



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102459342 A

(43) 申请公布日 2012.05.16

(21) 申请号 201080027383.1

A61P 35/02(2006.01)

(22) 申请日 2010.04.27

C07K 16/46(2006.01)

(30) 优先权数据

61/172923 2009.04.27 US

G01N 33/53(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011.12.20

C12N 15/02(2006.01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2010/057510 2010.04.27

C12P 21/08(2006.01)

C12R 1/91(2006.01)

(87) PCT申请的公布数据

W02010/126066 JA 2010.11.04

(71) 申请人 协和发酵麒麟株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 俵知纪 高柳晋一郎 稲垣好昌

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 张颖 樊卫民

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 61 页

A61K 39/395(2006.01)

序列表 65 页 附图 6 页

(54) 发明名称

用于治疗血液肿瘤的抗 IL-3RA 抗体

(57) 摘要

本申请提供了针对人类 IL-3R α 链的抗体，其不抑制 IL-3 信号传导并与人类 IL-3R α 链的 B 结构域结合，但是不结合人类 IL-3R α 链的 C 结构域；用于预防或治疗血液肿瘤的组合物，在所述血液肿瘤中在对象的骨髓或外周血中发现了表达 IL-3R α 的细胞，所述组合物的特征在于包含人类 IL-3R α 抗体作为活性成分；以及用于治疗血液肿瘤的方法，在所述血液肿瘤中在骨髓或外周血中发现了表达 IL-3R α 的细胞，所述方法的特征在于包含向对象给药包含人类 IL-3R α 抗体作为活性成分的组合物。

1. 一种针对人类 IL-3R α 链的抗体,所述抗体不抑制 IL-3 信号传导并与人类 IL-3R α 链的 B 结构域结合,但是不结合人类 IL-3R α 链的 C 结构域。
2. 权利要求 1 的抗体,其进一步具有高抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。
3. 权利要求 1 或 2 的抗体,其中通过使用用 IL-2 培养的 PBMC 的 Colon-26/hCD123ADCC 测定法,高抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 在 0.01 μ g/ml 的抗体浓度下显示出 10% 的特异的裂解率。
4. 权利要求 1 至 3 任一项的抗体,其包含选自下列 (a) 至 (e) 的重链 CDR 和轻链 CDR 的氨基酸序列 :
 - (a) 重链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :113 至 115 的氨基酸序列,轻链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :131 至 133 的氨基酸序列,
 - (b) 重链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :116 至 118 的氨基酸序列,轻链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :134 至 136 的氨基酸序列,
 - (c) 重链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :119 至 121 的氨基酸序列,轻链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :137 至 139 的氨基酸序列,
 - (d) 重链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :122 至 124 的氨基酸序列,轻链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :140 至 142 的氨基酸序列,以及
 - (e) 重链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :125 至 127 的氨基酸序列,轻链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :143 至 145 的氨基酸序列。
5. 权利要求 1 至 4 任一项的抗体,其包含选自下列 (a) 至 (f) 的重链可变区和轻链可变区 :
 - (a) 包含 SEQ ID NO :53 的氨基酸序列中从 20 位谷氨酰胺 (Q) 至 139 位丝氨酸 (S) 的氨基酸序列的重链可变区,以及包含 SEQ ID NO :55 的氨基酸序列中从 23 位缬氨酸 (V) 至 129 位赖氨酸 (K) 的氨基酸序列的轻链可变区 ;
 - (b) 包含 SEQ ID NO :57 的氨基酸序列中从 20 位谷氨酰胺 (Q) 至 139 位丝氨酸 (S) 的氨基酸序列的重链可变区,以及包含 SEQ ID NO :59 的氨基酸序列中从 23 位缬氨酸 (V) 至 129 位赖氨酸 (K) 的氨基酸序列的轻链可变区 ;
 - (c) 包含 SEQ ID NO :61 的氨基酸序列中从 20 位谷氨酰胺 (Q) 至 139 位丝氨酸 (S) 的氨基酸序列的重链可变区,以及包含 SEQ ID NO :63 的氨基酸序列中从 23 位天冬氨酸 (D) 至 129 位赖氨酸 (K) 的氨基酸序列的轻链可变区 ;
 - (d) 包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列中从 20 位谷氨酰胺 (Q) 至 139 位丝氨酸 (S) 的氨基酸序列的重链可变区,以及包含 SEQ ID NO :67 的氨基酸序列中从 23 位天冬氨酸 (D) 至 129 位赖氨酸 (K) 的氨基酸序列的轻链可变区 ;
 - (e) 包含 SEQ ID NO :69 的氨基酸序列中从 20 位谷氨酰胺 (Q) 至 138 位丝氨酸 (S) 的氨基酸序列的重链可变区,以及包含 SEQ ID NO :71 的氨基酸序列中从 23 位天冬氨酸 (D) 至 129 位赖氨酸 (K) 的氨基酸序列的轻链可变区 ;以及
 - (f) 重链可变区和 / 或轻链可变区,其包含在上述 (a) 至 (e) 所显示的重链可变区和 / 或轻链可变区中缺失、取代、添加或插入 1 至 3 个氨基酸残基的氨基酸序列。
6. 一种用于预防或治疗血液肿瘤的组合物,在所述血液肿瘤中在对象的骨髓或外周血中发现了表达 IL-3R α 的细胞,所述组合物包含权利要求 1 至 5 任一项的 IL-3R α 抗体作

为活性成分。

7. 一种用于治疗血液肿瘤的方法,在所述血液肿瘤中在骨髓或外周血中发现了表达 IL-3R α 的细胞,所述方法包含向对象给药包含权利要求 1 至 5 任一项的 IL-3R α 抗体作为活性成分的组合物。

8. 一种用于检测血液肿瘤的组合物,在所述血液肿瘤中在来自对象的生物样品的骨髓或外周血中发现了表达 IL-3R α 的细胞,所述组合物包含权利要求 1 至 5 任一项的 IL-3R α 抗体。

9. 权利要求 1 至 5 任一项的组合物或方法,其中血液肿瘤是急性骨髓性白血病 (AML)。

用于治疗血液肿瘤的抗 IL-3RA 抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及针对人类 IL-3R α 蛋白（另一个名称：人类 CD123）的抗体。本发明还涉及用于髓细胞恶性肿瘤、特别是急性骨髓性白血病（AML）的治疗药剂和诊断药剂，其包含人类 IL-3R α 抗体作为活性成分的发明。

[0002] 发明背景

[0003] 关于恶性肿瘤：

[0004] 在日本，恶性肿瘤（癌症）是死亡的第一主导原因，患者数量每年增加，极其需要开发具有高的效能和安全性的药物和治疗方法。作为形成恶性肿瘤的原因，存在着由辐射、紫外线和各种致癌物质引起的 DNA 突变。关于恶性肿瘤的研究集中于通过分子生物学鉴定这些遗传变化。结果，认为致瘤性转化由大量突变的积累等诱导。通过细胞系模型等已经显示，某些决定性突变与致瘤性转化直接相关。关于作为本发明的目标疾病之一的白血病，已经鉴定并分类了许多染色体畸变。在许多病例中发现了染色体易位，并且在主要的染色体易位中已经鉴定了与染色体易位相关的一些基因。通过分析易位相关基因的功能发现了一种情况，即这些基因与白血病的发生相关。

[0005] 关于癌症干细胞：

[0006] 另一方面，长时间以来，从细胞生物学观点提出了所谓的癌症干细胞假说，其主张与正常组织类似，恶性肿瘤同样起源于干细胞。干细胞被定义为具有自主复制能力和多能性的细胞，并粗略分成全能干细胞和组织干细胞。组织干细胞源自于特定组织和器官例如血液系统、肝脏、神经系统等，并以极低频率存在。其中，造血干细胞研究得最频繁。已报道，通过将一个造血干细胞移植到造血系统被致死剂量的辐射所破坏的小鼠中，可以在长时间内重建造血系统（非专利文献 1）。与正常干细胞不同，关于癌症干细胞的研究已经延迟了很长时间，因为不能发现它们的真正本质。然而，在 1997 年由 Dick 等首次在急性骨髓性白血病中鉴定到癌症干细胞。此后，已经在各种恶性肿瘤中报道了癌症干细胞的存在。概括来说，癌症干细胞以全部肿瘤的百分之几或更低的频率存在，并且与正常干细胞同样稀少。据认为，形成肿瘤的其余细胞是增殖能力有限的肿瘤前体细胞或肿瘤细胞。

[0007] 通过这些报告，显示了即使是在肿瘤中也存在与正常组织类似的层次结构，并且位于其顶点（源点）的癌症干细胞具有强的肿瘤形成能力。

[0008] 癌症干细胞的特征和治疗问题：

[0009] 总结许多报告，认为癌症干细胞维持了正常干细胞所具有的各种特征。相似性的实例包括细胞的稀少性、细胞存在于其中的微环境（生境）、多药物抗性基因的表达、细胞周期阻滞等。

[0010] 具体来说，它们表达一组多药物抗性基因并且与正常干细胞类似处于细胞周期间期的特征，可能变成治疗上的极大问题。多药物抗性基因 BCRP 是通过将各种抗肿瘤药剂排除到细胞外部而损害药物效能的泵，并且已经报道了一种利用这种活性收集干细胞的方法（非专利文献 2）。此外，它们在细胞周期间期在“冬眠”状态下存在（非专利文献 3），引起对靶向癌症细胞快速生长的许多抗肿瘤药剂以及辐照敏感性的降低（非专利文献 4 和 5）。

[0011] 根据上述特征,认为对治疗表现出抗性的癌症干细胞是肿瘤再生的原因。

[0012] 关于分子定向药物

[0013] 恶性肿瘤治疗的三个主要过程包括抗肿瘤药剂治疗、放射治疗和切除。血液肿瘤仅限于抗肿瘤药剂治疗和放射治疗,并且如上所述,癌症干细胞可能对这些治疗具有抗性。另一个问题是由于这两种治疗影响整个身体,因此副作用大。预期分子定向药物将作为这个问题的解决手段。它能够通过只在表达靶分子的细胞中表现出其药效来降低副作用。

[0014] 在血液病领域中分子定向药物的典型药物实例包括伊马替尼和利妥昔单抗。伊马替尼靶向由在 95% 的 CML 患者中观察到的染色体畸变(费城染色体)所产生的被称为 Bcr-Ab1 的引起白血病的因子。这是一种低分子量药物,其通过抑制 Bcr-Ab1 的功能诱导白血病细胞自杀。利妥昔单抗是治疗性抗体,其识别 B 细胞上的表面分子 CD20,并对 B 细胞的恶性肿瘤(非霍奇金淋巴瘤等)具有抗肿瘤效应。另一方面,用于 AML 的分子定向药物很少,只有药剂吉妥珠单抗-奥唑米星(Mylotarg),其中将抗生素 calicheamicin 与针对已知 AML 细胞表面抗原 CD33 的单克隆抗体相连。然而,目前的形势是 Mylotarg 的使用受限,这是因为据认为源自于 calicheamicin 的强烈毒性,以及治疗范围狭窄的问题。基于上述,可以说发现新的靶基因并开发用于它的治疗药剂将是重要的发明,其直接导致治疗的可能性并扩展了选择范围。

[0015] 作为分子定向药物的实施方案,已经研究并开发了各种物质,例如治疗性抗体和低分子量药物,以及肽类药物、生物蛋白制剂例如细胞因子、siRNA、适体(aptamer)等。当抗体被用作治疗药剂时,由于其特异性,它可用于治疗其中患病细胞表达特定抗原的病理状况。抗体与作为其抗原在细胞表面上表达的蛋白结合,并有效地作用于被结合细胞。抗体具有长的血液半衰期和对其抗原的高特异性的特征,并且也可显著用作抗肿瘤药剂。例如,当抗体靶向肿瘤特异性抗原时,可以预计给药的抗体积累在肿瘤中,从而通过补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)攻击肿瘤细胞。此外,通过将放射活性物质、细胞毒性物质等与抗体结合,有可能将药剂有效转移到肿瘤部分并因此允许在其上发挥作用。同时,它能够降低药剂到达其他非特异性组织的量,并且也可以预期副作用的降低。当肿瘤特异性抗原具有诱导细胞死亡的活性时通过给药具有激动活性的抗体,或者当肿瘤特异性抗原与细胞生长和存活有关时通过给药具有中和活性的抗体,预期可以抑制肿瘤生长或使肿瘤退行。由于上述特征,因此认为抗体适合用作抗肿瘤药剂。

[0016] 关于治疗性抗体:

[0017] 在原始抗体制备中,使用小鼠作为待免疫动物。然而,由于大量原因,使用小鼠抗体作为药物受到限制。在人体中可以被识别为外来物质的小鼠抗体,可以诱导所谓的“人类抗小鼠抗体”、即“HAMA”应答(非专利文献 6)。此外,小鼠抗体的 Fc 区不能通过人类补体或细胞毒性有效攻击患病细胞。

[0018] 作为用于避免这样的问题的方法之一,开发了嵌合抗体(专利文献 1 和 2)。嵌合抗体含有源自于两种或更多物种的抗体部分(小鼠抗体可变区、人类抗体恒定区等)。这种嵌合抗体的优点在于它保持了小鼠抗体的特征,但是可以刺激人类补体或细胞介导的细胞毒性,因为它具有人类 Fc。然而,已知这样的嵌合抗体仍然诱导“人类抗嵌合抗体”、即“HACA”应答(非专利文献 7)。

[0019] 此外,已经开发了重组抗体,其中只有一部分被取代的抗体是互补性决定区

(“CDR”)(专利文献3和4)。通过使用CDR嫁接技术,制备了包含小鼠CDR和人类可变区构架和人类恒定区的抗体,即所谓的“人源化抗体”(非专利文献8)。此外,通过使用产人类抗体的小鼠或通过使用人类抗体文库进行筛选,已经提供了可用于制备完全人类抗体的广泛应用的技术(非专利文献9和10)。

[0020] 关于IL-3R α :

[0021] IL-3R α 是IL-3受体的 α 链,属于细胞因子受体家族,并对作为其配体的IL-3显示出弱亲和性。通过与其 β 链(CD131,在后文中也称为IL-3R β)形成异源受体,IL-3受体具有强的结合性,并通过 β 链的细胞内区域将信号例如生长、分化等传递到细胞中。IL-5受体 α 链和GM-CSF受体 α 链享有共同的 β 链。

[0022] IL-3R α 是单次通过的跨膜I型膜蛋白,并且根据序列了解到在膜外区域中存在IL-3结合位点和III型纤连蛋白位点。已知不存在能够在膜内区域中传递信号的结构。尽管IL-3R α 的三维结构还没有被分析,但可以推测家族之间细胞因子受体的结构是相似的,因为在大多数情况下形成结构上重要的S-S键的半胱氨酸残基的位置得以保留。在同样的细胞因子受体中,IL-13受体 α 链、IL-4受体 α 链和GM-CSF受体 α 链的晶体结构已被分析。根据这些细胞因子受体家族的信息,可以推测IL-3R α 的膜外区域粗略分成3个结构域(A-B-C结构域)。已识别别人类IL-3R α 的A结构域的抗体7G3阻断IL-3信号传导(非专利文献11)。此外,已经报道了缺少A结构域的IL-3R α 分子的表达(非专利文献12),并且当然识别A结构域的抗体不能识别缺少A结构域的IL-3R α 。此外,据认为C结构域是IL-3R α 分子的根,并具有在三维上抑制IL-3R β 与IL-3R α 的结合的高度可能性。

[0023] IL-3是已知作为IL-3R α 配体的唯一配体。IL-3是一种造血因子,其已知加速下列细胞的集落形成:红细胞,巨核细胞,中性粒细胞,嗜酸性粒细胞,嗜碱性粒细胞,肥大细胞和单核系统细胞。已知IL-3也刺激具有多能性的前体细胞,但是宁可将IL-3说成是加速具有自主复制能力的未成熟干细胞的分化,而是加速定向前体细胞的分化。

[0024] 已知IL-3R α 通过与 β 链形成异源二聚体,从而通过丝氨酸/苏氨酸磷酸化途径将IL-3信号传导到细胞中,而与骨髓细胞的生长和分化有关。已知IL-3R α 表达在造血祖细胞中的粒细胞-巨噬细胞祖细胞(GMP)或髓系共同祖细胞(CMP)中,并通过IL-3信号传导诱导生长和分化成中性粒细胞和巨噬细胞系统。另一方面,已报道存在于CMP下游中的巨核细胞-红细胞类祖细胞(MEP)与也存在于下游中的GMP不同,不表达IL-3R α 。

[0025] 关于AML干细胞,Bonnet和Dick报道了AML干细胞存在于CD34阳性CD38阴性级分中(非专利参考文献13)。此外,通过与正常干细胞的相同级分(CD34阳性CD38阴性)进行比较,Jordan等已经发现IL-3R α 在AML干细胞中高表达(非专利参考文献14)。在随后的多篇报告中也已报道了IL-3R α 不仅作为AML干细胞而且作为白血病干细胞的标志物的高潜力(非专利参考文献15和16)。在癌症包括白血病的治疗中,重要的是尽可能多地只移除癌症细胞而不损伤正常细胞,并且据认为,IL-3R α 在正常干细胞与白血病干细胞之间的这种表达差异,可用于靶向白血病干细胞的治疗。

[0026] 关于与IL-3R α 形成异源二聚体的IL-3R β ,没有报告表明IL-3R β 在白血病干细胞中高表达,并且在其中对白血病干细胞和正常干细胞中mRNA的表达进行比较的微阵列的情况下,事实上IL-3R β 未被鉴定为在白血病干细胞中表达被增加的分子(非专利参考文献17)。

[0027] 关于与 IL-3R α 形成异源二聚体的 IL-3R β ，没有报告表明 IL-3R β 在白血病干细胞中高表达，并且在其中对白血病干细胞和正常干细胞中 mRNA 的表达进行比较的微阵列的情况下，事实上 IL-3R β 未被鉴定为在白血病干细胞中表达增加的分子（非专利参考文献 18）。

[0028] 长时间以来，已知道存在依赖于 IL-3 的白血病细胞，并且老的研究聚焦于占白血病细胞的大多数的母细胞。根据关于白血病干细胞的最新研究，据说白血病干细胞通过尽可能详尽地抑制其生长获得了抗肿瘤药剂抗性。此外，据认为 IL-3 反应性母细胞具有高增殖能力，因此推测这种细胞在使用抗肿瘤药剂的普通治疗中是有效的。

[0029] 作为靶向 IL-3R 受体的药剂的候选物，长时间以来 IL-3 本身被给药于造血不足的患者，但是它没有因此变成药物。其中将白喉毒素添加到 IL-3 上的融合蛋白的临床试验正在进行之中，其目的在于将白血病作为靶疾病。对于 IL-3 和白喉毒素 -IL-3 融合物来说，它们不适合作为药剂靶向其中 IL-3R α 的表达特异性增加的细胞，因为 IL-3 不是强烈地结合单独的 IL-3R α 蛋白，而是强烈结合 IL-3R α 和 β 的异源蛋白，这是由 IL-3 的性质而决定的。另一方面，作为靶向 IL-3R α 的药剂的候选物，已经报道了 IL-3R α 人类小鼠嵌合抗体 7G3 的一期结果（非专利文献 19）。因为 7G3 嵌合抗体利用 IL-3 信号传导的阻断目的作为 AML 疗法的机制，它不是旨在除去 IL-3R α 阳性细胞的药剂。此外，尽管已知一些其他的 IL-3R α 抗体（9F5(Becton Dickinson)、6H6(SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) 和 AC145(Miltenyi-Biotech)），但它们不具有除去高表达 IL-3R α 的细胞的能力。

[0030] 引用文献名单

[0031] 专利文献

[0032] 专利文献 1 :EP 公开的专利申请 120694

[0033] 专利文献 2 :EP 公开的专利申请 No. 125023

[0034] 专利文献 3 :GB 专利申请 No. GB2188638A

[0035] 专利文献 4 :美国专利 No. 5, 585, 089

[0036] 非专利文献

[0037] 非专利文献 1 :Osawa M 等, Science. 273 :242-5 (1996)

[0038] 非专利文献 2 :Goodell MA 等, J Exp Med. 183 :1797-806 (1996)

[0039] 非专利文献 3 :Yamazaki S 等, EMBOJ. 25 :3515-23 (2006)

[0040] 非专利文献 4 :Ishikawa F 等, Nat Biotechnol. 25 :1315-21. (2007)

[0041] 非专利文献 5 :Bao S 等, Nature. 444 :756-60 (2006)

[0042] 非专利文献 6 :Schiff 等, Cane. Res. , 45, 879-885 (1985)

[0043] 非专利文献 7 :Bruggemann 等, J. Exp. Med. , 170 :2153-2157 (1989)

[0044] 非专利文献 8 :Riechmann 等, Nature, 332 :323-327 (1988)

[0045] 非专利文献 9 :Ishida I 等, Cloning Stem Cells. 4 :91-102 (2002)

[0046] 非专利文献 10 :Wu 等, J Mol Biol 19 :151-62 (1999)

[0047] 非专利文献 11 :Sun 等, Blood, 87 :83 (1996)

[0048] 非专利文献 12 :Chen 等, J Biol Chem, 284 :5763 (2009)

[0049] 非专利文献 13 :Bonnet 等, NatMed, 1997 ;3 :730

[0050] 非专利文献 14 :Jordan 等, Leukemia, 2000 ;14 :1777

[0051] 非专利文献 15 :Haematologica, 2001 ;86 :1261

[0052] 非专利文献 16 :LeukLymphoma, 2006 ;47 :207

[0053] 非专利文献 17 :Majeti 等, Proc Natl Acad Sci USA. 2009 ;106 :3396

[0054] 非专利文献 18 :Majeti 等, Proc Natl Acad Sci USA. 106 :3396 (2009)

[0055] 非专利文献 19 :Blood, 2008;112(11) :摘要 2956

[0056] 发明概述

[0057] 技术问题

[0058] 本发明的目的是提供能够单独移除白血病干细胞并且也能几乎不表现出对正常细胞的副作用（显示出较少副作用）的治疗药剂。具体来说，本发明提供了针对人类 IL-3R α 链的抗体，其不抑制 IL-3 信号传导并与人类 IL-3R α 链的 B 结构域结合，但不与 C 结构域结合；包含抗体的组合物；以及包含抗体的治疗方法或检测方法。

[0059] 解决问题的方案

[0060] 本发明涉及下列 (1) 至 (9)。

[0061] (1) 一种针对人类 IL-3R α 链的抗体，所述抗体不抑制 IL-3 信号传导并与人类 IL-3R α 链的 B 结构域结合，但是与 C 结构域结合。

[0062] (2) 上述 (1) 中描述的抗体，其进一步具有高抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。

[0063] (3) 上述 (1) 或 (2) 中描述的抗体，其中通过使用用 IL-2 培养的 PBMC 的 Colon-26/hCD123 ADCC 测定法，高抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 在 0.01 μ g/ml 的抗体浓度下显示出 10% 的特异的裂解率。

[0064] (4) 上述 (1) 至 (3) 任一项中描述的抗体，其包含选自下列 (a) 至 (e) 的重链 CDR 和轻链 CDR 的氨基酸序列：

[0065] (a) 重链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :113 至 115 的氨基酸序列，轻链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :131 至 133 的氨基酸序列，

[0066] (b) 重链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :116 至 118 的氨基酸序列，轻链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :134 至 136 的氨基酸序列，

[0067] (c) 重链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :119 至 121 的氨基酸序列，轻链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :137 至 139 的氨基酸序列，

[0068] (d) 重链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :122 至 124 的氨基酸序列，轻链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :140 至 142 的氨基酸序列，以及

[0069] (e) 重链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :125 至 127 的氨基酸序列，轻链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :143 至 145 的氨基酸序列。

[0070] (5) 上述 (1) 至 (4) 任一项中描述的抗体，其包含选自下列 (a) 至 (f) 的重链可变区和轻链可变区：

[0071] (a) 包含 SEQ ID NO :53 的氨基酸序列中从 20 位谷氨酰胺 (Q) 至 139 位丝氨酸 (S) 的氨基酸序列的重链可变区，以及包含 SEQ ID NO :55 的氨基酸序列中从 23 位缬氨酸 (V) 至 129 位赖氨酸 (K) 的氨基酸序列的轻链可变区；

[0072] (b) 包含 SEQ ID NO :57 的氨基酸序列中从 20 位谷氨酰胺 (Q) 至 139 位丝氨酸 (S) 的氨基酸序列的重链可变区，以及包含 SEQ ID NO :59 的氨基酸序列中从 23 位缬氨酸 (V) 至 129 位赖氨酸 (K) 的氨基酸序列的轻链可变区；

[0073] (c) 包含 SEQ ID NO :61 的氨基酸序列中从 20 位谷氨酰胺 (Q) 至 139 位丝氨酸 (S) 的氨基酸序列的重链可变区, 以及包含 SEQ ID NO :63 的氨基酸序列中从 23 位天冬氨酸 (D) 至 129 位赖氨酸 (K) 的氨基酸序列的轻链可变区;

[0074] (d) 包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列中从 20 位谷氨酰胺 (Q) 至 139 位丝氨酸 (S) 的氨基酸序列的重链可变区, 以及包含 SEQ ID NO :67 的氨基酸序列中从 23 位天冬氨酸 (D) 至 129 位赖氨酸 (K) 的氨基酸序列的轻链可变区;

[0075] (e) 包含 SEQ ID NO :69 的氨基酸序列中从 20 位谷氨酰胺 (Q) 至 138 位丝氨酸 (S) 的氨基酸序列的重链可变区, 以及包含 SEQ ID NO :71 的氨基酸序列中从 23 位天冬氨酸 (D) 至 129 位赖氨酸 (K) 的氨基酸序列的轻链可变区; 以及

[0076] (f) 重链可变区和 / 或轻链可变区, 其包含在上述 (a) 至 (e) 所显示的重链可变区和 / 或轻链可变区中缺失、取代、添加或插入 1 至 3 个氨基酸残基的氨基酸序列。

[0077] (6) 一种用于预防或治疗血液肿瘤的组合物, 在所述血液肿瘤中在对象的骨髓或外周血中发现了表达 IL-3R α 的细胞, 所述组合物包含 (1) 至 (5) 任一项中描述的 IL-3R α 抗体作为活性成分。

[0078] (7) 一种用于治疗血液肿瘤的方法, 在所述血液肿瘤中在骨髓或外周血中发现了表达 IL-3R α 的细胞, 所述方法包含向对象给药包含 (1) 至 (5) 任一项中描述的 IL-3R α 抗体作为活性成分的组合物。

[0079] (8) 一种用于检测血液肿瘤的组合物, 在所述血液肿瘤中在来自对象的生物样品的骨髓或外周血中发现了表达 IL-3R α 的细胞, 所述组合物包含 (1) 至 (5) 任一项中描述的 IL-3R α 抗体。

[0080] (9) (1) 至 (5) 任一项中描述的组合物或方法, 其中上面提到的血液肿瘤是急性骨髓性白血病 (AML)。

[0081] 本发明的有益效果

[0082] 本发明能够提供针对人类 IL-3R α 链的抗体, 其不抑制 IL-3 信号传导并与人类 IL-3R α 链的 B 结构域结合, 但不结合 C 结构域; 包含所述抗体的组合物以及使用所述抗体的治疗方法或检测方法。

[0083] 附图简述

[0084] [图 1] 和 [图 2] 图 1 和 2 是使用标记的抗 IL-3R α 抗体对表达 IL-3R α / GM-CSFR α 嵌合蛋白的细胞进行的流式细胞术分析结果。

[0085] [图 3] 图 3 是使用标记的抗 IL-3R α 抗体对表达 IL-3R α / GM-CSFR α 嵌合蛋白的细胞进行的流式细胞术分析的结果。

[0086] [图 4] 图 4 是图表, 其中在人类 IL-3R α 分子的 A 和 B 结构域的核苷酸和氨基酸序列中, 排列在分子外部的区域 1 至 7 被 GM-CSFR α 序列取代的区域部分用虚线显示。

[0087] [图 5] 图 5 是用于检测 IL-3 信号传导的阻断活性的细胞生长试验的结果。纵坐标表示细胞生长抑制率 (%), 横坐标表示各种 IL-3R α 抗体名称。

[0088] [图 6] 图 6 是用于检测 IL-3 信号传导的阻断活性的集落测定试验。GM、E 和 GEMM 分别显示了使用粒细胞 / 巨噬细胞系统、红细胞类系统集落和混合集落的结果。

[0089] [图 7] 图 7 是在带肿瘤模型中检测各种人类抗体的抗肿瘤效果的结果。纵坐标表示 MOLM13 细胞的数量, 横坐标表示各种 IL-3R α 抗体名称。

[0090] [图 8] 和 [图 9] 图 8 和 9 是使用抗 IL-3R α 抗体对表达 IL-3R α 的细胞系进行的 ADCC 试验的结果。在图 8 中使用了未用 IL-2 培养的 PBMC，在图 9 中使用了用 IL-2 培养的 PBMC。

[0091] [图 10] 图 10 是通过抗 IL-3R α 抗体和 PE- 标记的抗人类 IgG 第二抗体检测的表达食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) IL-3R α 的流式细胞术分析的结果。上排显示了表达食蟹猴 IL-3R α 的细胞，下排显示了表达人类 IL-3R α 的细胞。

[0092] 实施本发明的方式

[0093] (特别理想的实施方案的详细描述)

[0094] 在本说明书中使用的分段标题仅仅是出于组织的目的，不应被解释为对所描述的主题内容的限制。在本申请中引用的所有参考文献以任选目的在本说明书中明确引为参考。

