala Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp
1 5 10

<210> 81
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 81
Leu Ala Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp
1 5 10

<210> 82
<211> 12
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 82

Leu Glu Ala Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp
1 5 10

<210> 83

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 83

Leu Glu Glu Ala Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp
1 5 10

<210> 84

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 84

Leu Glu Glu Lys Ala Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp
1 5 10

<210> 85

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 85

Leu Glu Glu Lys Lys Ala Asn Tyr Val Val Thr Asp
1 5 10

<210> 86

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 86

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Ala Tyr Val Val Thr Asp
1 5 10

<210> 87
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 87
Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Ala Val Val Thr Asp
1 5 10

<210> 88
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 88
Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Ala Val Thr Asp
1 5 10

<210> 89
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 89
Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Ala Thr Asp
1 5 10

<210> 90
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 90
Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Ala Asp
1 5 10

<210> 91
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 91
 Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Ala
 1 5 10

<210> 92
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽序列

<400> 92
 Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
 1 5 10 15
 Gly Ser Cys Val Arg Ala
 20

<210> 93
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽序列

<400> 93
 Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys
 1 5 10 15
 Val Arg Ala

<210> 94
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽序列

<400> 94
 Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr
 1 5 10

<210> 95
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽序列

<400> 95
 Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp
 1 5 10

<210> 96
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 96
Tyr Val Val Thr Asp His
1 5

<210> 97
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 97
Tyr Val Val Thr Asp
1 5

<210> 98
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 98
Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr
1 5 10

<210> 99
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 99
Gly Asn Tyr Val Val Thr
1 5

<210> 100
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 100

Asp Thr Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser His Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 20

<210> 101
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽序列

<400> 101
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser
 1 5 10 15

<210> 102
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽序列

<400> 102
 Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10

<210> 103
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽序列

<400> 103
 Arg Ile Ser Arg Arg Phe Ser
 1 5

<210> 104
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽序列

<400> 104
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Glu Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 105

Met	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr
1				5				

<210> 106

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 106

Phe	Gly	Gln	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
1				5				

<210> 107

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 107

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

<210> 108

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 108

Asn	Tyr	Gly	Met	His
1				5

<210> 109

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 109

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

<210> 110

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 110

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

<210> 111

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 111

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

<210> 112

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 112

Asp Gly Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asn Pro Arg Asp Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 113

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 113

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 114

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 114

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Leu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys									
			20												

<210> 115

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 115

Trp	Leu	His	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr
1			5						10					15

<210> 116

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 116

Lys	Ile	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
1				5		

<210> 117

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 117

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

<210> 118

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 118

Met Gln Ala Thr Gln Leu Pro Arg Thr
 1 5

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 119

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 120

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 120

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

<210> 121

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 121

Ser Tyr Gly Met His
 1 5

<210> 122

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 122

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

<210> 123

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 123

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 124

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 124

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 125

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 125

Asp Gly Trp Gln Gln Leu Ala Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 126

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 126

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

1 5 10

<210> 127

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 127

Glu Glu Lys Lys Gly Asn
 1 5

<210> 128

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 128

ataaaagctt ctggaggaaa agaaaggtaa tta

33

<210> 129

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 129

Thr Thr Ala Thr Thr Gly Gly Thr Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Cys Gly Ala Thr Gly Gly Ala Cys Gly Gly Ala Thr Cys Thr Thr
 20 25 30
 Ala

<210> 130

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 130

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly
 1 5 10

<210> 131

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 131

Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr
 1 5

<210> 132
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽序列

<400> 132
 Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr
 1 5 10

<210> 133
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽序列

<400> 133
 Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr
 1 5

<210> 134
 <211> 1186
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 134
 Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln
 1 5 10 15
 Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn
 20 25 30
 Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg
 35 40 45
 Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr
 50 55 60
 Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu
 65 70 75 80
 Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala
 85 90 95
 Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro
 100 105 110
 Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn
 115 120 125
 Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val
 130 135 140
 Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu
 145 150 155 160
 Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp
 165 170 175
 Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala
 180 185 190
 Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys
 195 200 205
 His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys

Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
 705 710 715 720
 Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
 725 730 735
 Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg
 740 745 750
 Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu
 755 760 765
 Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn
 770 775 780
 Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly
 785 790 795 800
 Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
 805 810 815
 Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe
 820 825 830
 Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu
 835 840 845
 Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His
 850 855 860
 Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
 865 870 875 880
 Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
 885 890 895
 Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
 900 905 910
 Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
 915 920 925
 Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe
 930 935 940
 Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp
 945 950 955 960
 Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala
 965 970 975
 Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr
 980 985 990
 Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr
 995 1000 1005
 Pro Leu Leu Ser Ser Leu Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala
 1010 1015 1020
 Cys Ile Asp Arg Asn Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser
 1025 1030 1035 1040
 Phe Leu Gln Arg Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp
 1045 1050 1055
 Ser Ile Asp Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser
 1060 1065 1070
 Val Pro Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn
 1075 1080 1085
 Gln Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro
 1090 1095 1100
 His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro
 1105 1110 1115 1120
 Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys
 1125 1130 1135
 Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe
 1140 1145 1150
 Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala
 1155 1160 1165
 Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln Ser Ser Glu Phe Ile
 1170 1175 1180
 Gly Ala

1185

<210> 135
 <211> 919
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 135

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys
 1 5 10 15
 Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val
 20 25 30
 Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly
 35 40 45
 Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn
 50 55 60
 Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile
 65 70 75 80
 Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu
 85 90 95
 Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly
 100 105 110
 Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala
 115 120 125
 Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln
 130 135 140
 Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg
 145 150 155 160
 Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys
 165 170 175
 Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr
 180 185 190
 Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys
 195 200 205
 Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys
 210 215 220
 Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg
 225 230 235 240
 Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg
 245 250 255
 Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu
 260 265 270
 Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys
 275 280 285
 Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys
 290 295 300
 Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala
 305 310 315 320
 Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly
 325 330 335
 Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile
 340 345 350
 Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Val
 355 360 365
 Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His Ile Val Arg
 370 375 380
 Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu Val Glu Pro
 385 390 395 400
 Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu Arg Ile Leu
 405 410 415

Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe
 420 425 430
 Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu Lys Val Lys
 435 440 445
 Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser Pro Lys Ala
 450 455 460
 Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser Val Asp Asn
 465 470 475 480
 Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln
 485 490 495
 Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp Tyr Val Arg
 500 505 510
 Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn Trp Cys Val
 515 520 525
 Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg Leu Val His
 530 535 540
 Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro Gln His Val
 545 550 555 560
 Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala Glu Glu Lys
 565 570 575
 Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu
 580 585 590
 Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser
 595 600 605
 Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser Lys Pro Tyr
 610 615 620
 Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu Lys Gly Glu
 625 630 635 640
 Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met
 645 650 655
 Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys Phe Arg Glu
 660 665 670
 Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu
 675 680 685
 Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro Thr Asp Ser
 690 695 700
 Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp Asp Val Val
 705 710 715 720
 Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe Phe Ser Ser Pro
 725 730 735
 Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu Ser Ala Thr Ser Asn
 740 745 750
 Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn Gly Leu Gln Ser Cys Pro
 755 760 765
 Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly
 770 775 780
 Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu
 785 790 795 800
 Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn
 805 810 815
 Pro Val Tyr His Asn Gln Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro
 820 825 830
 His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu
 835 840 845
 Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala
 850 855 860
 His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp
 865 870 875 880
 Tyr Gln Gln Asp Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe
 885 890 895
 Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln

		900				905				910				
Ser	Ser	Glu	Phe	Ile	Gly	Ala								
		915												

<210> 136
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 136

Val	Cys	Gln	Gly	Thr	Ser	Asn	Lys	Leu	Thr	Gln	Leu	Gly	Thr	Phe	Glu
1				5					10					15	
Asp	His	Phe	Leu	Ser	Leu	Gln	Arg	Met	Phe	Asn	Asn	Cys	Glu	Val	Val
			20					25					30		
Leu	Gly	Asn	Leu	Glu	Ile	Thr	Tyr	Val	Gln	Arg	Asn	Tyr	Asp	Leu	Ser
		35					40					45			
Phe	Leu	Lys	Thr	Ile	Gln	Glu	Val	Ala	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	Leu
		50				55					60				
Asn	Thr	Val	Glu	Arg	Ile	Pro	Leu	Glu	Asn	Leu	Gln	Ile	Ile	Arg	Gly
65					70					75					80
Asn	Met	Tyr	Tyr	Glu	Asn	Ser	Tyr	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Ser	Asn	Tyr
				85					90					95	
Asp	Ala	Asn	Lys	Thr	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Pro	Met	Arg	Asn	Leu	Gln
			100					105					110		
Glu	Ile	Leu	His	Gly	Ala	Val	Arg	Phe	Ser	Asn	Asn	Pro	Ala	Leu	Cys
		115					120					125			
Asn	Val	Glu	Ser	Ile	Gln	Trp	Arg	Asp	Ile	Val	Ser	Ser	Asp	Phe	Leu
	130					135						140			
Ser	Asn	Met	Ser	Met	Asp	Phe	Gln	Asn	His	Leu	Gly	Ser	Cys	Gln	Lys
145					150					155					160
Cys	Asp	Pro	Ser	Cys	Pro	Asn	Gly	Ser	Cys	Trp	Gly	Ala	Gly	Glu	Glu
				165					170					175	
Asn	Cys	Gln	Lys	Leu	Thr	Lys	Ile	Ile	Cys	Ala	Gln	Gln	Cys	Ser	Gly
			180						185					190	
Arg	Cys	Arg	Gly	Lys	Ser	Pro	Ser	Asp	Cys	Cys	His	Asn	Gln	Cys	Ala
		195					200					205			
Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Arg	Glu	Ser	Asp	Cys	Leu	Val	Cys	Arg	Lys
		210				215					220				
Phe	Arg	Asp	Glu	Ala	Thr	Cys	Lys	Asp	Thr	Cys	Pro	Pro	Leu	Met	Leu
225					230					235					240
Tyr	Asn	Pro	Thr	Thr	Tyr	Gln	Met	Asp	Val	Asn	Pro	Glu	Gly	Lys	Tyr
				245					250					255	
Ser	Phe	Gly	Ala	Thr	Cys	Val	Lys	Lys	Cys	Pro	Arg				
			260					265							

<210> 137
 <211> 512
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 137

cagggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cgtctggatt	caccttcagt	agctatggca	tgactgggt	cgcaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt	atatggtatg	atggaagtaa	taaatactat	180
gtagactccg	tgaaggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagagatgga	300
tggcagcagc	tggccccctt	tgactactgg	ggccagggaa	ccctgggtcac	cgtctcctca	360
gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcaccct	ctagcaagag	cacctctggg	420
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacggtgtcg	480

tggaactcag ggcgcctgac cagcggcgtg ca

512

<210> 138
 <211> 170
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 138
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val 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 Asp Gly Trp Gln Gln Leu Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170

<210> 139
 <211> 496
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 139
 gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttgga ggcggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgtg catagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
 cttcaccaga ggccaggcca gcctccaaga ctcctaattt ataagatttc taaccggttc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagctttcac actgaaaatc 240
 agcagggtgg aagctgagga tgtcggggtt tattactgca tgcaagctac acaacttctc 300
 cggacgttcg gcccaaggac caaggtggaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360
 ttcactctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgctagcgt tgtgtgcctg 420
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
 tcgggtaact cccagg 496

<210> 140
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 140
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu His Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

```

      50              55              60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile
65              70              75              80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
      85              90              95
Thr Gln Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100             105             110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
      115             120             125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
      130             135             140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145             150             155             160
Ser Gly Asn Ser Gln
      165

```

<210> 141
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 智人

```

<400> 141
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1              5              10              15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20              25              30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35              40              45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
      100            105            110

```

<210> 142
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 智人

```

<400> 142
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1              5              10              15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20              25              30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35              40              45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val 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 Asp Gly Trp Gln Gln Leu Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
      100            105            110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
      115            120

```

<210> 143
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 143
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Thr Gln Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg

<210> 144
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 144
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu His Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Thr Gln Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg

EGFR wt	1	DELKRV	VCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQE	60
EGFRvIII	1	LEENK	-----	1
EGFR wt	61		VAGYVLIALNTVERI PLENLQI IRGNMYEENS YALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEYL	120
EGFRvIII	1		-----	1
EGFR wt	121		HGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLSGCQKCDPSPNGSCW GAGE	180
EGFRvIII	1		-----	1
EGFR wt	181		ENCQKLTXXIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTC	240
EGFRvIII	1		-----	1
EGFR wt	241		PPLMLYNPTTYQMDVNPÉGKYSFGATCVKKCP	300
EGFRvIII	1		-----	33
EGFR wt	301		KCKKCEGPGRIKVCNGTIGCEFKDSLSIHAYTIKHFPTCTSTSEDIHILPVVFRGDSFTHT	360
EGFRvIII	34		KCKKCEGPGCRKVCNGLIGIGEFKDSLSINAYTIKHFPTCTSTSEDIHILPVVFRGDSFTHT	93
EGFR wt	361		PPLDPQELDILKTVRRTTGFLLIQAVFENRTDLHAFENLEITFGHTRKQEGQFSLAVVSLN	420
EGFRvIII	94		PPLDPQELDILKTVKKEITGFLLIQAVFENRTDLHAFENLEITFGHTRKQEGQFSLAVVSLN	153
EGFR wt	421		ITSLGLRSIKKEISDGDVITSGNKNLCYANTINRYKLFPTSCQHTIITSRGPHSCKATGQ	480
EGFRvIII	154		ITSLGLRSIKKEISDGDVITSGNKNLCYANTINRYKLFPTSCQHTIITSRGPHSCKATGQ	213
EGFR wt	481		VCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRRCRCVDRKCNLLEGEPEFVVEHSECTLOCHPECLF	540
EGFRvIII	214		VCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRRCRCVDRKCNLLEGEPEFVVEHSECTLOCHPECLF	273
EGFR wt	541		QAMNICTGKRGFDNCTQCAHYIDGPHCVKTCFAGVGENHTLVKRYATASHVCHLCHPNC	600
EGFRvIII	274		QAMNICTGKRGFDNCTQCAHYIDGPHCVKTCFAGVGENHTLVKRYATASHVCHLCHPNC	333
EGFR wt	601		TYGCTGPGLEGGPTNGPKTFSIATGAVCALIEANVALGIGLFGERRHYVRKRTLRRLLO	660
EGFRvIII	334		TYGCTGPGLEGGPTNGPKTFSIATGAVCALIEANVALGIGLFGERRHYVRKRTLRRLLO	393
EGFR wt	661		ERELVEPLFPPSGFAPNQCALLRILKETEFAKIKVLGSCAFCTVYKGLMIFEGEKVKIPVAI	720
EGFRvIII	394		ERELVEPLFPPSGEAPNQCALLRILKETEFAKIKVLGSCAFCTVYKGLMIFEGEKVKIPVAI	453
EGFR wt	721		KELREATSPKANKEILDEAYVNASVDNPHVCRLLGICLTSTVQIITQLMPPGCLLDVYRE	780
EGFRvIII	454		KELREATSPKANKEILDEAYVNASVDNPHVCRLLGICLTSTVQIITQLMPPGCLLDVYRE	513
EGFR wt	781		HKDNIGSQYLLNWCVOIAGKGMNYLEDRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGA	840
EGFRvIII	514		HKDNIGSQYLLNWCVOIAGKGMNYLEDRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGA	573
EGFR wt	841		EEKEYHAEGGKVPKGMALLESILHRIYTHQSDVWSYCVTVWELNTPGSKPYDGI PASEIS	900
EGFRvIII	574		EEKEYHAEGGKVPKGMALLESILHRIYTHQSDVWSYCVTVWELNTPGSKPYDGI PASEIS	633
EGFR wt	901		SILEKGERLPQPPICTIDVYMIWVKCWMIDADSRPKFRELITFEFSIGARDPQRYLVIQGD	960
EGFRvIII	634		SILEKGERLPQPPICTIDVYMIWVKCWMIDADSRPKFRELITFEFSIGARDPQRYLVIQGD	693
EGFR wt	961		ERMHLPSPTDSNFFYRALNDEEDDDVVDADAYLITQCGFFSSPSTSRTPLLSSLSATSNN	1020
EGFRvIII	694		ERMHLPSPTDSNFFYRALNDEEDDDVVDADAYLITQCGFFSSPSTSRTPLLSSLSATSNN	753
EGFR wt	1021		STVACIDRNGLOSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSEDDTFLVPEYINQSVPKRPAGS	1080
EGFRvIII	754		STVACIDRNGLOSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSEDDTFLVPEYINQSVPKRPAGS	813
EGFR wt	1081		VQNPVYHNQPLNPAFSPRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNIVQPTCVHSTFDSPAHRAQKGSIIQ	1140
EGFRvIII	814		VQNPVYHNQPLNPAFSPRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNIVQPTCVHSTFDSPAHRAQKGSIIQ	873
EGFR wt	1141		ISLDNPDYQODFFPKAKPNGIFKGSFAENAEYLRLVAPSSSEPIGA	1186 (序列号: 134
EGFRvIII	874		ISLDNPDYQODFFPKAKPNGIFKGSFAENAEYLRLVAPSSSEPIGA	919 (序列号: 135

图1

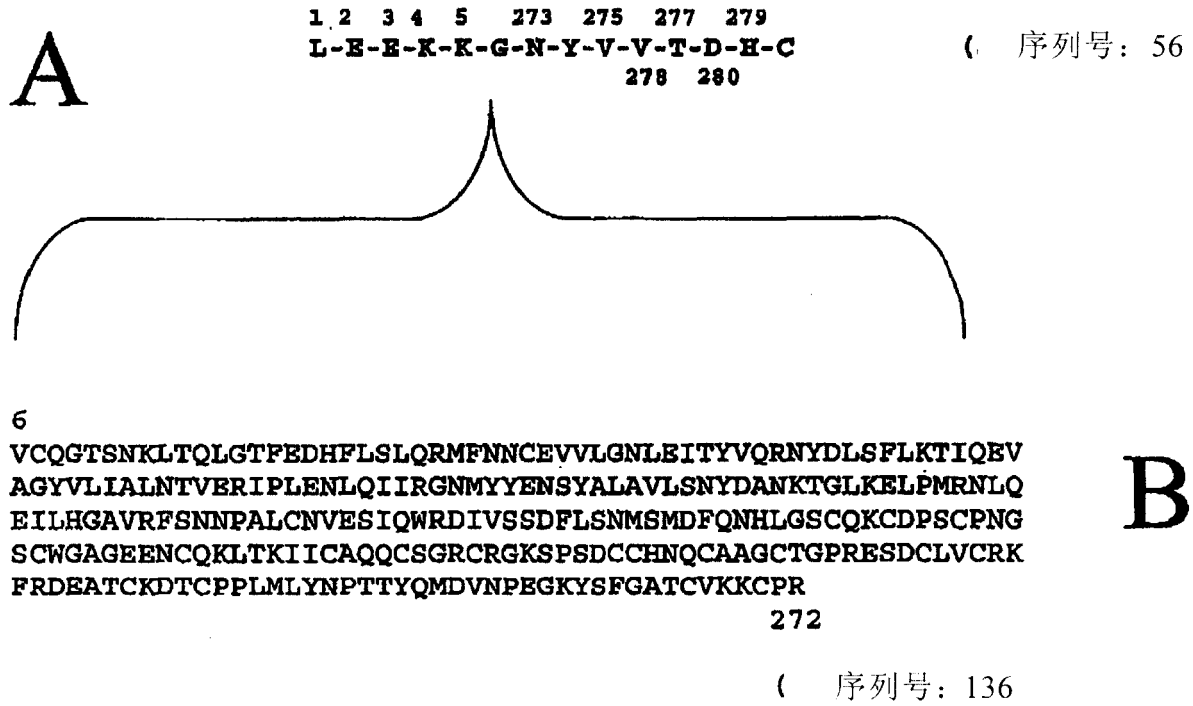


图2

XenoMax衍生的人类抗EGFRvIII抗体核苷酸和氨基酸序列

095

重链可变区的核苷酸序列

5'CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGT
CCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCT
GGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTTCATCTATTACAGA
GGGAACACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTTGACACG
TCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTG
TATTACTGTGCGCGAGACGGATATTGTAGTAGAACC GGCTGCTATGGCGGCTGGTTC
GACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACGTCTCCT3' (序列号: 35)

重链可变区的氨基酸序列

QVQLQESGPFLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGFIYYRGNTY
YNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGYCSRTGCGYGGWFDPWGQ
GTLVTVSP (序列号 : 7)

轻链可变区的核苷酸序列

5'GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCACCCTTGGACAGCCGGC
CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCATAACACTGATGGAAACATCTATTT
GAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTTATAAGATTC
TAATCGGTTCTCTGGGGTCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTC
CACACTGAAGATCAGCAGGGTGGAAAGCTGAGGATGTGGGGGTTTATTACTGCATGC
AAGGTACACAATTTCTATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTA3'
(序列号: 34)

轻链可变区的氨基酸序列

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLIHTDGNTYLSWLQQRPGQPRLLIYKISNRFSG
VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTQFPITFGQGTRLEIK (序列号
: 23)

图3A

123k/124g

重链可变区的核苷酸序列

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCCTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATGTCATATGATGGAAGT
AAAGAAGACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCTAGAGACAATTC
CGAGAACATGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTAT
ATTACTGTGTGAGCGAAGGATATTGTAGTAGTCGTAGCTGCTATAAGTACTACTACT
ACGGCATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' (序列号
:37)

重链可变区的氨基酸序列

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
KEDYADSVKGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSEGYCSSRSCYKYYYYG
MDVWGQGTTVTVSS (序列号: 13)