[0095] (概要)

[0096] 本发明涉及针对人类 IL-3R α 链的抗体，其不抑制 IL-3 信号传导并与人类 IL-3R α 链（在后文中称为 IL-3R α ）的 B 结构域结合，但不与 C 结构域结合。

[0097] IL-3 受体（在后文中称为 IL-3R）、特别是 IL-3R α 表达在白血病干细胞的细胞表面上。一般来说，IL-3 受体 β 链（在后文中称为 IL-3R β ）将 IL-3 信号传导传递到细胞中，并因此诱导生长和分化。

[0098] 因此，存在着 IL-3 信号传导的抑制引起副作用、例如正常干细胞的正常造血功能的抑制的可能性。因此，作为靶向白血病干细胞的新治疗方法，优选情况下该方法靶向 IL-3R α ，并且也不抑制 IL-3 信号传导。

[0099] (IL-3R α)

[0100] IL-3R α 基因是 I 型跨膜蛋白，其属于细胞因子受体家族。在正常细胞中，IL-3R α 分子表达在一部分造血前体细胞、嗜碱性粒细胞、一部分树突状细胞等上。在肿瘤的情况下，已知它在造血系统癌症和白血病中表达。作为表达 IL-3R α 的肿瘤的实例，已知 IL-3R α 在急变期 AML 和 CML 的母细胞上，以及在 AML、CML、MDS、ALL 和 SM 中被认为是白血病干细胞的分化标志物阴性 CD34 阳性 CD38 阴性级分的情形中表达。在血液中，IL-3R α 的已知配体 IL-3 表达在活化的 T 细胞、自然杀伤细胞、肥大细胞和一部分巨核细胞上。此外，IL-3R α 也被称为 CD 123。IL-3R α 包括哺乳动物（例如灵长类和人类）类型的 IL-3R α 。IL-3R α 序列包括多态性变体。全长人类 IL-3R α 的具体实例包括下列氨基酸序列。

[0101] MVLLWLTLIALPCLLQTKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRM

[0102] VTDIECVKDADYSMPAVNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVANPPFST

[0103] WILFPENSGKPWAGAENLTCWIHDVDFLSCSWAVGPGAPADVQYD

[0104] LYLNVANRRQQYECLHYKTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGSQSSHILV

[0105] RGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFMHWKMRSH

[0106] FNRKFRYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRARERV

[0107] YEFLSAWSTPQRFECDQEEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVIC

[0108] RRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQNDKLVVWEAGKAGLEECLVTE

[0109] VQVVQKT (SEQ ID NO :1)

[0110] 人类 IL-3R α 的细胞外区域氨基酸序列的具体实例包括下列氨基酸序列。

- [0111] MVLLWLTL LIALPCLLQTKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLN RN
- [0112] VTDIECVKDADYSMPAVNNNSYCQFGAISLC EVTNYTVRVANPPFST
- [0113] WILFPENSGKPWAGAENLTCWIHDVDFLS CSWAVGPGAPADVQYD
- [0114] LYLNVNRRQQYECLHYKTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGSQSSHILV
- [0115] RGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFMHWKMRSH
- [0116] FNRKF RYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRARERV
- [0117] YEFLSAWSTPQRFECDQEEGANTRAWRTSL (SEQ ID NO :2)
- [0118] 此外, IL-3R α 的细胞外区域分成 A 至 C 三个结构域。
- [0119] A 结构域包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸中从 18 位的谷氨酰胺 (Q) 到 100 位的丝氨酸 (S) 的区域, B 结构域包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸中从 101 位的甘氨酸 (G) 至 203 位的丝氨酸 (S) 的区域, C 结构域是 SEQ ID NO :2 的氨基酸中从 204 位的谷氨酰胺 (Q) 到 308 位的亮氨酸 (L) 的区域。
- [0120] 此外, 在 A 结构域和 B 结构域中, 下列 7 个区域排列在分子外部。
- [0121] 区域 1 是 SEQ ID NO :2 的氨基酸中从 55 位的天冬氨酸 (D) 到 61 位的脯氨酸 (P), 区域 2 是 SEQ ID NO :2 的氨基酸中从 63 位的缬氨酸 (V) 到 70 位的苯丙氨酸 (F), 区域 3 是 SEQ ID NO :2 的氨基酸中从 91 位的丝氨酸 (S) 到 98 位的谷氨酸 (E), 区域 4 是 SEQ ID NO :2 的氨基酸中从 97 位的脯氨酸 (P) 到 104 位的色氨酸 (W), 区域 5 是 SEQ ID NO :2 的氨基酸中从 122 位的半胱氨酸 (C) 到 128 位的脯氨酸 (P), 区域 6 是 SEQ ID NO :2 的氨基酸中从 182 位的异亮氨酸 (I) 到 188 位的丝氨酸 (S), 区域 7 是 SEQ ID NO :2 的氨基酸中从 192 位的甘氨酸 (G) 到 198 位的赖氨酸 (K)。
- [0122] 因此, 本发明抗体的实例, 包括与 SEQ ID NO :2 的氨基酸中作为 IL-3R α 的细胞外区域的 101 至 203 位的氨基酸序列结合, 但不与 204 至 308 位的氨基酸序列结合的抗体, 以及进一步与 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列中 182 至 188 位和 192 至 198 位的氨基酸序列结合的抗体。
- [0123] 本发明的抗体与 IL-3R α 的细胞外区域的上述特定区域结合, 并且不抑制 IL-3 信号传导。
- [0124] 当在本发明中使用时, 术语“不抑制 IL-3 信号传导”是指它不由 IL-3 通过 IL-3R 抑制细胞内信号, 并且它包括其中 IL-3 与 IL-3R 的结合不被抑制和 IL-3R α 链与 β 链的结合不被抑制的情况。具体来说, 它意味着按照实施例 8 中的分析, 当抗体浓度被设定为 10 μ g/ml 时, 如图 5 所示的细胞生长抑制率为 40% 以上, 优选为 60% 以上, 更优选为 80% 以上。根据本说明书, 术语“IL-3 信号传导的阻断”和“IL-3 信号传导的抑制”以相同意义使用并且不可区分, 并且 IL-3 信号传导的阻断活性是指抑制 IL-3 信号传导的能力。
- [0125] 此外, 除了上面提到的性质之外, 本发明的抗体具有高的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。
- [0126] 具有 ADCC 活性的 IL-3R α 抗体是指与表达 IL-3R α 的细胞结合, 通过具有细胞毒性的效应细胞例如 NK 细胞等杀死表达 IL-3R α 的细胞的抗体。
- [0127] 高 ADCC 活性是指使用用 IL-2 培养的 PBMC 通过 Colon-26/hCD123ADCC 测定法测量时, 在 0.01 μ g/ml 或以下的抗体浓度下特异的裂解率为 10% 以上。
- [0128] 特异的裂解率是指通过测量靶细胞被抗体的裂解率而获得的值, 具体来说它可以

按照下面的实施例 11 来计算。

[0129] 表达 IL-3R α 的细胞的实例包括血液癌细胞（急性骨髓性白血病（AML）细胞、慢性骨髓性白血病（CML）细胞、骨髓增生异常综合征（MDS）细胞、急性淋巴性白血病（ALL）细胞、慢性淋巴性白血病（CLL）细胞、多发性骨髓瘤（多发性骨髓瘤：MM）细胞、系统性肥大细胞瘤（SM）细胞等）、调节性 T 细胞（例如 CD4 阳性 CD25 阳性细胞）、抗原呈递细胞（例如树突状细胞、单核细胞、巨噬细胞和与其类似的细胞（肝星状细胞、破骨细胞、小神经胶质细胞、主要表皮吞噬细胞、尘细胞（肺泡巨噬细胞）等））、嗜碱性粒细胞等。

[0130] 此外，AML 细胞、CML 细胞、ALL 细胞、CLL 细胞、MDS 细胞、SM 细胞、MM 细胞、各种淋巴瘤细胞包括它们的癌症干细胞。

[0131] 癌症干细胞是构成肿瘤的细胞组之一。例如，在急性骨髓性白血病（AML）中，它用谱系（-）CD34（+）CD38（-）髓系细胞表示。因此，由于本发明的抗体具有高 ADCC 活性，它诱导表达 IL-3R α 的细胞的减少或消除。

[0132] 此外，本发明的 IL-3R α 抗体包括具有选自下列 (a) 至 (e) 的重链 CDR 和轻链 CDR 的 IL-3R α 抗体：

[0133] (a) 重链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :113 至 115 所显示的氨基酸序列，轻链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :131 至 133 所显示的氨基酸序列，

[0134] (b) 重链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :116 至 118 所显示的氨基酸序列，轻链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :134 至 136 所显示的氨基酸序列，

[0135] (c) 重链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :119 至 121 所显示的氨基酸序列，轻链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :137 至 139 所显示的氨基酸序列，

[0136] (d) 重链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :122 至 124 所显示的氨基酸序列，轻链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :140 至 142 所显示的氨基酸序列，以及

[0137] (e) 重链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :125 至 127 所显示的氨基酸序列，轻链的 CDR 1 至 3 分别为 SEQ ID NO :143 至 145 所显示的氨基酸序列。

[0138] 此外，本发明的抗体包括含有选自下列 (a) 至 (f) 的重链可变区和轻链可变区的 IL-3R α 抗体（括号中显示的是下面实施例中描述的每个可变区所源自的抗体的名称）：

[0139] (a) 包含 SEQ ID NO :53 的氨基酸序列中从 20 位谷氨酰胺 (Q) 至 139 位丝氨酸 (S) 的氨基酸序列的重链可变区，以及包含 SEQ ID NO :55 的氨基酸序列中从 23 位缬氨酸 (V) 至 129 位赖氨酸 (K) 的氨基酸序列的轻链可变区（抗体名称：01d4）

[0140] (b) 包含 SEQ ID NO :57 的氨基酸序列中从 20 位谷氨酰胺 (Q) 至 139 位丝氨酸 (S) 的氨基酸序列的重链可变区，以及包含 SEQ ID NO :59 的氨基酸序列中从 23 位缬氨酸 (V) 至 129 位赖氨酸 (K) 的氨基酸序列的轻链可变区（抗体名称：01d5）

[0141] (c) 包含 SEQ ID NO :61 的氨基酸序列中从 20 位谷氨酰胺 (Q) 至 139 位丝氨酸 (S) 的氨基酸序列的重链可变区，以及包含 SEQ ID NO :63 的氨基酸序列中从 23 位天冬氨酸 (D) 至 129 位赖氨酸 (K) 的氨基酸序列的轻链可变区（抗体名称：01d17）

[0142] (d) 包含 SEQ ID NO :65 的氨基酸序列中从 20 位谷氨酰胺 (Q) 至 139 位丝氨酸 (S) 的氨基酸序列的重链可变区，以及包含 SEQ ID NO :67 的氨基酸序列中从 23 位天冬氨酸 (D) 至 129 位赖氨酸 (K) 的氨基酸序列的轻链可变区（抗体名称：01d19）

[0143] (e) 包含 SEQ ID NO :69 的氨基酸序列中从 20 位谷氨酰胺 (Q) 至 138 位丝氨酸 (S)

的氨基酸序列的重链可变区,以及包含 SEQ ID NO :71 的氨基酸序列中从 23 位天冬氨酸 (D) 至 129 位赖氨酸 (K) 的氨基酸序列的轻链可变区 (抗体名称 :New102);以及

[0144] (f) 重链可变区和 / 或轻链可变区,其包含在上述 (a) 至 (e) 所显示的重链可变区和 / 或轻链可变区中缺失、取代、添加或插入了 1 至 3 个氨基酸残基的氨基酸序列。

[0145] (抗体)

[0146] 抗体以最广义的意义使用,并包括单克隆抗体、多克隆抗体、多价抗体、多特异性抗体 (例如双特异性抗体) 以及抗体片段,只要它们显示出所需生物活性即可。

[0147] 抗体含有成熟的重链或轻链可变区序列。此外,抗体还包括修饰形式和变体形式,例如抗体的恒定区、成熟重链或轻链可变区序列的互补性决定区 (CDR) 或构架 (FR) 区内部或外部的取代等。在特定实施方案中,取代包括保守氨基酸取代。

[0148] 此外,抗体还包括成熟重链或轻链可变区序列的子序列。在特定实施方案中,子序列选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fd、单链 Fv (scFv)、二硫键 Fv (sdFv) 和 VL 或 VH。

[0149] 此外,抗体还包括异源结构域。在特定实施方案中,异源结构域包括标签、可检测标记物或细胞毒性剂。

[0150] 抗体的实例包括单克隆抗体和多克隆抗体及其任何同种型或亚类。在特定实施方案中,上面提到的抗体是 IgG 的同种型 (例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)、IgA、IgM、IgE 或 IgD。“单克隆”抗体是指抗体基于、得自单一克隆包括真核细胞克隆、原核细胞克隆或噬菌体克隆,或源自于单一克隆包括真核细胞克隆、原核细胞克隆或噬菌体克隆,基于单一克隆包括真核细胞克隆、原核细胞克隆或噬菌体克隆,因此,“单克隆”抗体是结构确定的物质,而不是用于产生它的方法。

[0151] IL-3R α 抗体、抗 IL-3R α 和抗 IL-3R α 抗体是指特异性结合 IL-3R α 的抗体。特异性结合是指它对于 IL-3R α 中存在的表位具有选择性。特异性结合可以使用本技术领域中已知的测定方法 (例如免疫沉淀、ELISA、流式细胞术、Western 印迹) 与非特异性结合区分开。

[0152] 当 IL-3R α 抗体所特异性结合的全部或部分抗原表位存在于不同蛋白中时,存在着该抗体能够与不同蛋白结合的可能性。因此,取决于 IL-3R α 表位的序列或结构同源性,存在着 IL-3R α 抗体特异性结合与 IL-3R α 表位具有高的序列或结构同源性的其他蛋白的可能性。因此,当不同蛋白中存在具有足够序列或结构同源性的表位时,存在着 IL-3R α 抗体与不同蛋白结合的可能性。

[0153] IL-3R α 抗体包括分离和纯化抗体。本发明的抗体包括从人类分离或纯化的 IL-3R α 抗体。

[0154] 术语“(被) 分离的”当用作组合物的修饰语时,是指组合物通过人工制备,或一般通过一个或多个操作步骤或过程与天然存在的体内环境中的一种或多种其他组分分离开。一般来说,通过这种方式分离的组合物基本上不含在自然状态下一般与其相伴的一种或多种物质,例如一种或多种蛋白质、核酸、脂类、糖类和细胞膜。因此,分离的组合物与组合物天然存在于其中的生物体细胞中的其他生物组分、或组合物在其中生产 (例如通过合成或细胞培养) 的人造介质分离开。例如,分离的 IL-3R α 抗体可以从产生抗体的动物 (例如非转基因哺乳动物或转基因动物 (鼠类 (小鼠) 或有蹄类动物 (牛))) 获得,并与其它多肽和核酸分离开。因此,含有从这样的动物获得的抗体的血清被认为是分离的。术语“(被)

分离的”不排除可选的物理形式,例如,分离的抗体可以包括抗体子序列和嵌合体、多聚体或衍生化形式。

[0155] 术语“(被)纯化的”当用作组合物的修饰语时,是指组合物不含在自然状态下典型与其相伴的大部分或基本上所有的物质。一般来说,纯化的抗体从普遍存在于抗体环境中的组分获得。因此,从产抗体杂交瘤的细胞培养混合物分离的抗体上清液被认为是纯化的。因此,“(被)纯化的”不要求绝对纯度,并且取决于上下文。此外,“(被)纯化的”组合物可以与一种或多种其他分子组合。因此,术语“(被)纯化的”不排除组合物的组合。纯度可以通过任选的适合方法来确定,例如UV光谱测定法、色谱法(例如HPLC、气相)、凝胶电泳(例如银染色或考马斯亮蓝染色)、序列分析(肽和核酸)等。

[0156] “(被)纯化的”蛋白和核酸包括通过标准纯化方法获得的蛋白和核酸。通过在宿主细胞中重组表达和化学合成获得的蛋白和核酸也包括在该术语中。此外,“(被)纯化的”也可以是指组合物中污染物的水平低于用于人类或非人类动物给药的管理机构例如食品和药品管理局(FDA)所能接受的水平。

[0157] IL-3R α 抗体包括在体内或体外(例如在对象中)与IL-3R α 结合并调节IL-3R α 的功能或活性的抗体。在本说明书中,“调节”及其语法变化形式当与IL-3R α 的活性或功能关联使用时,是指IL-3R α 的活性或功能受到可检测的影响、修改或改变,但是不包括IL-3信号传导的抑制。因此,调节IL-3R α 的活性或功能的IL-3R α 抗体是提供影响、修改或改变,使得可以检测到一种或多种IL-3R α 活性或功能而不抑制IL-3信号传导的抗体,并且这样的IL-3R α 活性或功能可以包括例如IL-3R α 与IL-3R α 配体(例如IL-3)的结合,IL-3R α 介导的信号传递,或IL-3R α 介导的细胞应答或可以被IL-3R α 调节的细胞应答,或本说明书中描述的或公知的或可以了解到的其他IL-3R α 活性或功能。

[0158] 可以被调节的各种非限制性的IL-3R α 活性和功能的实例包括IL-3R α 介导的信号转导或IL-3R α 介导的细胞应答,可以通过IL-3R α 调节的细胞应答,细胞增殖或细胞扩增(例如AML细胞、CML细胞、ALL细胞、CLL细胞、MDS细胞、MM细胞、SM细胞、各种淋巴瘤细胞、单核细胞、巨噬细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、辅助性T细胞、调节性T细胞、自然杀伤细胞、髓系祖细胞和淋巴祖细胞),细胞存活或凋亡(例如AML细胞、CML细胞、ALL细胞、CLL细胞、MDS细胞、MM细胞、SM细胞、各种淋巴瘤细胞、单核细胞、巨噬细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、辅助性T细胞、调节性T细胞、自然杀伤细胞、髓系祖细胞和淋巴祖细胞),细胞因子(例如Th、Th2和非Th1/Th2细胞因子)和干扰素表达或生产,抗凋亡蛋白或前凋亡蛋白的表达或生产,障碍、疾病、生理状况、病理状况和症状的治疗、抑制或改善。可以被调节的具体细胞因子不受限制,其实例包括IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-14、IL-16、IL-17、IL-23、IL-26、TNF- α 和 γ -干扰素(体外或体内)。具体的抗凋亡蛋白和前凋亡蛋白不受限制,其实例包括Bcl-xL、Bcl-2、Bad、Bim和Mcl-1。

[0159] 因此,本说明书中描述的抗IL-3R α 抗体包括调节下列过程的抗体:IL-3R α 介导的信号转导或IL-3R α 介导的细胞应答,可以通过IL-3R α 调节的细胞应答,细胞增殖或细胞生长(例如AML细胞、CML细胞、ALL细胞、CLL细胞、MDS细胞、MM细胞、SM细胞、各种淋巴瘤细胞、单核细胞、巨噬细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、辅助性T细胞、调节性T细胞、自然杀伤细胞、髓系祖细胞和淋巴祖细胞),细胞存活或凋亡(例如AML细胞、CML细胞、ALL细胞、CLL细胞、MDS细胞、MM细胞、SM细胞、各种淋巴瘤细胞、单核细胞、巨噬细胞、肥大细胞、

嗜碱性粒细胞、辅助性 T 细胞、调节性 T 细胞、自然杀伤细胞、髓系祖细胞和淋巴祖细胞), 细胞因子(例如 Th、Th2 和非 Th1/Th2 细胞因子)和干扰素表达或生产, 抗凋亡蛋白或前凋亡蛋白的表达或生产, 障碍、疾病、生理状况、病理状况和症状的治疗、抑制或改善。在具体实施方案中, 本发明的抗 IL-3R α 抗体能够调节 AML 细胞的扩增或存活, 其他血液癌细胞(例如 CML 细胞、ALL 细胞、MDS 细胞、MM 细胞、SM 细胞或各种淋巴瘤细胞)的数量, 非癌血液细胞例如单核细胞、巨噬细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、辅助性 T 细胞、调节性 T 细胞、自然杀伤细胞、髓系祖细胞和淋巴祖细胞的生长或存活, 以及减少、消除或贫化 AML 细胞、CML 细胞、ALL 细胞、CLL 细胞、MDS 细胞、MM 细胞、SM 细胞或各种淋巴瘤细胞。

[0160] IL-3R α 抗体包括修饰的形式, 例如也被称为变体的取代产物(例如氨基酸取代产物)、添加产物、缺失产物(例如子序列或片段)等。这样的修饰的抗体形式和变体保留了本发明显示的 IL-3R α 抗体的至少部分功能或活性, 例如与 IL-3R α 的结合或 IL-3R α 活性或功能(例如 IL-3R α 信号传递)的调节。因此, 修饰的 IL-3R α 抗体可以保留调节例如至少一部分 IL-3R α 结合或一种或多种 IL-3R α 功能或活性(例如信号传递、细胞应答等)的能力。

[0161] 根据本说明书, 术语“改变”(“修饰”)及其语法变化形式是指组合物衍生自参比组合物。修饰的蛋白、核酸和其他组合物可以具有与参比的未修饰蛋白、核酸或其他组合物相比更高或更低的活性, 或者可以具有与参比的未修饰蛋白、核酸或其他组合物不同的功能。

[0162] 这样的含有氨基酸取代的抗体可以由核酸编码。因此, 本发明还提供了编码含有氨基酸取代的抗体的核苷酸序列。

[0163] 术语“同一性”或“同一的”是指两个或多个参比物质相同。因此, 当两个蛋白序列(例如 IL-3R α 抗体)同一时, 它们至少在参比区域或部分中具有相同的氨基酸序列。术语“同一区”是指两个或多个参比物质的同一的区域。因此, 当两个蛋白序列在一个或多个序列区域中同一时, 它们在所述区域中具有同一性。“显著同一性”是指分子在结构或功能上保守, 使得分子具有或预计具有一种或多种参比分子功能或活性的至少部分功能或活性, 或具有与其享有同一性的参比分子的相关/相应区域或部分。因此, 具有显著同一性的多肽(例如 IL-3R α 抗体)具有或预计具有参比多肽(例如 IL-3R α 抗体)的至少部分活性或功能。例如, 在特定实施方案中, 具有一个或多个修饰(例如 1 至 3 个氨基酸残基的缺失、取代、添加或插入)并保留了未修饰 IL-3R α 抗体的至少部分活性或功能的 IL-3R α 抗体, 被认为与参比 IL-3R α 抗体具有显著同一性。

[0164] 由于结构相关蛋白和功能相关蛋白之间的变异, 需要一定量的序列同一性才能保留蛋白、区域上的功能或活性以及区域的功能或活性。在蛋白的情况下, 通过仅存在 30% 的氨基酸序列同一性就可能保留活性或功能, 但一般来说, 存在着与参比序列的 50%、60%、75%、85%、90%、95%、96%、97% 或 98% 的较高同一性。两个序列之间的同一性程度可以使用本技术领域中公知的计算机程序或数学算法来确认。在这样的计算序列同一性(同源性)比例的算法中, 一般来说考虑比较区域内的序列间隙和错配。例如, BLAST(例如 BLAST 2.0)检索算法(例如参见 Altschul 等, J. Mol. Biol., 215 :403 (1990), 可通过 NCBI 公开使用)具有下列说明性的检索参数: 错配 -2; 间隙开始 5; 间隙延长 2。在多肽序列比较中, BLASTP 算法典型地与计分矩阵例如 PAM100、PAM 250、BLOSUM 62、BLOSUM50、FASTA(例如

FASTA 2 和 FASTA 3) 等组合使用, 并且也可以使用 SSEARCH 序列比较程序来确定同一性程度 (Pearson 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 :2444 (1988); Pearson, Methods Mol. Bio., 132 :185 (2000); 和 Smith 等, J. Mol. Biol., 147 :195 (1981))。也可以使用基于 Delaunary 类型的拓扑作图来开发用于确定蛋白结构相似性的程序 (Bostick 等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 304 :320 (2003))。

[0165] “保守取代”是将一个氨基酸用生物、化学或结构上类似的残基取代。生物相似性是指生物活性例如 IL-3R α 结合活性不被取代所破坏。结构相似性是指氨基酸具有长度相似的侧链 (例如丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸) 或具有相似尺寸。化学相似性是指残基具有相同电荷或是亲水或疏水的。具体实例包括将一个疏水残基例如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸和甲硫氨酸用另一个残基取代, 或将一个极性残基用另一个残基取代, 例如用赖氨酸取代精氨酸、用天冬氨酸取代谷氨酸或用天冬酰胺取代谷氨酰胺, 以及用苏氨酸取代丝氨酸。

[0166] 此外, 修饰的抗体的实例包括肽模拟物, 其具有一个或多个用 L- 氨基酸 (或其混合物) 取代的 D- 氨基酸、结构和功能类似物例如合成或非天然氨基酸或氨基酸类似物及其衍生形式。修饰的实例包括环状结构, 例如分子的氨基和羧基末端之间的端对端酰胺键或分子内或分子间二硫键或分子内或分子间二硫键。

[0167] 氨基酸修饰的其他非 6 限制性具体实例包括 IL-3R α 的部分序列 (子序列) 和片段。IL-3R α 的示例性子序列和片段包括与本发明的示例性 IL-3R α 抗体结合的 IL-3R α 序列的部分。此外, IL-3R α 的示例性子序列和片段包括免疫原性区域, 例如与本发明的示例性 IL-3R α 抗体结合的 IL-3R α 的部分。

[0168] 根据本发明, 提供了编码 IL-3R α 抗体片段子序列的核酸, 所述片段保留了 IL-3R α 抗体和未修饰或参比 IL-3R α 抗体的至少部分功能或活性。在本说明书中, 术语“子序列”或“片段”是指全长分子的一部分。编码 IL-3R α 抗体的 IL-3R α 抗体子序列具有比全长 IL-3R α 抗体少至少一个的氨基酸 (例如缺失了一个或多个内部氨基酸或从氨基端或羧基端缺失一个或多个末端氨基酸)。IL-3R α 抗体的子序列具有比全长 IL-3R α 抗体少至少一个的氨基酸。核酸子序列具有比全长对比核酸序列少至少一个的核苷酸。因此, 子序列可以是全长天然 IL-3R α 内的任选长度。

[0169] IL-3R α 抗体子序列和片段可以具有与全长抗体相同的结合亲和性、与全长抗体相同的结合特异性或与全长抗体相同的一种或多种活性或功能, 例如 IL-3R α 拮抗或激动抗体的功能或活性。在指称抗体时, 术语“功能子序列”或“功能片段”是指保留了与全长参比抗体相同的一种或多种功能或活性, 例如 IL-3R α 抗体的至少一部分功能或活性的抗体部分。例如, 与 IL-3R α 或 IL-3R α 片段结合的抗体子序列被认为是功能子序列。

[0170] 抗体子序列和片段可以组合。例如, VL 或 VH 子序列可以通过连接序列相连, 并可以由此形成 VL-VH 嵌合体。单链 Fv (scFv) 子序列的组合可以通过连接序列相连, 并可以由此形成 scFv-scFv- 嵌合体。IL-3R α 抗体子序列和片段包括单独或与所有或一部分其他 IL-3R α 抗体子序列组合的单链抗体或可变区。

[0171] 抗体子序列和片段可以通过抗体的蛋白水解作用、例如用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化完整抗体来制备。通过用胃蛋白酶进行酶切割获得的抗体子序列和片段, 提供用 $F(ab')_2$ 表示的 5S 片段。该片段可以用巯基还原剂进一步切割, 形成 3.5S 的 Fab' 单价片段。或者, 使用胃蛋白酶进行的酶切割直接产生两个单价 Fab' 片段和 Fc 片段 (参见例如

美国专利 No. 4, 036, 945 和美国专利 No. 4, 331, 647 ;以及 Edelman 等, Methods Enzymol 1 : 422(1967)。也可以使用其他切割抗体的方法,例如分离重链以形成单价轻链 - 重链片段, 进一步切割片段, 或其他酶或化学方法。

[0172] 蛋白和抗体及其子序列和片段可以使用遗传工程来制备。技术包括将编码蛋白或抗体的全部或部分基因在宿主细胞例如 COS 细胞和大肠杆菌中表达。重组宿主细胞合成全长或子序列例如 scFv (例如 Whitlow 等, In :Methods :A Companion to Methods in Enzymology 2 :97(1991) ;Bird 等, Science 242 :423(1988) ;和美国专利 No. 4, 946, 778)。单链 Fv 和抗体可以按照下述文献中描述的步骤来制备 :美国专利 No. 4, 946, 778 和美国专利 No. 5, 258, 498 ;Huston 等, Methods Enzymol 203 :46(1991) ;Shu 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :7995(1993) ;和 Skerra 等, Science 240 :1038(1988)。

[0173] 修饰形式包括衍生化序列, 例如在氨基酸中游离氨基形成胺的盐酸盐、对甲苯磺酸基团和簇基苯醌基团; 游离羧基形成盐或甲基和乙基酯; 游离羟基形成 O- 酰基或 O- 烷基衍生物, 以及天然存在的氨基酸衍生物例如 4- 羟基脯氨酸 (脯氨酸的衍生物)、5- 羟基赖氨酸 (赖氨酸的衍生物)、高丝氨酸 (丝氨酸的衍生物)、鸟氨酸 (赖氨酸的衍生物) 等。修饰可以使用本技术领域通常已知的方法来进行 (例如基于 PCR 的位点特异性缺失或插入突变、化学修饰和诱变、交联等)。