轻链可变区的核苷酸序列

5'ATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCC
TCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGTATAGAAATGGAAACAACATTTG
GATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTCT
AATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCGGGCACAGATTTT
AACTGAACATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGCATTACTGCATGCA
GGCTCTACAACTCCTCGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA3'
(序列号: 36)

轻链可变区的氨基酸序列

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLYRNGNNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRA
SGVPDRFSGSGSGTDFTLNISRVEAEDVGHYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIK (序列号
:29)

图3B

131

重链可变区的核苷酸序列 :

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGTCTGGGAGGTCCCTGA
 GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGAACTATGGCATGCACTGGGTCC
 GCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGT
 GATAAATACTATGCAGACTCCGTGAGGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCC
 AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTÁ
 TTACTGTGCGAGAGATGGCTACGATATTTGACTGGTAATCCTAGGGACTTTGACTA
 CTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' (序列号: 39)

重链可变区的氨基酸序列 :

QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSG
 DKYYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYDILTGNPRDFDYW
 GQGTLVTVSS (序列号: 2)

轻链可变区的核苷酸序列 :

5'GATACTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACATGTAACCCTTGGACAGCCGGC
 CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACCTACTT
 GAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAACCTCCAAGACTCCTAATTTATAGGATTC
 TAGGCGGTTCTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATT
 TCACACTGGAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATG
 CAATCTACACACGTTCTCGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA3'
 (序列号: 38)

轻链可变区的氨基酸序列 :

DTVMTQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPRLLIYRISRFRS
 GVPDRFSGSAGTDFTLTLEISRVEAEDGVVYCMQSTHVPWTFGQGTKVEIK (序列号:
 :19)

图3C

139

重链可变区的核苷酸序列:

**5'GAGGTGCAGGTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCGGCTATTAGTGGTAGTGGTGGT
AGTACAAACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATC
CAAGAACACACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTCT
ATTACTGTGCTGGGAGCAGTGGCTGGTCCGAGTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC
ACCGTCTCCTCG3'** (序列号: 41)

重链可变区的氨基酸序列:

**EVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST
NYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSSGWSEYWGQGLTVTS
S** (序列号: 10)

轻链可变区的核苷酸序列:

**5'GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCACTTGCCGGGCTAGTCAGGGCATTAGAAATAATTTAGCCTGGTATCAGCA
GAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCCTCCAATTTGCAAAGTG
GGGTCCCATCAAGGTTCAACCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCATAGTCA
GCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCGACTTATTACTGTCTACAGCATCACAGTTACC
CGCTCACTTCCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA3'** (序列号: 40)

轻链可变区的氨基酸序列:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNNLAWYQQKPGKAPKRLIYAASNLSGVPS
RFTGSGSGTEFTLIVSSLQPEDFATYYCLQHHSYPLTSGGGTKVEIK** (序列号: 25)

图3D

150

重链可变区的核苷酸序列:

5'CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCT
 CACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCTACAGTTCTGCTTGGA
 ACTGGATCAGGCAGTCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGGCATATCACAGG
 TCCAGGTGGTATTACGAGTATGCAGTATCGGTGAAAAGTCGAATAAACATCACCCC
 AGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACAC
 GGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGGCAGTCGCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCT
 GGTCACCGTCTCCTCA3' (序列号: 43)

重链可变区的氨基酸序列:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLTCAISGDSVSSYSSAWNWRQSPSRGLEWLGRAYHRSRW
 YYEYAVSVKSRINITPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGSRFDYWGQGLVTVSS
 (序列号: 5)

轻链可变区的核苷酸序列:

5'GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCACCCTTGGACAGCCGGC
 CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGGGATGGAAATACCTACTT
 GAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTTATAAGATTT
 TAACCGGTTCTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATT
 TCACACTGAAAATTAGCAGGGTGGAAAGCTGAGGATGTCGGGATTTATTTCTGCATGC
 ATACTACACAATTCCTTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAGGGTGGAAATCAA3'
 (序列号: 42)

轻链可变区的氨基酸序列:

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHRDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKISNRFS
 GVPDRFSGSAGTDFTLKISRVEAEDVGIYFCMHTTQFPWTFGQGRVEIK (序列号:
 :21)

图3E

170

重链可变区的核苷酸序列:

5'CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCT
 CACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAATGCTGCTTGGA
 GGATCAGGCAGTCCCCAGCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGG
 TCCAAGTGGTATAATGATTATGTAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCA
 GACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACG
 GCTGTGTATTACTGTGTAAGAGGCAGTCGCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTG
 GTCACCGTCTCCTCA3' (序列号: 45)

重链可变区的氨基酸序列:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLTSLTCAISGDSVSSNNAAWNWIRQSPARGLEWLGRTYYRSK
 WYNDYVVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCVRATAFDYWGQGLVTV
 SS (序列号: 4)

轻链可变区的核苷酸序列:

5'GCTATTGTGTTGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCACCCTTGGACAGCCGGC
 CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTTCACAGGGATGGAAACACCTACTT
 GAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTTATAAGATTC
 TAACCGGTTCTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATT
 TCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAACCTGACGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGC
 ATACTACACAACCTCCTTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA3'
 (序列号: 44)

轻链可变区的氨基酸序列:

AIVLTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHRDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKISNRFSG
 VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEPDDVGVYYCMHTTQLPWTFGQGTKVEIK (序列号
 :20)

图3F

211

重链可变区的核苷酸序列:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
 GACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTACCCCTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCC
 GCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGACATCATATGATGGAAGT
 AAAAAAGACTATGCAGACTCCGCGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTC
 CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGT
 ATTACTGTGTGAGCGAAGGATATTGTAGTAGTAGTAGCTGCTATAAGTACTACTATT
 ACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTTCA3' (序列号
 :47)

重链可变区的氨基酸序列:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTLSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVTSYDGSK
 KDYADSAKGRFTISRDN SKNTLYLOMNSLR AEDTAVYYCVSEGYCSSSSCYKYYYYGM
 DVWGQGTITVTVSS (序列号: 12)

轻链可变区的核苷酸序列:

5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGC
 CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTATATAGAAATGGAAACA ACTATTT
 GGATTGGTATCTGCAGAGGCCAGGGCAGTCTCCACA ACTCCTGATCTATTTGGGTTC
 TAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTT CAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATT
 TACATTGAAAATCGGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCA
 GGCTCTACAAACTCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA3'
 (序列号: 46)

轻链可变区的氨基酸序列:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGN NYLDWYLQRPGQSPQLLIYLGSNRA
 SGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIK (序列号
 :28)

图3G

250

重链可变区的核苷酸序列:

**5'GAGGGGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGTACAGCCTGGGGAGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCGGCTATTAGTGGTAGTGGTGGT
AGCACAAATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGAACACGCTGTATCTGCAAGTGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTAT
ATTACTGTGCTGGGAGCAGTGGCTGGTCCGAGTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC
ACCGTCTCCTCA3' (序列号 :49)**

重链可变区的氨基酸序列:

**EGQLLESGGGWVQPGESLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST
NYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQVNSLRVEDTAVYYCAGSSGWSEYWGQGLTVTVSS
(序列号 :9)**

轻链可变区的核苷酸序列:

**5'GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGCGT
CACCATCACTTGCCGGACAAGTCAGGGCATTAGAAAAAATTTAGGCTGGTATCAGC
AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTACAAAGT
GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACAATC
CGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGAACCTTACTGTCTCCAGCATCATAGTTAC
CCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAGGGTGGAGATCAGA3' (序列号 :48)**

轻链可变区的氨基酸序列:

**DIQMTQSPSSLSASVGDSTITCRYSQGIKRNIGWYQQKPKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISRLEPEDFATYYCLQHHSPYPI.TFGGGTRVEIR (序列号 :26)**

图3H

318

重链可变区的核苷酸序列:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
 GACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTCACCCTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCC
 GCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGACATCATATGATGGAAGT
 AAAAAAGACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATC
 CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGT
 ATTACTGTGTGAGCGAAGGATATTGTGATAGTAGTAGCTGCTATAAGTACTACTACT
 ACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCAAGGTCACCGTCTCTTCA3' (序列号
 :51)

重链可变区的氨基酸序列:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTLSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVTSYDGSK
 KDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSEGYCDSSSCYKYYYYG
 MDVWGQGTITVTVSS (序列号 :15)

轻链可变区的核苷酸序列:

5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGC
 CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTATATAGAAATGGAAACA ACTATTT
 GGATTGGTATCTGCAGAGGCCAGGGCAGTCTCCACA ACTCCTGATCTATTTGGGTTC
 TAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTT CAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTT
 TACTACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGC
 AGGCTCTACAAACTCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA3'
 (序列号 :50)

轻链可变区的氨基酸序列:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGN NYLDWYLRPGQSPQLLIYLGSNRA
 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIK (序列号
 :33)

图3I

333

重链可变区的核苷酸序列:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
 GACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTCACCCTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCC
 GCCAGGCTCTAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGACATCATATGATGGAAGT
 AAAAAAGACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTC
 CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGT
 ATTACTGTGTGAGCGAAGGATATTGTGATAGTACTAGTTGCTATAAGTACTACTACT
 ACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTTCA3' (序列号: 53)

重链可变区的氨基酸序列:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTLSSYGMHWVRQALGKGLEWVAVTSYDGSK
 KDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSEGYCDSTSCYKYYYYG
 MDVWGQGTITVTVSS (序列号: 17)

轻链可变区的核苷酸序列:

5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGC
 CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTATATAGAAATGGAAACA ACTATTT
 GGATTGGTATCTGCAGAGGCCAGGGCAGTCTCCACA ACTCCTGATCTATTTGGGTTC
 TAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTT CAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTT
 TACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGC
 AGGCTCTACAAACTCCTCGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA3'
 (序列号: 52)

轻链可变区的氨基酸序列:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGNNYLDWYLQRPGQSPQLLIYLGSNRA
 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIK (序列号: 32)

图3J

342

重链可变区的核苷酸序列:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
 GACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTACCCTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCC
 GCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGACATCATATGATGGAAGT
 AAAAAAGACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC
 CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGT
 ATTACTGTGTGAGCGAAGGATATTGTGATAGTACTAGCTGCTATAAGTACTACTACT
 ACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTTCA3' (序列号: 55)

重链可变区的氨基酸序列:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTLSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVTSYDGSK
 KDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSEGYCDSTSCYKYYYYG
 MDVWGQGTITVTVSS (序列号: 16)

轻链可变区的核苷酸序列:

5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGC
 CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTATATAGAAATGGAAACA ACTATTT
 GGATTGGTATCTGCAGAGGCCAGGGCAGTCTCCACA ACTCCTGATCTATTTGGGTTC
 TAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTT CAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTT
 TACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGC
 AGGCTCTACAACTCCTCGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA3'
 (序列号: 54)

轻链可变区的氨基酸序列:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGNNYLDWYLQRPGQSPQLLIYLGSNRA
 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEABDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIK (序列号: 31)

图3K

13.1.2

重链可变区的核苷酸序列:

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGC
 CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATT
 CACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATG
 ATGGAAGTAATAAATACTATGTAGACTCCGTGAAGGGCCG
 ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGT
 TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
 GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCT
 CTAGCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
 CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTG
 TGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA (序列号 137)

重链可变区的氨基酸序列:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
 SYGMHWVRQAPGKLEWVAVIWDGSKYY
 VDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED
 TAVYYCARDGWQQLAPFDYWGQGLVTVSS
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGV (序列号 138)

轻链可变区的核苷酸序列:

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCA
 CCCTTGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCA
 AAGCCTCGTGCATAGTGATGGAAACACCTACTTGAGTTGG
 CTTACCCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTT
 ATAAGATTTCTAACCGTTCTCTGGGGTCCCAGACAGATT
 CAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGCTTTCACACTGAAAATC
 AGCAGGGTGGAAAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCA
 TGCAAGCTACACAACCTCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGAC
 CAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC
 TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
 CTGCTAGCGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG
 AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAA
 TCGGGTAACTCCCAGG (序列号 139)

轻链可变区的氨基酸序列

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLV
 HSDGNTYLSWLHQRFQPPRLLIYKISNRF
 SGVPDRFSGSAGTAFTLKISRVEAEDVGV
 YYCMQATQLPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
 VQWKVDNALQSGNSQ (序列号 140)

图3L

重链 链名称	V	D	J	FR1	序列号
		种系		QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAAS	序列号 141
13 1 2	VH3-33	D6-13	JH4B	-----	序列号 142

	CDR1	FR2	CDR2	序列号
	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VIWYDGSNKYYADSVKG	序列号 141
13 1 2	-----	-----	-----V-----	序列号 142

	FR3	CDR3	J	序列号
	RFTISRDN\$KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR		WGQGLVTVSSA	序列号 141
13 1 2	-----	DGWQQLAPFDY	-----	序列号 142

图4

轻链				序列号
链名称	V	J	FR1	
		种系	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISC	序列号 143
13_1_2	A23	JK1	_____	序列号 144

				序列号
	CDR1	FR2	CDR2	
	RSSQSLVHSDGNTYLS	WLQQRPGQPPRLIY	KISNRFS	序列号 143
13_1_2	_____	-H_____	_____	序列号 144

				序列号
	FR3	CDR3	J	
	GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	MQATQFPRT	FGQGTKVEIKR	序列号 143
13_1_2	_____A_____	___L___	_____	序列号 144

图5

		CDR1	FR3	CDR3	FR2	序列号:
-	-	种系	QVQLVDSGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFS	SYGMR	VVROAPGKGLVVA	序列号 1
174E1	131	VH3-33/D3-9/JH4b	-----S-----R	N-----	-----	序列号 2
-	-	种系	QVQLQQSGPGLVKPSQTLISLTCAISGDSVS	SNSAAVN	VIRQSPSRGLEVIG	序列号 3
125D10	170	VH6-01/D2-21/JH4b	-----	N-----	A-----	序列号 4
102D5	150		-----	-Y-S-	-----	序列号 5
-	-	种系	QVQLQDSGPFLLVKPSQTLISLTCTVSGGSIS	SGGYVVS	VIRQSPGKGLVIG	序列号 6
172B12	095	VH4-31/D4/JH5b	-----	-----	-----	序列号 7
-	-	种系	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYAMS	VVROAPGKGLVVS	序列号 8
130D2	250	VH3-23/D6-19/JH5b	-G-----V-----E	-----	-----	序列号 9
102A5	139		-Y-----	-----	-----	序列号 10
-	-	种系	QVQLVDSGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFS	SYGMR	VVROAPGKGLVVA	序列号 11
130D7	211	VH3-30/D2-15/JH6b	-----V-----L-	-----	-----	序列号 12
129A7	124		-----L-	-----	-----	序列号 13
-	-	种系	QVQLVDSGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFS	SYGMR	VVROAPGKGLVVA	序列号 14
141A10	310	VH3-30/D2-2/JH6b	-----V-----L-	-----	-----	序列号 15
124D4	342		-----V-----L-	-----	-----	序列号 16
132D6	333		-----V-----L-	-----	L-----	序列号 17

		CDR2	FR3	CDR3	FR1	序列号:
-	-	VIVYDGSNKYYADSVKQ	RFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR		VGQGITLVTVSS	序列号 1
174E1	131	-----D-----R	-----	DGYDILTGNPRDFDY	-----	序列号 2
-	-	RTYYRSKVYNDYAVSVKS	RITINFDTSKNQPSLQLSNVTPEDTAVYYCAR		VGQGITLVTVSS	序列号 3
125D10	170	-----V-----	-----V-	ATAFDY	-----	序列号 4
102D5	150	-A-E-R-YE	-N-T-	GSR	-----	序列号 5
-	-	VIVYDGSNKYYADSVKQ	RFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR		VGQGITLVTVSS	序列号 6
172B12	095	F-R-N	-----	DGYCSRTGCGGWFDP	-----	序列号 7
-	-	AISGSGSYTYADSVKQ	RFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAK		VGQGITLVTVSS	序列号 8
130D2	250	-----N-----	-----V-----V-----G	SSGTFSEY	-----	序列号 9
102A5	139	-----N-----	-----G	-----	-----	序列号 10
-	-	VIVYDGSNKYYADSVKQ	RFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAK		VGQGITLVTVSS	序列号 11
130D7	211	-T-----K-D-----	-----VS	EGYCSSSCYKYYYGMDV	-----	序列号 12
129A7	124	-N-----KED-----	-----E-----VS	R	-----	序列号 13
-	-	VIVYDGSNKYYADSVKQ	RFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAK		VGQGITLVTVSS	序列号 14
141A10	310	-T-----K-D-----	-----VS	EGYCSSSCYKYYYGMDV	-----	序列号 15
124D4	342	-T-----K-D-----	-----VS	T	-----	序列号 16
132D6	333	-T-----K-D-----	-----VS	T	-----	序列号 17

图6

7		11		13		17			
序列号	种系	DI VHTQTP LSSPVT LGGP ASISC	RSSQSLVHS DGN TYLS	V LQORFGQ PPRLLIY	序列号	种系	DI VHTQTP LSSPVT LGGP ASISC	RSSQSLVHS DGN TYLS	V LQORFGQ PPRLLIY
174F1	131	-T-----H			序列号 18				
125D10	170	A-L-----		-----R-----	序列号 19				
182D5	150			-----R-----	序列号 20				
-	-				序列号 21				
172B12	095			-----I-T-I-----	序列号 22				
-	-				序列号 23				
182A5	139			-----N-A-----	序列号 24				
138D2	250			-----S-----	序列号 25				
-	-			-----T-----XN-----	序列号 26				
-	-				序列号 27				
190D7	211			-----YR-N-----R-----	序列号 28				
129A7	123			-----YR-N-----	序列号 29				
-	-				序列号 30				
124D1	342			-----YR-N-----R-----	序列号 31				
132D8	333			-----YR-N-----R-----	序列号 32				
141A10	318			-----YR-N-----R-----	序列号 33				

CDR2		EP2		CDR3		FRA					
序列号	种系	KISNRFS	GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGYTYC	MQALQFPWT	FGGQTKVEIK	序列号	种系	KISNRFS	GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGYTYC	MQALQFPWT	FGGQTKVEIK
174F1	131	R-R---	-----E-----	-----S-NV-----		序列号 18					
125D10	170		-----FD-----	-----HT-I-----		序列号 19					
182D5	150			-----HT-----	-----R-----	序列号 20					
-	-					序列号 21					
172B12	095			-----C-----		序列号 22					
-	-					序列号 23					
182A5	139	---Y---	-----T-----IV-----	-----R-----	-----S-----	序列号 24					
138D2	250			-----R-----	-----R-----R-----	序列号 25					
-	-					序列号 26					
190D7	211					序列号 27					
129A7	123			-----N-----N-----	-----R-----	序列号 28					
-	-					序列号 29					
124D1	342					序列号 30					
132D8	333					序列号 31					
141A10	318					序列号 32					
						序列号 33					

图7

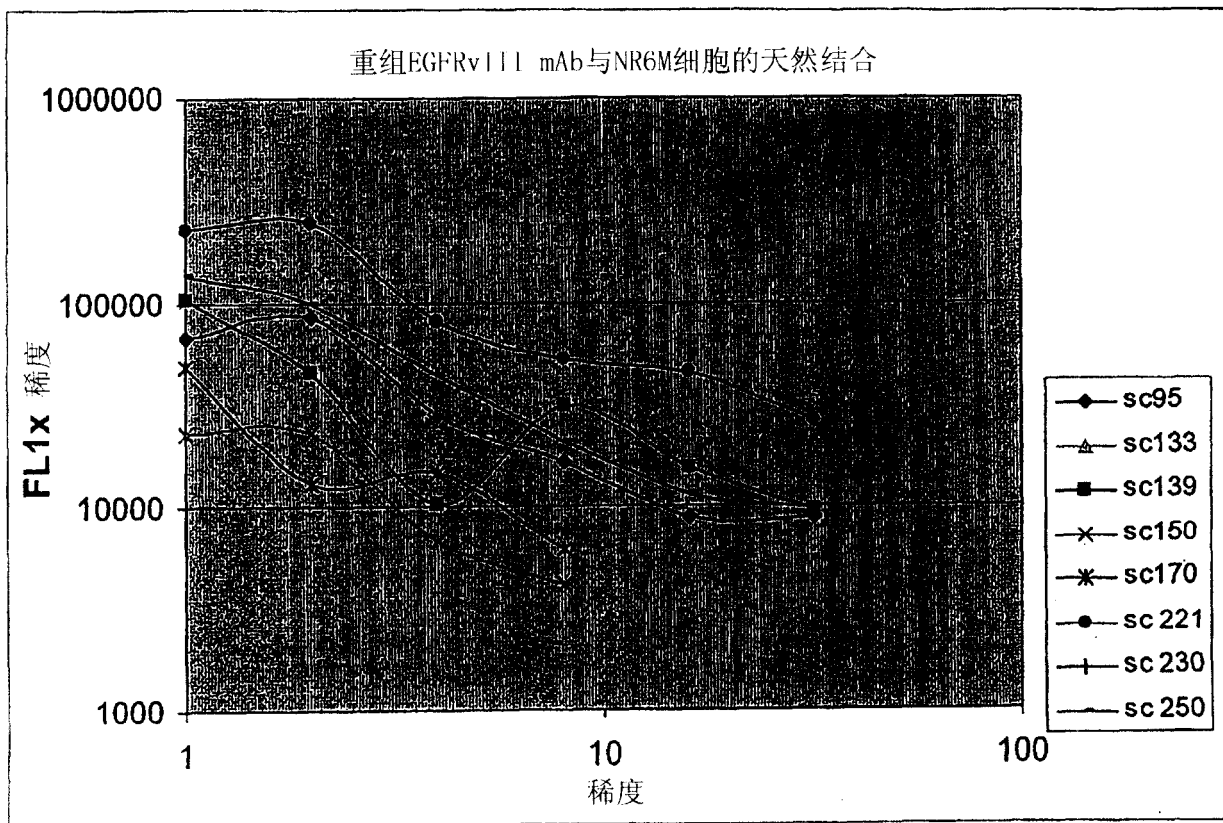


图8

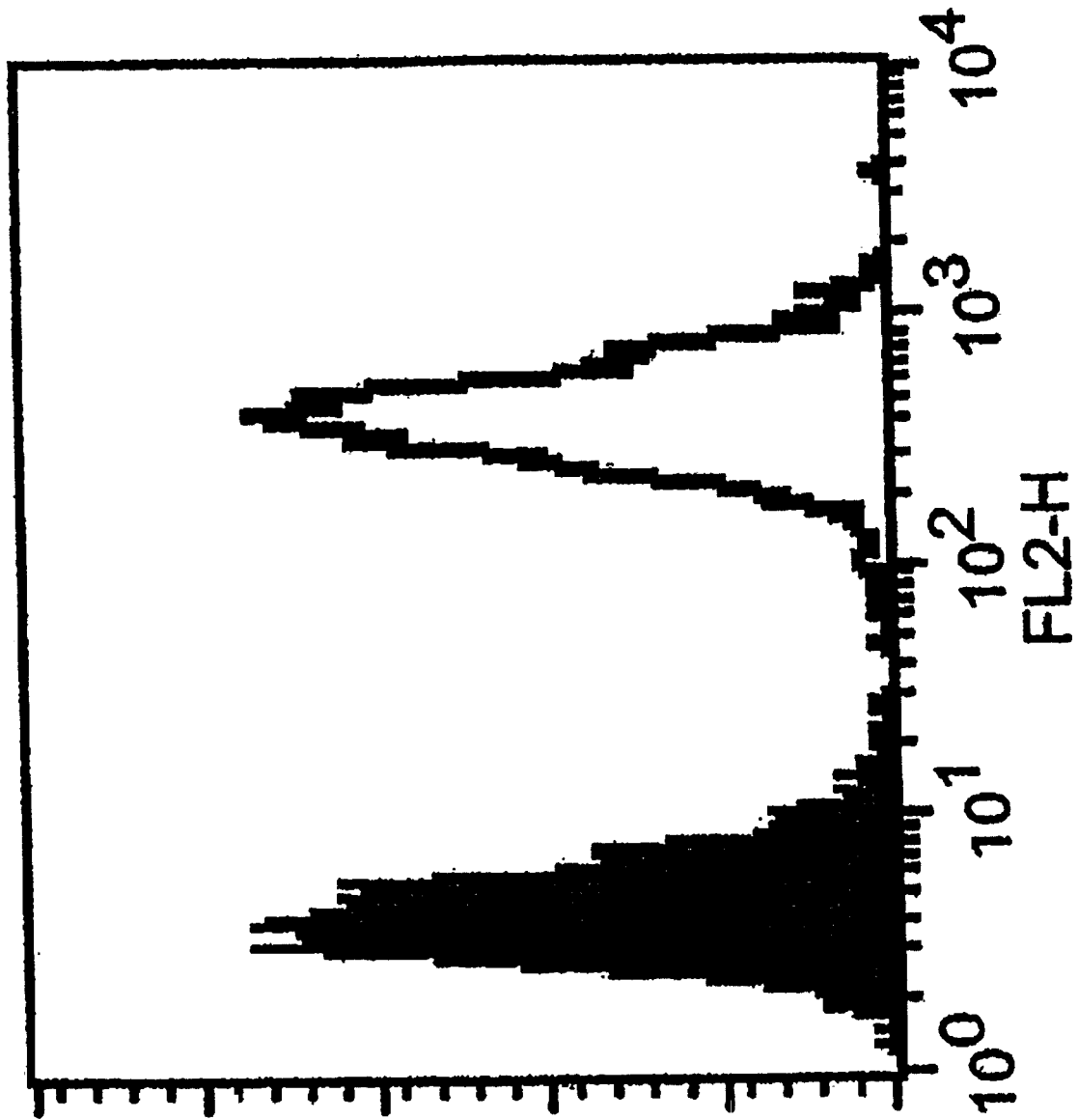


图9A

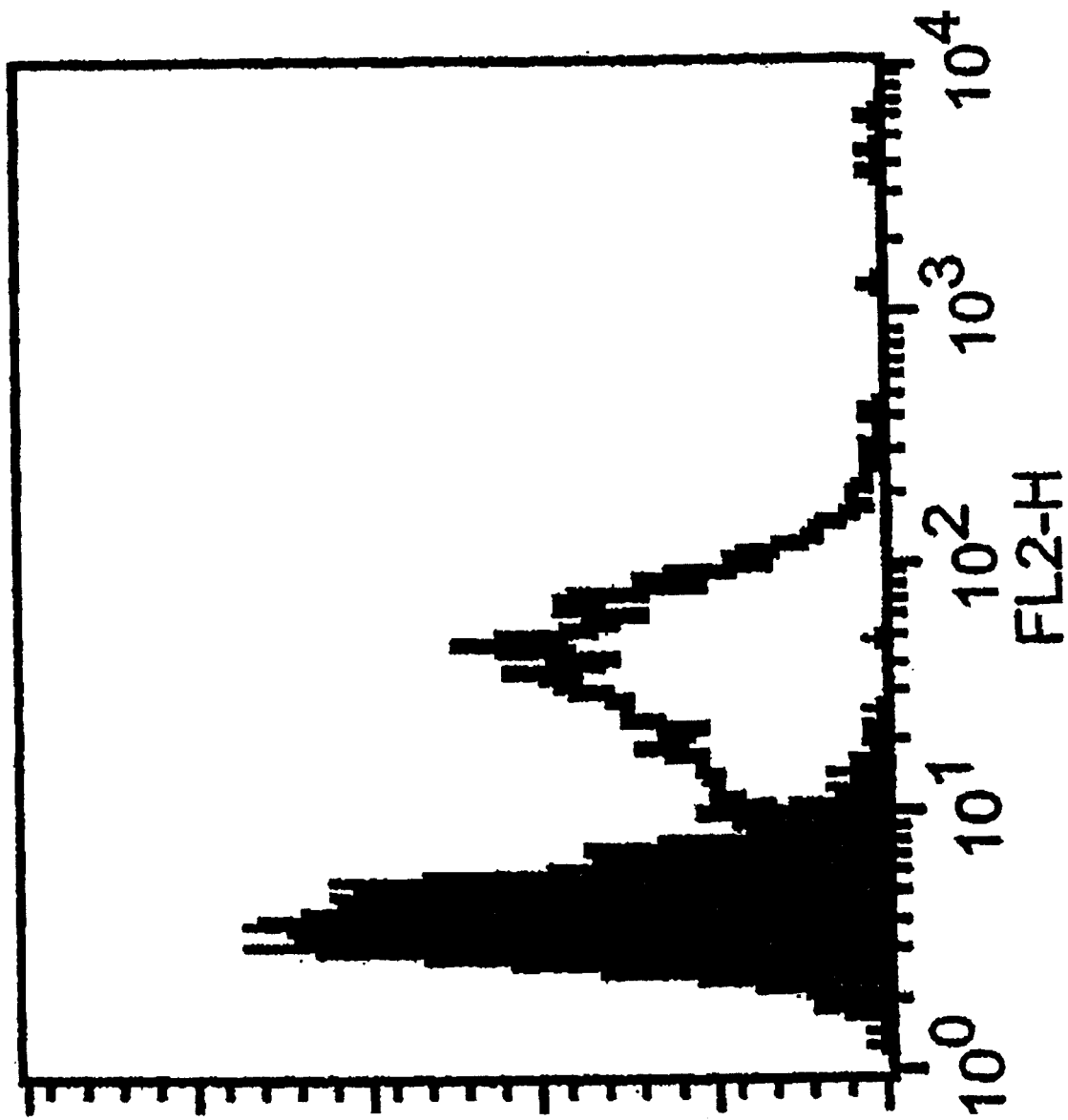


图 9B

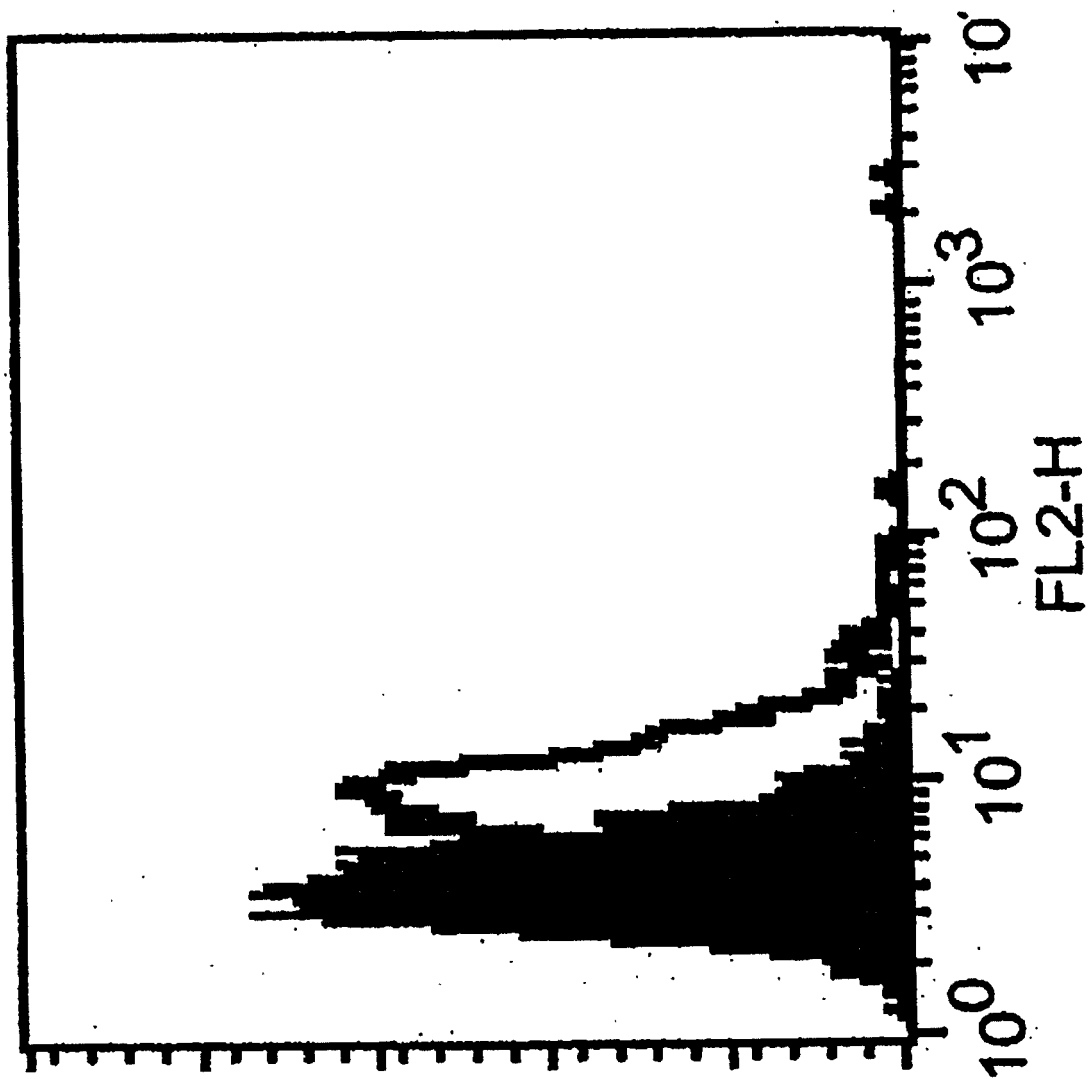
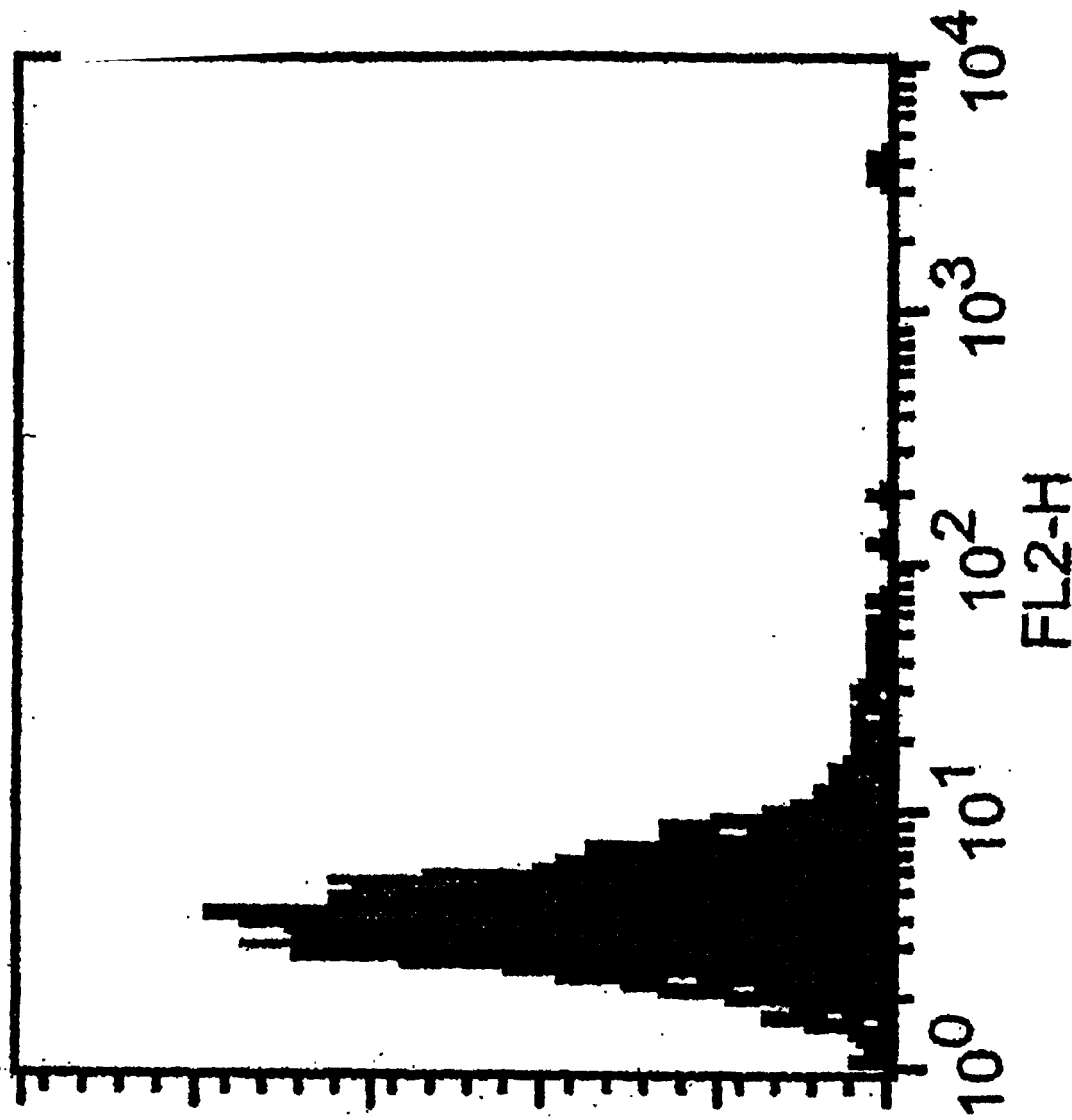