[0174] 添加产物和插入产物包括在蛋白 (抗体)、核酸和其他组合物的修饰形式中。例如, 添加可以是与任何类型的蛋白 (抗体)、核酸或其他组合物的分子的共价或非共价键合。一般来说, 添加和插入产生不同功能或活性。

[0175] 融合 (嵌合) 多肽或核酸序列包括在添加和插入产物中, 它们是具有在参比的天然 (野生型) 序列中一般不存在的一个或多个分子共价连接于上述序列而形成的序列。具体实例是另一个蛋白 (例如抗体) 的序列, 用于产生多功能蛋白 (例如多特异性抗体)。

[0176] 本发明的抗体还包括嵌合或融合产物, 其中一个或多个附加结构域共价连接到其上, 以赋予不同或互补的功能或活性。抗体的实例包括在自然界中天然不存在并且其中两个或多个氨基酸序列相互键合的嵌合和融合产物。

[0177] 根据本发明, 提供了含有异源结构域和编码 IL-3R α 抗体的核酸的 IL-3R α 抗体。异源结构域可以是氨基酸添加产物或插入产物, 但是不限于氨基酸残基。因此, 异源结构域可以由各种类型的小的或大的功能部分中的任一种构成。这样的部分包括核酸、肽、糖类、脂类或小的有机化合物例如药物、金属 (金、银) 等。

[0178] 异源结构域的具体的非限制性实例包括标签、可检测标记物和细胞毒性药剂。标签和可检测标记物的具体实例包括 T7-、His-、myc-、HA- 和 FLAG- 标签, 酶 (辣根过氧化物酶、脲酶、过氧化氢酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素转移酶), 酶的底物, 配体 (例如生物素), 受体 (亲和素), 放射性核素 (例如 C14、S35、P32、P33、H3、I125 和 I131), 电子密度试剂, 能量转移分子, 顺磁性标记物, 荧光团 (荧光素、罗丹明、藻红蛋白), 发色团, 化学发光剂 (咪唑、萤光素酶) 和生物发光剂。细胞毒性药剂的具体实例包括白喉毒素 (白喉, 毒素)、霍乱毒素和赖氨酸。

[0179] 连接序列可以插入到蛋白 (例如抗体)、核酸或其他组合物与添加产物或插入产物 (例如异源结构域) 之间, 使得两种物质维持至少一部分不同功能或活性。连接序列可以具有一种或多种性质, 其能够加速任一结构域或能够执行与任一结构域的相互反应, 并

且这样的特征包括不能形成柔性结构和有序二级结构,或疏水性质或带电性质。在柔性蛋白区域中通常发现的氨基酸的实例包括甘氨酸、天冬酰胺和丝氨酸。其他接近中性的氨基酸例如苏氨酸和丙氨酸也可用于连接序列中。连接序列的长度可以变化(例如参见美国专利No. 6,087,329)。连接物还可以包括化学交联剂和结合试剂(偶联试剂)例如磺基-琥珀酰亚胺基衍生物(磺基-SMCC、磺基-SMPB)、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯(DSS)、二琥珀酰亚胺基戊二酸酯(DSG)和二琥珀酰亚胺基酒石酸酯(DST)。

[0180] 添加的其他实例包括下列任一种:糖基化,脂肪酸,脂类,乙酰化,磷酸化,酰胺化,甲酰化,泛素化和通过保护或阻断基团衍生化,以及大量化学修饰。本技术领域的专业人员可以容易地理解其他的替代方案和可能性,并且它们被认为属于本发明的范围内。

[0181] 这样的修饰序列可以使用介导细胞表达或体外翻译的重组DNA技术来制备。多肽和核酸序列也可以通过本技术领域公知的方法来制备,例如使用自动化肽合成仪的化学合成(参见例如 Applied Biosystems, Foster City CA)。

[0182] 修饰的和变体抗体例如取代产物、子序列添加产物等,可以维持IL-3R α 抗体的可检测活性。在实施方案中,修饰抗体具有与IL-3R α 分子结合的活性,并通过免疫系统、主要以效应细胞为中心,诱导IL-3R α 表达细胞的减少或消除。修饰抗体涉及IL-3R α 表达细胞的功能控制,并诱导细胞的存活、生长、静息、细胞死亡等。细胞死亡包括凋亡、坏死、自噬等。

[0183] (IL-3R α 的筛选方法)

[0184] 根据本发明,还提供了筛选、检测和鉴定IL-3R α 的无细胞方法和基于细胞的方法(例如体内或体外方法)(例如在溶液中或通过固相)。这些方法可以在体外在溶液中使用生物材料或样品来进行,以及使用例如动物来源细胞(例如淋巴细胞)的样品在体内进行。在实施方案中,方法包含将生物材料或样品与结合IL-3R α 的抗体在允许抗体与IL-3R α 结合的条件下进行接触的步骤,以及测定与IL-3R α 结合的抗体的步骤。IL-3R α 的存在通过抗体与IL-3R α 的结合来检测。在实施方案中,IL-3R α 存在于细胞或组织中。在另一个实施方案中,上面提到的生物材料或样品从哺乳动物被分析物获得。

[0185] 当用于组合物例如蛋白(例如IL-3R α 抗体)、材料、样品或治疗时,术语“接触”是指组合物(例如IL-3R α 抗体)与其他所指称物质之间的直接或间接相互作用。直接相互作用的具体实例包括结合。间接相互作用的具体实例包括其中组合物作用于中间分子,然后将该中间分子作用于所指称物质的情况。因此,例如将细胞(例如淋巴细胞)与IL-3R α 抗体接触包括允许抗体与细胞结合(例如通过与IL-3R α 结合)或允许抗体作用于中间物质,然后将该中间物质作用于细胞。

[0186] 术语“测定”和“测量”及其语法变化形式在本说明书中同义使用,并且是指定性测量和定量测量中的任一种或定性测量和定量测量两者。当这些术语用于指称结合时,它们包括评估结合的相对量、亲和性或特异性的任何手段,包括在说明书中描述的和本技术领域中公知的各种方法。例如,IL-3R α 抗体与IL-3R α 的结合可以通过流式细胞术测定法来测定或测量。

[0187] (抗体的生产)

[0188] 本发明还提供了用于制备具有对IL-3R α 阳性细胞有毒性的人类IL-3R α 抗体的方法。在实施方案中,方法包含向能够表达人类免疫球蛋白的动物(例如转基因小鼠

或转基因牛)给药与导入到细胞中的人类 IL-3R α 重组蛋白或 IL-3R α 基因偶联的人类 IL-3R α 细胞外区域;筛选动物中人类 IL-3R α 抗体的表达;选择产生人类 IL-3R α 抗体的动物;以及从所选动物分离抗体。

[0189] 适合用于抗体生产的 IL-3R α 蛋白可以通过各种标准的蛋白纯化和重组表达技术中的任一种来生产。例如, IL-3R α 序列可以通过标准的肽合成技术例如固相合成来制备。为了便于表达或合成的蛋白的纯化,蛋白的一部分可以包含氨基酸序列例如 FLAG 标签、T7 标签、聚组氨酸序列等。蛋白表达在细胞内,并可以被纯化。蛋白可以通过重组方法表达成另一个大的蛋白(例如融合或嵌合产物)的一部分。适合用于产生免疫应答的 IL-3R α 的实施方案包括 IL-3R α 子序列例如免疫原性片段。IL-3R α 的其他实施方案包括表达 IL-3R α 的细胞、含有 IL-3R α 的制备物或细胞提取液或分级,以及部分纯化的 IL-3R α 。

[0190] 用于制备多克隆抗体和单克隆抗体的方法在本技术领域中是公知的。例如,将 IL-3R α 或其免疫原性片段通过任选与载体例如匙孔血蓝蛋白(KLH)或卵清蛋白(例如 BSA)偶联,或与佐剂例如弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂混合,用于免疫动物。通过分离源自于对 IL-3R α 有反应的被免疫动物的脾细胞,可以使用杂交瘤技术将其与骨髓瘤细胞融合。通过与 IL-3R α 或其免疫原性片段的反应性,可以筛选由杂交瘤产生的单克隆抗体。

[0191] 可以被免疫的动物包括灵长类、小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、牛和豚鼠。最初和任选的任何后续免疫可以通过静脉内途径、腹膜内途径、肌肉内途径或皮下途径。此外,为了增加免疫应答,可以将抗原与其他蛋白例如匙孔血蓝蛋白(KLH)、甲状腺球蛋白和破伤风类毒素偶联,或者可以与佐剂例如弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂等混合。最初和任选的任何后续免疫可以通过腹膜内途径、肌肉内途径、眼内途径和皮下途径。免疫可以使用相同浓度或不同浓度的 IL-3R α 制备物,或以规则或不规则的时间间隔进行。

[0192] 动物包括经过遗传修饰以包含人类基因座的动物,并且可以使用其制备人类抗体。具有一个或多个类免疫球蛋白基因的转基因动物的实例,描述在例如美国专利 No. 5,939,598、W002/43478 和 W002/092812 中。使用常规的杂交瘤技术,从对抗原具有高响应性的被免疫小鼠分离脾细胞,并将其与骨髓瘤细胞融合。由此可以获得与 IL-3R α 结合的单克隆抗体。

[0193] 用于生产人类多克隆抗体和人类单克隆抗体的方法被进一步描述(参见例如 Kuroiwa 等, Nat. Biotechnol. 20 :889(2002); W098/24893; W092/01047; W096/34096; W096/33735; 美国专利 No. 5,413,923; 美国专利 No. 5,625,126; 美国专利 No. 5,633,425; 美国专利 No. 5,569,825; 美国专利 No. 5,661,016; 美国专利 No. 5,545,806; 美国专利 No. 5,814,318; 美国专利 No. 5,885,793; 美国专利 No. 5,916,771 和美国专利 No. 5,939,598)。

[0194] 术语“人类”当用于指称抗体时,是指抗体的氨基酸序列完全是人类氨基酸序列,即是人类重链和人类轻链可变区和人类恒定区。因此,所有氨基酸都是人类的氨基酸或存在于人类抗体中。非人类抗体的抗体可以通过用人类抗体中存在的氨基酸残基取代非人类氨基酸残基,制造成完全人类抗体。人类抗体中存在的氨基酸残基、CDR 区图谱和人类抗体共有残基在本技术领域中是众所周知的(参见例如 Kabat, 免疫重要的蛋白的序列(第四版)(Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th edition), 美国卫生与人类服务部公共卫生服务局(US Department of Health and Human Services, Public Health

Service(1987) ;Chothia 和 Lesk(1987))。根据使用 22 个已知人类 VHII 序列作为对象所进行的调查获得的人类 VH 第 III 亚组的共有序列, 以及根据使用 30 个已知人类 κ 链 I 序列作为对象所进行的调查获得的人类 VL κ 链第 I 亚组的共有序列, 描述在 Padlan, Mol. Immunol, 31 :169 (1994) 和 Padlan, Mol. Immunol, 28 :489 (1991) 中。因此, 人类抗体包括其中一个或多个氨基酸残基已被在任选的其他人类抗体中存在的一个或多个氨基酸取代的抗体。

[0195] 抗 IL-3R α 抗体的实例包括使用本技术领域中的已知方法制备的抗体, 所述方法例如 CDR 嫁接 (EP 239, 400 ;W091/09967 ; 美国专利 No. 5, 225, 539 ; 美国专利 No. 5, 530, 101 ; 和美国专利 No. 5, 585, 089) 、表面修饰、表面重塑 (EP592, 106 ;EP519, 596 ; Padlan, Molecular Immunol. 28 :489 (1991) ; Studnicka 等, Protein Engineering 7 : 805 (1994) ; Roguska 等, Proc. Natl Acad. Sci. USA 91 :969 (1994)) 和链改组 (美国专利 No. 5, 565, 332)。为了产生人源化抗体, 人类共有序列 (Padlan, Mol. Immunol 31 : 169 (1994) ; 和 Padlan, Mol. Immunol. 28 :489 (1991)) 已被使用 (Carter 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :4285 (1992) ; 和 Presta 等, J. Immunol 151 :2623 (1993))。

[0196] 术语“人源化”当用于指称抗体时, 是指抗体的氨基酸序列在受体的人类免疫球蛋白分子中具有与目标抗原特异性结合的互补决定区 (CDR) 的一个或多个非人类氨基酸残基 (例如小鼠、大鼠、山羊、兔等), 以及 Fv 构架区 (FR) 中的一个或多个类氨基酸残基 (位于 CDR 两侧的氨基酸残基)。被称为“灵长类化”的抗体在“人源化”的意义范围之内, 只是受体人类免疫球蛋白分子和构架区的氨基酸残基, 除了任何人类残基之外, 可以是任何灵长类的氨基酸残基 (例如猴、长臂猿、大猩猩、黑猩猩、猩猩、恒河猴)。免疫球蛋白的人类 FR 残基可以用相应的非人类残基取代。因此, 例如, 为了改变、通常是提高抗原亲和性或特异性, CDR 或人类构架区中的残基可以替换成相应的来自非人类 CDR 或构架区供体抗体的残基。人源化抗体可以包含不能在人类抗体和供体 CDR 或构架序列中发现的残基。例如, 可以预计, 在特定位置处不能在人类抗体和供体非人类抗体中发现的 FR 取代, 可以提高人类抗体在该位点处的结合亲和性或特异性。基于分子模拟的抗体构架和 CDR 取代在本技术领域中是公知的, 例如通过模拟 CDR 和构架残基的相互作用来鉴定对于抗原结合来说重要的构架残基, 以及通过序列比较来鉴定特定位置处的不常见构架残基 (参见例如美国专利 No. 5, 585, 089 ; 和 Riechmann 等, Nature, 332 :323 (1988))。

[0197] 在 IL-3R α 抗体中包括嵌合抗体。根据本说明书, 术语“嵌合”及其语法变化形式当用于指称抗体时, 是指抗体的氨基酸序列包含一个或多个部分, 其源自于两种或多种不同物种, 从两种或多种不同物种获得或分离, 或基于两种或多种不同物种。例如, 抗体的一部分可以是人类的 (例如恒定区), 并且抗体的其他部分可以是非人类的 (例如小鼠重链或小鼠轻链可变区)。因此, 嵌合抗体的实例包括其中抗体的不同部分源自于不同物种的抗体。与人源化或灵长类化抗体不同, 嵌合抗体可以在抗体的任意区域中具有不同物种的序列。

[0198] 用于生产嵌合抗体的方法在本技术领域中是已知的 (例如 Morrison, Science 229 :1202 (1985) ; Oi 等, BioTechniques 4 :214 (1986) ; Gillies 等, J. Immunol. Methods 125 :191 (1989) ; 美国专利 No. 5, 807, 715 ; 美国专利 No. 4, 816, 567 ; 和美国专利 No. 4, 816, 397)。例如, 在 Munro, Nature 312 :597 (1984) ; Neuberger 等, Nature 312 :

604(1984) ;Sharon 等, Nature 309 :364(1984) ;Morrison 等, Proc. Natl' Acad. Sci. USA 81 :6851(1984) ;Boulian 等, Nature 312 :643(1984) ;Capon 等, Nature 337 :525(1989) ; 和 Traunecker 等, Nature 339 :68(1989) 中, 嵌合抗体中源自于一个物种的抗体可变区被源自于另一个物种的抗体可变区代替。

[0199] 此外, 抗 IL-3R α 抗体可以通过杂交瘤技术、重组技术和噬菌体展示技术及其组合来制备(参见美国专利 No. 4,902,614、美国专利 No. 4,543,439 和美国专利 No. 4,411,993; 也参见《单克隆抗体, 杂交瘤: 新维度生物分析》(Monoclonal Antibodies. Hybridomas :A New Dimensionin Biological Analyses), Plenum Press, Kennett, McKearn 和 Bechtol 等, 1980, 以及 Harlow 等,《抗体实验指南》(Antibodies :A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第二版, 1988)。

[0200] 本发明的人类抗人类 IL-3R α 抗体使用染色体转移小鼠(KM 小鼠(注册商标))产生, 所述小鼠用各种形式的可溶型重组人类 IL-3R α 蛋白或表达 IL-3R α 的细胞系来免疫(WO02/43478, WO02/092812 和 Ishida 等,《IBC 第 11 次抗体工程会议摘要》(IBC's 11th Antibody EngineeringMeeting, Abstract(2000)))。因为人类抗人类 IL-3R α 抗体可检测染色的不是未转化的亲代细胞系, 而是人类 IL-3R α 稳定转染的细胞系例如 Jurkat-IL-3R α 细胞和 L929-IL-3R α 细胞, 因此特异性显示与人类 IL-3R α 结合的抗体。

[0201] 本发明的抗体可以具有 κ 轻链序列或 λ 轻链序列、如天然存在的抗体中所存在的它们任一种的全长、其混合物(即 κ 链序列与 λ 链序列的融合产物)及其子序列 / 片段。天然存在的抗体分子含有两个 κ 轻链或两个 λ 轻链。

[0202] 本发明提供了用于制备与 IL-3R α 特异性结合的抗体的方法。在特定实施方案中, 制备 IL-3R α 抗体的方法包含将人类 IL-3R α 、其子序列或其片段(例如 IL-3R α 细胞外区域), 如果需要与人类 Fc 重组蛋白偶联, 给药于能够表达人类免疫球蛋白的动物(例如转基因小鼠或转基因牛), 筛选表达人类 IL-3R α 抗体的动物, 选择产生人类 IL-3R α 抗体的动物, 以及从所选动物分离抗体。在实施方案中, 人类 IL-3R α 抗体是否具有 IL-3R α 拮抗或激动活性通过该方法判断。

[0203] 效应细胞活性是指通过抗体的 Fc 区的抗体依赖性活性, 已知的例如抗体依赖性细胞毒性(ADCC 活性)、补体依赖性细胞毒性(CDC 活性)、由吞噬细胞例如巨噬细胞和树突状细胞进行的抗体依赖性细胞吞噬作用(ADP 活性)等。

[0204] 作为控制本发明的抗 IL-3R α 单克隆抗体的效应细胞活性的方法, 实例包括控制与抗体 Fc 区的 297 位天冬氨酸(Asn)结合的复合物类型的 N- 连接糖链的还原端中, 通过 α -1,6 键与 N- 乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)结合的岩藻糖(也称为核心岩藻糖)的量的方法(WO2005/035586、WO2002/31140 和 WO00/61739), 通过修饰抗体 Fc 区的氨基酸残基进行控制的方法等。效应细胞活性可以通过向本发明的抗 IL-3R α 单克隆抗体使用这些方法中的任一种来控制。

[0205] 通过控制抗体 Fc 的复合物类型的核心岩藻糖含量, 可以增加或降低抗体的效应细胞活性。作为降低与结合抗体 Fc 的复合物类型的 N- 连接糖链结合的岩藻糖含量的方法, 可以提到的是脱岩藻糖化作用(脱岩藻糖化或非岩藻糖化)。脱岩藻糖化作用是使用 α -1,6- 岩藻糖基转移酶基因被缺失的 CHO 细胞来表达抗体, 并可以获得不与岩藻糖结合的抗体。不与岩藻糖结合的抗体具有高的 ADCC 活性。另一方面, 作为增加与结合

抗体Fc的复合物类型的N-连接糖链结合的岩藻糖含量的方法,可以通过使用导入了 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因的宿主细胞表达抗体来获得与岩藻糖结合的抗体。与岩藻糖结合的抗体与不与岩藻糖结合的抗体相比,具有较低的ADCC活性。

[0206] 此外,可以通过修饰抗体Fc区的氨基酸残基来增加或降低ADCC活性和CDC活性。例如,可以使用在US2007/0148165中描述的Fc区的氨基酸序列来增加抗体的CDC活性。此外,可以通过执行在US6,737,056、US7,297,775和US7,317,091中描述的氨基酸修饰来增加或降低ADCC活性或CDC活性。此外,可以通过在一个抗体中使用组合的上述方法,来获得其中抗体的效应细胞活性被控制的抗体。

[0207] 根据本发明,进一步提供了本发明的例如载体等的核苷酸序列。在实施方案中,载体包含编码IL-3R α 抗体或其子序列或片段的核酸序列。

[0208] 核酸可以具有各种不同长度。编码本发明的IL-3R α 抗体或其子序列的核酸的长度一般约为100至600个核苷酸,或涵盖在上述长度范围内的任何数值或范围;100至150、150至200、200至250、250至300、300至350、350至400、400至450、450至500、500至550或550至600个核苷酸长,或在上述长度范围内或涵盖上述长度范围的任何数值或范围。编码本发明的IL-3R α 抗体或其子序列的核酸长度的实例一般包括10至20、20至30、30至50、50至100、100至150、150至200、200至250、250至300、300至400、400至500、500至600个核苷酸,以及在这些长度内或涵盖这些长度的任何数值或范围。

[0209] 术语“核酸”和“多核苷酸”是指通过磷酸酯键或等效的键相连的至少两个或多个核糖或脱氧核糖核酸碱基对(核苷酸)。核酸包括多核苷酸和多核苷。核酸包括单分子、双分子、三分子、环状分子或线性分子。核酸的实例包括RNA、DNA、cDNA、基因组核酸、天然存在的核酸和非天然核酸例如合成的核酸,但不限于此。短的核酸和多核苷酸(例如10至20、20至30、30至50、50至100个核苷酸)通常被称为单链或双链DNA的“寡核苷酸”或“探针”。

[0210] 核酸可以使用各种标准克隆技术和化学合成技术来制备。技术的实例包括但不限于核酸扩增例如聚合酶链反应(PCR),其使用基因组DNA或cDNA靶,并使用可以与抗体编码序列退火的引物(例如简并引物混合物)。此外,核酸也可以通过化学合成(例如固相氨基磷酸酯合成)或从基因转录来制备。然后,在将制备的序列克隆到质粒中然后扩增,或体外翻译所述序列后,制备的序列可以被细胞(例如宿主细胞例如酵母、细菌或真核细胞(动物或哺乳动物细胞或在植物中))表达。

[0211] 载体是可以通过插入或掺入核酸进行操作的媒介。载体的实例包括质粒载体、病毒载体、原核细胞(细菌)载体和真核细胞(植物、真菌、哺乳动物)载体。载体可用于核酸的体外或体内表达。这样的载体被称为“表达载体”,可用于转移包括编码IL-3R α 抗体或其子序列或片段的核酸的核酸,以及通过体外(例如在溶液中或在固相上)、通过细胞或通过在对象体内来表达被编码的蛋白。

[0212] 此外,载体可用于核酸的操作。对于遗传操作来说,可以使用“克隆载体”在体外(例如在溶液中或在固相上)、在细胞中或在对象体内对插入的核酸进行转录和翻译。

[0213] 一般来说,载体含有复制原点,用于在细胞中在体外或体内扩增。如果需要,可以包括控制元件例如载体中存在的表达控制元件,以便于转录和翻译。

[0214] 载体可以包括选择标志物。“选择标志物”是允许对含有基因的细胞进行选择的基

因。“正选择”是指通过正向选择来选择含有选择标志物的细胞的方法。药物抗性是正选择标志物的实例，含有标志物的细胞将在含有药物的培养基中存活，而不含标志物的细胞将死亡。选择标志物的实例包括药物抗性基因，例如提供对 G418 的抗药性的 neo、提供对潮霉素的抗药性的 hygr、提供对嘌呤霉素的抗药性的 puro 等。其他正选择标志物包括能够鉴定或筛选含有标志物的细胞的基因。这些基因的实例包括荧光蛋白 (GFP 和 GFP 样发色团、萤光素酶) 基因、lacZ 基因、碱性磷酸酶基因和表面标志物例如 CD8。“负选择”是指通过暴露于适合的负向选择药剂杀死含有负选择标志物的细胞的方法。例如，含有单纯性疱疹病毒胸苷激酶 (HSV-tk) 基因的细胞 (Wigler 等, Cell, 11 :223 (1977)) 对药物更昔洛韦 (GANC) 敏感。类似地，gpt 基因使细胞对 6- 硫代黄嘌呤敏感。

[0215] 病毒载体包括基于下列病毒的载体：反转录病毒（不仅感染分裂中的细胞而且感染未分裂细胞的慢病毒），泡沫病毒（美国专利 No. 5,624,820、美国专利 No. 5,693,508、美国专利 No. 5,665,577、美国专利 No. 6,013,516 和美国专利 No. 5,674,703 ;W092/05266 和 W092/14829），腺病毒（美国专利 No. 5,700,470、美国专利 No. 5,731,172 和美国专利 No. 5,928,944），腺相关病毒 (AAV)（美国专利 No. 5,604,090），单纯性疱疹病毒载体（美国专利 No. 5,501,979），细胞肥大病毒 (CMV) 系统载体（美国专利 No. 5,561,063），呼肠孤病毒，轮状病毒基因组，猿猴病毒 40 (SV40) 或乳头瘤病毒 (Cone 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 :6349 (1984) ;《真核病毒载体》(Eukaryotic Viral Vectors), Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman 主编, 1982 ;Sarver 等, Mol. Cell. Biol, 1 :486 (1981) ;美国专利 No. 5,719,054）。腺病毒有效侵染缓慢复制的和 / 或终端分化细胞，并可用于靶向缓慢复制的细胞和 / 或终端分化细胞。可用于表达的病毒载体的其他实例包括细小病毒、诺沃克病毒、冠状病毒、副粘液病毒和杆状病毒、披膜病毒（例如辛德毕斯病毒和 Semliki 森林病毒）以及疱疹性口腔炎病毒 (VSV)。

[0216] 包含核苷酸的载体，当核酸与表达元件相连以发挥作用时，可以被表达。术语“相连以发挥作用”（可操作连接）是指所指称的元件之间的物理或功能关系允许它们以所打算的方式运作。因此，核酸与表达控制元件可操作连接是指控制元件调节核酸转录并在适合情况下调节转录产物的翻译。

[0217] “表达控制元件”或“表达控制序列”是影响可操作连接的核酸的表达的多核苷酸。启动子和增强子是表达控制元件和序列的非限制性的具体实例。“启动子”是顺式作用的 DNA 调控区，其能够起始下游 (3' 方向) 核酸序列的转录。加速转录起始的核苷酸包含在启动子序列中。增强子也调控核酸的表达，但是在远离与其可操作连接的核酸的转录起始位点处起作用。当增强子存在于核酸的 5' 或 3' 末端以及核酸内部（例如内含子或编码序列）时，增强子也起作用。表达控制元件的其他实例包括前导序列和融合配偶体序列、用于制备多基因或多顺反子信使的内部核糖体进入位点 (IRES) 元件、用于维持基因的正确阅读框以使 mRNA 能够框内翻译的内含子拼接信号、为目标转录产物产生正确的多腺苷化的多腺苷化信号和终止密码子。

[0218] 表达控制元件的实例包括“组成型”元件，其中可操作连接的核酸的转录不需要信号或刺激物的存在即可发生。对信号或刺激物做出响应而产生表达和增加或降低可操作连接的核酸的表达的表达控制元件是“可调节的”。对信号或刺激物做出响应而增加可操作连接的核酸的表达的可调节元件，被称为“诱导型元件”。对信号或刺激物做出响应而降低可

操作连接的核酸的表达的可调节元件,被称为“阻遏型元件”(即信号降低表达;并且当信号被移除或不存在时表达增加)。

[0219] 用于细菌表达的组成型启动子的实例包括例如 λ 噬菌体的T7和pL、plac、ptrp和ptac(ptrp-lac杂合启动子)等启动子。对于昆虫细胞系统来说,可以使用组成型或诱导型启动子(例如蜕皮激素启动子)。用于酵母的组成型启动子包括诱导的启动子例如ADH、LEU2、GAL等(例如参见Ausubel等,《分子生物学现代方法》(Current Protocols in Molecular Biology),Vol. 2,第13章,Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience edition,1988;Grant等,《酶学方法》(Methods in Enzymology),153:516-544(1987)Wu&Grossman,1987,Acad. Press, N. Y.;Glover,《DNA克隆》(DNA Cloning),Vol. 11,第3章,IRLPress, Wash., D. C., 1986;Bitter,《酶学方法》(Methods in Enzymology),152:673-684(1987),Berger&Kimmel主编,Acad. Press, N. Y.;以及Strathern等,《酵母菌的分子生物学》(The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces),Cold Spring Harbor Press, Vol. 1 和 Vol. 11(1982))。

[0220] 对于在哺乳动物中表达来说,可以使用源自于病毒或其他来源的组成型启动子。例如,可以使用源自于CMV、SV40或病毒长末端重复序列(LTR),或哺乳动物细胞基因组(例如金属硫蛋白IIA启动子、热休克蛋白启动子、甾体/甲状腺激素/视黄酸响应元件)或哺乳动物病毒(例如腺病毒晚期启动子、小鼠乳腺癌病毒LTR)的诱导型启动子。

[0221] 表达控制元件的实例包括在特定组织或细胞类型中有活性的元件,这样的元件被称为“组织特异性表达控制元件”。一般来说,组织特异性表达控制元件在特定细胞或组织类型中与其他细胞或组织类型相比更有活性,这是因为该组织特异性表达控制元件,被在特定细胞或组织类型中有活性的转录激活蛋白或其他转录因子所识别。这样的表达控制元件的非限制性的具体实例是己糖激酶II、COX-2、 α -胎蛋白、癌胚抗原、DE3/MUC1、前列腺特异抗原、C-erbB2/neu、葡萄糖依赖性胰岛素分泌刺激性多肽(GIP)、端粒酶反转录酶和启动子例如缺氧响应性启动子。