图9C



FL2-H

图9D

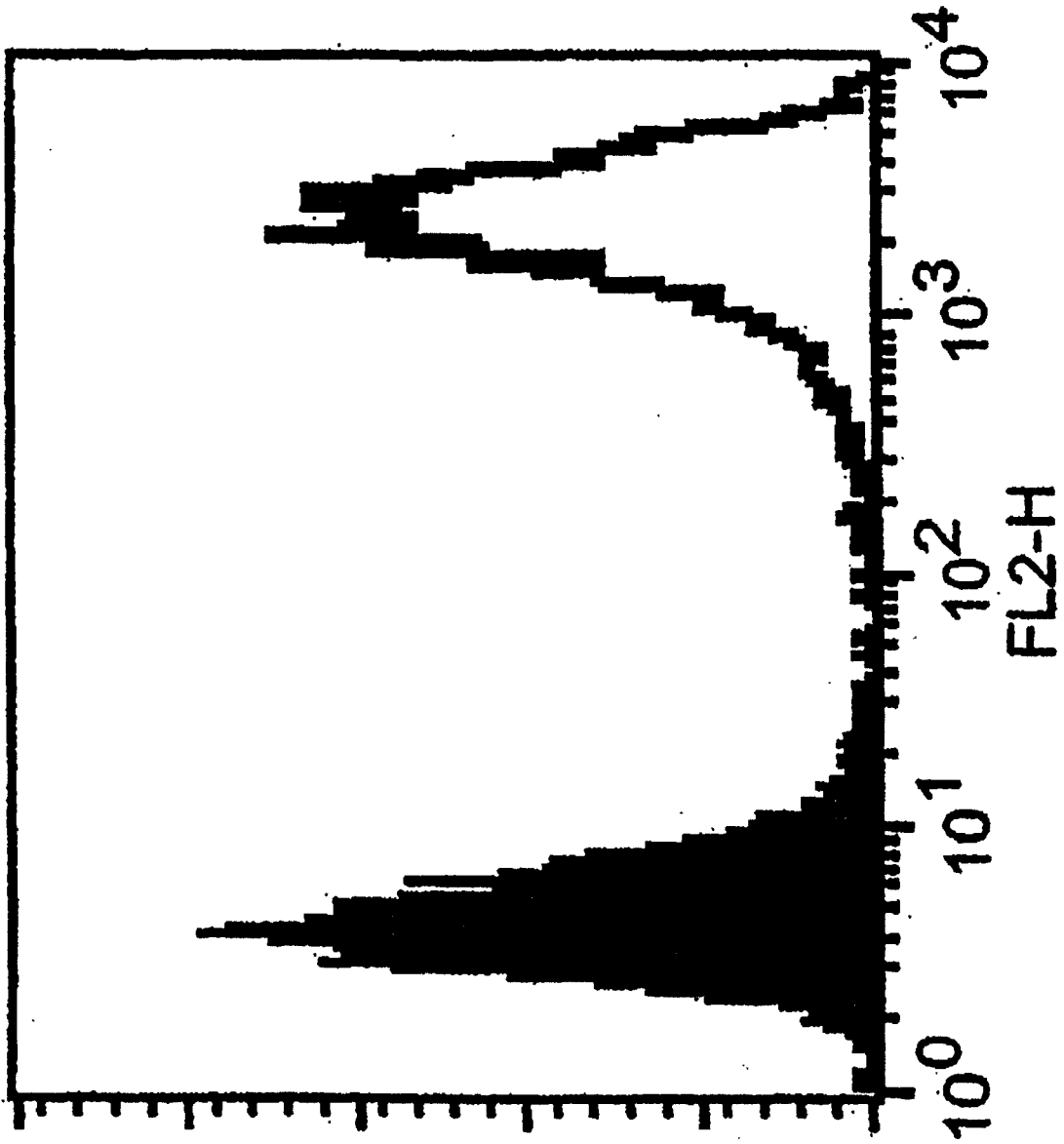


图9E

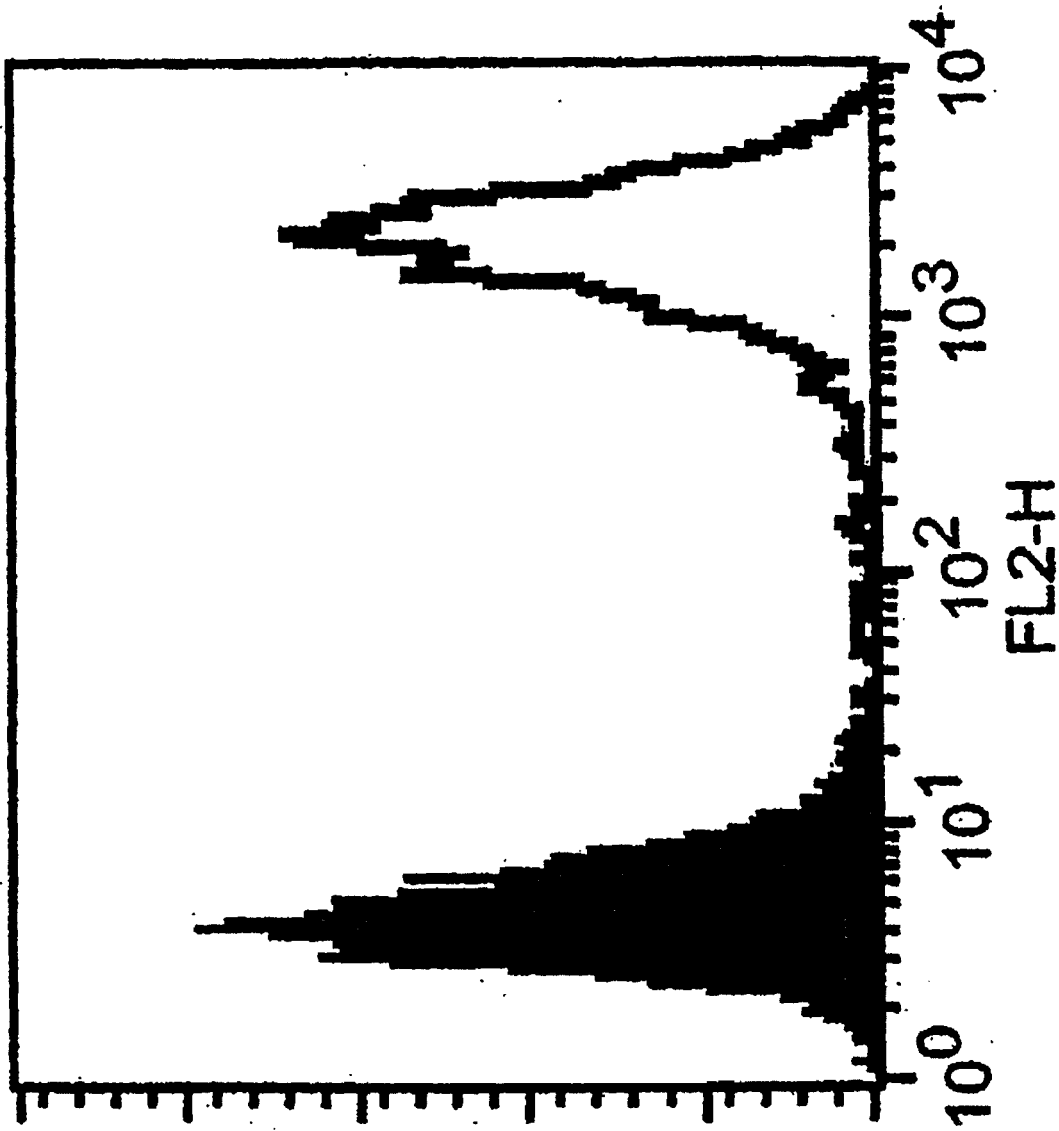


图9F

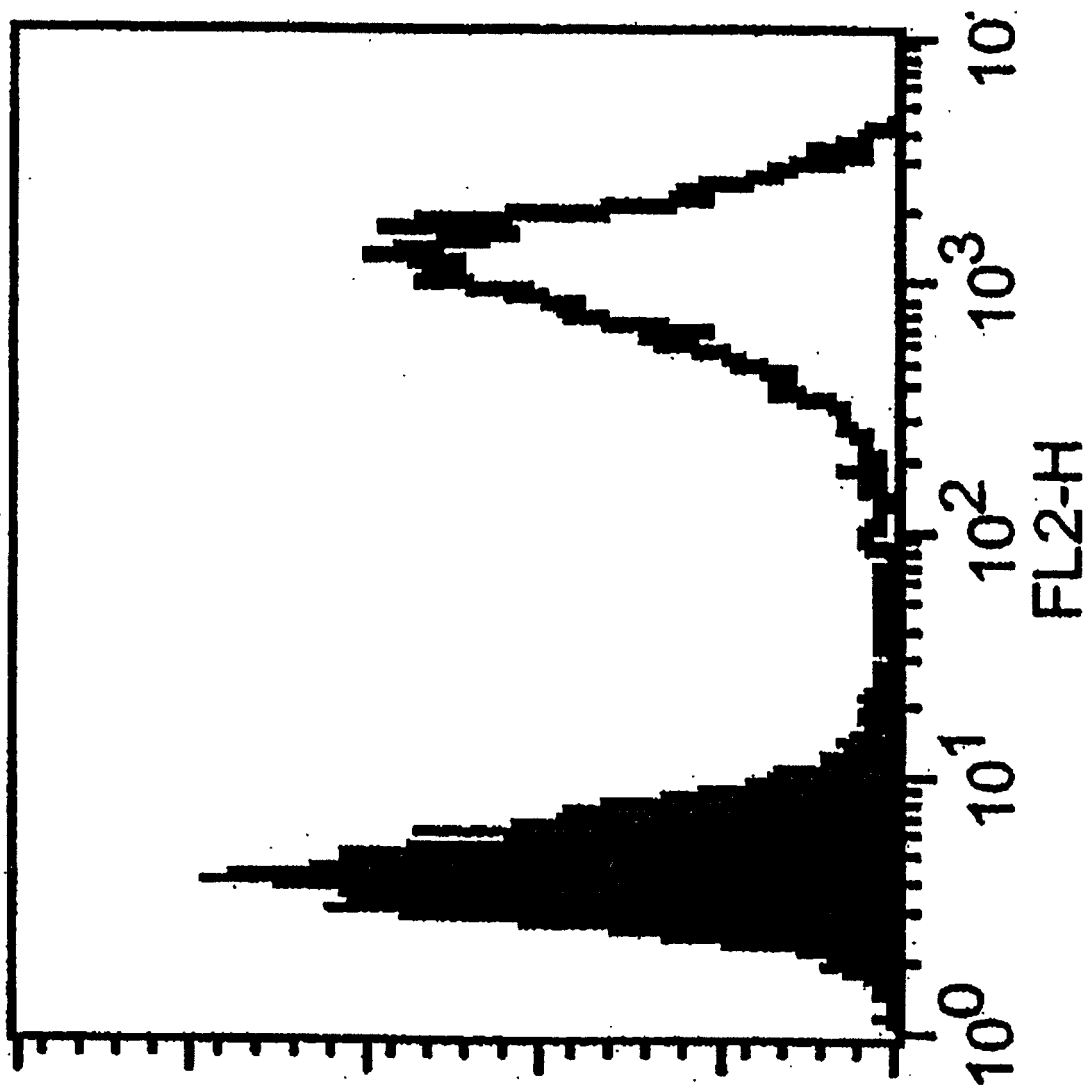
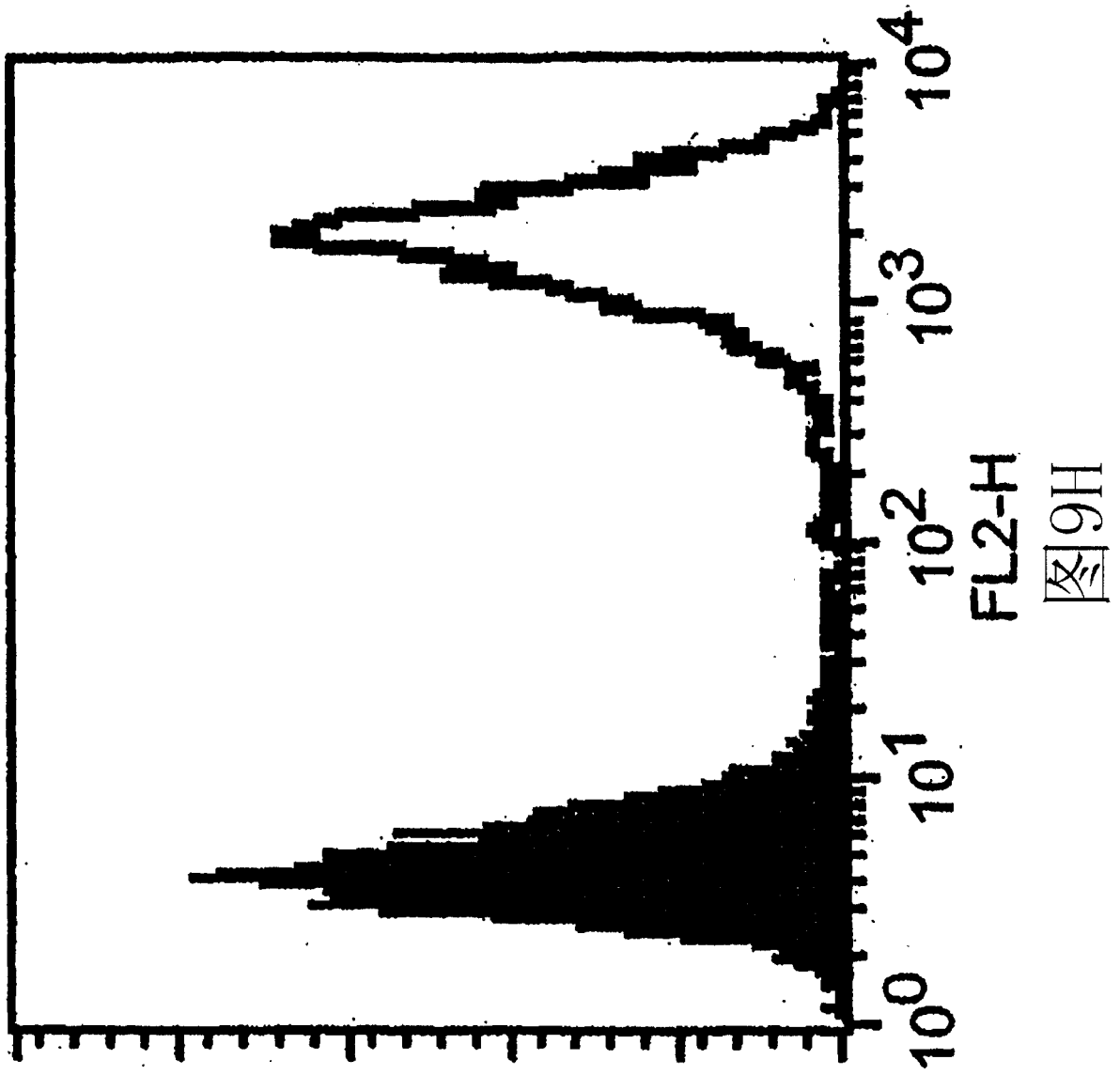