[0222] 根据本发明,提供了用本发明的IL-3R α 核酸或载体转化或转染的宿主细胞。宿主细胞的实例包括但不限于原核细胞和真核细胞,例如细菌、真菌(酵母)和植物、昆虫和动物(例如哺乳动物例如灵长类、人类等)的细胞。被转化的细胞的非限制性实例包括用重组噬菌体核酸、质粒核酸或粘粒核酸表达载体转化的细菌;用重组酵母表达载体转化的酵母;用重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒CaMV、烟草花叶病毒TMV)感染或用重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转化的植物细胞;用重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞;以及用重组病毒表达载体(例如反转录病毒、腺病毒、痘苗病毒)感染的动物细胞或被操作用于稳定表达的转化的动物细胞。CHO细胞是表达IL-3R α 抗体及其子序列和片段的哺乳动物宿主细胞的非限制性实例。宿主细胞可以是来自于原初细胞分离系的多个细胞或细胞群体、分离的次级细胞或传代培养细胞或建立的细胞系或永生化细胞培养物。

[0223] 术语“被转化”或“被转染”当用于指称细胞(例如宿主细胞)或生物体时,是指在将外源分子例如蛋白或核酸(转入基因)引入到细胞中后,细胞中基因的改变。因此,“被转染”或“被转化”的细胞是其中通过人工通过例如重组DNA技术引入了外源分子的细胞或其后代。

[0224] 核酸或蛋白可以被稳定或暂时转染或转化（表达）在细胞或其后代中。导入的蛋白可以通过生长细胞或转录核酸来表达。因为在复制期间有可能发生突变，因此存在着被转染或转化的细胞的后代与亲代细胞不同一的情况。

[0225] 一般来说，在细胞转染或转化中使用载体。载体可以包含在病毒粒子或囊泡中，并可以任选地通过将蛋白包含在与靶细胞配体或受体结合的粒子或囊泡的表面上，根据需要定向到特定细胞类型。因此，通过制备用于体外、离体或体内转染或转化目的病毒粒子或囊泡本身或病毒表面蛋白，可以将细胞用作靶。因此，载体包括将病毒和非病毒载体体外、体内和离体递送到细胞、组织或器官中的技术。

[0226] 此外，将核酸引入靶细胞（例如宿主细胞），也可以通过本技术领域公知的方法来进行，例如渗透冲击（例如磷酸钙）、电穿孔、微注射、细胞融合等。核酸和多肽的体外、离体和体内导入也可以使用其他技术来进行。例如聚合物质例如聚酯、聚酰胺酸、水凝胶、聚乙烯吡咯烷酮、乙烯-乙酸乙烯酯共聚物、甲基纤维素、羧甲基纤维素、硫酸鱼精蛋白或乳酸交酯/乙醇酸交酯共聚物、聚乳酸交酯/乙醇酸交酯共聚物或乙烯-乙酸乙烯酯共聚物等。核酸可以通过凝聚技术或通过界面聚合，分别包封在羟甲基纤维素或明胶微胶囊或使用聚甲基丙烯酸甲酯制备的微胶囊或胶体系统中。胶体分散系统包括基于聚合物复合物、纳米粒子、微球、珠子或脂类（水包油类型的乳液、微胶粒、混合的微胶粒、脂质体等）的系统。

[0227] 用于将各种组合物导入细胞的脂质体在本技术领域中是公知的，其中包括例如磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、lipofectin 和 DOTAP（例如美国专利 No. 4,844,904、美国专利 No. 5,000,959、美国专利 No. 4,863,740 和美国专利 No. 4,975,282，以及 GIBCO-BRL, Gaithersburg, Md.）。可用于基因治疗的基于哌嗪的两亲性阳离子脂类（参见例如美国专利 No. 5,861,397）也是已知的。阳离子脂类系统也是已知的（参见例如美国专利 No. 5,459,127）。在本说明书中，聚合物质、微胶囊和胶体分散系统（脂质体等）合称为“囊泡”。

[0228] 此外，可使用在生产抗体的方法中的适合技术的实例是亲和纯化、非改性凝胶纯化、HPLC 或 RP-HPLC、孔径排阻、通过蛋白 A 柱纯化以及这些技术的任选组合。可以使用 ELISA 测定法确定 IL-3R α 抗体同种型，并且例如可以使用吸附抗人类 Ig 的小鼠 Ig 来鉴定人类 Ig。

[0229] 结合亲和性可以通过结合 (Ka) 和解离 (Kd) 速率来确定。平衡亲和常数 KD 是 Ka/Kd 的比率。结合 (Ka) 和解离 (Kd) 速率可以使用表面等离子共振 (SPR) 来测量 (Rich 和 Myszka, Curr. Opin. Biotechnol., 11 :54 (2000); Englebienne, Analyst., 123 :1599 (1998))。用于实时检测和监测结合速率的仪器和方法是公知的并可商购 (Biacore2000, Biacore AB, Upsala, Sweden; 以及 Malmqvist, Biochem. Soc. Trans., 27 :335 (1999))。KD 值可以被定义为饱和 IL-3R α 上的一半结合位点 (50%) 所需的 IL-3R α 抗体浓度。

[0230] （在灵长类中的交叉性质）

[0231] 目前，尽管在世界上正开发多达 500 种治疗性抗体，也就是说人类抗体有很大可能能够避免免疫原性问题。但另一方面，在许多情况下人类抗体的药效完全不能在啮齿动物中表现出来。在这样的情况下，在许多情况下在毒性测试中不得不使用灵长动物，此外，只在黑猩猩中发现反应性，这在许多情况下并不罕见。当只能在黑猩猩中发现药理反

应时,毒性测试受到更显著的限制。首先,能够进行黑猩猩试验的场所相当有限,在许多情况下个体感染 HIV,并且还存在参与实验的工人的劳动卫生的问题。此外,对于黑猩猩来说,还存在着最终给药后的解剖试验不能进行以及生殖毒性试验也不可能进行等大量限制。因此,从对于开发药物来说必需的高级毒性试验的观点来看,在猴(食蟹猴(*Macaca fascicularis*) 和 / 或恒河猴(*Macaca mulatto*)) 中验证药效的能力是有用的。

[0232] 关于使用猴用来证实猴交叉反应性的方法,它可以通过公知的方法例如免疫化学组织染色方法、固相酶免疫测定法(在后文中称为“ELISA”)流式细胞术(FCM)等来证实。

[0233] (药物组合物)

[0234] 抗体可以包含在药物组合物中。在实施方案中,抗体包含可药用载体、稳定剂或填充剂,并被制备成水溶液或作为冷冻干燥制剂的形式。典型情况下,使用适量可药用盐使药物制剂等渗。可接受的载体、稳定剂或填充剂的实例包括缓冲溶液例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸等;低分子量(残基数量少于 10)多肽;蛋白例如血清白蛋白、明胶、免疫球蛋白等;亲水性聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、赖氨酸等;单糖二糖和其他糖类,例如葡萄糖、甘露糖、糊精等;螯合剂例如 EDTA 等;甜味剂例如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖、山梨糖醇等;成盐平衡离子例如钠等;金属络合物(例如 Zn-蛋白络合物);防腐剂(十八烷基二甲基苄基氯化铵、氯化六烃季铵、苯扎氯铵、苄索氯铵、苯酚、丁醇或苯甲醇、对羟苯甲酸烷基酯例如对羟苯甲酸甲酯或丙酯、儿茶酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇和间甲酚);和 / 或非离子表面活性剂例如 TWEENTM、PLURONICSTM、聚乙二醇(PEG)等。

[0235] (靶向 IL-3R α 表达细胞的抗肿瘤物质的治疗应用)

[0236] 对治疗应用进行检验的疾病的实例,包括但不限于被认为可以通过结合或靶向表达 IL-3R α 的细胞来治疗的疾病,所述细胞例如血液肿瘤细胞(AML 细胞、CML 细胞、MDS 细胞、ALL 细胞、CLL 细胞、多发性骨髓瘤细胞等)、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、辅助性 T 细胞(例如 Th1 细胞、Th17 细胞)、调节性 T 细胞(例如 CD4 阳性 CD25 阳性细胞)、抗原呈递细胞(例如树突状细胞、单核细胞-巨噬细胞和相关细胞(肝星状细胞、破骨细胞、小神经胶质细胞、表皮内巨噬细胞、尘细胞(肺泡吞噬细胞)等))。

[0237] 对治疗应用进行检验的疾病的实例,包括其中在骨髓或外周血中发现 IL-3R α 表达的血液疾病。具体实例可以包括急性骨髓性白血病(AML)。根据能够确定从造血干细胞分化成各种血细胞的过程中细胞中的那个细胞阶段引起致瘤性转化的 FAB 分类标准(法国-美国-英国标准),急性骨髓性白血病被分类成 M0(微分化类型的成髓细胞性白血病)、M1(未分化的成髓细胞性白血病)、M2(已分化的成髓细胞性白血病)、M3(急性早幼粒细胞性白血病)、M4(髓单核细胞性白血病)、M5(单核细胞性白血病)、M6(红白血病)、M7(巨核细胞性白血病)疾病类型及其亚型。此外,疾病的其他实例包括急性淋巴细胞性白血病、非典型白血病、慢性淋巴细胞性白血病、成人 T 细胞白血病、NK/T 细胞淋巴瘤、颗粒状淋巴细胞增生(LGL 白血病)、真性红细胞增多症、特发性血小板增多症、高嗜酸性粒细胞综合征、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、MALT 淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、弥漫性大 B- 细胞淋巴瘤、Burkitt 淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤和巨大淋巴结增生症。

[0238] 本发明的包含给药或递送靶向表达 IL-3R α 的细胞的 IL-3R α 抗体和抗肿瘤物质的方法,可以通过任何可接受的方法来进行。在具体实施方案中,它们被局部、区域性或系

统性给药于对象。

[0239] 此外,对于 IL-3R α 抗体来说,靶向表达 IL-3R α 的细胞的用于治疗上面提到的疾病的抗肿瘤物质,也可以考虑与适合于同样疾病的其他治疗药剂(典型为化疗药剂)组合,或与放疗组合给药。适合的其他治疗药剂的实例包括化疗药剂例如阿糖胞苷(Ara-C)、蒽环系统抗肿瘤药剂(典型为柔红霉素(DNR)、伊达比星(IDA))等、分化诱导治疗药剂例如全反式视黄酸(ATRA)、亚砷酸、Am80(他米巴罗汀)、吉妥珠单抗-奥唑米星(奥唑米星-抗CD33抗体偶联物)、托泊替康、氟达拉滨、环孢霉素、米托蒽醌(MIT)、干扰素和伊马替尼,但不限于此,并且还包括与被认为在临幊上有效的治疗方法的组合。

[0240] 哺乳动物(例如人类)被包括在可以通过本发明治疗的对象中。在具体实施方案中,对象是血液肿瘤候选者或接受血液肿瘤治疗的对象,有可能引起 IL-3R α 介导的细胞应答的对象或接受 IL-3R α 介导的细胞应答的治疗的对象,作为髓细胞性恶性肿瘤候选者的对象或接受髓细胞性恶性肿瘤治疗的对象,或作为急性骨髓性白血病候选者的对象或接受急性骨髓性白血病治疗的对象。

[0241] 更具本说明书,术语“治疗”及其语法变化形式是指对每个希望获得生理效应或在患者上获得良好结果的对象执行的方案、计划、过程或改善方法。因此,本发明的方法包括特别是对给定对象的障碍、疾病、病理、疾病状况或症状产生可测量的改进或有益效果的治疗和治疗方法。可测量的改进或有益效果是障碍、疾病、病理、疾病状况或症状中的任一种的客观或主观的、不适中的、暂时或长期的改进,或与障碍、疾病、生理条件、病理或状态相关或由其引起的不利症状的发作、严重性、持续时间或频率的减少。根据本发明的方法,有可能其效果不总是立即显现,而是随着时间的过去,在较晚些时候发现最终的改进或有益效果,由此在给定对象中将出现稳定或改善。

[0242] 除非另有指明,否则在本说明书中使用的所有技术术语和科学术语,具有与本发明所涉及的技术领域中的专业人员所通常理解的相同的意义。与本说明书中所描述的类似或等效的方法和材料可用于本发明的操作或检验中,但是在本说明书中所描述的是适合的方法和材料。

实施例

[0243] 实施例 1 人类、食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) 或恒河猴 (*Macaca mulatto*) IL-3R α 表达细胞的制备

[0244] (IL-3R α cDNA 的分子克隆和表达载体的制备)

[0245] 使用 ExTaq(TAKARA BIO INC.), 通过 PCR 从血细胞来源的 DNA(CLONTECH Human MTC Panel) 扩增了人类 IL-3R α cDNA。作为 PCR 装置,使用了 GeneAmp PCR 系统 9700(Applied Biosystems, 在后文中,在本说明书中 PCR 装置是相同的)。对于 PCR 来说,在 94°C 5 分钟的变性步骤后,将 94°C 30 秒 -55°C 30 秒 -72°C 2 分钟的三步反应执行 40 个循环,然后执行 99°C 30 秒的反应。使用的 PCR 引物如下:

[0246] IL-3R α _Fw : 5' -CGGCAATTGCCACCATGGTCCTCCTTGCTCAC-3' (SEQ ID NO:3)

[0247] IL-3R α _Re : 5' -ATTGCGGCCGCTCAAGTTCTGCACGACCT-3' (SEQ ID NO:4)

[0248] 对由此获得的 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳(135V, 15 分钟, TAE 缓冲液)。DNA 通过溴乙锭染色进行可视化。切下约 1.2kb 的条带,并用 JetSob(Genomed) 提取。将提

取到的 DNA 用 MfeI 和 NotI 消化,与用 EcoRI 和 NotI 消化过的 pEGFP-N1 载体 (Clontech) 或 pEF6/Myc-His 载体混合,并使用 TaKaRa 连接试剂盒进行连接。对于转化来说,将连接样品与 DH10B 感受态细胞混合,铺于 LB 平板 (含卡那霉素) 上。使用 LA Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.),通过直接菌落 PCR 进行 pEGFP-N1 载体的插入检查。对于 PCR 来说,在 94°C 5 分钟的变性步骤后,将 94°C 30 秒 -55°C 30 秒 -72°C 2 分钟的三步反应执行 40 个循环,然后执行 99°C 30 秒的反应。关于所用的引物,使用了 IL-3R α -Fw 和 IL-3R α -Re。

[0249] 对由此获得的 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (135V, 15 分钟, TAE 缓冲液)。DNA 通过溴乙锭染色进行可视化。使用可以从中获得约 1.2kb 扩增产物的菌落,通过直接测序方法测定核苷酸序列。在测序样品的反应中,使用了 BigDye (R) Terminator v3.1 循环测序试剂盒 (Applied Biosystems) 和 GeneAmp PCR 系统 9700 (Applied Biosystems) (它们用于本说明书中所有的 DNA 序列分析中)。关于引物,使用了 IL-3R α -Fw、IL-3R α -Re 和下列引物。

[0250] IL-3R α _seqF1 :5' -GTCTTCACTACAAAACGGAT-3' (SEQ ID NO :5)

[0251] 使用 ABI 3700XL DNA 分析仪 (Applied Biosystems) 作为序列分析装置。选择与 GenBank 关联号 NP-002174.1 的编码区具有相同序列的克隆,并通过 Miniprep 方法提取质粒 DNA。载体名分别是 pEGFR-N1/hCD123 和 pEF6/Myc-His/hCD123。

[0252] 插入片段的序列 (MfeI 至 NotI) 如下。

[0253] CAATTGCCACCATGGTCCCTCCTTGGCTACGCTGCTCCTGATGCCCTGCC

[0254] TGTCTCCTGCAAACGAAGGAAGATCCAACCCACCAATCACGAACCTAAGG

[0255] ATGAAAGCAAAGGCTCAGCAGTTGACCTGGGACCTTAACAGAAATGTGACC

[0256] GATATCGAGTGTGTTAAAGACGCCGACTATTCTATGCCGGCAGTGAACAATAG

[0257] CTATTGCCAGTTGGAGCAATTCCCTATGTGAAGTGACCAACTACACCGTCC

[0258] GAGTGGCCAACCCACCATTCTCACGTGGATCCTCTTCCCTGAGAACAGTGG

[0259] GAAGCCTTGGGCAGGTGCGGAGAACATGACCTGCTGGATTATGACGTGGAT

[0260] TTCTTGAGCTGCAGCTGGCGGTAGGCCGGGGCCCCCGCGGACGTCCAG

[0261] TACGACCTGTACTTGAACGTTGCCAACAGGCCTCACAGTACGAGTGTCTTC

[0262] ACTACAAAACGGATGCTCAGGAACACGTATCGGTGTCGTTCGATGACAT

[0263] CTCTCGACTCTCCAGCGGTTCTCAAAGTCCCACATCCTGGTGCAGGGCAGG

[0264] AGCGCAGCCTCGGTATCCCTGCACAGATAAGTTGTCGTCTTCACAGAT

[0265] TGAGATATTAACCTCACCCAACATGACTGCAAAGTGTAAATAAGACACATTCT

[0266] TTATGCACTGGAAAATGAGAACGTCATTCAATCGCAAATTGCGTATGAGCTT

[0267] CAGATACAAAAGAGAACATGCAGCCTGTAATCACAGAACAGGTAGAGACAGA

[0268] ACCTCCTTCCAGCTACTCAATCCTGGAACGTACACAGTACAAATAAGAGCCC

[0269] GGGAAAGAGTGTATGAATTCTTGAGCGCCTGGAGCACCCCCCAGCGCTCGA

[0270] GTGCGACCAGGAGGAGGGCGCAAACACACGTGCGCTGGCGACGTCGCTGCT

[0271] GATCGCGCTGGGACGCTGCTGGCCCTGGTCTGTCTCGTATCTGCAGA

[0272] AGGTATCTGGTATGCAGAGACTCTTCCCCGATCCCTCACATGAAAGACC

[0273] CCATCGGTGACAGCTCCAAAACGACAAGCTGGTGGTCTGGGAGGCAGGGCA

[0274] AAGCCGGCCTGGAGGAGTGTCTGGTACTGAAGTACAGGTGTCGTGCAGAAA

[0275] CTTGAGCGGCCGC (SEQ ID NO :6)

[0276] 通过 PCR 方法, 使用 LA Taq (TAKARA BIO INC), 从食蟹猴骨髓来源的 cDNA 或恒河猴骨髓来源的 cDNA 扩增了食蟹猴和恒河猴 cDNA 样品。使用 GeneAmp PCR 系统 9700 (Applied Biosystems) 作为 PCR 装置。对于 PCR 来说, 在 95 °C 1 分钟的变性步骤后, 将 95 °C 15 秒 -56 °C 15 秒 -72 °C 70 秒的三步反应执行 40 个循环, 然后执行 72 °C 2 分钟的反应。根据 hIL-3R α cDNA 序列, 通过对恒河猴基因组的公共数据库 (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/blast.hgsc>) 进行 BLAST 检索获得了子序列, 用于设计引物。所使用的引物序列如下。

[0277] Rhe123Fw1 :

[0278] CGGCAATTGCCACCATGACCCTCCTTGGCTGACGCTG (SEQ ID NO :7)

[0279] Rhe123Rv1 :TATATTGCGGCCGCTCAAGTTCTCCACCACCTGCAC (SEQ ID NO :8)

[0280] 对由此获得的 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (135V, 15 分钟, TAE 缓冲液)。DNA 通过溴乙锭染色进行可视化。切下约 1.2kb 的条带, 并用凝胶提取试剂盒 (QIAGEN) 提取。将如此提取到的 DNA 与 pGEM-T Easy 载体 (Promega) 混合, 并使用 TaKaRa 连接试剂盒进行连接。对于转化来说, 将连接样品与 DH10B 感受态细胞混合, 铺于 LB 平板 (含卡那霉素) 上。使用 LA Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.), 通过直接菌落 PCR 进行 pGEM-T Easy 载体的插入检查。对于 PCR 来说, 在 95 °C 1 分钟的变性步骤后, 将 95 °C 15 秒 -56 °C 15 秒 -72 °C 1 分钟的三步反应执行 35 个循环, 然后执行 72 °C 2 分钟的反应。使用了下列引物 :

[0281] T7 :TAATACGACTCACTATAGGG (SEQ ID NO :9)

[0282] SP6 :GATTAGGTGACACTATAG (SEQ ID NO :10)

[0283] 对由此获得的 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (135V, 15 分钟, TAE 缓冲液)。DNA 通过溴乙锭染色进行可视化。使用可以从中获得约 1.2kb 扩增产物的菌落, 通过直接测序方法测定核苷酸序列。作为 PCR 引物, 使用了 T7 和 SP6。选择通过 PCR 显示出没有突变的菌落, 并通过 Miniprep 方法提取其质粒 DNA。将由此获得的 DNA 用 MfeI 和 NotI 消化, 与用 EcoRI 和 NotI 消化过的 pEGFP-N1 载体 (Clontech) 混合, 并使用 TaKaRa 连接试剂盒进行连接。对于转化来说, 将连接样品与 DH10B 感受态细胞混合, 铺于 LB 平板 (含卡那霉素) 上。

[0284] 使用 La Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.), 通过直接菌落 PCR 进行 pEGFP-N1 载体的插入检查。对于 PCR 来说, 在 94 °C 5 分钟的变性步骤后, 将 94 °C 30 秒 -55 °C 30 秒 -72 °C 2 分钟的三步反应执行 40 个循环, 然后执行 99 °C 30 秒的反应。关于所用的 PCR 引物, 使用了 Rhe123Fw1 和 Rhe123Rv1。

[0285] 对由此获得的 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (135V, 15 分钟, TAE 缓冲液)。DNA 通过溴乙锭染色进行可视化。使用可以从中获得约 1.2kb 扩增产物的菌落, 通过直接测序方法测定核苷酸序列。在测序样品的反应中, 使用了 BigDye (R) Terminator v3.1 循环测序试剂盒 (Applied Biosystems) 和 GeneAmp PCR 系统 9700 (Applied Biosystems) (它们用于本说明书中所有的 DNA 序列分析中)。关于引物, 使用了 Rhe123Fw1 和 Rhe123Rv1。载体分别命名为 pEGFR-N1/cyCD123 和 pEGFR-N1/rhCD123。

[0286] 食蟹猴 IL-3R α 的插入片段的序列 (MfeI 至 NotI) 如下。

[0287] CAATTGCCACCATGACCCTCCTTGGCTGACGCTGCTCCTGGTCGCCACGCC

[0288] CTGTCTCCTGCAAACGAAGGAGGATCCAAATGCACCAATCAGGAATCTAAGG

[0289] ATGAAAGAAAAGGCTCAGCAGTTGATGTGGGACCTGAACAGAAACGTGACC
 [0290] GACGTGGAGTGTATCAAAGGCACCGACTATTCTATGCCGGCAATGAACAACA
 [0291] GCTATTGCCAGTCGGAGCCATTCCCTATGTGAAGTGACCAACTACACCGTC
 [0292] CGAGTGGCCAGTCAGCCCCGTTCTCCACGTGGATCCTCTCCCTGAGAACAGTG
 [0293] GGACGCCTCAGGCAGGCAGCGGAGAACATCTGACCTGCTGGGTTCATGACGTGG
 [0294] ATTCTTGAGCTGCAGCTGGTGGCAGGCCGGGGCGCTGACGTCCA
 [0295] GTACGACCTGTACTTGAACAATCCAACAGCCACGAACAGTACAGGTGCCTT
 [0296] CACTACAAAACGGATGCTCGGGGAACACAGQATCGGGTGTGGTCACTGACA
 [0297] TCGCTCGACTCTCCCGGGTCTCAAAGTCCCACATCCTGGTGGGGCAG
 [0298] GAGCGCAGCCGTCACTATCCCACAGATAAGTTGTCTTCACTGACA
 [0299] TTGAGAGATTAACCTCACCAACATGACTGGAGAGTGTAAATGAGACACATT
 [0300] CTTCATGCACTGGAAAATGAAAGTCATTCAATCGCAAATTCCGCTATGAGC
 [0301] TTCGGATCCAAAAGAGAATGCAGCCTGTAAGGACAGAACAGGTAGAGACA
 [0302] CAACCTCCTCCAGCTACCCAAATCCTGGAACGTACACAGTCAAATAAGAGC
 [0303] CCGGGAAACAGTGTATGAATTCTGAGTGCCTGGAGCACCCCCCAGCGCTTC
 [0304] GAGTGCAGCAGGAGGAGGGCGAGCTCGCTGGGAGCTCGCTG
 [0305] CTGATCGCCTGGGACGCTGCTGGCCTGCTCTGTGTGTTCCCTCATCTGCAG
 [0306] AAGGTATCTGGTATGCAGAGGCTGTTCCCCGATCCCACACATGAAAGAC
 [0307] CCCATCGGTGACACCTCCAACAGGACAAGCTGGTGGTCTGGAGGCGGGC
 [0308] AAAGCCGGCCTGGAGGAGTGTCTGGTGTGAAGTGCAGGTGGAGAAA
 [0309] ACTTGAGCGGCCGC (SEQ ID NO :11)
 [0310] 恒河猴 IL-3R α 的插入片段的序列 (MfeI 至 NotI) 如下。
 [0311] CAATTGCCACCATGACCCCTCCTTGGCTGACGCTGCTCCCTGGCGCCACGCC
 [0312] CTGTCTCCTGCAAACCAAGGAGGATCCAATGCACCAATCAGGAATCTAAGG
 [0313] ATGAAAGAAAAGGCTCAGCAGTTGATGTGGGACCTGAACAGAAACGTGACC
 [0314] GACGTGGAGTGTATCAAAGGCACCGACTATTCTATGCCGGCAATGAACGACA
 [0315] GCTATTGCCAGTCGGAGCCATTCCCTATGTGAAGTGACCAACTACACCGTC
 [0316] CGAGTGGCCAGTCCTCCGGTCTCCACGTGGATCCTCTCCCTGAGAACAGTG
 [0317] GGACGCCTCGGGCAGGCCAGGA TTGACCTGCTGGGTTCATGACGTGG
 [0318] ATTCTTGAGCTGCAGCTGGTGGTAGGCCGGGGGGCGCTGACGTCCA
 [0319] GTACGACCTGTACTTGAACAATCCAACAGCCACGAACAGTACAGGTGCCTT
 [0320] CGCTACAAAACGGATGCTCGGGGAACACAGATCGGGTGTGGTCACTGACA
 [0321] TCGCTCGACTCTCCCGGGTCTCAAAGTCCCACATCCTGGTGGGGCAG
 [0322] GAGCGCAGCCGTCACTATCCCACAGATAAGTTGTCTTCACTGACA
 [0323] TTGAGAGATTAACCTCACCAACATGACTGGAGAGTGTAAATGAGACACATT
 [0324] CTTCATGCACTGGAAAATGAAAGTCATTCAATCGCAAATTCCACTATGAGC
 [0325] TTCGGATCCAAAAGAGAATGCAGCCTGTAAGGACAGAACAGGTAGAGACA
 [0326] CAACCTCCTCCAGCTACCCAAATCCTGGAACGTACACAGTCAAATAAGAGC
 [0327] CCGGGAAACAGTGTATGAATTCTGAGTGCCTGGAGCACCCCCCAGCGCTTC

- [0328] GAGTGCACCAGGAGGAGGGCGCGAGCTCGCTGCCTGGCGACGTCGCTG
[0329] CTGATCGCGCTGGGACGCTGCTGGCCTGCTCTGTGTGTTCCCTCATCTGCAG
[0330] AAGGTATCTGGTGATGCAGAGGCTGTTCCCCGATCCCACACATGAAAGAC
[0331] CCCATCGGTGACACCTCCAACAGGACAAGCTGGTGGTCTGGGAGGCAGGGC
[0332] AAAGCCGGCCTGGAGGAGTGTCTGGTGTCTGAAGTGCAGGTGGTGGAGAAA
[0333] ACTTGAGCGGCCGC (SEQ ID NO :12)
[0334] (IL-3R α 强制表达细胞系的制备)
[0335] 使用电穿孔 (BTX), 用 pEGFP-N1 载体 / hCD123 或 pEF6/Myc-His 载体 / hCD123 感染 L929 细胞 (由 ATCC 制造) 和 Colon-26 细胞 (由 ATCC 制造)。具体来说, 将 10 至 20 μg DNA 与 10 万个细胞混合, 并使其在 300V 和 950 μF 反应。关于细胞, 对 pEGFP-N1/hCD123 来说使用新霉素 (Calbiochem) 或对于 pEF6/Myc-His/hCD123 来说使用灭瘟素 (Invitrogen) 来筛选药物抗性细胞。对于由此选择到的细胞, 使用流式细胞仪 (FAC SVantage、FACSaria 等, BD Biosciences) 通过分拣进一步选择 GFP 阳性细胞或高表达 IL-3R α (CD123) 的细胞, 并分别命名为 L929/hCD123 和 Colon-26/hCD123。
[0336] 对于食蟹猴 IL-3R α 和恒河猴 IL-3R α 强制表达细胞的制备来说, 它们也以与人类 IL-3R α 强制表达细胞的情况相同的方式, 使用 L929 和 Colon-26 来制备, 并命名为 L929/cyCD 123、Colon-26/cyCD123、L929/rhCD123 和 Colon-26/rhCD123。
[0337] 实施例 2 制备 IL-3R α 细胞外区域的可溶形式
[0338] (制备人类 IL-3R α 细胞外区域表达载体的可溶形式)
[0339] 通过 PCR 方法扩增编码人类 IL-3R α 细胞外区域的 cDNA, 并将 FLAG 标签连接到它的下游。具体来说, 使用 pEF6/Myc-His/hCD123 质粒 DNA 作为模板, 使用 Platinum Pfu 聚合酶 (Invitrogen), 通过 PCR 扩增编码人类 IL-3R α 细胞外区域的 cDNA。对于 PCR 来说, 在 96 °C 2 分钟的变性步骤后, 将 96 °C 20 秒 -55 °C 30 秒 -68 °C 65 秒的三步反应执行 30 个循环。所使用的引物是 IL-3R α -Fw 和下列引物。
[0340] hIL-3R α sol-FLAG-NotI :
[0341] 5' -ATTGCGGCCGCTCACTTATCGTCGTACCTTGAGTCCGCCAGGCACGTGTGTTG-3' (SEQ ID NO :13)
[0342] 对由此获得的 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (135V, 15 分钟, TAE 缓冲液)。DNA 通过溴乙锭染色进行可视化。将 DNA 用 JetSorb (Genomed) 提取。将如此纯化的 DNA 用 MfeI 和 NotI 消化, 并再次进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (135V, 15 分钟, TAE 缓冲液)。切下约 1.0kb 的条带, 并用 JetSorb (Genomed) 提取。将获得的 DNA 和已用与纯化 DNA 相同的切开的 pTracer-CMV/Bsd 载体混合, 并使用 TaKaRa 连接试剂盒进行连接。对于转化来说, 将连接样品与 DH10B 感受态细胞混合, 铺于 LB 平板 (含氨苄青霉素) 上。使用 LA Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.), 通过直接菌落 PCR 进行插入检查。对于 PCR 来说, 在 95 °C 1 分钟的变性步骤后, 将 95 °C 15 秒 -56 °C 15 秒 -72 °C 40 秒的三步反应执行 35 个循环, 然后执行 72 °C 2 分钟的延伸反应。所用的 PCR 引物是 IL-3R α -Fw 和 IL-3R α sol-FLAG-NotI。
[0343] 对由此获得的 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (135V, 15 分钟, TAE 缓冲液)。DNA 通过溴乙锭染色进行可视化。通过 Miniprep 方法从其中获得了约 1.0kb 扩增产物的菌落提取质粒 DNA。通过 DNA 序列分析发现纯化的质粒 DNA 具有与 GenBank 登记号