图9G



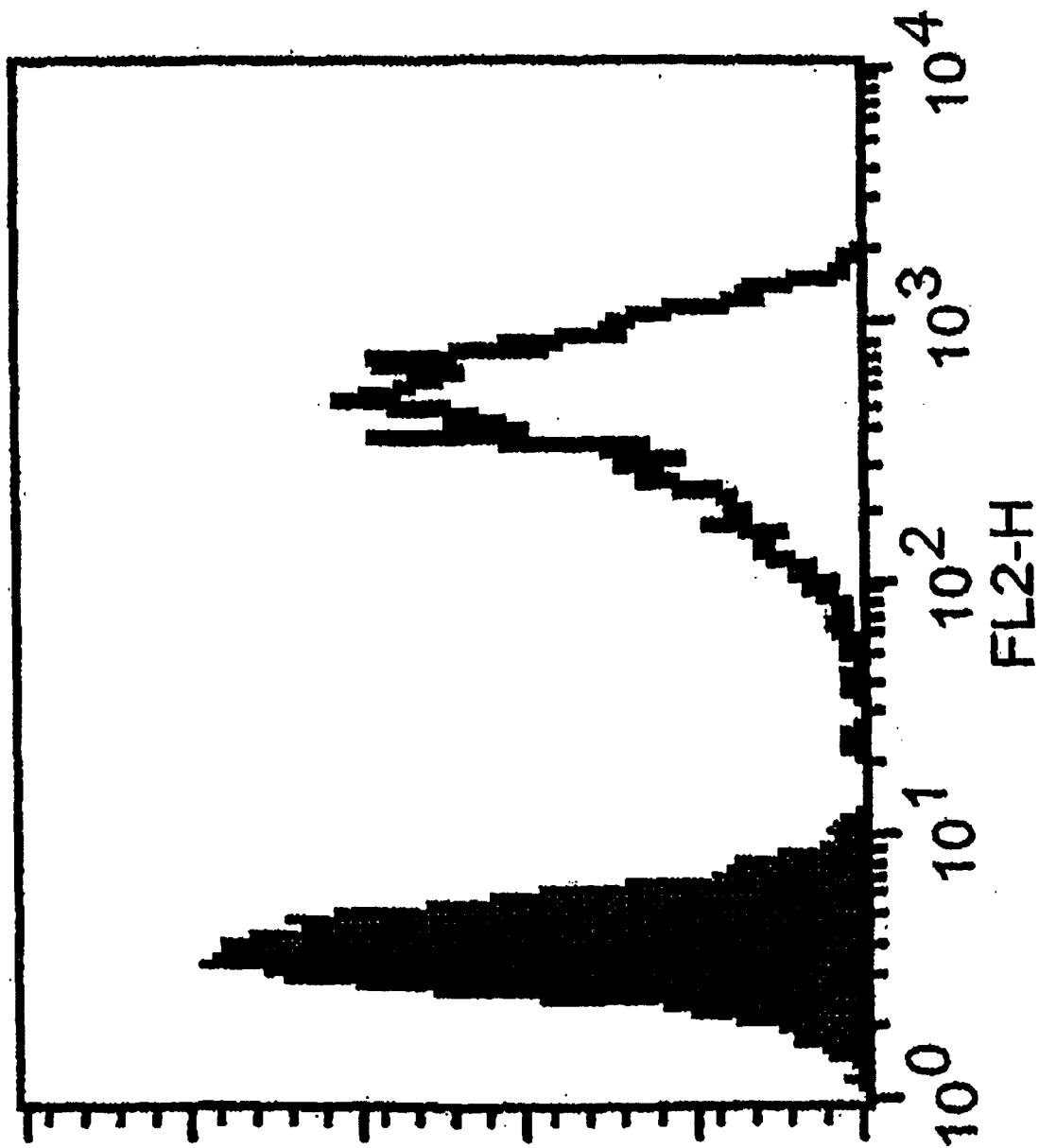


图9I

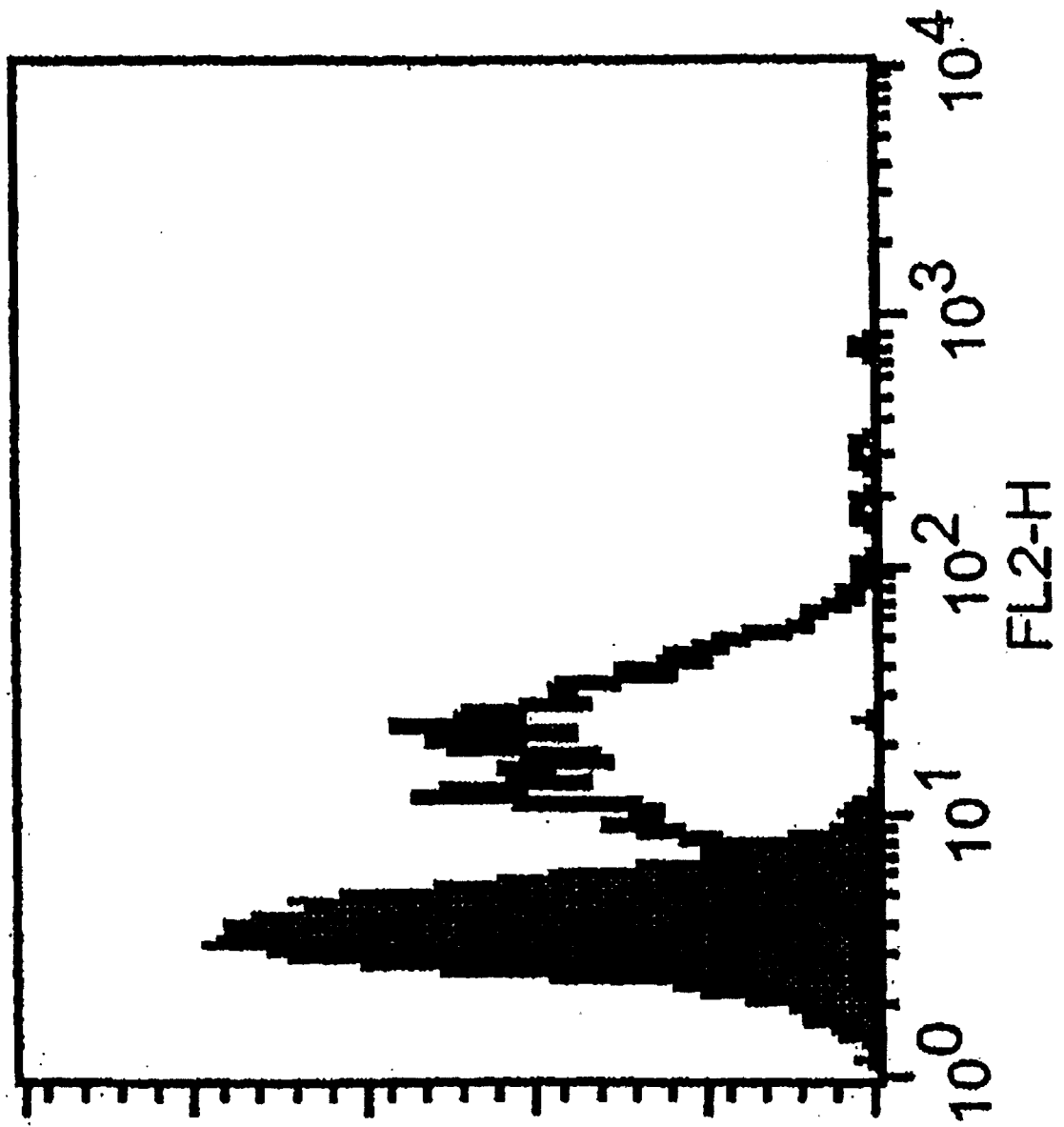


图9J

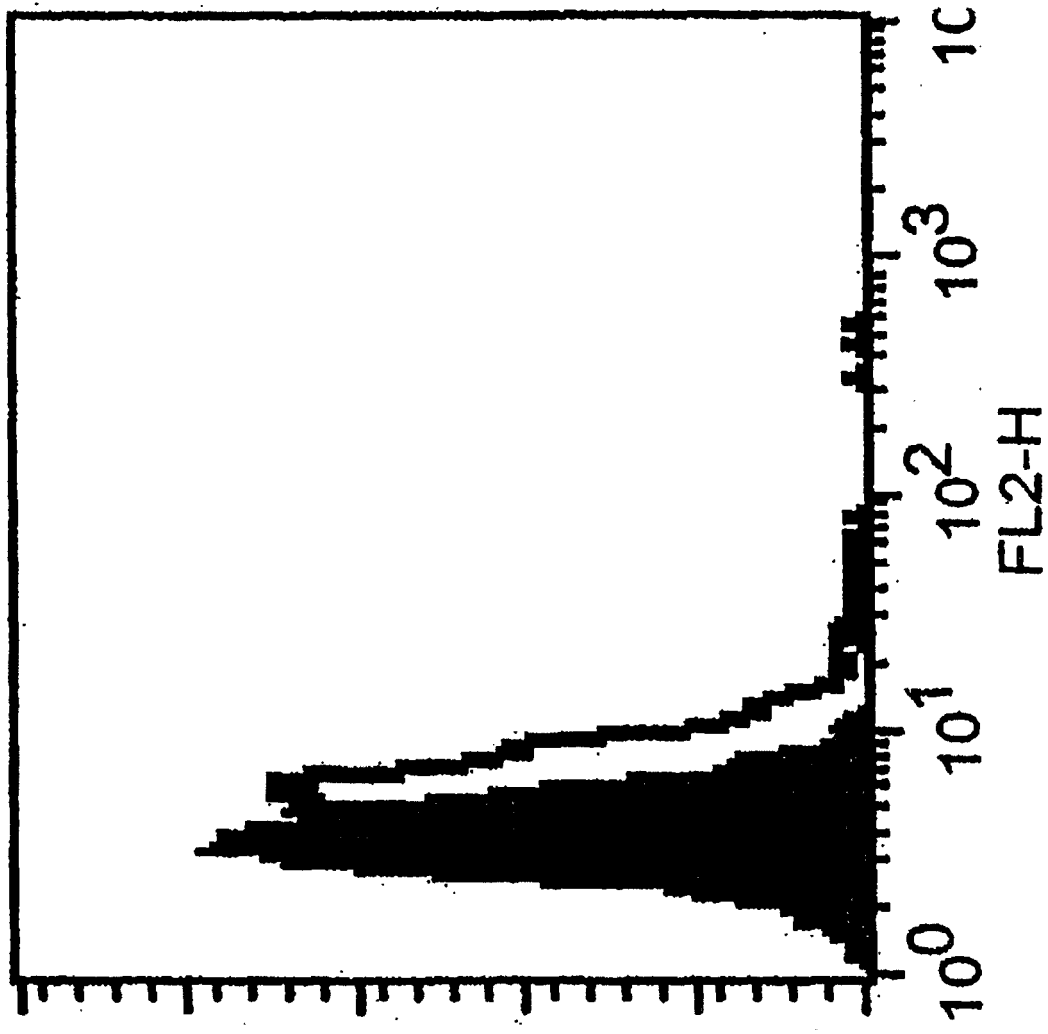


图9K

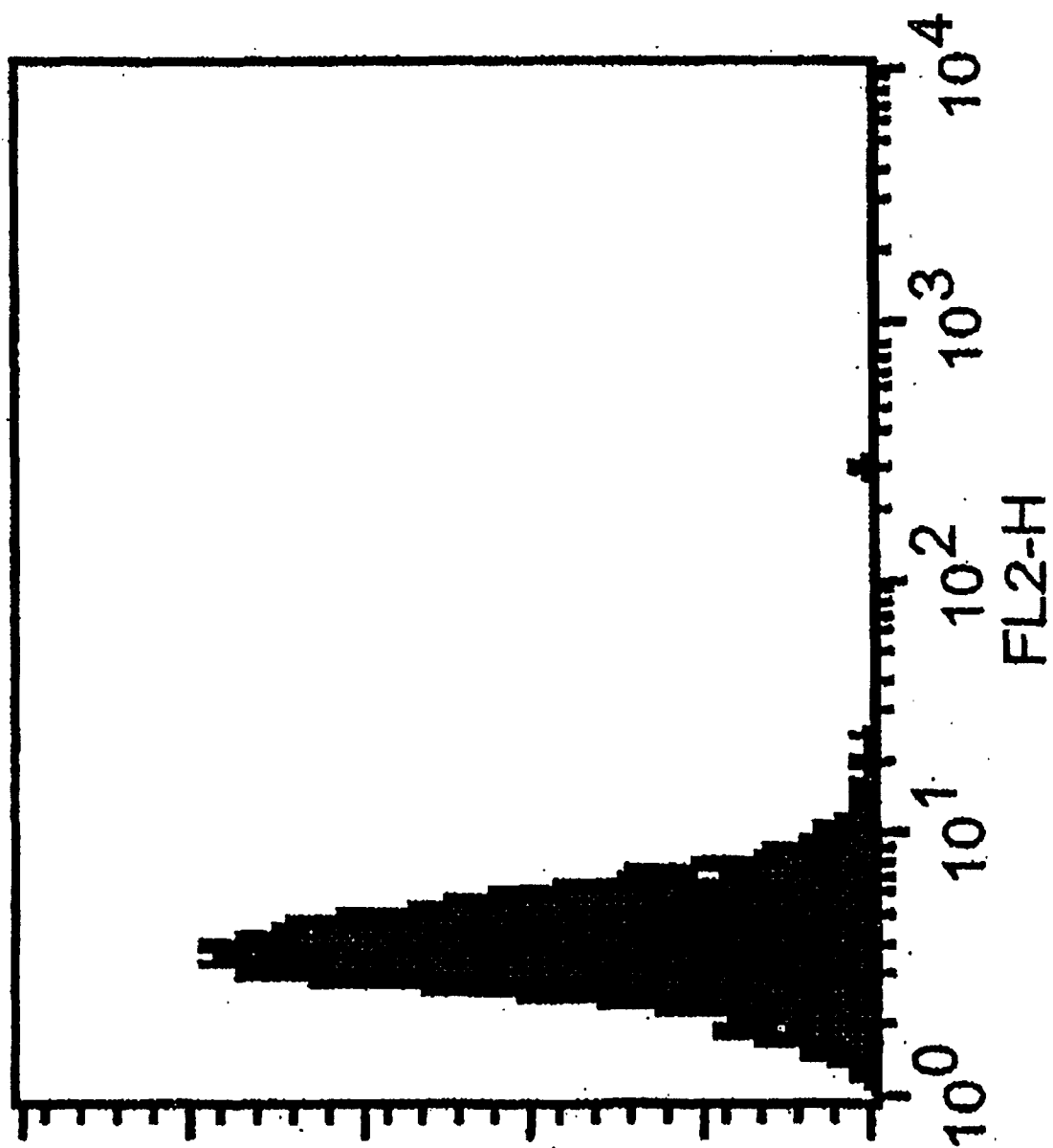


图9L

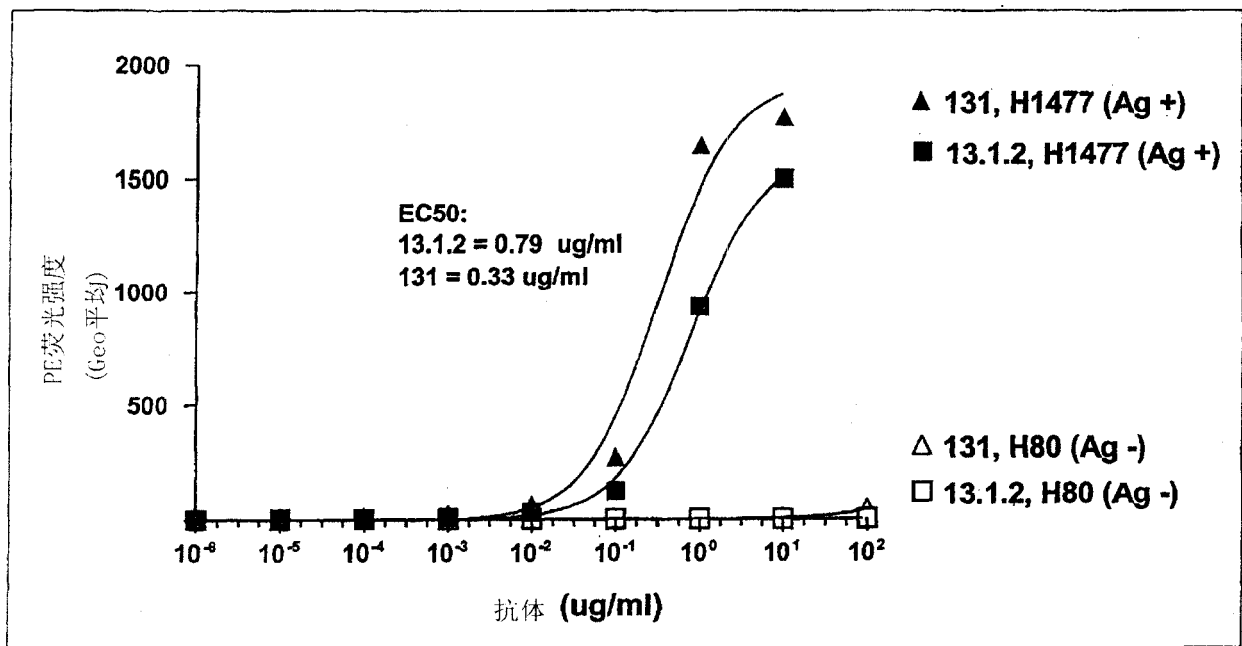


图9M

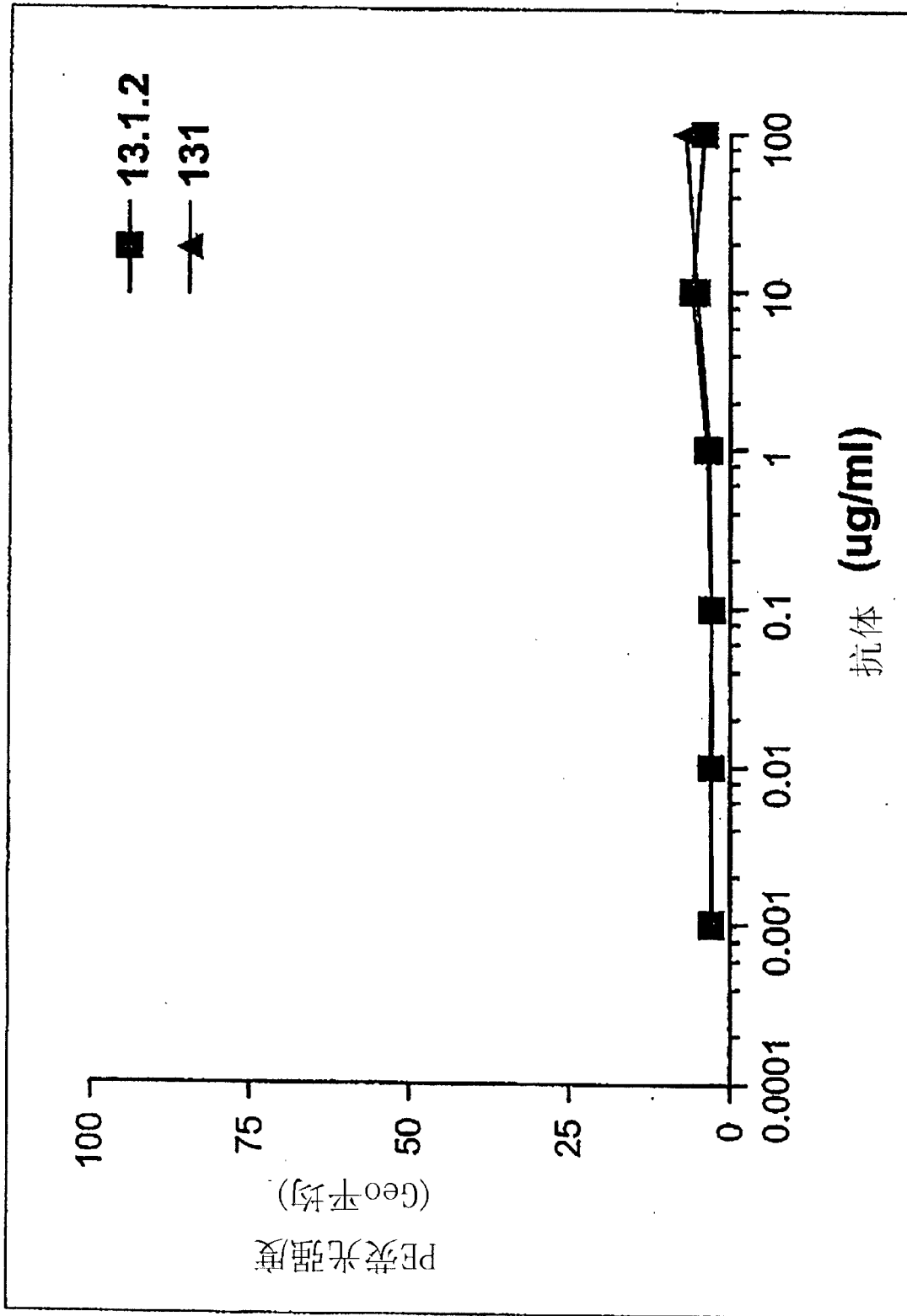


图9N

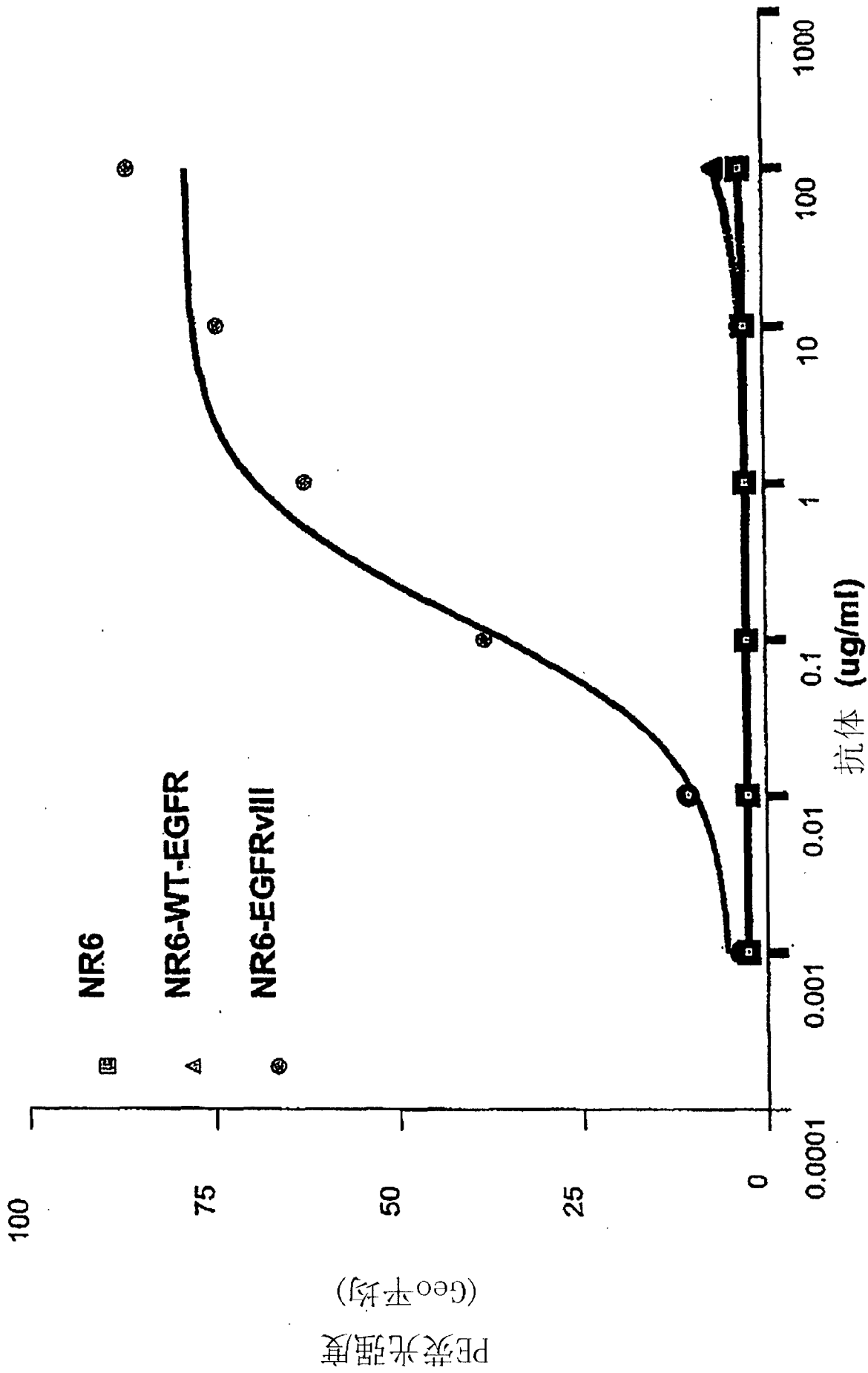


图 90

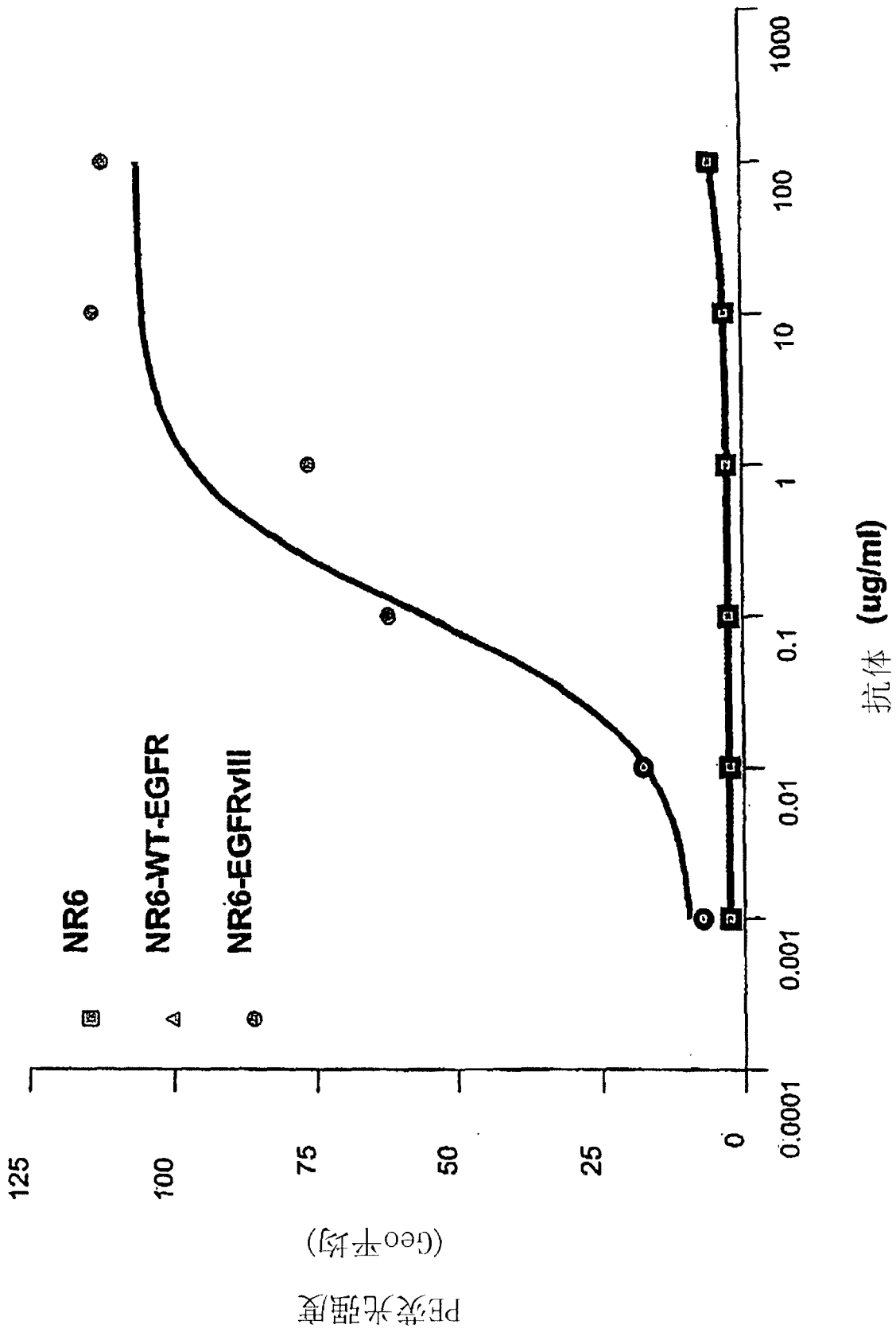


图9P

ABX-EGF

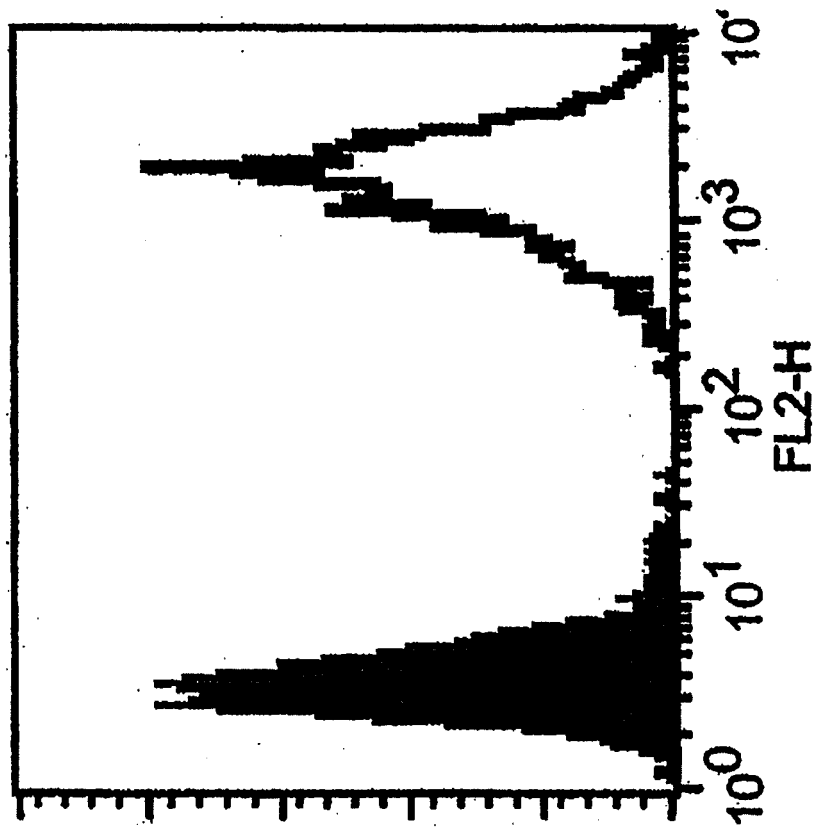


图10A

XG1-131

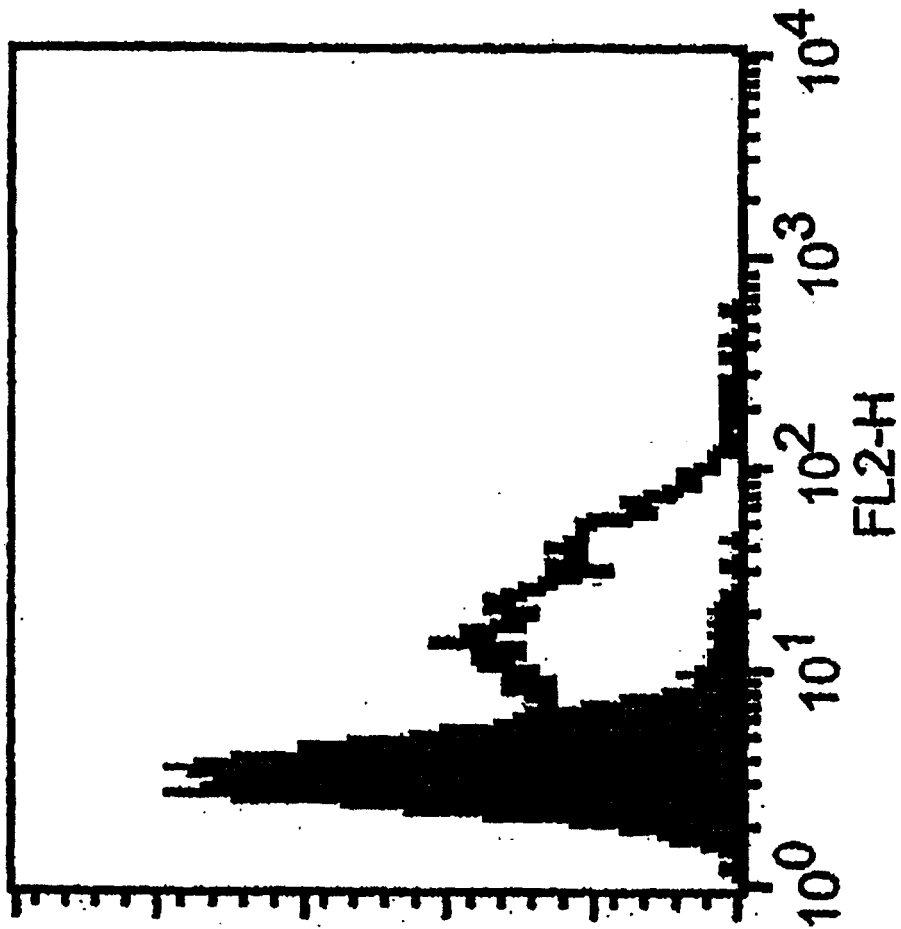


图10B

XG1-139

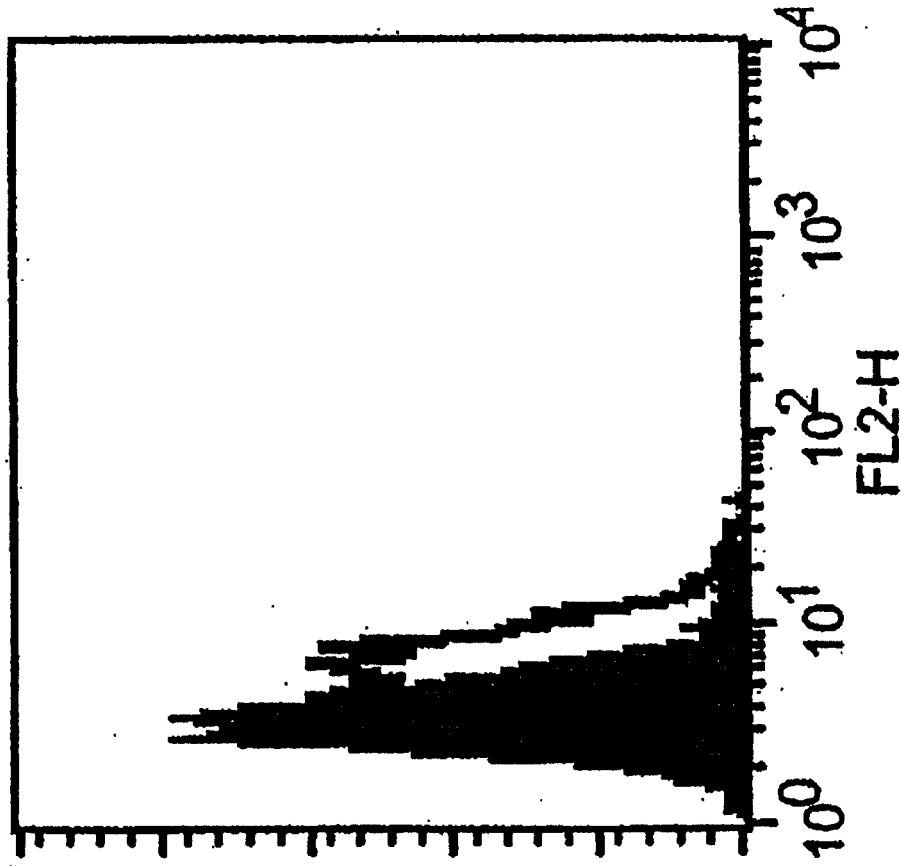


图10C

DEGFR13.1.2

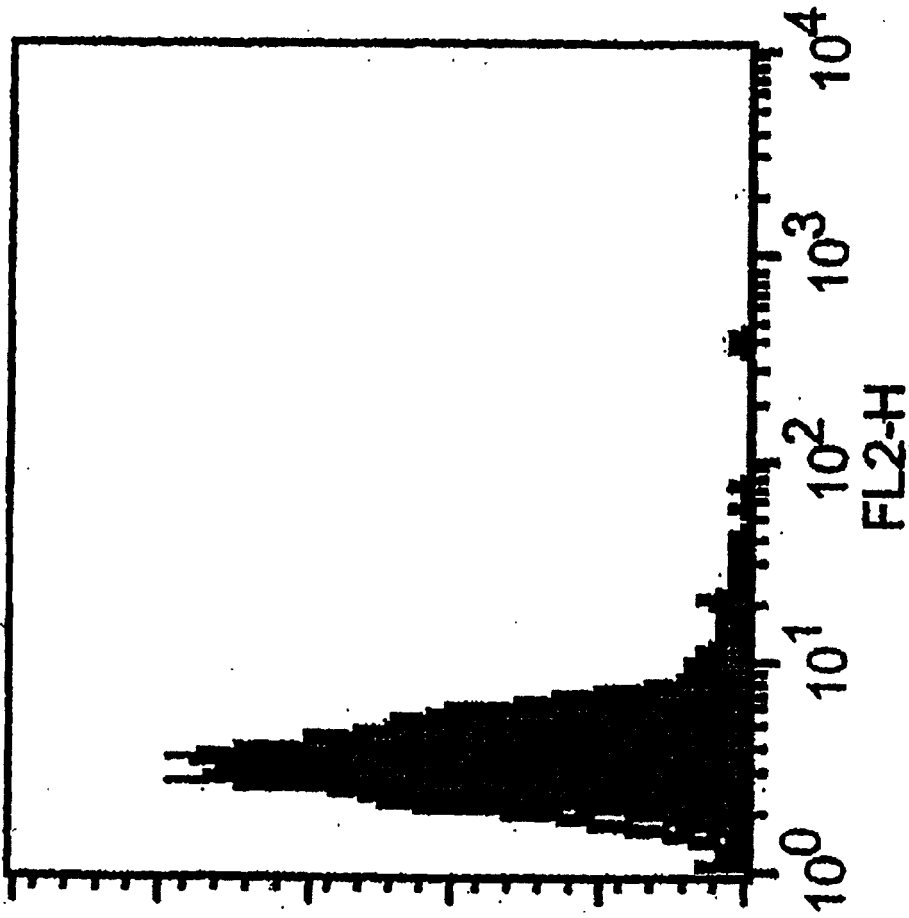


图10D

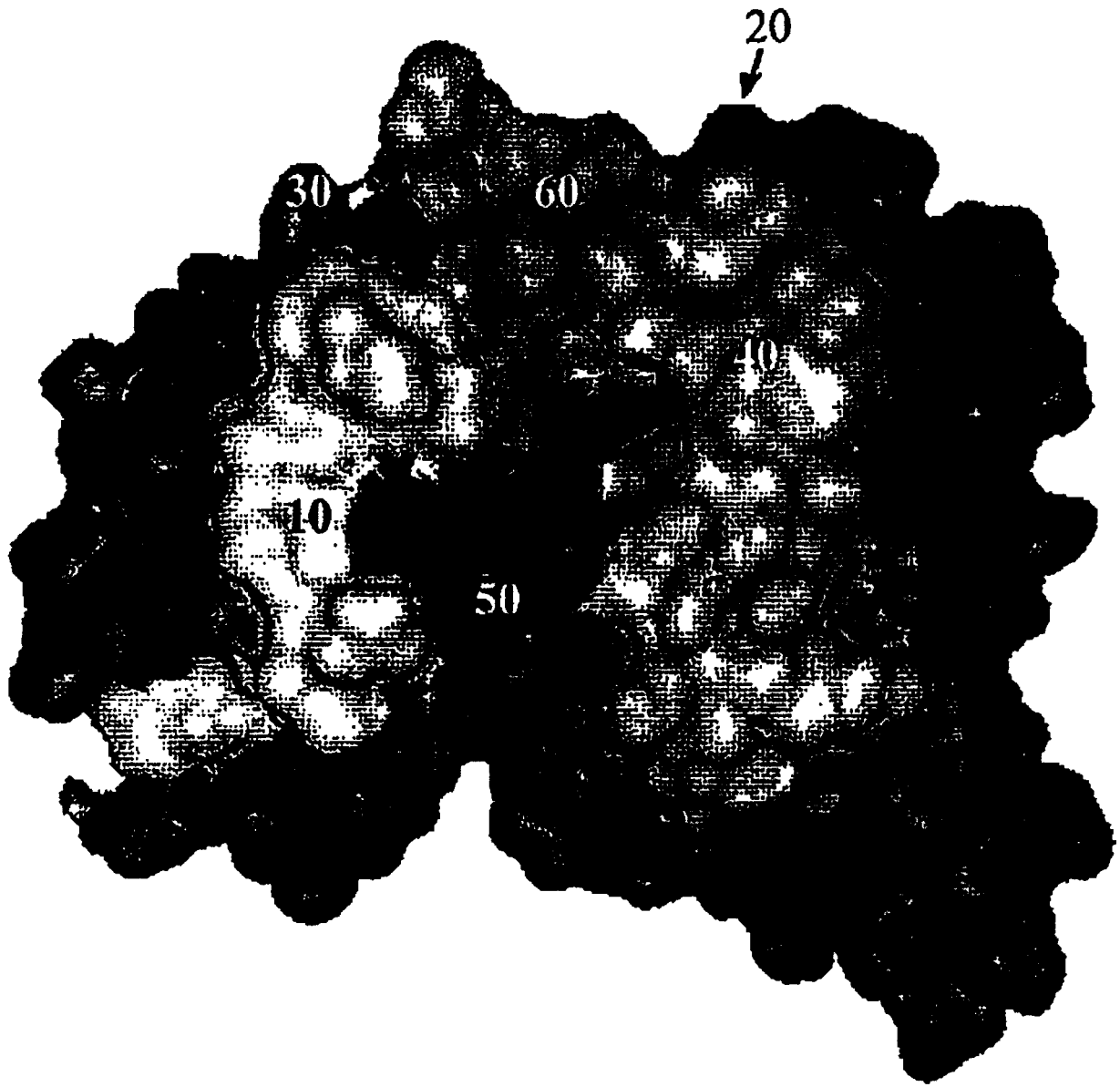


图11

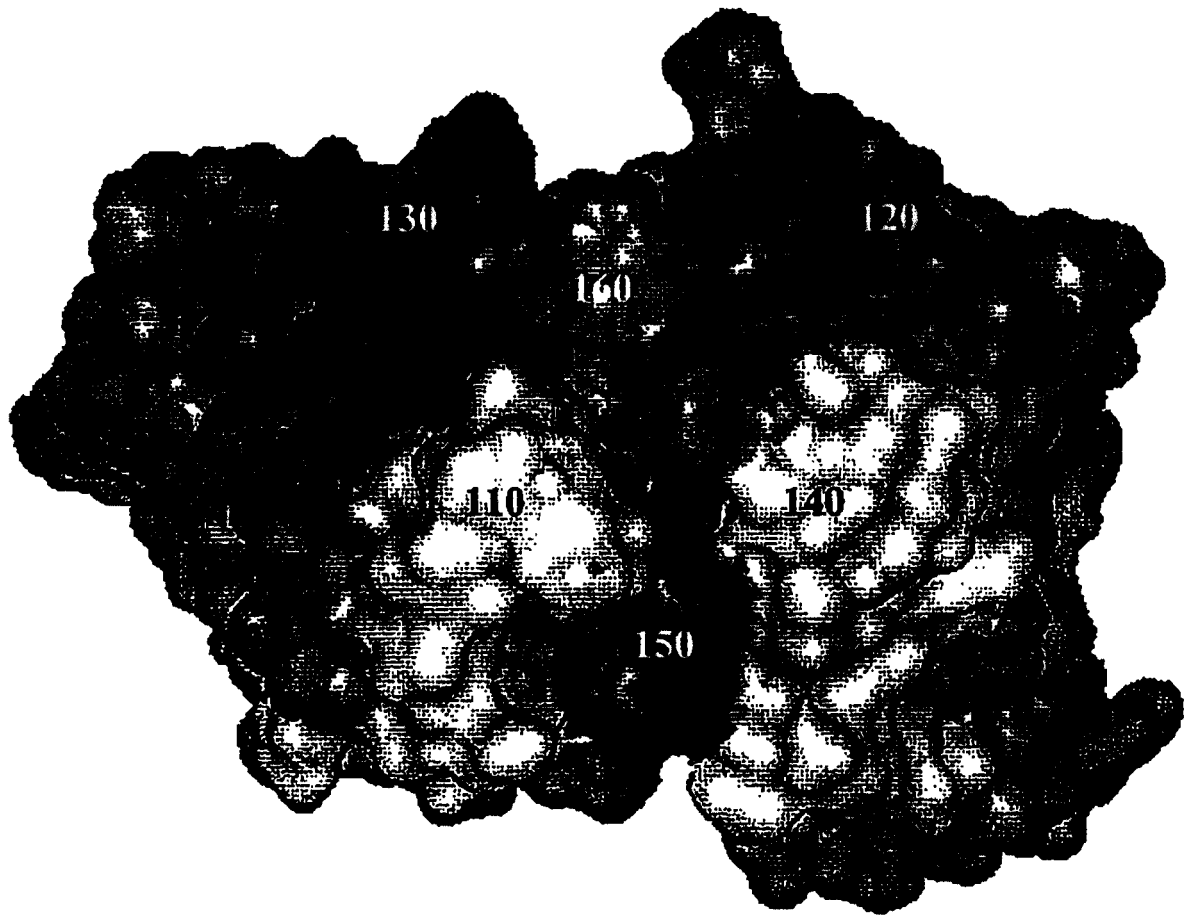


图12

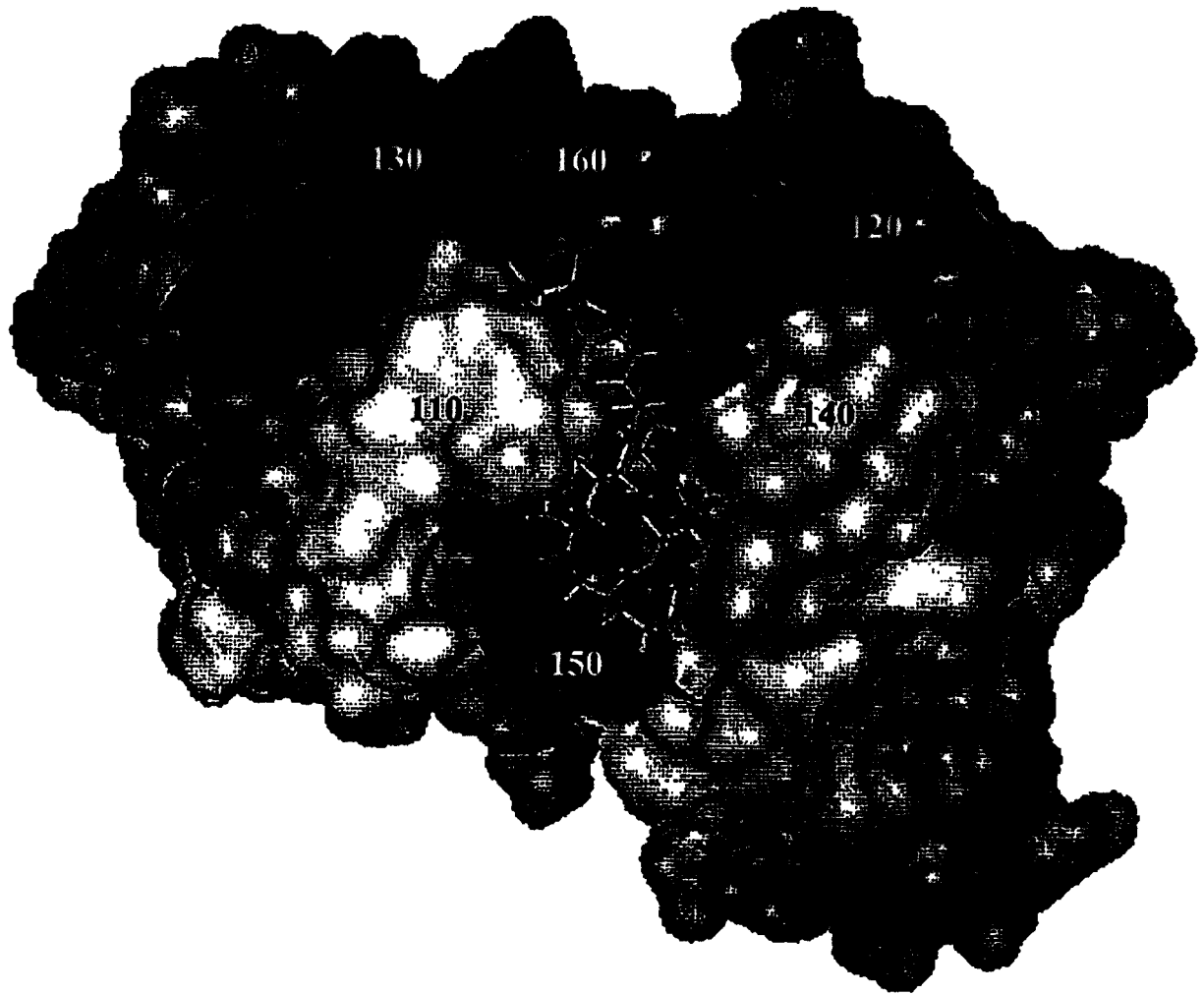


图13A



图13B

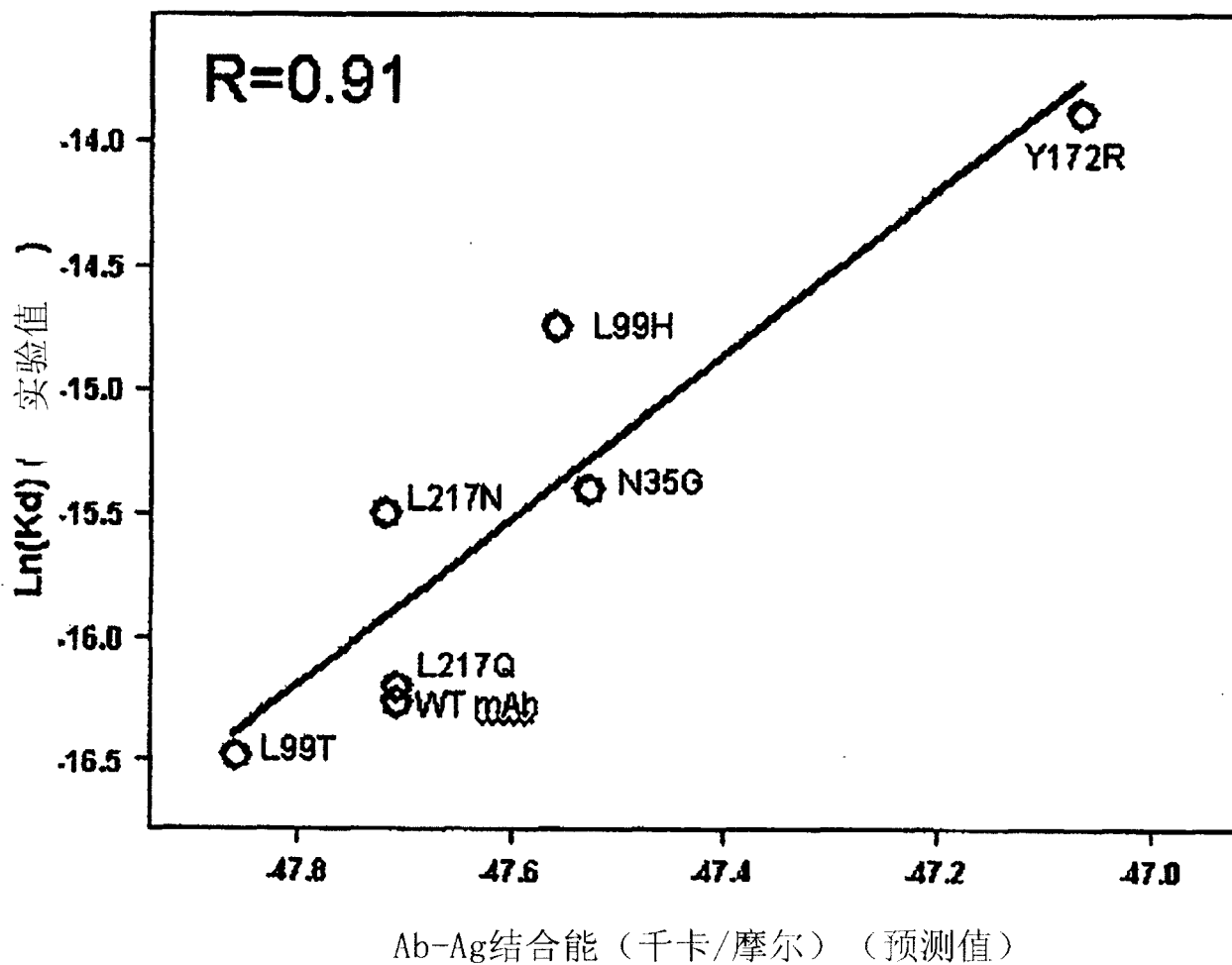


图14

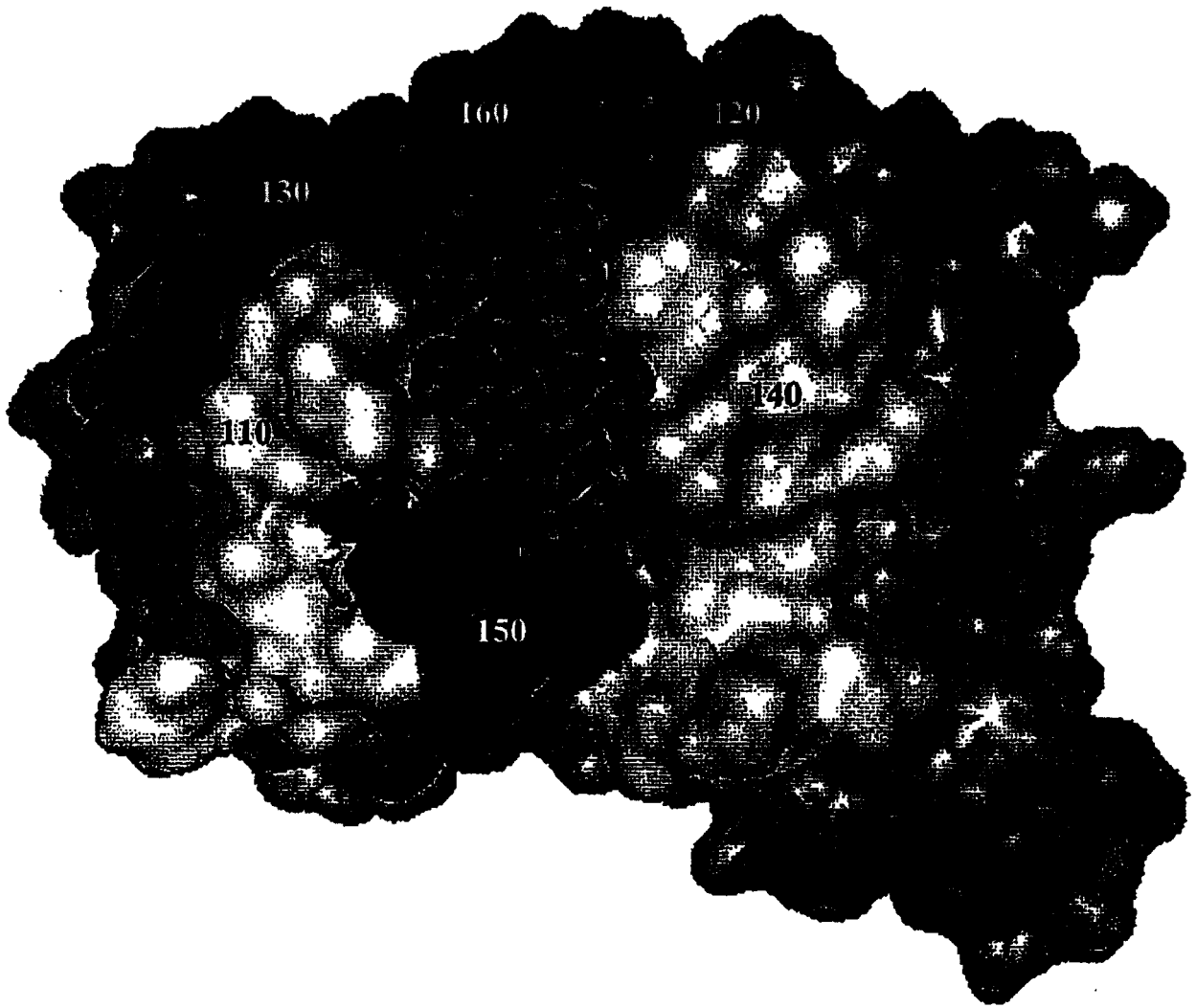


图15

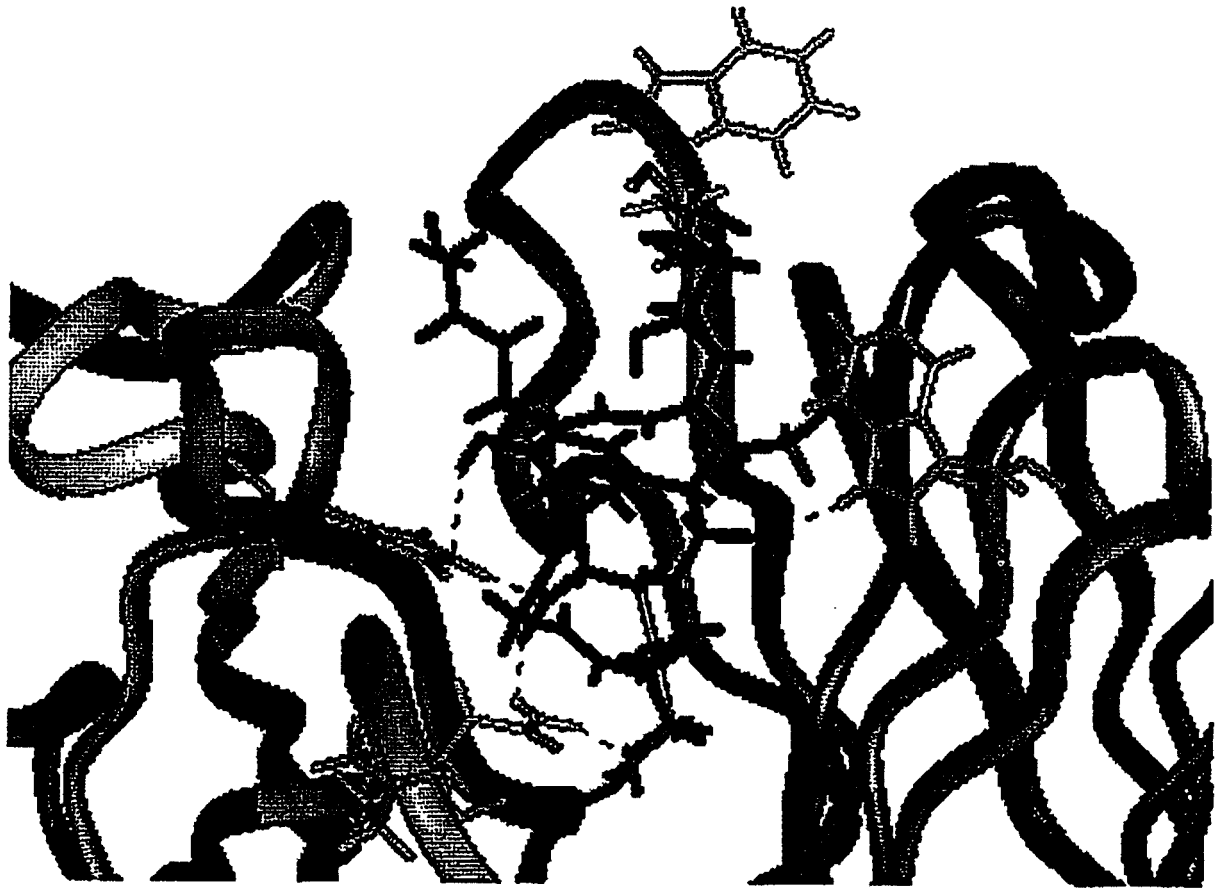


图16

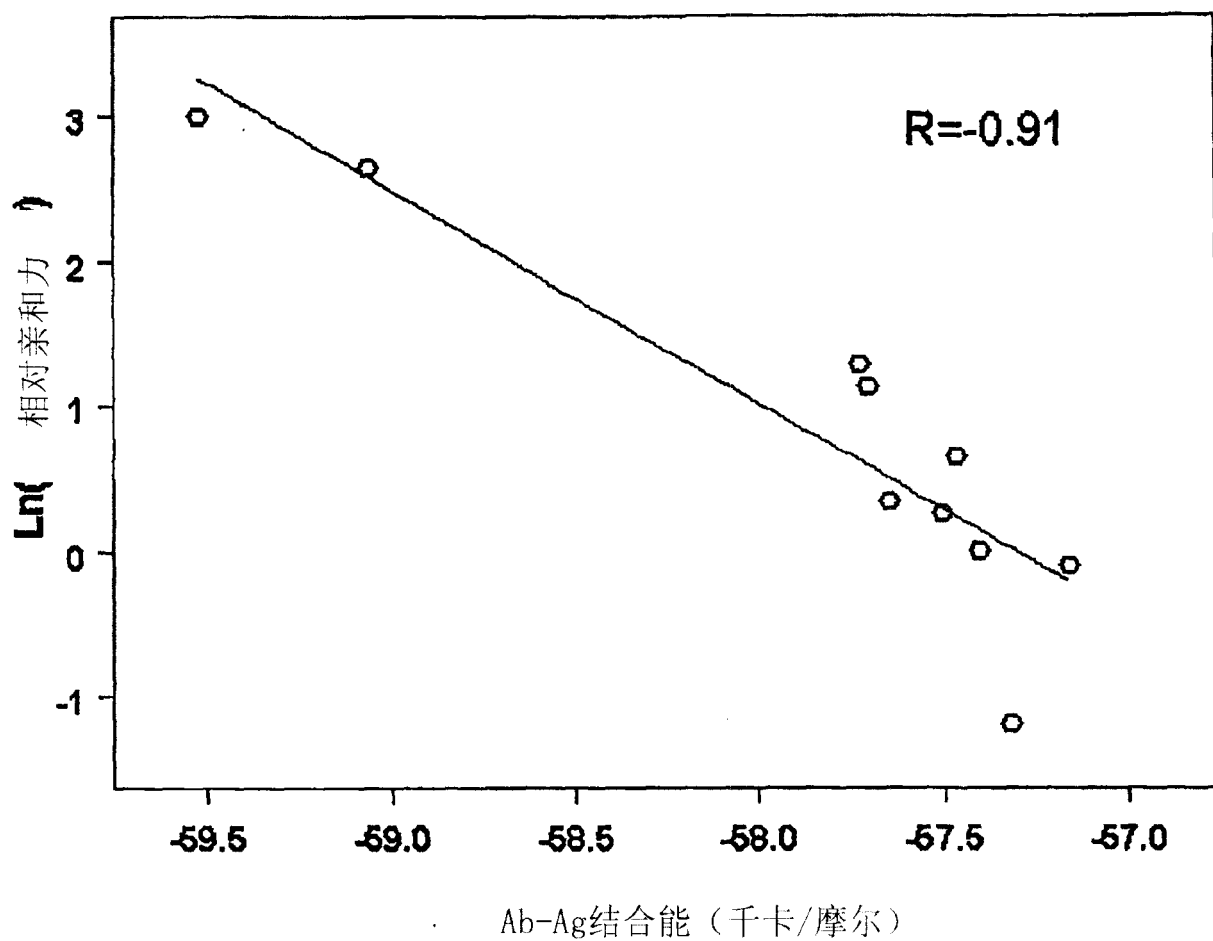


图17

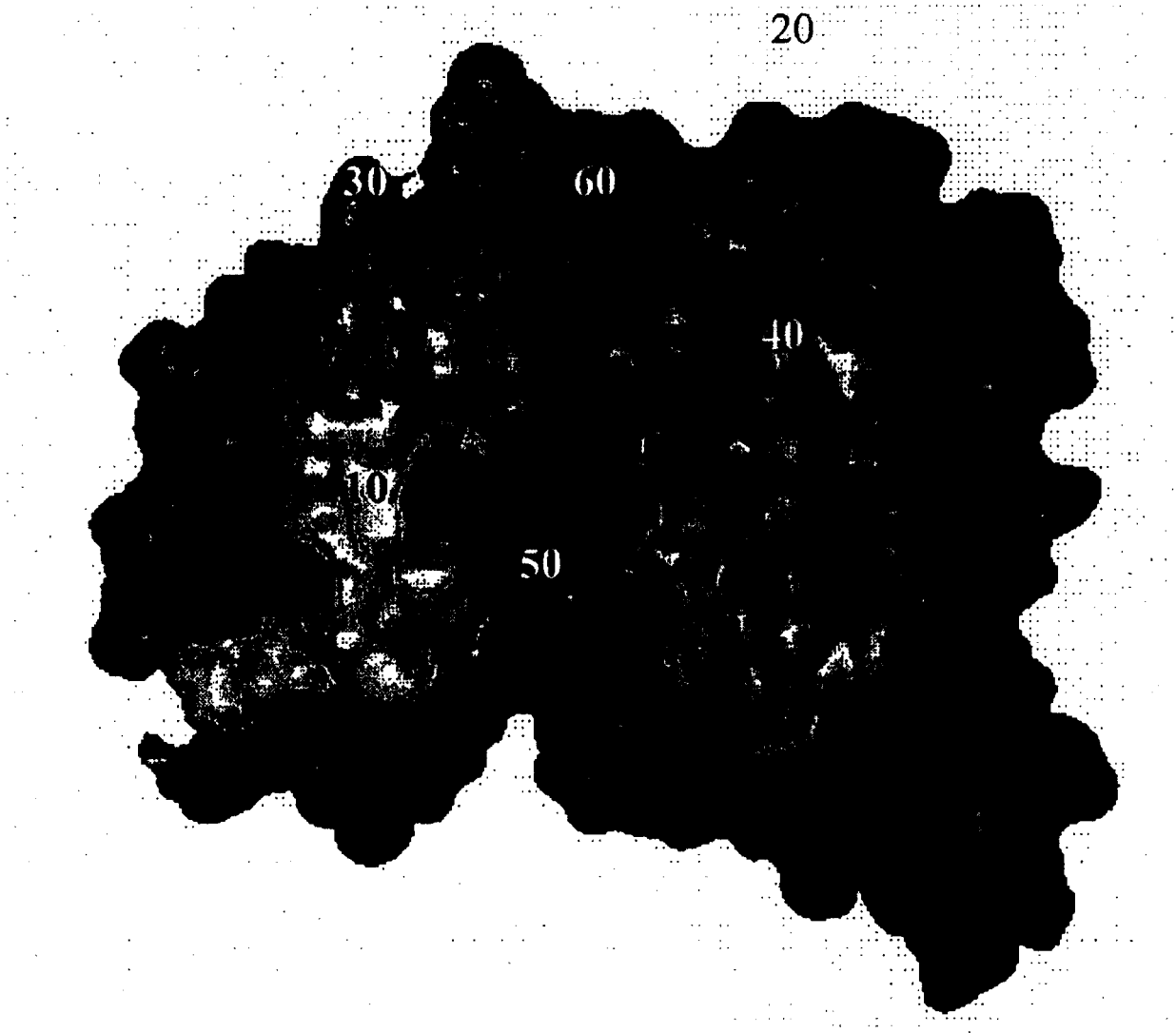


图11

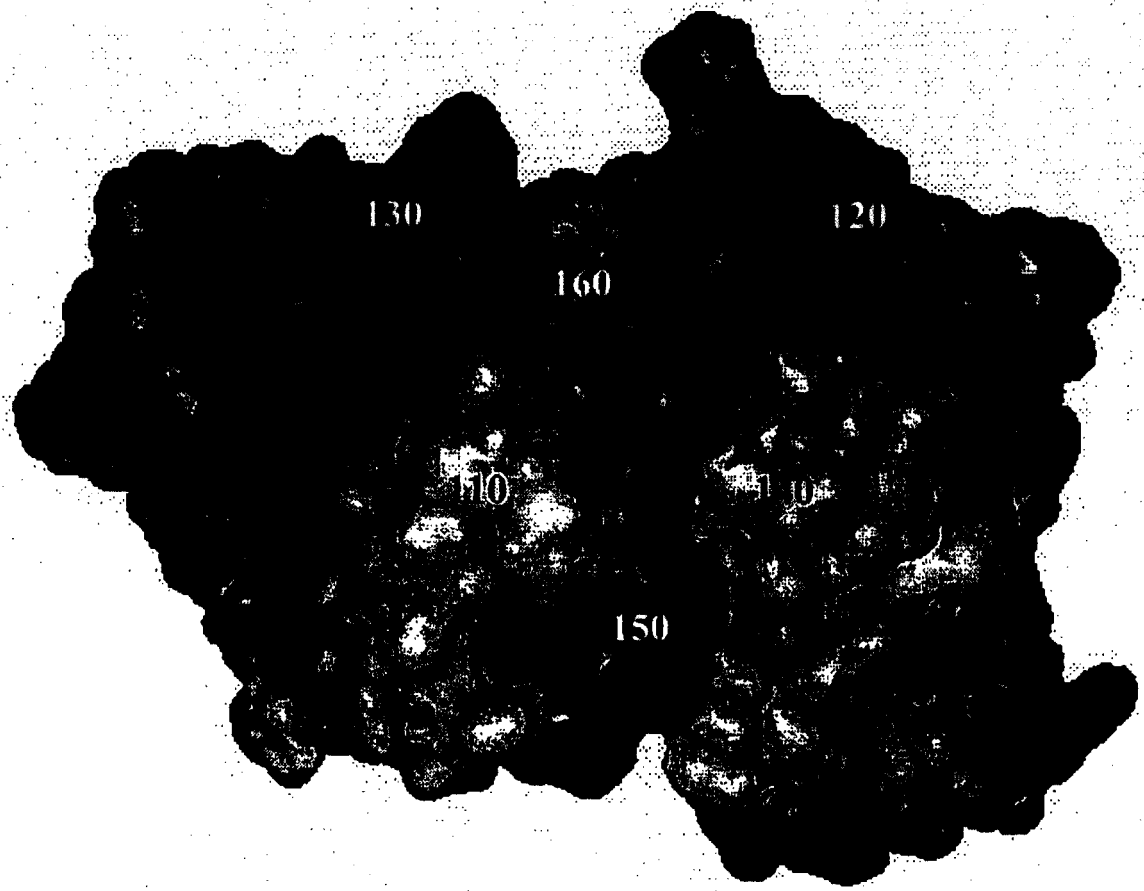


图 12

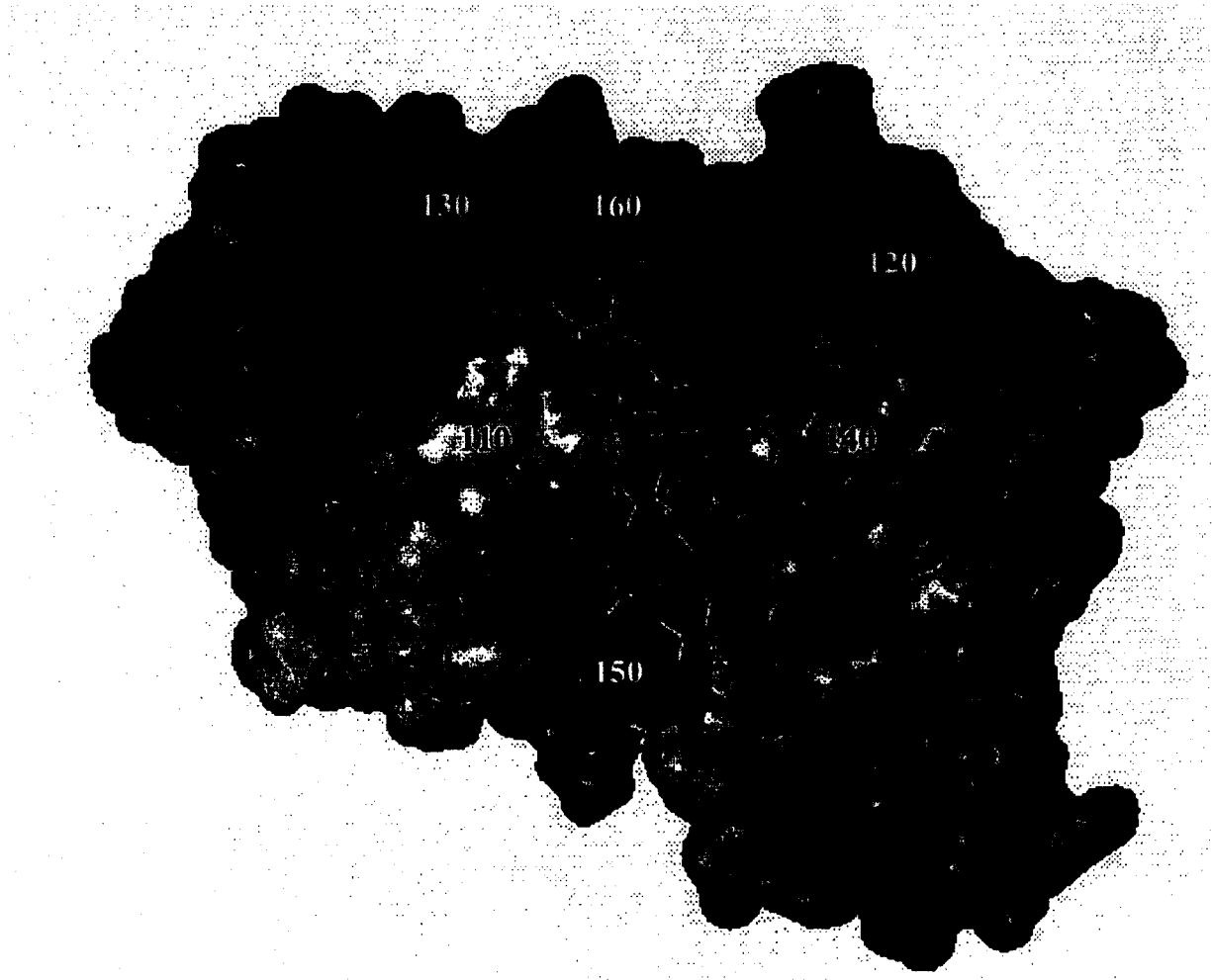


图13A

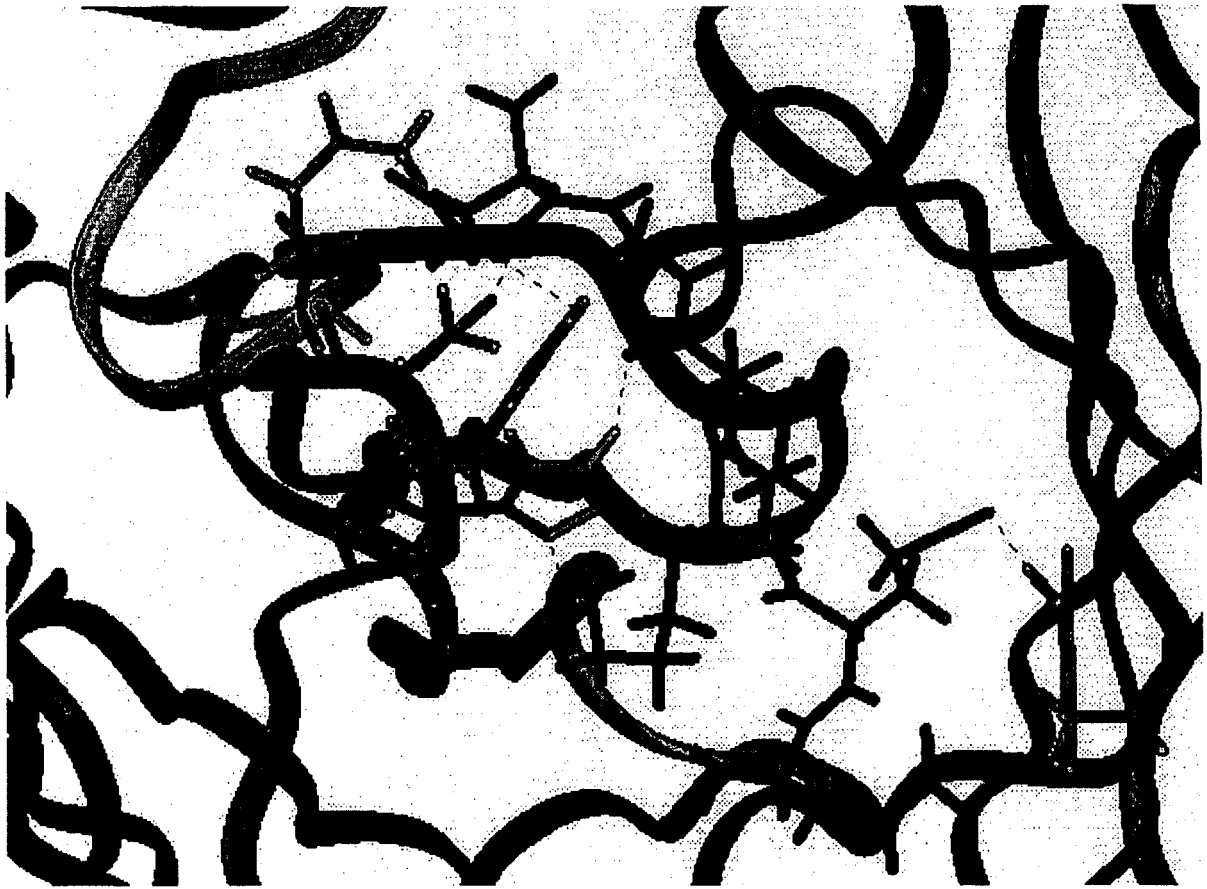
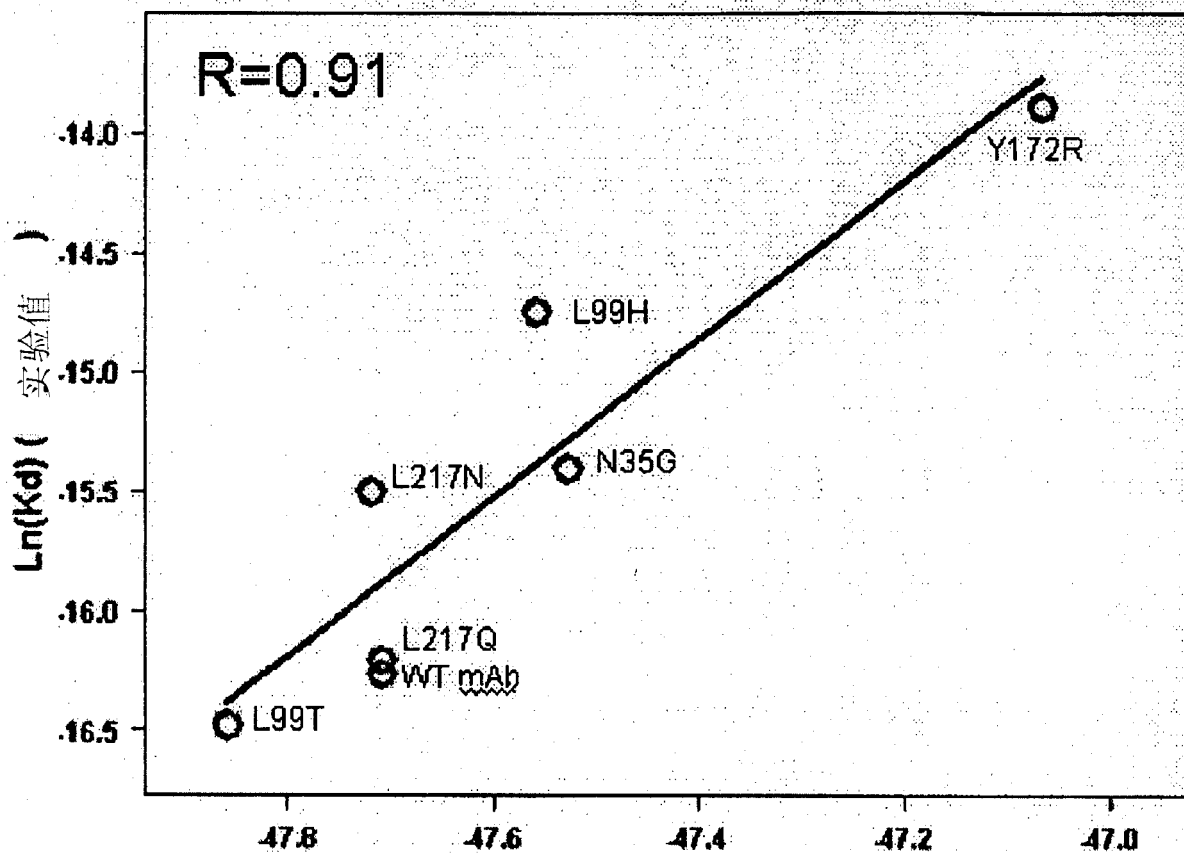


图 13B



Ab-Ag结合能 (千卡/摩尔) (预测值)

图14

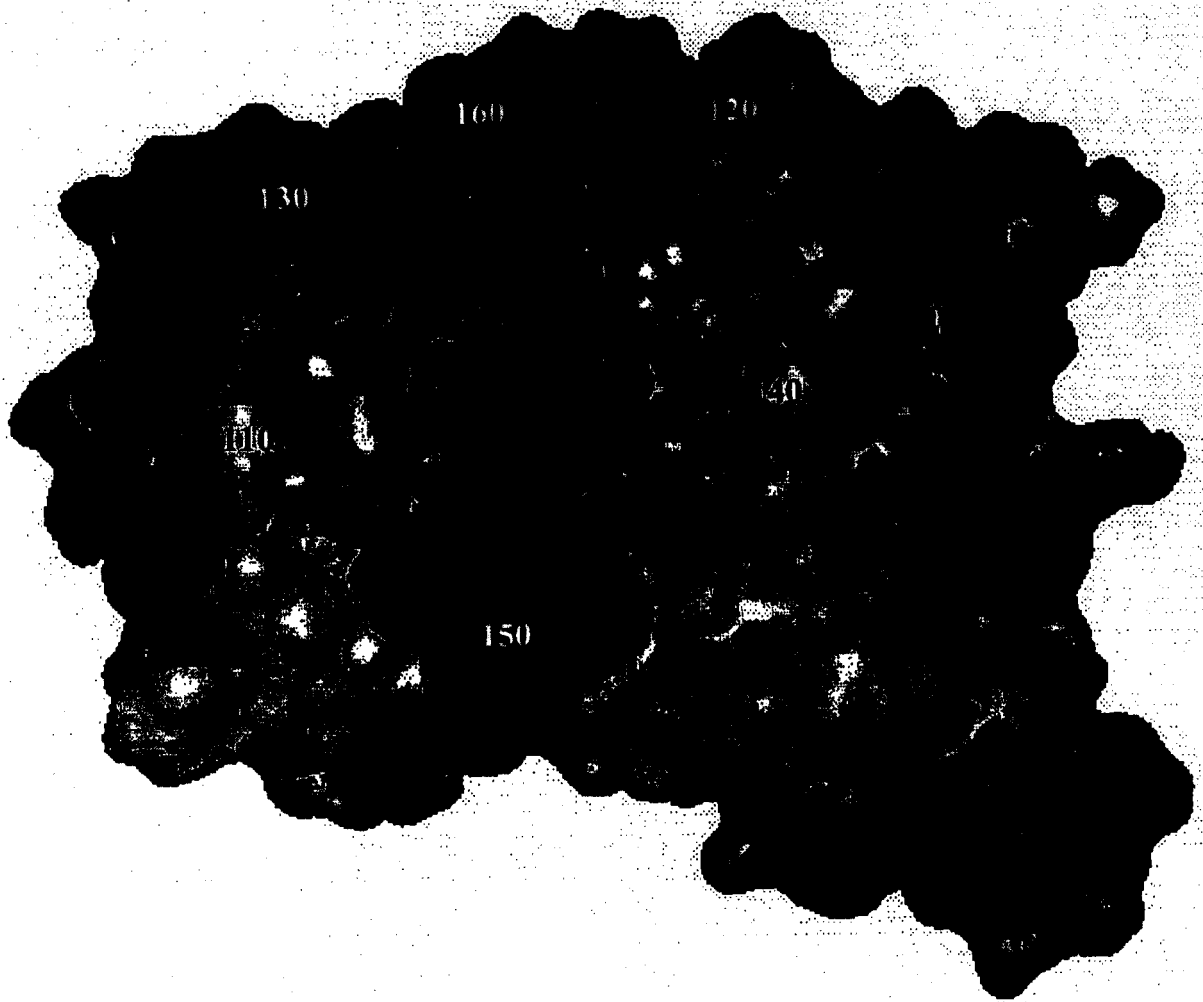


图15

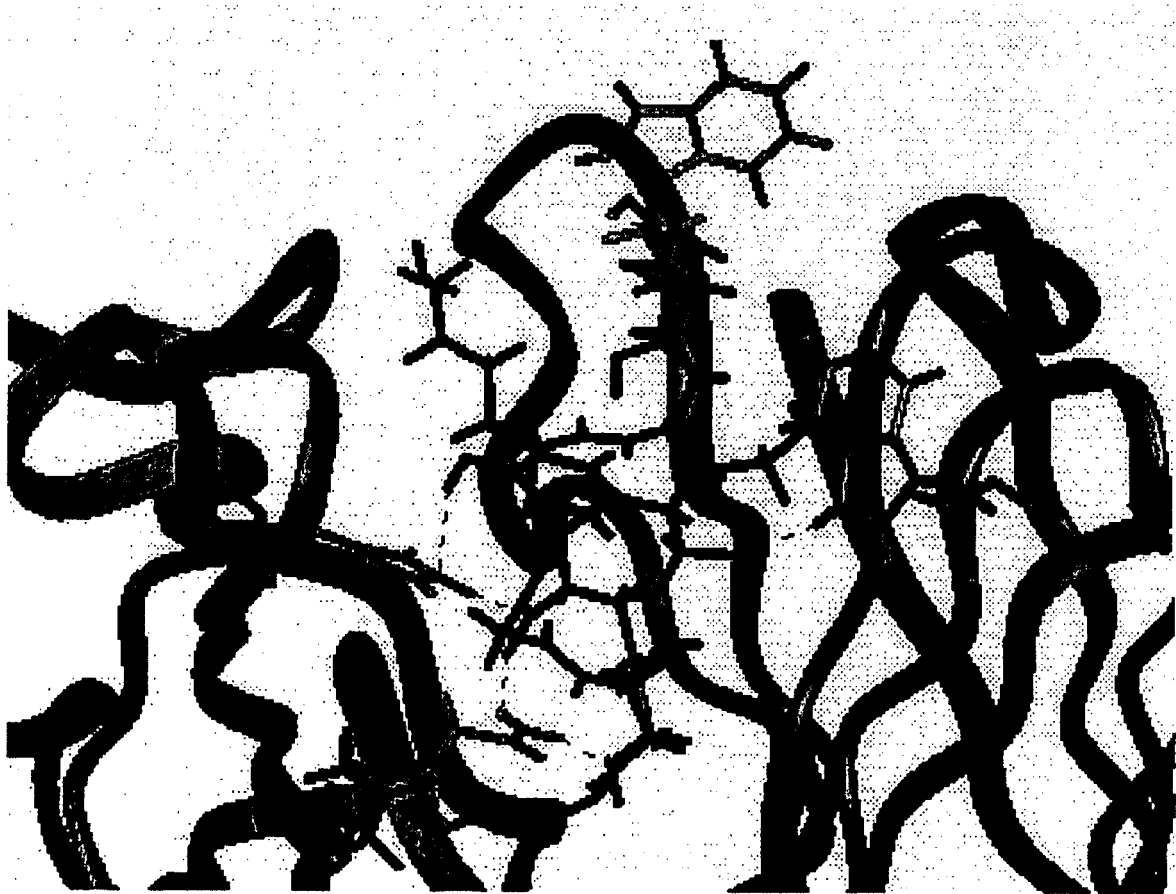


图16

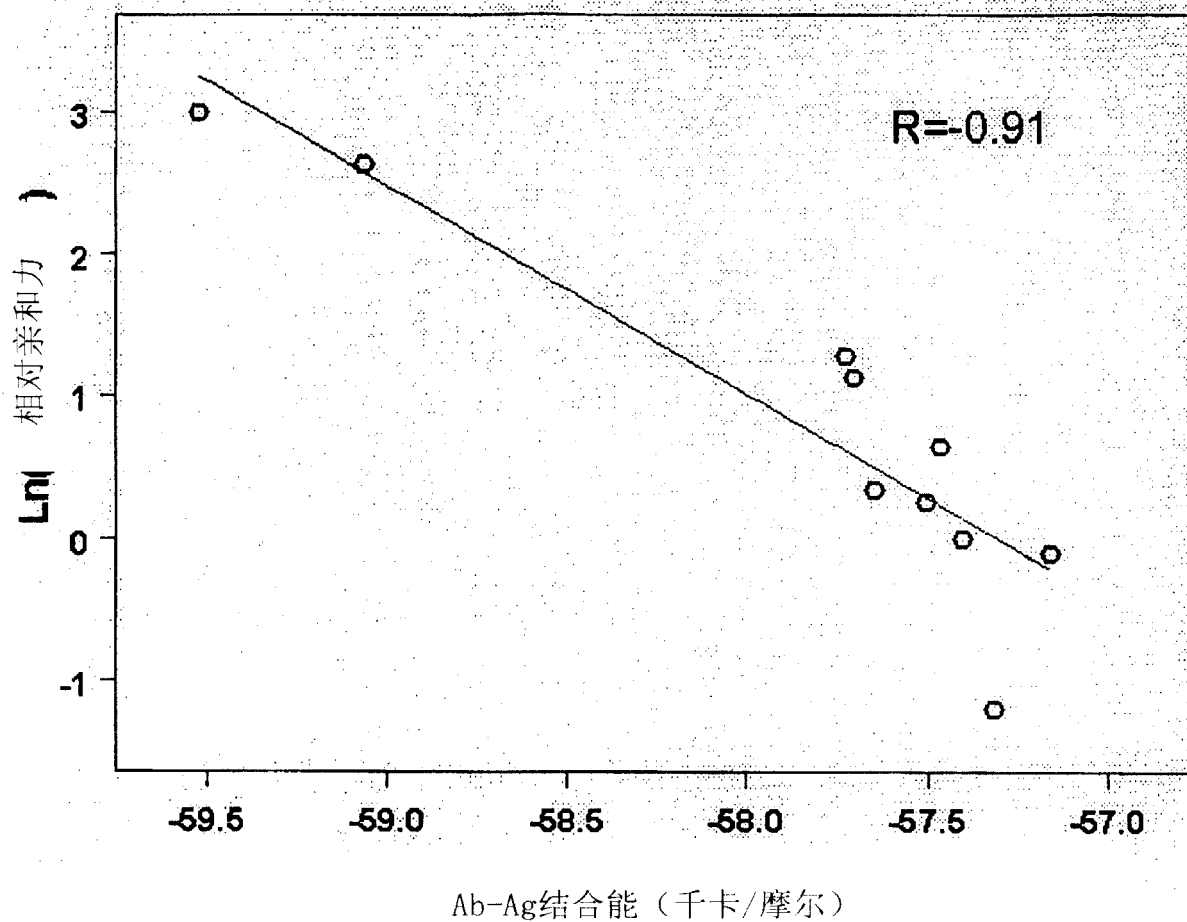


图17

专利名称(译)	针对表皮生长因子受体的缺失突变体的抗体及其使用		
公开(公告)号	CN1930187A	公开(公告)日	2007-03-14
申请号	CN200480018185.3	申请日	2004-06-25
[标]申请(专利权)人(译)	阿布格尼克斯公司		
申请(专利权)人(译)	艾伯吉尼斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	艾伯吉尼斯公司		
[标]发明人	理查德韦伯 冯晓 奥里特福德 拉里格林 琼古达斯 布鲁斯基特 刘颖 帕拉尼拉塔纳斯瓦米 罗伯特拉亚 杨晓东 乔斯克爾瓦兰 伊恩福尔茨 贾小池 贾斯帕康 查德威克T金 斯科特L克拉坎普 巧娟简苏		
发明人	理查德·韦伯 冯晓 奥里特·福德 拉里·格林 琼·古达斯 布鲁斯·基特 刘颖 帕拉尼·拉塔纳斯瓦米 罗伯特·拉亚 杨晓东 乔斯·克尔瓦兰 伊恩·福尔茨 贾小池 贾斯帕·康 查德威克·T·金 斯科特·L·克拉坎普 巧娟·简·苏		
IPC分类号	C07K16/28 C07K16/42 C07K14/71 C12P21/08 A61K39/44 A61K39/395 C07H21/04 C12N5/12 G01N33/53 G01N33/552 G01N33/577		
代理人(译)	刘国伟		