NP-002174. 1 的相应区域同一的序列。

[0344] 插入片段的序列 (MfeI 至 NotI) 如下。

[0345] CAATTGCCACCATGGCCTCCTTGGCTCACGCTGCTCCTGATGCCCTGCC
[0346] TGTCTCCTGCAAACGAAGGAAGATCCAACCCACCAATCACGA ACCTAAGG
[0347] ATGAAAGCAAAGGCTCAGCAGTTGACCTGGGACCTAACAGAAATGTGACC
[0348] GATATCGAGTGTGTTAAAGACGCCACTATTCTATGCCGGCAGTGAACAATAG
[0349] CTATTGCCAGTTGGAGCAATTCTTATGTGAAGTGACCAACTACACCGTCC
[0350] GAGTGGCCAACCCACCATTCTCACGTGGATCCTCTTCCCTGAGAACAGTGG
[0351] GAAGCCTTGGGCAGGTGCGGAGAATCTGACCTGCTGGATTGACGTGGAT
[0352] TTCTTGAGCTGCAGCTGGCGGTAGGCCCGGGGCCCCCGCGGACGTCCAG
[0353] TACGACCTGTACTTGAACGTTCCAACAGGCGTCAACAGTACGAGTGTCTTC
[0354] ACTACAAAACGGATGCTCAGGGAACACGTATCGGGTGTGTTGATGACAT
[0355] CTCTCGACTCTCAGCGGTTCTCAAAGTTCCCACATCCTGGTGCAGGGCAGG
[0356] AGCGCAGCCTCGGTATCCCCCTGCACAGATAAGTTGCGTCTTCACAGAT
[0357] TGAGATATTAACCTCCACCCAACATGACTGCAAAGTGTAAATAAGACACATTCT
[0358] TTATGCACTGGAAAATGAGAAGTCATTCAATCGCAAATTGCGTATGAGCTT
[0359] CAGATACAAAAGAGAATGCAGCCTGTAATCACAGAACAGGTAGAGACAGA
[0360] ACCTCCTCCAGCTACTCAATCCTGGAACGTACACAGTACAAATAAGAGCCC
[0361] GGGAAAGAGTGTATGAATTCTTGAGCGCCTGGAGCACCCCCCAGCGCTTCGA
[0362] GTGCGACCAGGAGGAGGGCGCAAACACACGTGCCTGGCGGGACTACAAGG
[0363] ATGACGACGATAAGTGAGCGGCCGC (SEQ ID NO :14)

[0364] (可溶形式的人类 IL-3R α 蛋白的制备)

[0365] 使用 QIAGEN 质粒大提试剂盒纯化含有可溶形式 IL-3R α 序列的 pTracer CMV 表达载体的质粒 DNA。使用 CH0ras1 细胞作为用于表达的宿主细胞。CH0ras1 细胞使用 SFMII 培养基 (Invitrogen) 振摇培养 (37°C, 5% CO₂)。

[0366] 在基因导入中使用 PEI 方法。将 MW 25,000 的直链聚乙烯亚胺 (Polysciences) 称重并溶解在 PBS 中, 同时用 HCl 调整到 pH7.0 左右 (1g/1)。将获得的溶液搅拌 1 小时, 然后通过经孔径为 0.22 μm 的膜滤器 MILLEX-GV (Millipore) 过滤进行除菌。然后将 1mg 纯化的质粒 DNA 与 20ml Opti-Pro SFM (Invitrogen) 混合以获得溶液 A。通过将 2.5ml PEI 溶液 (1g/1) 与 20ml Opti-Pro SFM (Invitrogen) 混合, 制备了溶液 B。在将溶液 A 和溶液 B 混合后, 将其静置 10 分钟, 并将获得的溶液加入到 CH0ras1 细胞 (每 1ml 1,000,000 个细胞) 中。6 天后, 回收细胞上清液并用于蛋白纯化。

[0367] 可溶形式人类 IL-3R α 蛋白的纯化通过下列方法进行。在基因导入后 6 天通过离心回收含有可溶形式 IL-3R α 蛋白的培养上清液, 并通过滤器。将获得的溶液用 Tris 缓冲的盐水 (TBS) 稀释 5 倍, 使用抗 FLAGM2 琼脂糖亲和凝胶 (Sigma) 制备抗 FLAG 柱, 并使用 HiLoad 泵 P-50 (Pharmacia Biotech) 向其施加溶液。使用 FLAG 肽 (Sigma) 并按照手册进行洗脱。将洗脱液分级成几个级分, 将每个级分在还原条件下进行 SDS-PAGE (MultiGel II Mini 10/20% 梯度胶; Cosmo Bio Co., Ltd.), 然后进行银染和 Western 印迹。银染使用银染试剂 “Daiichi” (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.)。将抗 FLAG M2 抗体 (Sigma) 和

碱性磷酸酶标记的兔抗小鼠免疫球蛋白抗体用于Western印迹。将其中发现了目标蛋白的级分使用 Amicon Ultra-410K (Millipore) 浓缩，并使用 Superdex 200gp (GE Healthcare) 进行凝胶过滤层析。在分级后，将每个级分在还原条件下进行 SDS-PAGE (MultiGel II Mini 10/20% 梯度胶；Cosmo Bio Co., Ltd.)，然后进行银染和 Western 印迹。银染使用银染试剂“Daiichi”(Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.)。将抗 FLAG M2 抗体 (Sigma) 和碱性磷酸酶标记的兔抗小鼠免疫球蛋白抗体用于 Western 印迹。将其中发现了目标蛋白的级分使用 Amicon Ultra-410K (Millipore) 浓缩，并用 PBS 洗涤。通过使用孔径为 0.22 μm 的膜滤器 MILLEX-GV (Millipore) 过滤来进行除菌，获得了可溶形式的人类 IL-3R α 蛋白。作为使用 Limulus ES-II Kit Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 进行 Limulus 试验的结果，没有检测到内毒素。对于可溶形式的人类 IL-3R α 蛋白的浓度来说，测量 280nm 处的吸光度，并将 1mg/ml 计算为 1.4OD。

[0368] 实施例 3 使用产人类抗体的小鼠制备抗人类 IL-3R α 人类抗体

[0369] (产人类抗体的小鼠)

[0370] 在免疫接种中使用的小鼠具有内源 Ig 重链和 κ 轻链破坏两者的纯合的遗传背景，并且还同时保持含有人类 Ig 重链基因座 (SC20) 和人类 Ig κ 链转入基因 (KCo5) 的第 14 号染色体片段。该小鼠通过将具有人类 Ig 重链基因座的株系 A 小鼠与具有人类 Ig κ 链转入基因的株系 B 小鼠进行杂交来制备。株系 A 对内源 Ig 重链和 κ 轻链破坏两者是纯合的，是维持了可以传递给后代的第 14 号染色体片段 (SC20) 的小鼠株系，并描述在例如 Tomizuka 等的报道中 [Tomizuka 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, Vol. 97 :722]。株系 B 也对内源 Ig 重链和 κ 轻链破坏两者是纯合的，是维持了人类 Ig κ 链转基因 (KCo5) 的小鼠株系 (转基因小鼠)，并描述在例如 Fishwild 等的报道中 [Nat. Biotechnol (1996), 14 : 845]。

[0371] 在下面的免疫试验中使用了通过株系 A 雄性小鼠与株系 B 雌性小鼠的杂交或株系 A 雌性小鼠与株系 B 雄性小鼠的杂交获得的在血清中同时检测到人类 Ig 重链和 κ 轻链的个体 [Ishida&Lonberg, IBC' s11' Antibody Engineering, 摘要 2000]。就此而言，上面提到的产人类抗体的小鼠 (被称为 KM 小鼠)，可以通过订立合同从 Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd. 获得。

[0372] (针对人类 IL-3R α 的人类单克隆抗体的制备)

[0373] 对于本实施例中单克隆抗体的制备来说，它按照在《单克隆抗体实验操作指南》(A Guide to Monoclonal Antibody Experimental Operations) (用日文书写) (由 Tamie Ando 等主编, Kodansha 出版, 1991) 等中描述的通用方法来制备。对于 IL-3R α 来说，作为免疫原，使用了表达 IL-3R α 的 L929 细胞 (CCL-1, ATCC)、表达 IL-3R α 的 Colon-26 细胞 (Tohoku 大学发育、衰老和癌症研究所生物医学研究细胞资源中心 (Cell Resource Center for Biomedical Research Institute of Development, Aging and Cancer Tohoku University) 或可溶形式的人类 IL-3R α Fc 融合蛋白。作为待免疫的动物，使用了上面提到的 KM 小鼠。

[0374] 为了制备针对人类 IL-3R α 的人类单克隆抗体，将 KM 小鼠用实施例 1 中制备的表达 IL-3R α 的 L929 细胞或表达 IL-3R α 的 Colon-26 细胞，以每 1 周至 2 周每只动物 1×10^7 个细胞的剂量进行腹膜内免疫接种，总共接种 4 次。在如下所述提取脾脏前三天，通过尾静

脉向每只小鼠个体给药 20 μg 可溶形式的人类 IL-3R α 蛋白。

[0375] 在从被免疫小鼠通过手术获得脾脏后, 将脾脏放入 PBS 中, 并使用注射器活塞将其在筛网(细胞滤网,FALCON)上切碎。在将细胞悬液通过筛网并离心后, 将获得的沉淀细胞重悬浮在红细胞裂解缓冲液(Sigma)中。在室温下温育 5 分钟后, 向其加入含有 350mg/ml 碳酸氢钠、50 单位/ml 青霉素和 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的无血清 DMEM 培养基(Invitrogen)(在后文中称为“无血清 DMEM 培养基”)以沉淀细胞。通过再次悬浮在无血清 DMEM 培养基中, 测量细胞数量。

[0376] 另一方面, 使用含有 10% FCS(Invitrogen)、50 单位/ml 青霉素和 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的 DMEM 培养基(Invitrogen)(在后文中称为“含血清 DMEM 培养基”), 在 37°C 下, 在 5% 二氧化碳存在下培养骨髓瘤细胞 SP2/0(ATCC No. CRL-1581)。将 SP2/0 细胞用无血清 DMEM 培养基清洗。采用同样方式, 将细胞悬浮在无血清 DMEM 培养基中以测量细胞数量。在将回收的源自脾脏的细胞悬液与小鼠骨髓瘤悬液以 5 : 1 的细胞数量比例混合后, 将混合的悬液离心, 然后完全移除上清液。作为融合试剂, 将 50% (w/v) 聚乙二醇 1500(Boehringer-Mannheim) 缓慢加入到获得的细胞沉淀中, 同时用移液器头搅拌沉淀, 然后向其缓慢加入预先加热到 37°C 的无血清 DMEM 培养基。此外, 向其缓慢加入适量的无血清 DMEM 培养基。然后将获得的溶液在 5% 二氧化碳存在下在 37°C 下静置 5 分钟。在离心后, 除去上清液, 并将由此获得的融合细胞悬浮在含有 10% FCS(Invitrogen)、青霉素 - 链霉素 - 谷氨酰胺(Sigma)、IL-6(5ng/ml) 和 2-巯基乙醇(Invitrogen) 的 DMEM 培养基(Invitrogen)中(在后文中称为“含 IL-6 的 DMEM 培养基”), 并在 5% 二氧化碳存在下在 37°C 下培养。第二天, 通过吸取回收细胞并通过离心进行沉淀。将获得的细胞沉淀重新悬浮在含有 IL-6 的 DMEM 培养基中。将悬浮的细胞在 96 孔板上进行有限稀释, 并培养约 7 天至 14 天。将培养上清液用于下面的实施例中描述的杂交瘤筛选。

[0377] (筛选产生与人类 IL-3R α 结合的人类单克隆抗体的杂交瘤)

[0378] 杂交瘤的筛选使用在上述实施例中制备的细胞上清液来进行。简而言之, 方法通过流式细胞术来进行, 其中使用了稳定表达人类 IL-3R α 的细胞。

[0379] 具体来说, 将表达人类 IL-3R α 的 L929 细胞与亲代细胞系 L929 细胞的组合或表达人类 IL-3R α 的 Colon-26 细胞与亲代细胞系 Colon-26 细胞的组合, 与杂交瘤的上清液混合, 并将其在 4°C 下静置 30 分钟。在将获得的细胞用染色培养基(Dulbecco 的 PBS, 含有 2% 胎牛血清、2mM EDTA、0.05% NaN_3)清洗两次后, 向其加入作为第二抗体的山羊 F(ab')₂ 抗人类 IgG-PE(Southern Biotech), 并将其在 4°C 下静置 30 分钟。在用染色培养基清洗两次后, 将获得的细胞通过 FACSCalibur(BD Biosciences) 进行分析。收集只与表达人类 IL-3R α 的 L929 细胞反应的杂交瘤。

[0380] 将所选的杂交瘤进行有限稀释, 并使用其培养上清液进行筛选。具体来说, 将每个表达人类 IL-3R α 的 L929 细胞和亲代细胞系 L929 细胞与杂交瘤的上清液混合, 并将其在 4°C 下静置 30 分钟。在用染色培养基清洗两次后, 向其加入作为第二抗体的山羊 F(ab')₂ 抗人类 κ -PE(Dako), 并将其在 4°C 下静置 30 分钟。在用染色培养基清洗两次后, 将细胞通过 FACSCalibur(BD Biosciences) 进行分析。收集只与表达人类 IL-3R α 的 L929 细胞反应的杂交瘤。

[0381] 实施例 4 重组抗人类 IL-3R α 人类抗体的制备

[0382] (从杂交瘤获得抗人类 IL-3R α 人类抗体基因和表达载体的制备)

[0383] 从实施例 3 中获得的杂交瘤, 使用含 10ng/ml IL-6(R&DSystems) 和 10% 胎牛血清 (SIGMA) 的 eRDF 培养基 (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd.), 对克隆名 01d4、01d5、01d17、01d19、New102 和 01d6 进行培养, 然后通过离心收集细胞。然后向获得的细胞加入 TRIZOL(GIBCO), 并按照说明书提取总 RNA。抗体可变区 cDNA 的克隆, 使用 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech) 按照其随附的说明书来进行。

[0384] 此外, 从产生抗人类 IL-3R α 小鼠抗体 7G3 的杂交瘤 ATCC, HB12009 克隆可变区, 并用作对照。通过将如此获得的 cDNA 与编码人类 IgG1 恒定区的 DNA 相连, 制备了嵌合抗体表达载体。具体来说, 从低温保存的杂交瘤通过离心收集细胞, 然后向其加入 TRIZOL(GIBCO), 按照说明书提取总 RNA。抗体可变区 cDNA 的克隆使用小鼠 IgG 抗体特异性引物以及 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech), 按照其随附的说明书来进行。

[0385] 使用 5 μ g 总 RNA 作为模板, 制备了第一链 cDNA。

[0386] 1) 第一链 cDNA 的合成

[0387] 总 RNA 5 μ gm/3 μ L

[0388] 5' CDS 1 μ L

[0389] SMART 寡聚物 1 μ L

[0390] 在将包含上述组分的反应混合物在 72°C 下温育 2 分钟后, 向反应混合物加入

[0391] 5x 缓冲液 2 μ L

[0392] DTT 1 μ L

[0393] DNTP 混合物 1 μ L 和

[0394] SuperscriptII 1 μ L

[0395] 并在 42°C 下温育 1.5 小时。

[0396] 向获得的混合物进一步加入 100 μ l Tricine 缓冲液, 并在 72°C 下温育 7 分钟。

[0397] 2) 通过 PCR 扩增重链基因和轻链基因并构建重组抗体表达载体

[0398] 为了扩增 cDNA, 使用了由 Takara 公司制造的 Z-Taq。

[0399] cDNA 2 μ L

[0400] 10xZ-Taq 缓冲液 5 μ L

[0401] dNTP 混合物 4 μ L

[0402] Z-Taq 1 μ L

[0403] 引物 1

[0404] 引物 2

[0405] 使用重蒸水将包含上面提到的组分的反应溶液调整到 50 μ l 的终体积, 以进行 PCR。

[0406] 为了扩增重链, 使用 UPM(SMART RACE cDNA 扩增试剂盒; 由 Clonetech 公司制造) 和 hh-6 引物 (5' -GGTCCGGGAGATCATGAGGGTGCCTT-3') (SEQ ID NO:15), 并将 98°C 1 秒和 68°C 30 秒的反应循环重复 30 次。此外, 使用 1 μ l 获得的反应溶液作为模板, 并使用 NUP(SMART RACE cDNA 扩增试剂盒; 由 Clonetech 制造) 和 hh-3 引物 (5' -GTGCACGCCGCTGGT CAGGGCGCCTG-3') (SEQ ID NO:16) 作为引物, 将 98°C 1 秒和 68°C 30 秒的反应循环重复 20 次。然后使用 PCR 纯化试剂盒 (QIAGEN) 纯化扩增的 PCR 产物, 并使用 hh-4 (5' -GGT GCC

AGGGGG AAG ACC GAT GG-3') (SEQ ID NO :17) 作为引物测定核苷酸序列。根据序列信息合成了下列特异性引物，并也使用下列引物从相反方向测定了序列。

- [0407] 01d4 重链特异性引物 Fw
- [0408] (5' -AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCTCTTGT-3') (SEQ ID NO :18)
- [0409] 01d4 重链特异性引物 Rv
- [0410] (5' -AGAGAGAGAGGCTAGCTGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC-3') (SEQ ID NO :19)
- [0411] 01d5 重链特异性引物 Fw
- [0412] (5' -AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCTCT TTGT-3') (SEQIDNO :20)
- [0413] 01d5 重链特异性引物 Rv
- [0414] (5' -AGAGAGAGAGGCTAGCTGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC-3') (SEQ ID NO :21)
- [0415] 01d17 重链特异性引物 Fw
- [0416] (5' -AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCTCT TTGT-3') (SEQ ID NO :22)
- [0417] 01d17 重链特异性引物 Rv
- [0418] (5' -AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACAAGGGTTCCC-3') (SEQ ID NO :23)
- [0419] 01d19 重链特异性引物 Fw
- [0420] (5' -AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCTCT TTGT-3') (SEQ ID NO :24)
- [0421] 01d19 重链特异性引物 Rv
- [0422] (5' -AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTC-3') (SEQ ID NO :25)
- [0423] New102 重链特异性引物 Fw
- [0424] (5' -AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCTCTTGT-3') (SEQ ID NO :26)
- [0425] New102 重链特异性引物 Rv
- [0426] (5' -AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTT-3') (SEQ ID NO :27)
- [0427] 01d6 重链特异性引物 Fw
- [0428] (5' -AGAGAGAGAGGTCGACCCACCATGGAACCTGGGCTCCGCTG-3') (SEQ ID NO :28)
- [0429] 01d6 重链特异性引物 Rv
- [0430] (5' -AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTC-3') (SEQ ID NO :29)
- [0431] 为了扩增小鼠抗体 7G3 的重链，使用 UPM(SMART RACE cDNA 扩增试剂盒；由 Clontech 公司制造) 和 mH-Rv1 引物 (5'-ATTTG TCGACC KYG GTS YTG CTG GCY GGGTG-3') (SEQ ID NO :30)，并将 98°C 1 秒和 68°C 30 秒的反应循环重复 30 次。此外，使用 1 μl 获得的反应溶液作为模板，并使用 NUP(SMART RACE cDNA 扩增试剂盒；由 Clontech 制造) 和 mH-Rv2 引物 (5' -GCACACYRCTGGACAGGGATCCAGAGTTCC-3') (SEQ ID NO :31)，将 98°C 1 秒和 68°C 30 秒的反应循环重复 20 次。然后使用 PCR 纯化试剂盒 (QIAGEN) 纯化扩增的 PCR 产物，并使用 mH-Rv2 引物 (SEQ ID NO :31) 作为引物的定重链可变区的核苷酸序列。根据序列信息合成了下列特异性引物，并也使用下列引物从相反方向测定了序列。
- [0432] 7G3 重链特异性引物 Fw
- [0433] (5' -AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGATGGAGCTGGATCTTCTC-3') (SEQ ID NO :32)
- [0434] 7G3 重链特异性引物 Rv
- [0435] (5' -AGAGAGAGAGGCTAGCTGCAGAGACAGTGACCAGAGTCCC-3') (SEQ ID NO :33)
- [0436] 使用上面提到的特异性引物进行 PCR(98°C 1 秒, 60°C 30 秒, 72°C 30 秒)，并将重链

扩增 cDNA 片段用 SalI 和 NheI 消化, 插入到已用相同酶切开的 N5KG1-Va1 Lark 载体 [N5KG1 的修饰的载体 (US6, 001, 358, Idec Pharmaceuticals)] 中。通过使用载体作为模板测定序列, 发现插入的序列与通过直接测序测定的序列同一。

[0437] 轻链的扩增使用 UPM(SMART RACE cDNA 扩增试剂盒;由 Clontech 公司制造) 和 hk-2 引物 (5'-GTT GAAGCT CTT TGT GAC GGGCGA GC-3') (SEQ ID NO :34), 并将 98°C 1 秒和 68°C 30 秒的反应循环重复 30 次。此外, 使用 1 μl 该溶液作为模板, 并使用 NUP(SMARTRACE cDNA 扩增试剂盒;由 Clonetech 制造) 和 hk-6 (5'-TGGCGGGAAAGATG AAG ACA GAT GGT G-3') (SEQ IDNO :35), 将 98°C 1 秒和 68°C 30 秒的反应循环重复 20 次。然后使用 PCR 纯化试剂盒 (QIAGEN) 纯化扩增的 PCR 产物, 并使用 hk-6 引物测定核苷酸序列。根据序列信息合成了下列特异性引物, 并也从相反方向测定了序列。

- [0438] 01d4 轻链特异性引物 Fw
- [0439] (5' -AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGC-3') (SEQ ID NO :36)
- [0440] 01d4 轻链特异性引物 Rv
- [0441] (5' -AGAGAGAGAGCGTACGTTGATCTCCAGCTTGGTCCCCTG-3') (SEQ ID NO :37)
- [0442] 01d5 轻链特异性引物 Fw
- [0443] (5' -AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCG CTC AGC-3') (SEQ ID NO :38)
- [0444] 01d5 轻链特异性引物 Rv
- [0445] (5' -AGAGAGAGAGCGTACGTTGATCTCCAGCTTGGTCCCCTG-3') (SEQ ID NO :39)
- [0446] 01d17 轻链特异性引物 Fw
- [0447] (5' -AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCTCG CTC AG-3') (SEQ ID NO :40)
- [0448] 01d17 轻链特异性引物 Rv
- [0449] (5' -AGAGAGAGAGCGTACGTTGATCTCCAGCTTGGTCCCCCT G-3') (SEQ ID NO :41)
- [0450] 01d19 轻链特异性引物 Fw
- [0451] (5' -AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCTCG CTC AG-3') (SEQ ID NO :42)
- [0452] 01d19 轻链特异性引物 Rv
- [0453] (5' -AGAGAGAGAGCGTACGTTGATTCCACCTTGGTCCCTT GGC-3') (SEQ ID NO :43)
- [0454] New102 轻链特异性引物 Fw
- [0455] (5' -AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCTCG CTC AG-3') (SEQIDNO :44)
- [0456] New102 轻链特异性引物 Rv
- [0457] (5' -AGAGAGAGAGCGTACGTTGATCTCCAGCTTGG TCCCCT G-3') (SEQ ID NO :45)
- [0458] 01d6 轻链特异性引物 Fw
- [0459] (5 ' -AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGC-3') (SEQ ID NO :46)
- [0460] 01d6 轻链特异性引物 Rv
- [0461] (5' -AGAGAGAGAGCGTACGTTGATATCCACTTGGTCCCAGGGC-3') (SEQ ID NO :47)
- [0462] 小鼠抗体 7G3 的轻链使用 UPM(SMART RACE cDNA 扩增试剂盒;由 Clontech 公司制造) 和 mK-Rv1 引物 mK_Rv1 (5' -TT GAA GCTCTT GAC AAT GGG TGA AGT TGAT-3') (SEQ ID NO :48) 扩增, 并将 98°C 1 秒和 68°C 30 秒的反应循环重复 30 次。此外, 使用 1 μl 该反应溶液作为模板, 并使用 NUP(SMART RACE cDNA 扩增试剂盒;由 Clontech 制造) 和 mK-Rv2 (5'-GTAGGTGCTGTTGCTGTCCTGATCAGT-3') (SEQ ID NO :49), 将 98°C 1 秒和 68°C 30 秒的反应

循环重复 20 次。然后使用 PCR 纯化试剂盒 (QIAGEN) 纯化扩增的 PCR 产物，并使用 mK-Rv2 引物测定核苷酸序列。根据序列信息合成了下列特异性引物，并也从相反方向测定了序列。

[0463] 7G3 轻链特异性引物 Fw

[0464] (5' -AGAGAGAGAGAGATCTCACCATGGAAATCACAGACTCAGGTCCCT-3') (SEQ ID NO :50)

[0465] 7G3 轻链特异性引物 Rv

[0466] (5' -AGAGAGAGAGCGTACGTTTATTCCAGCTTGGTCCCCC-3') (SEQ ID NO :51)

[0467] 使用上面提到的特异性引物进行 PCR (98°C 1 秒, 60°C 30 秒, 72°C 30 秒)，并将轻链扩增 cDNA 片段用 BgIII 和 BsiWI 消化，插入到已用相同酶切开的 N5KG1-Va1 Lark 载体中。通过使用载体作为模板测定序列，发现插入的序列与通过直接测序测定的序列同一。

[0468] 下面显示了每个编码 01d4 的重链可变区和轻链可变区的 DNA 分子以及重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

[0469] <01d4 重链可变区>

[0470] GACCCGTCGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCCCTTTGTGGTGGCAG

[0471] CAGCTACAGGTGTCCAGTCCCAGGTCCAGCTGCT ACAGTCTGGGGCTGAGGT

[0472] GAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCATGCAAGGCTTCTGGAGGCAC

[0473] CTTCAGCACCTATGCTATCAGCTGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTT

[0474] GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTGGTATAGTAAACTACGCACAGAA

[0475] GTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAGGCCCTGGACTACGCCTAC

[0476] ATGGAAC TGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTGCGA

[0477] GAGGGGGGGGCTCGGGCCAGATGTTCTTGATATCTGGGCCAAGGGACAAT

[0478] GGTCACCGTCTCTCAGCTAGCACCAA (SEQ ID NO :52)

[0479] <01d4 重链可变区>

[0480] MDWTWRFLFVVAATGVQSQVQLLQSGAEVKKPGS SVKVSKASGGTFSTYAI

[0481] SWVRQAPGQGLEWMGGI IPIFGIVNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE

[0482] DTAVYYCARGGGSGPDVLDIWGQGTMVTSSASTX (SEQ ID NO :53)

[0483] 重链 DNA 的翻译起始位点是 ATG 密码子，其从 SEQ ID NO :52 的 5' 端起第 16 位的腺嘌呤 (A) 开始，并且抗体可变区与恒定区之间的边界位于 5' 端起第 432 位的腺嘌呤 (A) 与第 433 位的鸟嘌呤 (G) 之间。在重链氨基酸序列中，重链可变区直到从 SEQ ID NO :53 的 N- 端起第 139 位的丝氨酸 (S) 残基，恒定区从第 140 位的丙氨酸 (A) 开始并往后。通过基因序列估算软件 (Signal P ver. 2)，估计重链的信号序列直到从 SEQ ID NO :53 的 N- 端起第 19 位的丝氨酸 (S)。成熟形式的 N- 端被认为是 SEQ ID NO :53 的第 20 位的谷氨酰胺 (Q)。

[0484] <01d4 轻链可变区>

[0485] CACAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCC

[0486] TGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGTCATCTGGATGACCCAGTCTCCA

[0487] TCCTTA CTCTGCATCTACAGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGTCGGATGA

[0488] GTCAGGGCATTAGGAGTTATTAGCCTGGTATCAGAAAAACCAGGGAAAGC

[0489] CCCTGAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAA

[0490] GGTCAGTGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGCCT

[0491] GCAGTCTGAAGATTTGCAACTTATT SCTGTCAACAGTATT STSGTTCCCGTA

- [0492] CACTTTGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGG (SEQ ID NO :54)
- [0493] <01d4 轻链可变区 >
- [0494] MDMRVPAQLLGLLLWLPGARCVIWMTQSPSLLSASTGDRVTISCRMSQGIRSY
- [0495] LAWYQQKPGKAPELLIYAASLTLQSGVPSRSGSGSDFTLTISLQSEDFTAYYC
- [0496] QQYYSFPLYTFGQGTKLEIKRTVX (SEQ ID NO :55)
- [0497] 轻链 DNA 的翻译起始位点是 ATG 密码子, 其从 SEQ ID NO :54 的 5' 端起第 16 位的腺嘌呤 (A) 开始, 并且抗体可变区与恒定区之间的边界位于 5' 端起第 402 位的腺嘌呤 (A) 与第 403 位的胞嘧啶 (C) 之间。在轻链氨基酸序列中, 轻链可变区直到从 SEQ ID NO :55 的 N- 端起第 129 位的赖氨酸 (K) 残基, 恒定区从第 130 位的精氨酸 (R) 开始并往后。通过基因序列估算软件 (Signal P ver. 2), 估计轻链的信号序列直到从 SEQ ID NO :55 的 N- 端起第 22 位的半胱氨酸 (C)。成熟形式的 N- 端被认为是 SEQ ID NO :55 的第 23 位的缬氨酸 (V)。
- [0498] 下面显示了每个编码 01d5 的重链可变区和轻链可变区的 DNA 分子以及重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。
- [0499] <01d5 重链可变区 >
- [0500] GTCGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCCCTTTGTGGTGGCAGCAGCT
- [0501] ACAGGTGTCCAGTCCCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG
- [0502] AAGCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTCTCATGCAAGGCTCTGGAGGCACCTTC
- [0503] GCACCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTG
- [0504] GATGGGAGGGCTCATCCCTATCTTGATATAGAAAATACGCACAGAACAGTTCC
- [0505] AGGGCAGAGTCACGATTACCGCGAACGAATCCACGAGCACAGTCTATATGGA
- [0506] ACTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCGAGAGGG
- [0507] GGGGGTTCGGGCCCTGATGTTCTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCA
- [0508] CCGTCTCTCAGCTAGC (SEQ ID NO :56)
- [0509] <01d5 重链可变区 >
- [0510] MDWTWRFLFVVAAATGVQSQVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSTYAI
- [0511] SWVRQAPGQGLEWMGLIPIDENYYAQKFQGRVTITADESTSTVYMEMLSSLRSE
- [0512] DTAMYYCARGGSGPDVLDIWGQGTMVTVSSAS (SEQ ID NO :57)
- [0513] 重链 DNA 的翻译起始位点是 ATG 密码子, 其从 SEQ ID NO :56 的 5' 端起第 16 位的腺嘌呤 (A) 开始, 并且抗体可变区与恒定区之间的边界位于 5' 端起第 427 位的腺嘌呤 (A) 与第 428 位的鸟嘌呤 (G) 之间。在重链氨基酸序列中, 重链可变区直到从 SEQ ID NO :57 的 N- 端起第 139 位的丝氨酸 (S) 残基, 恒定区从第 140 位的丙氨酸 (A) 开始并往后。通过基因序列估算软件 (Signal P ver. 2), 估计重链的信号序列直到从 SEQ ID NO :57 的 N- 端起第 19 位的丝氨酸 (S)。成熟形式的 N- 端被认为是 SEQ ID NO :57 的第 20 位的谷氨酰胺 (Q)。
- [0514] <01d5 轻链可变区 >
- [0515] CACAGATCTCTCACATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCC
- [0516] TGCTGCTCTGGCTCCAGGTGCCAGATGTGTCATCTGGATGACCCAGTCTCCA
- [0517] TCCTTACTCTCTGCATCTACAGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGTCGGATGA
- [0518] GTCAAGGGCATTAGGAGTTATTA^GGCCTGGTATCAGCAAAACCAGGGAAAGC
- [0519] CCCTGAGCTCCTGATCTGCTGCATCCACTTGCAAAGTGGGGTCCCACCAA

- [0520] GGTCAGTGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGCCT
- [0521] GCAGTCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTATTATAGTTCCCGTA
- [0522] CACTTTGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGG (SEQ ID NO :58)
- [0523] <01d5 轻链可变区>
- [0524] MDMRVPAQLGLLLLWLPGARCVIWMTQSPSLLSASTGDRVTISCRMSQGIRSY
- [0525] LAWYQQKPGKAPELLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQSEDFATYYC
- [0526] QQYSFPYTFGQGTKLEIKRTVX (SEQ ID NO :59)
- [0527] 轻链 DNA 的翻译起始位点是 ATG 密码子, 其从 SEQ ID NO :58 的 5' 端起第 16 位的腺嘌呤 (A) 开始, 并且抗体可变区与恒定区之间的边界位于 5' 端起第 402 位的腺嘌呤 (A) 与第 403 位的胞嘧啶 (C) 之间。在轻链氨基酸序列中, 轻链可变区直到从 SEQ ID NO :59 的 N- 端起第 129 位的赖氨酸 (K) 残基, 恒定区从第 130 位的精氨酸 (R) 开始并往后。通过基因序列估算软件 (Signal P ver. 2), 估计轻链的信号序列直到从 SEQ ID NO :59 的 N- 端起第 22 位的半胱氨酸 (C)。成熟形式的 N- 端被认为是 SEQ ID NO :59 的第 23 位的缬氨酸 (V)。
- [0528] 下面显示了每个编码 01d17 的重链可变区和轻链可变区的 DNA 分子以及重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。
- [0529] <01d17 重链可变区>
- [0530] GACCCGTCGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCCCTTTGTGGTGGCAG
- [0531] CAGCTACAGGTGTCCAGTCCCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGG
- [0532] TGAAGAACGCTGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGACTCTGGAGGCA
- [0533] CCTTCAGCAACTTGCTATCAGCTGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCT
- [0534] TGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTGGTCAACAAACTACGCACAG
- [0535] AAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTAACGCAGGAATCCACGAGCACAGCC
- [0536] TACATGGAGCTGAGCAGTCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTG
- [0537] CGGGTGGAGACAAATATGGTCCTACTACTTTCACTACTGGGCCAGGAAAC
- [0538] CCTTGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC (SEQ ID NO :60)
- [0539] <01d17 重链可变区>
- [0540] MDWTWRFLFVVAAATGVQSQVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKTSGGTFSNFAI
- [0541] SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGSTNYAQKFQGRVTINADESTSTAYMELSSLRSE
- [0542] DTAVYYCAGGDKYGPYYFHYWGQGTLTVSSAS (SEQ ID NO :61)
- [0543] 重链 DNA 的翻译起始位点是 ATG 密码子, 其从 SEQ ID NO :60 的 5' 端起第 16 位的腺嘌呤 (A) 开始, 并且抗体可变区与恒定区之间的边界位于 5' 端起第 432 位的腺嘌呤 (A) 与第 433 位的鸟嘌呤 (G) 之间。在重链氨基酸序列中, 重链可变区直到从 SEQ ID NO :61 的 N- 端起第 139 位的丝氨酸 (S) 残基, 恒定区从第 140 位的丙氨酸 (A) 开始并往后。通过基因序列估算软件 (Signal P ver. 2), 估计重链的信号序列直到从 SEQ ID NO :61 的 N- 端起第 19 位的丝氨酸 (S)。成熟形式的 N- 端被认为是 SEQ ID NO :61 的第 20 位的谷氨酰胺 (Q)。
- [0544] <01d17 轻链可变区>
- [0545] AGATCTCTACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTAGCTCCTGGGCTCCTGC
- [0546] TGCTCTGTTCCCAGGTGCCAGATGTG ACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCC
- [0547] TCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCATTGTCGGCGAGTC

- [0548] AGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAAGCCCC
- [0549] TAAGTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTGCAAAAGTGGGTCCCCATCAAGGT
- [0550] TCAGCGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
- [0551] GCCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGTACA
- [0552] CTTTGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGT (SEQ ID NO :62)
- [0553] <01d17 轻链可变区>
- [0554] MDMRVLAQLLGLLLLCPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSW
- [0555] LAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
- [0556] QQYNSYPYTFGQGTKLEIKRTX (SEQ ID NO :63)
- [0557] 轻链 DNA 的翻译起始位点是 ATG 密码子, 其从 SEQ ID NO :62 的 5' 端起第 19 位的腺嘌呤 (A) 开始, 并且抗体可变区与恒定区之间的边界位于 5' 端起第 399 位的腺嘌呤 (A) 与第 400 位的胞嘧啶 (C) 之间。在轻链氨基酸序列中, 轻链可变区直到从 SEQ ID NO :63 的 N- 端起第 129 位的赖氨酸 (K) 残基, 恒定区从第 130 位的精氨酸 (R) 开始并往后。通过基因序列估算软件 (Signal P ver. 2), 估计轻链的信号序列直到从 SEQ ID NO :63 的 N- 端起第 22 位的半胱氨酸 (C)。成熟形式的 N- 端被认为是 SEQ ID NO :63 的第 23 位的天冬氨酸 (D)。
- [0558] 下面显示了每个编码 01d19 的重链可变区和轻链可变区的 DNA 分子以及重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。
- [0559] <01d19 重链可变区>
- [0560] TCGACCCCTGGACTGGACCTGGAGGTTCCCTTTGTGGTGGCAGCAGCTAC
- [0561] AGGTGTCCAGTCCCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAA
- [0562] GCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGC
- [0563] AGCTATGCTATCAGCTGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGG
- [0564] TGGGAGGGATCATCCCTATCTTGGTACAGCAAACATACGCACAGAACAGTTCCA
- [0565] GGGCAGAGTCACGATTACCGCGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGA
- [0566] GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGG
- [0567] ACACAAATATGGCCCTACTACTTGACTACTGGGCCAGGGAACCTGGTC
- [0568] ACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAG (SEQ ID NO :64)
- [0569] <01d19 重链可变区>
- [0570] MDWTWRFLFVVAATGVQSQVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI
- [0571] SWVRQAPGQGLEWVGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE
- [0572] DTAVYYCARGHKYGPYYFDYWGQGTLTVSSASTK (SEQ ID NO :65)
- [0573] 重链 DNA 的翻译起始位点是 ATG 密码子, 其从 SEQ ID NO :64 的 5' 端起第 9 位的腺嘌呤 (A) 开始, 并且抗体可变区与恒定区之间的边界位于 5' 端起第 425 位的腺嘌呤 (A) 与第 426 位的鸟嘌呤 (G) 之间。在重链氨基酸序列中, 重链可变区直到从 SEQ ID NO :65 的 N- 端起第 139 位的丝氨酸 (S) 残基, 恒定区从第 140 位的丙氨酸 (A) 开始并往后。通过基因序列估算软件 (Signal P ver. 2), 估计重链的信号序列直到从 SEQ ID NO :65 的 N- 端起第 19 位的丝氨酸 (S)。成熟形式的 N- 端被认为是 SEQ ID NO :65 的第 20 位的谷氨酰胺 (Q)。
- [0574] <01d19 轻链可变区>

- [0575] AGATCTCTCACCATGGACATGAGGGCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGC
- [0576] TGCTCTGTTCCCAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCC
- [0577] TCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTGTCGGCGAGTC
- [0578] AGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCC
- [0579] TAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT
- [0580] TCAGCGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
- [0581] GCCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCCTCGGA
- [0582] CGTCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACGTACGGTGGCT (SEQ ID NO :66)
- [0583] <01d19 轻链可变区>
- [0584] MDMRVLAQLLGLLLLCPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSW
- [0585] LAWYQQKPEAKPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
- [0586] QQYNNSYPRTFGQGTKVEIKRTVA (SEQ ID NO :67)
- [0587] 轻链 DNA 的翻译起始位点是 ATG 密码子, 其从 SEQ ID NO :66 的 5' 端起第 13 位的腺嘌呤 (A) 开始, 并且抗体可变区与恒定区之间的边界位于 5' 端起第 399 位的腺嘌呤 (A) 与第 400 位的胞嘧啶 (C) 之间。在轻链氨基酸序列中, 轻链可变区直到从 SEQ ID NO :67 的 N- 端起第 129 位的赖氨酸 (K) 残基, 恒定区从第 130 位的精氨酸 (R) 开始并往后。通过基因序列估算软件 (Signal P ver. 2), 估计轻链的信号序列直到从 SEQ ID NO :67 的 N- 端起第 22 位的半胱氨酸 (C)。成熟形式的 N- 端被认为是 SEQ ID NO :67 的第 23 位的天冬氨酸 (D)。
- [0588] 下面显示了每个编码 New102 的重链可变区和轻链可变区的 DNA 分子以及重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。
- [0589] <New102 重链可变区>
- [0590] TCGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCCCTCTTGTTGGTGGCAGCAGCTA
- [0591] CAGGTGTCCAGTCCCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGAAGA
- [0592] AGCCTGGATCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCATGGCTCAGGAGGCACCGTCAG
- [0593] CAGCTACGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTG
- [0594] GATGGGAGAGATCATCCCTATCTTGGTATAGTAAACTACGCACAGAACAGTTCC
- [0595] AGGGCAGAGTCACGATTACCGCGACGAATCCACGAACACAGCCTACATGG
- [0596] AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGCCATATATTACTGTGCGAGAGA
- [0597] GACAGCAGTGGCTGGTATTCTGGTTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACC
- [0598] GTCTCCTCAGCTAGCACCAAG (SEQ ID NO :68)
- [0599] <New102 重链可变区>
- [0600] MDWTWRFLFVVAAATGVQSQVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCMASGGTVSSYA
- [0601] ISWVRQAPGQGLEWMGEIIPIFGIVNYAQKFQGRVTITADESTNTAYMELSSLRS
- [0602] EDTAIYYCARETAVAGILGYWGQGTLTVSSASTK (SEQ ID NO :69)
- [0603] 重链 DNA 的翻译起始位点是 ATG 密码子, 其从 SEQ ID NO :68 的 5' 端起第 9 位的腺嘌呤 (A) 开始, 并且抗体可变区与恒定区之间的边界位于 5' 端起第 423 位的腺嘌呤 (A) 与第 424 位的鸟嘌呤 (G) 之间。在重链氨基酸序列中, 重链可变区直到从 SEQ ID NO :69 的 N- 端起第 138 位的丝氨酸 (S) 残基, 恒定区从第 139 位的丙氨酸 (A) 开始并往后。通过基因

序列估算软件 (Signal P ver. 2) , 估计重链的信号序列直到从 SEQ ID NO :69 的 N- 端起第 19 位的丝氨酸 (S) 。成熟形式的 N- 端被认为是 SEQ ID NO :69 的第 20 位的谷氨酰胺 (Q) 。

- [0604] <New102 轻链可变区 >
- [0605] AGATCTCTCACCATGGACATGAGGGCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGC
- [0606] TGCTCTGTTCCCAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCC
- [0607] TCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCACACTGTCGGCGAGTC
- [0608] AGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCC
- [0609] TAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTGCAAAGTGGGTCCCATCAAGGT
- [0610] TCAGCGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
- [0611] GCCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGTACA
- [0612] CTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCA (SEQ ID NO :70)

- [0613] <New102 轻链可变区 >
- [0614] MDMRVLAQLGLLLLCPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSW
- [0615] LAWYQQKPEAKPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSQSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
- [0616] QQYNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAA (SEQ ID NO :71)
- [0617] 轻链 DNA 的翻译起始位点是 ATG 密码子, 其从 SEQ ID NO :70 的 5' 端起第 13 位的腺嘌呤 (A) 开始, 并且抗体可变区与恒定区之间的边界位于 5' 端起第 399 位的腺嘌呤 (A) 与第 400 位的胞嘧啶 (C) 之间。在轻链氨基酸序列中, 轻链可变区直到从 SEQ ID NO :71 的 N- 端起第 129 位的赖氨酸 (K) 残基, 恒定区从第 130 位的精氨酸 (R) 开始并往后。通过基因序列估算软件 (Signal P ver. 2) , 估计轻链的信号序列直到从 SEQ ID NO :71 的 N- 端起第 22 位的半胱氨酸 (C) 。成熟形式的 N- 端被认为是 SEQ ID NO :71 的第 23 位的天冬氨酸 (D) 。

- [0618] 下面显示了每个编码 01d6 的重链可变区和轻链可变区的 DNA 分子以及重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

- [0619] <01d6 重链可变区 >
- [0620] CGACCCACCATGGAACTGGGGCTCCGCTGGGTTTCCTTGTGCTATTAGA
- [0621] AGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGAGGCCTGGTCAA
- [0622] GCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGT
- [0623] AGCCATAACATGAACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGG
- [0624] GTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTTACATATATTATGCAGACTCAGTGAAG
- [0625] GGCCGATTCAACCATCTCCAGAGACAAACGCCAAGAACTCA CTGTATCTGCAA
- [0626] TGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGG
- [0627] ACTGGGGCTACTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTC
- [0628] AGCTAGC (SEQ ID NO :72)
- [0629] <01d6 重链可变区 >
- [0630] MELGLRWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGLVKGSSLRLSCAASGFTFSSHNMN
- [0631] WVRQAPGKGLEWSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE
- [0632] DTAVYYCAREDWGYFDYWGQGTLVTVSSASTK (SEQ ID NO :73)
- [0633] 重链 DNA 的翻译起始位点是 ATG 密码子, 其从 SEQ ID NO :72 的 5' 端起第 10 位的

腺嘌呤 (A) 开始, 并且抗体可变区与恒定区之间的边界位于 5' 端起第 417 位的腺嘌呤 (A) 与第 418 位的鸟嘌呤 (G) 之间。在重链氨基酸序列中, 重链可变区直到从 SEQ ID NO :73 的 N- 端起第 136 位的丝氨酸 (S) 残基, 恒定区从第 137 位的丙氨酸 (A) 开始并往后。通过基因序列估算软件 (Signal P ver. 2), 估计重链的信号序列直到从 SEQ ID NO :73 的 N- 端起第 19 位的丝氨酸 (S)。成熟形式的 N- 端被认为是 SEQ ID NO :73 的第 20 位的谷氨酸 (E)。

[0634] <01d6 轻链可变区 >

[0635] AGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGC

[0636] TGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCC

[0637] TCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTGCCGGCAAGTC

[0638] AGGGCATTAGCAGTGATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCC

[0639] TAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTGGAAAGTGGGGTCCATCAAGGT

[0640] TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA

[0641] GCCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTAACAGTTAACAGTCAAGGT

[0642] TTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGTACGGT (SEQ ID NO :74)

[0643] <01d6 轻链可变区 >

[0644] MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSDL

[0645] AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC

[0646] QQFNSYPFTFGPGTKVDIKRTVAA (SEQ ID NO :75)

[0647] 轻链 DNA 的翻译起始位点是 ATG 密码子, 其从 SEQ ID NO :74 的 5' 端起第 13 位的腺嘌呤 (A) 开始, 并且抗体可变区与恒定区之间的边界位于 5' 端起第 399 位的腺嘌呤 (A) 与第 400 位的胞嘧啶 (C) 之间。在轻链氨基酸序列中, 轻链可变区直到从 SEQ ID NO :75 的 N- 端起第 129 位的赖氨酸 (K) 残基, 恒定区从第 130 位的精氨酸 (R) 开始并往后。通过基因序列估算软件 (Signal P ver. 2), 估计轻链的信号序列直到从 SEQ ID NO :75 的 N- 端起第 23 位的半胱氨酸 (C)。成熟形式的 N- 端被认为是 SEQ ID NO :75 的第 24 位的丙氨酸 (A)。

[0648] 下面显示了每个编码 7G3 的重链可变区和轻链可变区的 DNA 分子以及重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

[0649] <7G3 重链可变区 >

[0650] GTCGACCACCATGGGATGGAGCTGGATCTTCTCTTCTCGTGTCAAGGAAC

[0651] GGAGGTGTCCCTCTGAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTG

[0652] AAGCCTGGGCTTCAGTAAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGATAACACCTTC

[0653] CTGACTACTACATGAAGTGGGTGAAACAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGT

[0654] GGATTGGAGATATTATTCTAGCAATGGTGCCACTTCTACAACCAGAAGTTC

[0655] AAGGGCAAGGCCACTTGACTGTGGACAGATCCTCCAGCACAGCCTACATGC

[0656] ACCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTACAAGATCG

[0657] CATTACTGCGGGCCTCTGGTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCA

[0658] CTGTCTCTGCAGCTAGC (SEQ ID NO :76)

[0659] <7G3 重链可变区 >

[0660] MGWSWIFLFLVSGTGGVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFDTYY

[0661] MKWVKQSHGKSLEWIGDI IPSNGATFYNNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLT

[0662] SEDSAVYYCTRS~~H~~L~~R~~ASWFAYWGQGTLVTVAAS (SEQ ID NO :77)

[0663] 重链 DNA 的翻译起始位点是 ATG 密码子, 其从 SEQ ID NO :76 的 5' 端起第 16 位的腺嘌呤 (A) 开始, 并且抗体可变区与恒定区之间的边界位于 5' 端起第 427 位的腺嘌呤 (A) 与第 428 位的鸟嘌呤 (G) 之间。在重链氨基酸序列中, 重链可变区直到从 SEQ ID NO :77 的 N- 端起第 139 位的丙氨酸 (A) 残基, 恒定区从第 140 位的丙氨酸 (A) 开始并往后。通过基因序列估算软件 (Signal P ver. 2), 估计重链的信号序列直到从 SEQ ID NO :77 的 N- 端起第 19 位的丝氨酸 (S)。成熟形式的 N- 端被认为是 SEQ ID NO :77 的第 20 位的谷氨酸 (E)。

[0664] <7G3 轻链可变区 >

[0665] AGATCTCACCATGGAATCACAGACTCAGGTCC~~T~~CATGTCCCTGCTGTTCTGGG

[0666] TATCTGGTACCTGTGGGGACTTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCC~~T~~GACT

[0667] GTGACAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAGTCTAGTCAGAGTCTG

[0668] CAGTGGAAATCAAAGAACTACTTGACCTGGTATCTGCAGAAACCAG

[0669] GGCAGCCTCCTAAATTGTTGATCTATTGGGCATCCACTAGGAAATCTGGGTC

[0670] CCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTCACTCTCACCATCA

[0671] GCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTATTACTGTCAGAATGATTATAGT

[0672] TATCCGTACACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGT (SEQ ID NO :78)

[0673] <7G3 轻链可变区 >

[0674] MESQTQVLMSLLFWVGTCDFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSG

[0675] NQKNYLTWYLQKPGQPKL~~I~~YWASTRESGPDRFTGSGSGTDFTLT~~I~~SSVQAE

[0676] DLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO :79)

[0677] 轻链 DNA 的翻译起始位点是 ATG 密码子, 其从 SEQ ID NO :78 的 5' 端起第 11 位的腺嘌呤 (A) 开始, 并且抗体可变区与恒定区之间的边界位于 5' 端起第 409 位的腺嘌呤 (A) 与第 410 位的胞嘧啶 (C) 之间。在轻链氨基酸序列中, 轻链可变区直到从 SEQ ID NO :79 的 N- 端起第 133 位的赖氨酸 (K) 残基, 恒定区从第 134 位的精氨酸 (R) 开始并往后。通过基因序列估算软件 (Signal P ver. 2), 估计轻链的信号序列直到从 SEQ ID NO :79 的 N- 端起第 22 位的甘氨酸 (G)。成熟形式的 N- 端被认为是 SEQ ID NO :79 的第 23 位的天冬氨酸 (D)。

[0678] (重组类型抗体的制备)

[0679] 通过将每个构建的 6 个重组抗体表达载体导入宿主细胞, 制备了表达重组抗体的细胞。HEK293F (Invitrogen) 被用作用于表达的宿主细胞。

[0680] 使用 293Fectin (Invitrogen) 将每个表达载体导入 HEK293F。将 HEK293F 在 5% CO₂ 和 37°C 的条件下使用摇床进行培养, 并在培养后约 5 天回收培养上清液。将回收的培养上清液使用 rpm 蛋白 A (Amersham-Pharmacia Biotech) 进行亲和纯化。使用 PBS 作为吸附缓冲液, 0.02M 甘氨酸缓冲液 (pH3) 作为洗脱缓冲液, 根据用于纯化的量使用 0.8x40cm 柱子 (Bio-Rad Laboratories) 等。通过加入 1M Tris (pH9.0) 将洗脱分级调整到约 pH 7.2。使用透析膜 (截留分子量 10,000, Spectrum Laboratories) 将如此制备的抗体溶液更换成 PBS, 并使用孔径为 0.22 μm 的膜滤器 MILLEX-GV (Millipore) 通过过滤进行除菌, 由此获得纯化的人类抗 IL-3R α 单克隆抗体。通过在 280nm 处测量吸光值并将 1mg/ml 视为 1.40D 来计算纯化抗体的浓度。

[0681] 每个人类抗体 CDR (补性决定区) 的氨基酸序列和 SEQ ID NOs 的概述显示在表 1

中。

[表 1]

重链可变区	SEQ ID NO	CDR1	CDR2	CDR3
	CDR1	CDR2	CDR3	
Old4	113 114 115	TYAIS	GIPIFGIVNYAQKFAQG	GGGSGPDVLDI
Old5	116 117 118	TYAIS	GLIPIFDIENYAQKFQCG	GGGSGPDVLDI
Old 17	119 120 121	NFAIS	GIPIFGSTNYAQKFQCG	GDKYGPYYFHY
Old19	122 123 124	SYAIS	GIPIFGTANYAQKFQCG	GHKYGPYYFDY
New102	125 126 127	SYAIS	EIPIFGIVNYAQKFQCG	ETAVAGILGY
Old 6	128 129 130	SHNMN	SISSSSYYADSVKG	EDWGYFD

[0682]

轻链可变区	SEQ ID NO CDR1, CDR2, CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
Old4	131,132,133	RMSQGIRSYLA	AASTLQS	QQYYSFPYT
Old5	134, 135, 136	RMSQGIRSYLA	AASTLQS	QQYYSFPYT
Old17	137,138, 139	RASQGISSWLA	AASSLQS	QQYNNSYPYT
Old19	140,141, 142	RASQGISSWLA	AASSLQS	QQYNNSYPRT
New102	143, 144, 145	RASQGISSWLA	AASSLQS	QQYNNSYPYT
Old6	146, 147, 148	RASQGISSDLA	DASSLES	QQFNSYPFT

[0683]

[0684] 实施例 5 从杂交瘤培养上清液纯化抗 IL-3R α 人类抗体

[0685] 在从实施例 3 中使用的含 IL-6 的 DMEM 培养基改变成 E-RDF 培养基 (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd.) 后, 培养杂交瘤。从培养上清液纯化抗体。抗体的纯化按照实施例 4 的描述进行。

[0686] 首先, 使产生人类抗 IL-3R α 单克隆抗体的杂交瘤适应于含有 10ng/ml IL-6 和

10% 胎牛血清 (FCS ; SIGMA) 的 eRDF 培养基 (KyokutoPharmaceutical Industrial Co., Ltd.)。接下来,使获得的杂交瘤适应于含有牛胰岛素 ($5 \mu\text{g/ml}$, GIBCO BRL)、人类转铁蛋白 ($5 \mu\text{g/ml}$, GIBCOBRL)、乙醇胺 (0.01mM , SIGMA)、亚硒酸钠 ($2.5 \times 10^{-5}\text{mM}$, SIGMA) 和 1% 低 IgG 的 FCS(HyClone) 的 eRDF 培养基 (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd.)。将该适应的杂交瘤在摇瓶中培养,并回收培养上清液。将回收的上清液通过 $10 \mu\text{m}$ 和 $0.2 \mu\text{m}$ 滤膜 (Gelman Sciences Inc.),以除去无用的物质例如杂交瘤等。通过与实施例 4 相同的方法从如此回收的上清液纯化抗体。

[0687] 实施例 6 使用纯化的抗 IL-3R α 人类抗体计算结合和解离常数

[0688] 使用基于表面等离子共振原理的分析仪 (Biacore, GE Healthcare, hereinafter GE), 分析纯化的抗 IL-3R α 抗体的结合和解离常数。简单来说, 将抗人类抗体或抗小鼠抗体固定化在 CM5 传感器尖部上, 然后向其施加抗 IL-3R α 人类或小鼠抗体以使其结合, 然后向其施加在实施例 2 中制备的可溶形式的 IL-3R α 蛋白, 并使用 Biacore 2000 观察结合和解离。在整个试验步骤中, 基本上使用 GE Healthcare 的用于计算结合和解离常数的试验方法。