优先权	60/483145 2003-06-27 US 60/525570 2003-11-26 US 60/562453 2004-04-15 US		

摘要(译)

本发明涉及新颖抗体，尤其涉及针对表皮生长因子受体的缺失突变体的抗体，而且尤其涉及III型缺失突变体EGFRVIII。本发明也涉及针对表皮生长因子受体的缺失突变体的人类单克隆抗体，而且尤其为EGFRVIII。本发明也提供这些抗体的诊断和治疗配方，及其免疫偶联物。

EGFR wt	1	MEETVCGQTSNKLQLOTFREDHFLSLQRMFMNCEVVLGNLEITTVGRNYDLSFLKIQE	60
EGFRvIII	1	1
EGFR wt	61	VAGYVLIATLPTVERIPLRNLIQIRGNHYENSYALVGNVDANKTLKELPMNLIQELI	120
EGFRvIII	1	1
EGFR wt	121	HGAVRFNNPALCNVBSIQWHDIVSDPLGNMMDPQNTLGSQKCDSCDRGSGCWAQI	180
EGFRvIII	1	1
EGFR wt	181	ENCCOKITKILCAQQCSGRCKRSPDCCCHQCQAAGCTOPRMSDCLVCRKPRDRATCKDY	240
EGFRvIII	1	1
EGFR wt	241	DFALVNFPTTYQMDVRFGRKYSPOATCVKRC	300
EGFRvIII	1	53
EGFR wt	301	IKRKHGSGEGRVHETGELFACGFLTTCQDLEHREHNSGSLRITLHARVYFNSGFL	360
EGFRvIII	34	93
EGFR wt	361	DEIPLDGLDLEFVADTTPRFLQWDFRFLHDFRFLHDFRFLHDFRFLHDFRFLHDFR	420
EGFRvIII	94	153
EGFR wt	421	LSRPLDGLDLEFVADTTPRFLQWDFRFLHDFRFLHDFRFLHDFRFLHDFRFLHDFR	480
EGFRvIII	194	213
EGFR wt	481	VDNALCSPGDSVLHIVRGLDVEVVDKSDGLPKLRDLSIAISLGLTQLVDFLQV	540
EGFRvIII	214	273