[0689] 具体来说, CM5 (研究级) 用于传感器尖部 (均来自 GE)。首先, 通过向 CM5 尖部施加 400mM EDC(N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐) 与 100mM NHS(N-羟基琥珀酰亚胺) 的等量混合物, 使 CM5 尖部活化。接下来, 将人类抗体捕获试剂盒 (GE) 随附的针对人类抗体的抗体 (在后文中称为抗人类抗体的抗体) 用试剂盒随附的溶液稀释并施加于 CM5 尖部, 从而将所需量的抗人类抗体的抗体固定到 CM5 尖部上。对于用作对照的小鼠抗体来说, 将小鼠抗体捕获试剂盒 (GE) 随附的针对小鼠抗体的抗体 (在后文中称为抗小鼠抗体的抗体) 用试剂盒随附的溶液稀释并施加于 CM5 尖部, 从而将所需量的该抗体固定到 CM5 尖部上。接下来, 通过向其施加 1M 乙醇胺二盐酸盐将活化的尖部表面阻断并失活。通过到此为止的上述步骤, 完成了能够测量解离常数 K_D 的 CM5 传感器尖部的制备。

[0690] 接下来, 将每种抗 IL-3R α 抗体用 HBS-FP 缓冲液 (GE) 稀释以给出 $5 \mu\text{g/ml}$ 的浓度, 每个流动池施加一种抗体, 从而允许其与固定化的抗人类抗体的抗体或抗小鼠抗体的抗体结合。接下来, 向其施加可溶形式的 IL-3R α 蛋白。为了使结合的抗 IL-3R α 抗体与可溶形式的 IL-3R α 蛋白解离, 将人类抗体捕获试剂盒随附的 3M MgCl_2 或小鼠抗体捕获试剂盒随附的 pH 1.7 的甘氨酸-HCl, 以试剂盒随附的量施加。到此为止的步骤被当做一个步骤。通过使用两种或多种浓度的可溶形式的 IL-3R α 蛋白重复同样的步骤, 获得了用于计算结合和解离常数的数据 (传感器谱)。

[0691] 施加到对象的可溶形式的人类 IL-3R α 蛋白浓度, 按照实施例 2 中的描述通过测量 280nm 处的吸光值并将 1mg/ml 视为 1.40D 来计算。可溶形式的人类 IL-3R α 蛋白的分子量如下计算。对于人类 IL-3R α 蛋白的分子量来说, 已报道它包含 360 个氨基酸残基, 具有 6 个 N-型糖链结合位点, 并且分子量为 70KDa (《细胞因子实况手册》(The Cytokine Facts Book) 第二版, Academic Press)。因此, 可溶性人类 IL-3R α 蛋白的分子量, 通过从作为参考信息而知的 70KDa 中减除跨膜区和膜内区氨基酸的分子量, 并将得到的值加上 Flag 序列的氨基酸的分子量, 计算为约 63KDa 。

[0692] 在分析中, 使用 Biaevaluation 软件 (GE) 并参考 Biaevaluation 软件手册。具体来说, 通过基本上使用 1 : 1 Langmuir 结合反应模型和拟合执行力学分析的同时分析, 计

算了结合速率常数 (Ka) 和解离速率常数 (Kd), 并通过计算 Kd/Ka 来计算解离常数 KD 的值。

[0693] 结果显示在下面的表 2 中。

[0694] [表 2]

[0695]

抗体名称	Ka	Kd	K _D
人类抗体			
01d4	3. 88x10 ⁵	5. 15x10 ⁻⁴	1. 33x 10 ⁻⁹
01d5	7. 17x10 ⁵	4. 72x10 ⁻⁴	6. 58x10 ⁻¹⁰
01d17	2. 08x10 ⁵	2. 98x10 ⁻⁴	1. 43x10 ⁻⁹
01d19	1. 54x10 ⁵	4. 99x10 ⁻⁴	3. 24x10 ⁻⁹
New102	6. 02x10 ⁵	4. 80x10 ⁻⁴	7. 98x10 ⁻¹⁰
01d6	1. 71x10 ⁶	2. 15x10 ⁻⁵	1. 26x10 ⁻⁹
嵌合抗体			
7G3	2. 48x10 ⁵	4. 66x10 ⁻⁴	1. 88x10 ⁻⁹
小鼠抗体			
7G3	1. 68x10 ⁵	9. 52x10 ⁻⁵	5. 66x10 ⁻¹⁰
9F5	7. 13x10 ⁴	6. 5x10 ⁻⁵	9. 11x10 ⁻¹⁰
107D2. 08	4. 16x10 ⁵	2. 03x10 ⁻⁵	4. 88x10 ⁻⁸
AC145	7. 66x10 ⁴	4. 26x10 ⁻⁵	5. 57x10 ⁻⁸
L-16	8. 13x10 ⁵	4. 16x10 ⁻⁵	5. 12x10 ⁻⁹

[0696] 实施例 7 抗人类 IL-3R α 人类抗体的表位分析

[0697] (IL-3R α /GM-CSFR α 嵌合蛋白表达细胞的制备)

[0698] 为了执行 IL-3R α 抗体的表位分析, 将其中 IL-3R α 的一部分膜外区域被 GM-CSFR α 替换的嵌合蛋白表达在细胞中, 并分析每种抗 IL-3R α 抗体与细胞的结合活性。简单来说, 首先将 IL-3R α 分子和 GM-CSFR α 分子分成三个区域 (从上面提到的 N- 端起 A、B 和 C 结构域), 其次构建能够表达其中 IL-3R α 分子的每个 A、B 和 C 结构域分别被 GM-CSFR α 分子的相应结构域取代的分子的载体, 第三将它们强制表达在 HEK293F 细胞中, 第四, 通过流式细胞术观察每种用荧光染料标记的抗 IL-3R α 抗体是否与其结合。

[0699] (GM-CSFR/pEF6/Myc-HisC 质粒 DNA 的制备)

[0700] 通过 PCR 方法, 使用 KOD-Plus-Ver. 2(Toyobo Co., Ltd.) 从源自于脾脏的 cDNA(CLONTECH Human MTC Panel) 扩增了人类 GM-CSFR 受体 α 链(GM-CSFR α, CD 116) 的 cDNA。使用 GeneAmpPCR 系统 9700(Applied Biosystems) 作为 PCR 装置。对于 PCR 来说, 在 94°C 2 分钟的变性步骤后, 将 98°C 10 秒 -55°C 30 秒 -68°C 75 秒的三步反应执行 35 个循环。所使用的 PCR 引物如下。

[0701] hCD116Fw-MfeI :

[0702] 5' -CGGCAATTGCCACCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCT-3' (SEQ ID NO :80)

[0703] hCD116Rv-NotI :

[0704] 5' -ATTGCGGCCGCTCAGGTAAATTCCCTCACGG-3' (SEQ ID NO :81)

[0705] 对由此获得的 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳(TAE 缓冲液)。DNA 通过溴乙锭染色进行可视化。切下约 1.2kb 的条带, 并用 JETsorb 试剂盒 (Genomed, Bad Oeynhausen, 德国) 提取, 然后用 NotI 和 MfeI 消化。将 pEF6/Myc-HisC 质粒 DNA (Invitrogen) 用 EcoRI 和 NotI 消化。将每个 DNA 进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 并切下约 1.2kb 和约 6kb 的条带, 并使用 JETsorb 试剂盒 (Genomed, Bad Oeynhausen, 德国) 提取 DNA 分子。然后, 将 0.5 μl 源自 pEF6/Myc-HisC 质粒 DNA 的 DNA 溶液与 4 μl 源自 PCR 产物的 DNA 溶液混合, 并使用 TaKaRa 连接试剂盒 (TAKARA BIO INC.) 进行连接。对于转化来说, 将连接样品和 DH5 α 感受态细胞混合并铺在 LB 平板上。使用 LA Taq (TAKARA BIO INC.), 通过直接菌落 PCR 进行插入检查。对于 PCR 来说, 在 94°C 5 分钟的变性步骤后, 将 94°C 30 秒 -55°C 30 秒 -72°C 2 分钟的三步反应执行 40 个循环, 然后执行 99°C 30 分钟的处理。

[0706] 使用的 PCR 引物如下。

[0707] hCD116Fw-MfeI :

[0708] 5' -CGGCAATTGCCACCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCT-3' (SEQ ID NO :82)

[0709] hCD116Rv-NotI :

[0710] 5' -ATTGCGGCCGCTCAGGTAAATTCCCTCACGG-3' (SEQ ID NO :83)

[0711] 对由此获得的 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳(135V, 15 分钟, TAE 缓冲液)。DNA 通过溴乙锭染色进行可视化。使用可以从中获得约 1.2kb 扩增产物的菌落, 通过直接测序方法测定核苷酸序列。在序列样品的反应中, 使用了 BigDye (R) Terminator v3.1 循环测序试剂盒 (Applied Biosystems) 和 GeneAmp PCR 系统 9700(Applied Biosystems) (它们用于本说明书中的所有 DNA 序列分析中)。使用的 PCR 引物如下。

[0712] hCD116Rv-NotI : 5' -ATTGCGGCCGCTCAGGTAAATTCCCTCACGG-3' (SEQ ID NO :85)

[0713] hCD116SeqFw1 : 5' -TGAAGTGTACCTGGCGAGG-3' (SEQ ID NO :86)

[0714] hCD116SeqFw2 : 5' -CTGGCACGGAAAACCTACTG-3' (SEQ ID NO :87)

[0715] hCD116SeqRv1 : 5' -CCTGAATTGGATAAAGCAG-3' (SEQ ID NO :88)

[0716] ABI 3700XL DNA 分析仪 (Applied Biosystems) 被用作序列分析装置 (其使用在本说明书中的所有 DNA 序列分析中)。通过选择经 PCR 没有发现氨基酸序列突变的菌落, 并通过 Largeprep 方法 (QIAGEN) 提取质粒 DNA。

[0717] (IL-3RA-FLAG/pEGFP-N1 的制备)

[0718] 通过 PCR 扩增人类 IL-3R α (CD123) 的全长 cDNA, 并将 FLAG 标签连接到其下游 (IL-3RA-FLAG/pEGFP-N1)。

[0719] 使用 hCD123/pEGFP-N1 质粒 DNA 作为模板并使用 LA Taq (TAKARA BIO INC.)，通过 PCR 方法扩增了人类 IL-3RA cDNA。对于 PCR 来说，在 95°C 30 秒的变性步骤后，将 95°C 15 秒 -56°C 15 秒 -72°C 60 秒的三步反应执行 10 个循环，然后执行 2 分钟的延伸反应。使用的 PCR 引物如下。

[0720] T7 :5' -TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO :89)

[0721] hCD123-C-FLAG-R1 :

[0722] 5' -TCGTCATCGCCTGTAGTCAGTTCTGCACGACCTGTA-3' (SEQ ID NO :90)

[0723] 使用 2 μl PCR 产物作为模板，使用 LA Taq (TAKARA BIO INC.) 通过 PCR 方法进行扩增。对于 PCR 来说，在 95°C 1 分钟的变性步骤后，将 95°C 15 秒 -56°C 15 秒 -72°C 60 秒的三步反应执行 15 个循环，然后执行 72°C 2 分钟的延伸反应。使用的 PCR 引物如下。

[0724] IL-3R α Fw :

[0725] 5' -CGGCAATTGCCACCATGGCCTCCTTGGCTCAC-3' (SEQ ID NO :91)

[0726] C-FLAG-NotR2 :

[0727] 5' -AAAAGCGGCCGCTCACTTGTGTCATCGCCTTAGTC-3' (SEQ ID NO :92)

[0728] 对由此获得的 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (135V, 15 分钟, TAE 缓冲液)。DNA 通过溴乙锭染色进行可视化。切下约 1kb 的条带，并将 DNA 用 Wizard SV 凝胶和 PCR Clean-Up 系统提取。将提取到的全部量的 DNA 用 MfeI 和 NotI 消化，并进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (135V, 15 分钟, TAE 缓冲液)。DNA 通过溴乙锭染色进行可视化。切下约 1kb 的条带，并将 DNA 用 Wizard SV 凝胶和 PCR Clean-Up 系统提取。然后，将 5 μl 由此提取的 IL-3RA-FLAG cDNA 与 1 μl 已用 EcoRI 和 NotI 切开的 pEGFP-N1 质粒 DNA 混合，并使用 TaKaRa 连接试剂盒 (TAKARA BIO INC.) 进行连接。对于转化来说，将连接样品和 DH10B 感受态细胞混合并铺在 LB 平板 (含卡那霉素) 上。使用 LA Taq (TAKARA BIO INC.)，通过直接菌落 PCR 进行插入检查。对于 PCR 来说，在 95°C 1 分钟的变性步骤后，将 95°C 15 秒 -56°C 15 秒 -72°C 60 秒的三步反应执行 35 个循环，然后执行 72°C 2 分钟的延伸反应。使用的 PCR 引物如下。

[0729] pEGFP-N1-Fw :5' -CGTGTACGGTGGGAGGTCTA-3' (SEQ ID NO :93)

[0730] pEGFP-N1-Re :5' -TTTATGTTCAGGTTCAAG-3' (SEQ ID NO :94)

[0731] 通过 Miniprep 方法从获得约 0.8kb 扩增产物的菌落提取质粒 DNA。

[0732] 通过 DNA 序列分析发现，纯化的 IL-3RA-FLAG/pEGFP-N1 质粒 DNA 不具有由 PCR 引起的突变，并且其中存在 FLAG 标签。在 DNA 序列分析中使用的引物如下。

[0733] pEGFP-N1-Fw :5' -CGTGTACGGTGGGAGGTCTA-3' (SEQ ID NO :95)

[0734] pEGFP-N1-Re :5' -TTTATGTTCAGGTTCAAG-3' (SEQ ID NO :96) (IL-3R α 的结构域作图)

[0735] 作为 BLASTP 搜索 (数据库 :Protein Data Bank 蛋白 (pdb)) 的结果，IL-13 受体 α 链 (IL-13R α) 以最高分值命中 (PDB :3BPNC ;IL4-IL4r-IL13ra 三元复合物 C 链的晶体结构)。使用从蛋白数据库 (Protein Data Bank) 下载的 PDB 文件和图形软件 RasMol，将 IL-13R α 蛋白的三维结构可视化，并分开构成细胞外区域的三个结构域 (上面提到的 A、B 和 C 结构域)。使用多序列比对软件 MUSCLE 对 IL-3R α 的氨基酸序列和 IL-13R α 的氨基酸序列进行比较，并且也将 IL-3R α 细胞外区域分成三个结构域。此外，以同样方式对

GM-CSFR α 和 IL-3R α 进行比较，并将 GM-CSFR α 细胞外区域也分成三个结构域。

[0736] 为了指派抗人类 IL-3R α 人类抗体的表位，制备了其中 IL-3R α 的三个结构域中的每个逐一被 GM-CSFR α 的所述结构域取代的蛋白并在细胞膜上表达，并验证了抗体结合是否存在。

[0737] 使用 IL-3RA-FLAG/pEGFP-N1 质粒 DNA 作为模板，使用 Prime STAR® HS DNA 聚合酶 (TAKARA BIO INC.) 通过 PCR 方法进行了扩增。对于 PCR 来说，将 98°C 10 秒 -68°C 6 分钟的两步反应执行 25 个循环。所使用的 PCR 引物如下。

[0738] A 结构域缺陷型：

[0739] CD123R11pEGFPN1 :AAAGGTACCGAATTCTGAAGCTTGAGCTC (SEQ ID NO :97)

[0740] CD123F11 :AAAGGTACCGGGAACGCCTGGGCAGGT (SEQ ID NO :98)

[0741] B 结构域缺陷型：

[0742] CD123R12-2 :AAAGGTACCACTGTTCTCAGGGAAAGAGGAT (SEQ ID NO :99)

[0743] CD123F12-2 :AAAGGTACCCAGATTGAGATATTAACCTCC (SEQ ID NO :100)

[0744] C 结构域缺陷型：

[0745] CD123R13 :AAAGGTACCTGAAAAGACGACAAACTT (SEQ ID NO :101)

[0746] CD123F13 :AAAGGTACCTCGCTGCTGATCGCGCTG (SEQ ID NO :102)

[0747] 对由此获得的 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (135V, 15 分钟, TAE 缓冲液)。DNA 通过溴乙锭染色进行可视化。在证实了扩增之后，使用 Wizard SV 凝胶和 PCR Clean-Up 系统对其进行纯化。将由此获得的 DNA 用 KpnI 和 DpnI 消化，使用 Wizard SV 凝胶和 PCRClean-Up 系统进行纯化，并使用 TaKaRa 连接试剂盒进行连接。对于转化来说，将连接样品与 DH10B 感受态细胞混合，并铺于 LB 平板 (含卡那霉素) 上。使用 LA Taq (TAKARA BIO INC.)，通过直接菌落 PCR 进行插入检查。对于 PCR 来说，在 95°C 1 分钟的变性步骤后，将 95°C 15 秒 -56°C 15 秒 -72°C 40 秒的三步反应执行 38 个循环，然后执行 72°C 2 分钟的延伸反应。使用的 PCR 引物如下。

[0748] pEGFP-N 1-Fw :5' -CGTGTACGGTGGGAGGTCTA-3' (SEQ ID NO :103)

[0749] pEGFP-N 1-Re :5' -TTTATGTTTCAGGTTTCAGG -3' (SEQ ID NO :104)

[0750] 对由此获得的 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (135V, 15 分钟, TAE 缓冲液)。DNA 通过溴乙锭染色进行可视化。通过 Miniprep 方法从获得约 1kb 扩增产物的菌落提取质粒 DNA。

[0751] 使用 GM-CSFR/pEF6/Myc-HisC 质粒 DNA 作为模板，使用 Prime STAR® HS DNA 聚合酶 (TAKARA BIO INC.) 通过 PCR 方法进行了扩增。对于 PCR 来说，将 98°C 10 秒 -68°C 30 秒的两步反应执行 25 个循环。所使用的 PCR 引物如下。

[0752] A 结构域插入：

[0753] GM-CSFRF11 :AAAGGTACGCCACCATGCTTCTCCTGGTGACA (SEQ ID NO :105)

[0754] GM-CSFRR11 :AAAGGTACCTGAATTGGATAAAGCAG (SEQ ID NO :106)

[0755] B 结构域插入：

[0756] GM-CSFRF12 :AAAGGTACCGGAAGGGAGGGTACCGCT (SEQ ID NO :107)

[0757] GM-CSFRR12 :AAAGGTACCCTTGTGTCCAAAAGTGA (SEQ ID NO :108)

[0758] C 结构域插入：

[0759] GM-CSFRF13 :AAAGGTACCAAAATAGAACGATTCAAC (SEQ IDNO :109)

[0760] GM-CSFRR13 :AAAGGTACCAATGTACACAGAGCCGAG (SEQ ID NO :110)

[0761] 对由此获得的 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (135V, 15 分钟, TAE 缓冲液)。DNA 通过溴乙锭染色进行可视化。在证实了扩增之后, 使用 Wizard SV 凝胶和 PCR Clean-Up 系统对其进行纯化。

[0762] 将由此获得的 DNA 用 KpnI 消化, 使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (QIAGEN) 进行纯化, 与其中相应结构域被缺失 (已经用 KpnI 切下并纯化) 的 IL-3RA-FLAG/pEGFP-N1 质粒 DNA 混合, 并使用 TaKaRa 连接试剂盒进行连接。对于转化来说, 将连接样品与 DH10B 感受态细胞混合, 并铺于 LB 平板 (含卡那霉素) 上。使用 LA Taq (TAKARA BIOINC.), 通过直接菌落 PCR 进行插入检查。对于 PCR 来说, 在 95°C 1 分钟的变性步骤后, 将 95°C 15 秒 -56°C 15 秒 -72°C 40 秒的三步反应执行 38 个循环, 然后执行 72°C 2 分钟的延伸反应。使用的 PCR 引物如下。

[0763] pEGFP-N1-Fw :5' -CGTGTACGGTGGGAGGTCTA-3' (SEQ ID NO :111)

[0764] pEGFP-N1-Re :5' -TTTATGTTTCAGGTTCAAGG-3' (SEQ IDNO :112)

[0765] 对由此获得的 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (135V, 15 分钟, TAE 缓冲液)。DNA 通过溴乙锭染色进行可视化。通过 Miniprep 方法从获得约 1kb 扩增产物的菌落提取质粒 DNA。

[0766] (用荧光染料标记抗 IL-3R α 人类抗体)

[0767] 为了测定抗人类 IL-3R α 人类抗体的结合活性, 将每种人类抗体用荧光染料 AlexaFlour488 (Molecular Probe, Invitrogen) 进行标记。对于标记方法来说, 按照由 Invitrogen 提供的手册来进行, 对于检测来说, 荧光通过流式细胞术 (FACS Calibur, BD Biosciences) 的 FL1 来检测。

[0768] 具体来说, 向溶解在 PBS 中的抗体溶液加入 1/10 体积的 1M Na₂CO₃。接下来, 将手册中描述的预定量的抗体溶液加入容器, 所述容器含有 AlexaFlour488 粉末并已向其中加入四氟苯基 (TFP), 并允许在搅拌下、在室温下、在暗处反应 1 小时。接下来, 在将凝胶过滤柱 (NAP-10 等, GE Healthcare) 用 PBS 充分替换后, 向其加入与 AlexaFlour488 反应的抗体溶液, 同时将抗体溶液的缓冲液用 PBS 替换。获得显示出黄绿色的抗体级分。对于通过上述方式获得的 AlexaFlour488 标记的抗人类 IL-3R α 抗体来说, 使用分光光度计测量 280nm 和 494nm 波长处的吸光值 (分别为 A₂₈₀ 和 A₄₉₄), 并通过下列计算公式计算抗体浓度。

[0769] 抗体浓度 (mg/ml) = (A₂₈₀-A₄₉₄ × 0.11) / 1.4

[0770] (使用标记的抗 IL-3R α 抗体对 IL-3R α /GM-CSFR α 嵌合蛋白表达细胞进行流式细胞术分析)

[0771] HEK293T 细胞 (ATCC CRL 1268) 被用于制备 IL-3R α /GM-CSFR α 嵌合蛋白表达细胞。使用 293Fectin (Invitrogen), 将上文中获得的质粒 DNA 作为表达载体导入 HEK293T 中。在导入两天后, 使用摇床, 在 5% CO₂ 和 37°C 条件下对向其导入表达载体的 HEK293T 进行培养, 将获得的蛋白用于流式细胞术分析。

[0772] 将嵌合蛋白表达细胞的 100,000 至 1,000,000 个细胞, 与浓度为 1 μg/ml 的 AlexaFlour488 标记的人类抗体或可商购的 FITC- 标记的抗 IL-3R α 小鼠抗体 (7G3 或 9F5; 都来自 BD Biosciences, 6H6 :Acrys Antibodies, AC145 :Milteny Biotech, 107D2.08 :

Dendritics), 在冰上反应 30 分钟。使用染色培养基 (增补有 2% 胎牛血清、2mM EDTA 和 0.05% NaN₃ 的 Dulbecco's PBS) 稀释抗体和细胞。接下来, 将与抗体反应的细胞用染色培养基洗涤三次, 并通过流式细胞术证实标记的抗体是否与细胞结合。

[0773] 结果显示在图 1 和 2 中。只有在表达其中 A 结构域被 GM-CSFR α 取代的蛋白的细胞中, 7G3、9F5、6H6 和 AC145 抗体的反应才消失。另一方面, 在表达其中 B 结构域被 GM-CSFR α 取代的蛋白的细胞中, 01d4、01d5、01d19 和 New102 抗体的反应消失。对于 01d19 来说, 它与表达其中 A 结构域被 GM-CSFR α 取代的蛋白的细胞的反应, 也消失。对于 01d6 和 107D2.08 来说, 它们与表达 B 结构域和 C 结构域被取代的蛋白的细胞的反应消失。

[0774] 根据上述结果, 显示出可能 7G3、9F5、6H6 和 AC145 识别 A 结构域, 01d4、01d5 和 New102 识别 B 结构域, 01d19 识别 A 结构域和 B 结构域, 而 01d6 和 107D2.08 识别 B 结构域和 C 结构域。因此, 各种抗 IL-3R α 抗体与 IL-3R α 的 A 至 C 结构域的反应性如下表 3 所示。

[表 3]

	7G3	9F5	6H6	AC145	107D2.08	Old19	New102	Old4	Old5	Old6	Old28
无取代	++	++	++	++	++	-	+	++	++	++	++
A 结构域取代	-	-	-	++	++	-	+	+	+	+	+
B 结构域取代	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C 结构域取代	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++

[0776] 实施例 8 抗 IL-3R α 抗体的 IL-3 信号传导阻断活性的分析

[0777] 为了检查如此获得的 IL-3R α 抗体是否抑制 IL-3 信号传导, 使用依赖于 IL-3 或

GM-CSF 生长的细胞系 TF-1 (DMSZ no. ACC344)。具体来说, 将 TF-1 细胞用含有 1ng/ml IL-3 和 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基 (TF-1 培养基) 稀释, 并分发在 96 孔板中。此外, 将各种 IL-3R α 抗体和作为阴性对照抗体的源自于人类血清的 IgG 用 TF-1 培养基稀释, 转移到 96 孔板并添加, 使得每种抗体的终浓度提供了 10 或 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的终浓度。作为对照, 制备了无细胞的单独培养基的孔和加入了 TF-1 细胞的孔。在 37°C 和 5% CO₂ 环境下培养三天后, 向其加入与培养基等量的 CelltiterGlo (Promega)。静置 30 分钟后, 使用读板器 (ARBO, Perkin Elmer) 测定发射。

[0778] 对于生长抑制率来说, 进行了下面的计算。

[0779] (样品的发射 - 无细胞的孔) / (只加入 TF-1 细胞的孔 - 无细胞的孔) $\times 100 (\%)$

[0780] 对于可商购的抗体 9F5、6H6 和 107D2.08 来说, 出于用 PBS 替换缓冲液的目的, 使用了 NAP-5 柱。具体来说, 将 0.5ml 抗体溶液加到用 PBS 充分替换的 NAP-5 柱上。接下来, 通过加入 1.0ml PBS, 回收从柱中排出的溶液。通过使用孔径为 0.22 μm 的膜滤器 MILLEX-GV (Millipore) 进行过滤除菌, 获得了溶解在作为溶剂的 PBS 中的抗体。

[0781] 结果显示在图 5 中。发现抗体 01d4、抗体 01d5、抗体 01d17、抗体 01d19、抗体 New102、抗体 9F5 和抗体 6H6 不抑制 IL-3 信号传导, 另一方面, 发现抗体 7G3、抗体 01d6 和抗体 107D2.08 抑制 IL-3 信号传导。

[0782] 实施例 9 检测使用抗 IL-3R α 人类抗体对集落形成能力的影响

[0783] 进行了集落测定以发现各种 IL-3R α 抗体对造血前体细胞的集落形成能力是否具有影响。

[0784] 简单来说, 将 400 个细胞 / ml 的源自脐带血的 CD34 阳性细胞 (AllCells) 加入到增补有促红细胞生成素、IL-3、G-CSF 和干细胞因子的 Methocult 培养基中 (Stem Cell Technologie), 并在 14 天至 16 天后测量集落的数量。通过将集落分成粒细胞 / 巨噬细胞系统集落 (CFU-GM)、红细胞类系统集落 (BFU-E) 和混合集落 (CFU-Mix 或 CFU-GEMM) 来对集落计数。对于集落类型的分类方法, 使用由 Stem Cell Technologie 提供的手册或各种血液学教科书作为参考。

[0785] 对于抗体来说, 使用了每种嵌合 7G3 抗体作为在实施例 8 中其 IL-3 信号传导阻断活性被发现的抗体, New102 抗体作为没有发现阻断活性的抗体。

[0786] 结果显示在图 6 中。在其中添加了促红细胞生成素、IL-3、G-CSF 和干细胞因子的集落测定中, 通过添加具有 IL-3 信号传导阻断活性的 7G3 抗体, 发现集落数量的减少和集落尺寸的减小。另一方面, 通过添加 New102 抗体, 没有发现集落数量的变化。根据该结果, 认为当 IL-3 信号传导没有被抑制或阻断时, 对正常造血功能的影响小, 并且几乎没有副作用。

[0787] 实施例 10 在带肿瘤小鼠模型中使用抗 IL-3R α 人类抗体的抗肿瘤效果

[0788] 将如此获得的抗 IL-3R α 抗体给药于带肿瘤小鼠模型, 并检测其抗肿瘤效果。简单来说, 将白血病细胞通过尾静脉转移到小鼠中, 在第二天向其给药抗体, 并在约 3 周后, 对从小鼠骨中收集到的骨髓细胞中的白血病细胞的数量进行计数。

[0789] 具体来说, 将 0.01ml 当量的抗 asialoGM1 抗血清 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 用生理盐水稀释并给药于 SCID 小鼠 (CLEAJapan Inc.) (第 -1 日)。在第二天, 将急性骨髓性白血病细胞系 MOLM13 (ATCC) 的 500,000 个细胞通过尾静脉植入

(第 0 日)。在第二天(第 1 日),腹膜内给药 10 μg 抗 IL-3R α 抗体。在第 21 日处死小鼠,从大腿骨和胫骨收集骨髓,并用 FITC- 标记的人类 CD45 抗体和 PE- 标记的抗 IL-3R α 抗体(二者都来自于 BD Biosciences)对骨髓细胞进行染色。具体来说,向约 1,000,000 个骨髓细胞加入抗体以给出每种抗体 1 μg/ml 的终浓度,并允许其在暗处在冰上静置 30 分钟。然后,将用抗体染色的细胞用染色培养基(通过向 PBS(GIBCO) 添加 2% 胎牛血清、0.05% 叠氮化钠和 2mM EDTA 而制备的溶液)清洗三次,并通过流式细胞术(FACSCalibur, BD Biosciences)检测人类 CD45 阳性和人类 IL-3R α 阳性细胞。此外,在收集小鼠骨髓时,使用 TURK 溶液对骨髓细胞的数量进行计数。此外,通过在上面提到的抗体染色时同时加入定量荧光珠(Flow-Count, Beckman Coulter),对一根大腿骨中包含的 MOLM13 细胞的绝对数量进行计数。