EGFR wt	541	YKRFITCFGRPHRTIQDHYTLDLDCVPLQAWMLRHRITLQVAVVYSLVCHT	600
EGFRvIII	274	333
EGFR wt	601	YKRFITCFGRPHRTIQDHYTLDLDCVPLQAWMLRHRITLQVAVVYSLVCHT	660
EGFRvIII	334	393
EGFR wt	661	DELDVDFTRPQAFTRCALRITLRELELPLKNSRQDLCVAVRSLPDRGRVLDVAV	720
EGFRvIII	394	453
EGFR wt	721	RELRVDFPQANRELDLAAVQAVNETHCRKLIHITLAEINQITLQVDFRFLQWDFR	780
EGFRvIII	454	513
EGFR wt	781	IKRKHGSGEGRVHETGELFACGFLTTCQDLEHREHNSGSLRITLHARVYFNSGFL	840
EGFRvIII	514	573
EGFR wt	841	IKRKHGSGEGRVHETGELFACGFLTTCQDLEHREHNSGSLRITLHARVYFNSGFL	900
EGFRvIII	574	633
EGFR wt	901	IKRKHGSGEGRVHETGELFACGFLTTCQDLEHREHNSGSLRITLHARVYFNSGFL	960
EGFRvIII	634	693
EGFR wt	961	IKRKHGSGEGRVHETGELFACGFLTTCQDLEHREHNSGSLRITLHARVYFNSGFL	1020
EGFRvIII	694	753
EGFR wt	1021	IKRKHGSGEGRVHETGELFACGFLTTCQDLEHREHNSGSLRITLHARVYFNSGFL	1080
EGFRvIII	754	813
EGFR wt	1081	IKRKHGSGEGRVHETGELFACGFLTTCQDLEHREHNSGSLRITLHARVYFNSGFL	1140
EGFRvIII	814	873
EGFR wt	1141	IKRKHGSGEGRVHETGELFACGFLTTCQDLEHREHNSGSLRITLHARVYFNSGFL	1186 (序列号)
EGFRvIII	874	919 (序列号)

图1