[0790] 结果显示在图 7 中。发现在给药每种抗体的组中,与没有给药抗体的介质组相比,大腿骨骨髓中 MOLM13 细胞的数量明显降低。该结果显示出抗 IL-3R α 抗体有可能用作白血病的治疗药剂。

[0791] 实施例 11 抗 IL-3R α 抗体对 IL-3R α 表达细胞的毒性试验

[0792] 为了测量抗体介导的细胞毒性(抗体依赖性细胞毒性,在后文中称为 ADCC),在抗体存在下使用人类外周血单核细胞(外周血单核细胞,在后文中称为 PBMC)作为效应细胞进行了试验。

[0793] 从健康志愿者收集外周血,并向其加入抗凝剂。将血液静置于 Ficoll-Plaque Plus(GE Healthcare) 上,使得界面不被扰乱,并使用大型离心机(CF9RX, Hitachi, Ltd.)以 2,000rpm 离心 20 分钟。收集含有细胞的中间层,并用 PBS 清洗,通过以 900rpm 离心 20 分钟除去血小板,并使用源自外周血的单核细胞(PBMC)作为效应细胞。

[0794] 此外,在 37 °C 和 5% CO₂ 条件下使用含有 10% 胎牛血清并添加人类 IL-2(Peprotech)至终浓度为 4ng/ml(40IU/ml 以上)的 RPMI 1640 培养基培养过夜的 PBMC,也用作 ADCC 测定的效应细胞。

[0795] 简单来说,在方法中,将靶细胞在抗体和 PBMC 存在下培养,并测量特定靶细胞被抗体的裂解率。

[0796] 使用下面的“Colon-26/hCD123ADCC 测定方法”测量裂解率。具体来说,通过将作为靶细胞的 IL-3R α 强制表达 Colon-26 细胞在 37 °C 下、在 5% CO₂ 存在下与用放射性同位素⁵¹Cr 标记的铬酸钠(Na₂⁵¹CrO₄, Perkin Elmer, NEZ030S)一起培养 1 小时,将靶细胞用⁵¹Cr 标记。将标记的靶细胞清洗三次以除去过量的⁵¹Cr,然后悬浮在培养基中,并转移到事先已经添加有各种浓度的抗体的 96 孔板中。将 PBMC 悬浮在培养基中,并转移到已添加靶细胞和抗体的板中(效应细胞 / 靶细胞比率 = 100)。作为抗体,使用了实施例 4 中纯化的抗 IL-3R α 抗体,并使用源自人类血清的 IgG(SIGMA)作为阴性对照。作为各种对照,制备了只有培养基和靶细胞的孔、只有 PBMC 和靶细胞的孔和增补有 Triton-X 的孔。将装填有混合溶液的 96 孔板在 5% CO₂ 存在下、在 37 °C 下培养 4 小时。

[0797] 在将板离心后,将 50 μl 每种上清液转移到含有闪烁剂的 96 孔板中(Lumaplate-TM, Perkin Elmer),并在 56 °C 下干燥 2 小时。将板密封(TopSeal-A, Packard),并使用微孔板读板器进行测量(TopCount, Perkin Elmer)。

[0798] 对于靶细胞的裂解率来说,测量由于细胞裂解而释放到培养基中的铬酸钠中的

⁵¹Cr 的量。也就是说,通过从来自每个孔的值中减去未添加抗体的孔的值所获得的值,除以从添加 Triton-X 的孔(特异的裂解率被设定为 100%)的值中减去未添加抗体的孔的值所获得的值,来计算“特异的裂解率”。

[0799] 结果显示在图 8 和图 9 中。在每种 IL-3R α 抗体中,发现对靶细胞的 ADCC 活性依赖于浓度。此外,这些抗体与作为对照的嵌合 7G3 抗体相比,显示出更高的 ADCC 活性。这显示 IL-3R α 抗体对表达 IL-3R α 的细胞表现出高 ADCC 活性,并在其中药效是除去 IL-3R α 阳性细胞的治疗中具有应用可能性。

[0800] 实施例 12 抗 IL-3R α 抗体对猴 IL-3R α 蛋白的亲和性试验

[0801] 关于由此获得的抗人类 IL-3R α 抗体与猴 IL-3R α 的结合的存在与否,使用流式细胞术分析了在实施例 7 中制备的抗人类 IL-3R α 抗体是否与实施例 1 中制备的食蟹猴 IL-3R α 强制表达细胞结合。

[0802] 具体来说,将猴 IL-3R α 强制表达 L929 细胞的 2×10^5 个细胞与 $100 \mu\text{l}$ 、使得终浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$ 的抗人类 IL-3R α 抗体,在 4°C 下反应 30 分钟。使用的抗体是抗二硝基苯酚(DNP) 人类 IgG1 抗体(由本公司制造)和 01d4、01d5、01d17、01d19、New102 和嵌合 7G3 抗体。然后,使用染色培养基(增补有 2% 胎牛血清、2mM EDTA 和 0.05% NaN3 的 Dulbecco's PBS) 将其清洗三次。接下来,将 PE- 标记的抗人类抗体 λ 链特异性抗体(Southern Bio) 在染色培养基中,以 $1 \mu\text{g/ml}$ 的终浓度进行反应,并以相同方式用染色培养基清洗 3 次。最后,将细胞与染色培养基混合,并通过流式细胞术分析 PE 阳性是否存在。

[0803] 结果显示在图 10 中。发现抗人类 IL-3R α 人类抗体、01d4、01d5、01d17、01d19、New102 和嵌合 7G3 抗体与食蟹猴 IL-3R α 反应。

[0804] 实施例 13 抗人类 IL-3R α 人类抗体的详细表位分析

[0805] (IL-3R α /GM-CSFR α 嵌合蛋白表达细胞的制备)

[0806] 为了对 IL-3R α 抗体进行进一步详细表位分析,将其中比 IL-3R α 膜外区结构域更小的区域被 GM-CSFR α 替代的嵌合蛋白表达在细胞中,并分析每种抗 IL-3R α 抗体对细胞的亲和性。简单来说,首先,根据 IL-3R α 分子的三维结构预测来确定被认为位于外部的区域,其次,分别构建表达其中小的区域被 GM-CSFR α 替代的 IL-3R α 分子的载体,第三,将它们在 HEK293F 细胞中强制表达,第四,通过流式细胞术观察用荧光染料标记的每种抗 IL-3R α 抗体是否与其结合。

[0807] (IL-3R α 的结构域作图)

[0808] 在根据实施例 7 分出的 3 个结构域中,选择了被获得的抗体 01d19 和 New102 所识别的 A 和 B 结构域,并对其进行详细分析。根据 IL-4 受体 α 链(IL-4R α ,CD124) 的三维结构(PDB :3BPNC; 链 C, IL4-IL4r-IL3ra 三元复合物的晶体结构),使用 SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>) 对 IL-3R α 的三维结构进行同源性模拟。预测的 IL-3R α 蛋白结构使用图形软件 RasMol(<http://rasmol.org/>) 进行可视化,并确定了被认为位于 IL-3R α 分子外部氨基酸区域的 7 个区域(图 4)。

[0809] 为了指定抗人类 IL-3R α 人类抗体的表位,制备了其中 GM-CSFR α 的相应区域被上述分出的 IL-3R α 的 6 个区域替代的蛋白并将其表达在细胞膜上,并确定抗体的结合是否存在。

[0810] 使用 IL-3RA-Flag/pEGFP-N1 质粒 DNA 作为模板,通过使用 Prime STAR® HS DNA

聚合酶 (TAKARA BIO INC.) 的 PCR 方法进行扩增。对于 PCR 反应来说, 将 98°C 10 秒–68°C 5 分钟的两步反应执行 25 个循环。使用的 PCR 引物如下。

- [0811] 区域 1 缺陷 :
- [0812] CD123-Fw21 :CGTGGAACCCGCAGTGAACAAATAGCTATT (SEQ ID NO :149)
- [0813] CD123-Re21 :ACTCTGTTCTTTAACACACTCGATATCG (SEQ ID NO :150)
- [0814] 区域 2 缺陷 :
- [0815] CD123-Fw22 :CTTTATCAAATAACAGTGGGAAGCCTTG (SEQID NO :151)
- [0816] CD123-Re22 :CAGTTCTGTTGGAATGGTGGGTGCCACT (SEQ ID NO :152)
- [0817] 区域 3 缺陷 :
- [0818] CD123-Fw23 :
- [0819] AGGGAGGGTACCGGTGCGGAGAATCTGACCTGCT (SEQ ID NO :153)
- [0820] CD123-Re23 :TCCTGAATTGGATAGAAGAGGATCCACGTGG (SEQ ID NO :154)
- [0821] 区域 4 缺陷 :
- [0822] CD123-Fw24 :GGTCCGACGGCCCCCGCGGACGTCCAGTA (SEQ ID NO :155)
- [0823] CD123-Re24 :CCTCGCCCAGGTACAGCTCAAGAAATCCACGT (SEQ ID NO :156)
- [0824] 区域 5 缺陷 :
- [0825] CD123-Fw25 :ACGGAACCAGCGCAGCCTCGGTATCCCT (SEQ ID NO :157)
- [0826] CD123-Re25 :TAACCAGAAAGTGGGAACCTTGAGAACCC (SEQ ID NO :158)
- [0827] 区域 6 缺陷 :
- [0828] CD123-Fw26 :TCTTGATTCAATTGTCGTCTTCACA (SEQ ID NO :159)
- [0829] CD123-Re26 :ATTGGATGCCGAAGGCTGCGCTCTGCC (SEQ ID NO :160)
- [0830] 将如此获得的 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (135V, 15 分钟, TAE 缓冲液)。DNA 通过溴化乙锭染色进行可视化。在证实了扩增之后, 使用 Wizard SV 凝胶和 PCR Clean-Up 系统进行纯化。使用多核苷酸激酶 (New England Biolabs) 对如此获得的 DNA 进行磷酸化, 并用乙醇沉淀, 然后使用 TaKaRa 连接试剂盒将其一部分进行连接反应。关于转化, 将连接样品与 DH10B 感受态细胞混合, 并铺在 LB 平板 (含卡那霉素) 上。通过 Miniprep 方法从如此获得的菌落提取质粒 DNA, 用 XhoI 和 NotI 消化, 并对插入片段进行验证。
- [0831] (使用标记的抗 IL-3R α 抗体对 IL-3R α /GM-CSFR α 嵌合蛋白表达细胞进行流式细胞术分析)
- [0832] 使用 HEK293T 细胞来制备 IL-3R α /GM-CSFR α 嵌合蛋白表达细胞。将上述获得的质粒 DNA 作为表达载体导入 HEK293T 中。将导入有表达载体的 HEK293T 在 5% CO₂ 和 37°C 的环境下培养, 并在导入后 2 天用于流式细胞术分析。
- [0833] 将浓度为 1 μ g/ml 的每种 AlexaFlour488 标记的人类抗体或可商购的 FITC 标记的抗 IL-3R α 小鼠抗体 (7G3 和 9F5 :都从 BD Biosciences 获得, 6H6 :从 Acrys Antibodies 获得), 与嵌合蛋白表达细胞的 100,000 至 1,000,000 个细胞在冰上反应 30 分钟。使用染色培养基 (含有 2% 胎牛血清、2mM EDTA 和 0.05% NaN₃ 的 Dulbecco's PBS) 稀释抗体和细胞。接下来, 将与每种抗体反应的细胞用染色培养基洗涤三次, 并通过流式细胞术证实标记的抗体是否与细胞结合。
- [0834] 结果显示在图 3 中。只有在其中区域 1 被 GM-CSFR α 替换的蛋白表达细胞的情况

下,抗体 c7G3 的反应才消失。在其中 A 结构域中的区域 2 和区域 3 以及 B 结构域中的区域 5 和区域 6 被 GM-CSFR α 替换的蛋白表达细胞的情况下,01d19 的反应消失。在其中 B 结构域中的区域 5 和区域 6 被 GM-CSFR α 替换的蛋白表达细胞的情况下,New102 的反应消失。

[0835] 根据上述结果,显示了有可能抗体 01d19 识别 A 结构域的区域 2 和 3 和 B 结构域的区域 5 和 6,抗体 New102 识别 B 结构域的区域 5 和 6。上述结果概述为表 4。

[0836] [表 4]

[0837]

区域 (结构域)	替换序列	7G3	9F5	6H6	01d19	New102
区域 1(A)	55-DADYSMP-61	-	++	++	++	++
区域 2(A)	91-STWLFPE-98	++	++	++	-	++
区域 3(A-B)	97-PENSGKPWA-104	++	++	++	-	++
区域 4(B)	122-CSWAVGPG-128	++	++	++	++	++
区域 5(B)	182-ILVRGRS-188	++	++	++	-	-
区域 6(B)	192-GIPCTDK-198	++	++	++	-	-

[0838] 工业实用性

[0839] 根据本发明,提供了针对人类 IL-3R α 蛋白(另一个名称:人类 CD123)的抗体,以及包含人类 IL-3R α 抗体作为活性成分的用于髓细胞性恶性肿瘤、特别是急性骨髓性白血病(AML)的治疗药剂和诊断药剂。

[0840] 序列公开文本名单

- [0841] SEQ ID NO :3 :IL-3R α _Fw 引物
- [0842] SEQ ID NO :4 :IL-3R α _Re 引物
- [0843] SEQ ID NO :5 :IL-3R α _seqF1 引物
- [0844] SEQ ID NO :6 :插入片段 (MfeI 至 NotI)
- [0845] SEQ ID NO :7 :Rhe123Fw1 引物
- [0846] SEQ ID NO :8 :Rhe123Rv1 引物
- [0847] SEQ ID NO :9 :T7 引物
- [0848] SEQ ID NO :10 :SP6 引物
- [0849] SEQ ID NO :11 :食蟹猴 (Macaca fascicularis) IL-3R α 的插入片段 (MfeI 至 NotI)
- [0850] SEQ ID NO :12 :恒河猴 (Macaca mulatto) IL-3R α 的插入片段 (MfeI 至 NotI)
- [0851] SEQ ID NO :13 :hIL-3R α sol-FLAG-NotI 引物
- [0852] SEQ ID NO :14 :插入片段 (MfeI 至 NotI)
- [0853] SEQ ID NO :15 :hh-6 引物
- [0854] SEQ ID NO :16 :hh-3 引物
- [0855] SEQ ID NO :17 :hh-4 引物

- [0856] SEQ ID NO :18 :01d4 重链特异性引物 Fw
- [0857] SEQ ID NO :19 :01d4 重链特异性引物 Rv
- [0858] SEQ ID NO :20 :01d5 重链特异性引物 Fw
- [0859] SEQ ID NO :21 :01d5 重链特异性引物 Rv
- [0860] SEQ ID NO :22 :01d17 重链特异性引物 Fw
- [0861] SEQ ID NO :23 :01d17 重链特异性引物 Rv
- [0862] SEQ ID NO :24 :01d19 重链特异性引物 Fw
- [0863] SEQ ID NO :25 :01d19 重链特异性引物 Rv
- [0864] SEQ ID NO :26 :New102 重链特异性引物 Fw
- [0865] SEQ ID NO :27 :New102 重链特异性引物 Rv
- [0866] SEQ ID NO :28 :01d6 重链特异性引物 Fw
- [0867] SEQ ID NO :29 :01d6 重链特异性引物 Rv
- [0868] SEQ ID NO :30 :mH_Rv1 引物
- [0869] SEQ ID NO :31 :mH_Rv2 引物
- [0870] SEQ ID NO :32 :7G3 重链特异性引物 Fw
- [0871] SEQ ID NO :33 :7G3 重链特异性引物 Rv
- [0872] SEQ ID NO :34 :hk-2 引物
- [0873] SEQ ID NO :35 :hk-6 引物
- [0874] SEQ ID NO :36 :01d4 轻链特异性引物 Fw
- [0875] SEQ ID NO :37 :01d4 轻链特异性引物 Rv
- [0876] SEQ ID NO :38 :01d5 轻链特异性引物 Fw
- [0877] SEQ ID NO :39 :01d5 轻链特异性引物 Rv
- [0878] SEQ ID NO :40 :01d17 轻链特异性引物 Fw
- [0879] SEQ ID NO :41 :01d17 轻链特异性引物 Rv
- [0880] SEQ ID NO :42 :01d19 轻链特异性引物 Fw
- [0881] SEQ ID NO :43 :01d19 轻链特异性引物 Rv
- [0882] SEQ ID NO :44 :New102 轻链特异性引物 Fw
- [0883] SEQ ID NO :45 :New102 轻链特异性引物 Rv
- [0884] SEQ ID NO :46 :01d6 轻链特异性引物 Fw
- [0885] SEQ ID NO :47 :01d6 轻链特异性引物 Rv
- [0886] SEQ ID NO :48 :mK_Rv1 引物
- [0887] SEQ ID NO :49 :mK_Rv2 引物
- [0888] SEQ ID NO :50 :7G3 轻链特异性引物 Fw
- [0889] SEQ ID NO :51 :7G3 轻链特异性引物 Rv
- [0890] SEQ ID NO :80 :hCD116Fw-MfeI 引物
- [0891] SEQ ID NO :81 :hCD116Rv-NotI 引物
- [0892] SEQ ID NO :82 :hCD116Fw-MfeI 引物
- [0893] SEQ ID NO :83 :hCD116Rv-NotI 引物
- [0894] SEQ ID NO :84 :hCD116Fw-MfeI 引物

- [0895] SEQ ID NO :85 :hCD116Rv-NotI 引物
- [0896] SEQ ID NO :86 :hCD116SeqFw1 引物
- [0897] SEQ ID NO :87 :hCD116SeqFw2 引物
- [0898] SEQ ID NO :88 :hCD116SeqRv1 引物
- [0899] SEQ ID NO :89 :T7 引物
- [0900] SEQ ID NO :90 :hCD123-C-FLAG-R1 引物
- [0901] SEQ ID NO :91 :IL-3R α _Fw 引物
- [0902] SEQ ID NO :92 :C-FLAG-NotR2 引物
- [0903] SEQ ID NO :93 :pEGFP-N1-Fw 引物
- [0904] SEQ ID NO :94 :pEGFP-N1-Re 引物
- [0905] SEQ ID NO :95 :pEGFP-N1-Fw 引物
- [0906] SEQ ID NO :96 :pEGFP-N1-Re 引物
- [0907] SEQ ID NO :97 :CD123R11pEGFPN1 引物
- [0908] SEQ ID NO :98 :CD123F11 引物
- [0909] SEQ ID NO :99 :CD123R12-2 引物
- [0910] SEQ ID NO :100 :CD123F12-2 引物
- [0911] SEQ ID NO :101 :CD123R13 引物
- [0912] SEQ ID NO :102 :CD123F13 引物
- [0913] SEQ ID NO :103 :pEGFP-N1-Fw 引物
- [0914] SEQ ID NO :104 :pEGFP-N1-Re 引物
- [0915] SEQ ID NO :105 :GM-CSFRF11 引物
- [0916] SEQ ID NO :106 :GM-CSFRR11 引物
- [0917] SEQ ID NO :107 :GM-CSFRF12 引物
- [0918] SEQ ID NO :108 :GM-CSFRR12 引物
- [0919] SEQ ID NO :109 :GM-CSFRF13 引物
- [0920] SEQ ID NO :110 :GM-CSFRR13 引物
- [0921] SEQ ID NO :111 :pEGFP-N1-Fw 引物
- [0922] SEQ ID NO :112 :pEGFP-N1-Re 引物
- [0923] SEQ ID NO :149 :CD123-Fw21 引物
- [0924] SEQ ID NO :150 :CD123-Re21 引物
- [0925] SEQ ID NO :151 :CD123-Fw22 引物
- [0926] SEQ ID NO :152 :CD123-Re22 引物
- [0927] SEQ ID NO :153 :CD123-Fw23 引物
- [0928] SEQ ID NO :154 :CD123-Re23 引物
- [0929] SEQ ID NO :155 :CD123-Fw24 引物
- [0930] SEQ ID NO :156 :CD123-Re24 引物
- [0931] SEQ ID NO :157 :CD123-Fw25 引物
- [0932] SEQ ID NO :158 :CD123-Re25 引物
- [0933] SEQ ID NO :159 :CD123-Fw26 引物

[0934] SEQ ID NO :160 :CD123-Re26 引物

[0001]

序列表

<110> 协和发酵麒麟株式会社
<120> 用于治疗血液肿瘤的抗 IL-3RA 抗体
<130> SCT114668-00
<150> US 61/172923
<151> 2009-04-27
<160> 160
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 378
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

Met Val Leu Leu Trp Leu Thr Leu Leu Leu Ile Ala Leu Pro Cys Leu
1 5 10 15

Leu Gln Thr Lys Glu Asp Pro Asn Pro Pro Ile Thr Asn Leu Arg Met
20 25 30

Lys Ala Lys Ala Gln Gln Leu Thr Trp Asp Leu Asn Arg Asn Val Thr
35 40 45

Asp Ile Glu Cys Val Lys Asp Ala Asp Tyr Ser Met Pro Ala Val Asn
50 55 60

Asn Ser Tyr Cys Gln Phe Gly Ala Ile Ser Leu Cys Glu Val Thr Asn
65 70 75 80

Tyr Thr Val Arg Val Ala Asn Pro Pro Phe Ser Thr Trp Ile Leu Phe
85 90 95

[0002]

Pro	Glu	Asn	Ser	Gly	Lys	Pro	Trp	Ala	Gly	Ala	Glu	Asn	Leu	Thr	Cys	
						100					105				110	
Trp	Ile	His	Asp	Val	Asp	Phe	Leu	Ser	Cys	Ser	Trp	Ala	Val	Gly	Pro	
							115				120				125	
Gly	Ala	Pro	Ala	Asp	Val	Gln	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Leu	Asn	Val	Ala	Asn	
						130				135				140		
Arg	Arg	Gln	Gln	Tyr	Glu	Cys	Leu	His	Tyr	Lys	Thr	Asp	Ala	Gln	Gly	
						145				150				155		160
Thr	Arg	Ile	Gly	Cys	Arg	Phe	Asp	Asp	Ile	Ser	Arg	Leu	Ser	Ser	Gly	
						165				170				175		
Ser	Gln	Ser	Ser	His	Ile	Leu	Val	Arg	Gly	Arg	Ser	Ala	Ala	Phe	Gly	
						180				185				190		
Ile	Pro	Cys	Thr	Asp	Lys	Phe	Val	Val	Phe	Ser	Gln	Ile	Glu	Ile	Leu	
						195				200				205		
Thr	Pro	Pro	Asn	Met	Thr	Ala	Lys	Cys	Asn	Lys	Thr	His	Ser	Phe	Met	
						210				215				220		
His	Trp	Lys	Met	Arg	Ser	His	Phe	Asn	Arg	Lys	Phe	Arg	Tyr	Glu	Leu	
						225				230				235		240
Gln	Ile	Gln	Lys	Arg	Met	Gln	Pro	Val	Ile	Thr	Glu	Gln	Val	Arg	Asp	
						245				250				255		
Arg	Thr	Ser	Phe	Gln	Leu	Leu	Asn	Pro	Gly	Thr	Tyr	Thr	Val	Gln	Ile	
						260				265				270		

[0003]

Arg Ala Arg Glu Arg Val Tyr Glu Phe Leu Ser Ala Trp Ser Thr Pro
 275 280 285

Gln Arg Phe Glu Cys Asp Gln Glu Glu Gly Ala Asn Thr Arg Ala Trp
 290 295 300

Arg Thr Ser Leu Leu Ile Ala Leu Gly Thr Leu Leu Ala Leu Val Cys
 305 310 315 320

Val Phe Val Ile Cys Arg Arg Tyr Leu Val Met Gln Arg Leu Phe Pro
 325 330 335

Arg Ile Pro His Met Lys Asp Pro Ile Gly Asp Ser Phe Gln Asn Asp
 340 345 350

Lys Leu Val Val Trp Glu Ala Gly Lys Ala Gly Leu Glu Glu Cys Leu
 355 360 365

Val Thr Glu Val Gln Val Val Gln Lys Thr
 370 375

<210> 2
 <211> 308
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Val Leu Leu Trp Leu Thr Leu Leu Leu Ile Ala Leu Pro Cys Leu
 1 5 10 15

Leu Gln Thr Lys Glu Asp Pro Asn Pro Pro Ile Thr Asn Leu Arg Met
 20 25 30

[0004]

Lys	Ala	Lys	Ala	Gln	Gln	Leu	Thr	Trp	Asp	Leu	Asn	Arg	Asn	Val	Thr
35															
Asp	Ile	Glu	Cys	Val	Lys	Asp	Ala	Asp	Tyr	Ser	Met	Pro	Ala	Val	Asn
50															
Asn	Ser	Tyr	Cys	Gln	Phe	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu	Cys	Glu	Val	Thr	Asn
65															
Tyr	Thr	Val	Arg	Val	Ala	Asn	Pro	Pro	Phe	Ser	Thr	Trp	Ile	Leu	Phe
85															
Pro	Glu	Asn	Ser	Gly	Lys	Pro	Trp	Ala	Gly	Ala	Glu	Asn	Leu	Thr	Cys
100															
Trp	Ile	His	Asp	Val	Asp	Phe	Leu	Ser	Cys	Ser	Trp	Ala	Val	Gly	Pro
115															
Gly	Ala	Pro	Ala	Asp	Val	Gln	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Leu	Asn	Val	Ala	Asn
130															
Arg	Arg	Gln	Gln	Tyr	Glu	Cys	Leu	His	Tyr	Lys	Thr	Asp	Ala	Gln	Gly
145															
Thr	Arg	Ile	Gly	Cys	Arg	Phe	Asp	Asp	Ile	Ser	Arg	Leu	Ser	Ser	Gly
165															
Ser	Gln	Ser	Ser	His	Ile	Leu	Val	Arg	Gly	Arg	Ser	Ala	Ala	Phe	Gly
180															
Ile	Pro	Cys	Thr	Asp	Lys	Phe	Val	Val	Phe	Ser	Gln	Ile	Glu	Ile	Leu
195															

[0005]

Thr Pro Pro Asn Met Thr Ala Lys Cys Asn Lys Thr His Ser Phe Met
 210 215 220

His Trp Lys Met Arg Ser His Phe Asn Arg Lys Phe Arg Tyr Glu Leu
 225 230 235 240

Gln Ile Gln Lys Arg Met Gln Pro Val Ile Thr Glu Gln Val Arg Asp
 245 250 255

Arg Thr Ser Phe Gln Leu Leu Asn Pro Gly Thr Tyr Thr Val Gln Ile
 260 265 270

Arg Ala Arg Glu Arg Val Tyr Glu Phe Leu Ser Ala Trp Ser Thr Pro
 275 280 285

Gln Arg Phe Glu Cys Asp Gln Glu Glu Gly Ala Asn Thr Arg Ala Trp
 290 295 300

Arg Thr Ser Leu
 305

<210> 3
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer IL-3RA_Fw

<400> 3
 cggcaattgc caccatggc ctccttggc tcac 34

<210> 4
 <211> 31
 <212> DNA

[0006]

<213> Artificial

<220>

<223> IL-3RA_Re

<400> 4

attgcggccg ctcaagttt ctgcacgacc t

31

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer IL-3RA_seqF1

<400> 5

gttttcacta caaaacggat

20

<210> 6

<211> 1156

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> insert sequence

<400> 6

caattgccac catggccctc ctttggctca cgctgctct gatgccttg ccctgtctcc

60

tgcaaacgaa ggaagatcca aacccaccaa tcacgaacct aaggatgaaa gcaaaggctc

120

agcagttgac ctgggacctt aacagaatg tgaccgatat cgagtgttt aaagacgccc

180

actattctat gccccagtg aacaatacg attgccagtt tggagcaatt tccttatgtg

240

aagtgaccaa ctacaccgtc cgagtggcca acccaccatt ctccacgtgg atcctttcc

300

ctgagaacag tggaaagcct tggcagggtg cggagaatct gacctgctgg attcatgacg

360

tggatttctt gagctgcagc tggcggttag gccgggggc ccccgccgac gtccagtacg

420

[0007]

acctgtactt gaacgttgcc aacaggcgac aacagtacga gtgtttcac tacaaaacgg	480
atgctcaggg aacacgtata ggggtgcgtt tegatgacat ctctcgactc tccagcggtt	540
ctcaaagttc ccacatcctg gtgcggggca ggagcgcage cttcggtata ccctgcacag	600
ataagtttgt cgtctttca cagattgaga tattaactcc acccaacatg actgcaaagt	660
gtaataagac acattcctt atgcactgga aaatgagaag tcatttaat cgcaaattc	720
gctatgagct tcagatacaa aagagaatgc agcctgtat cacagaacag gtcagagaca	780
gaacctcctt ccagctactc aatcctggaa cgtacacagt acaaataaga gccggggaaa	840
gagtgtatga attcttgagc gcctggagca ccccccagcg cttcgagtgc gaccaggagg	900
agggcgcaaa cacacgtgcc tggcggacgt cgctgctgat cgcgctgggg acgctgctgg	960
ccctggctcg tgtttcgat atctgeagaa ggtatctggt gatgeagaga cttttttttt	1020
gcatccctca catgaaagac cccatcggt acagcttcca aaacgacaag ctgggtgtct	1080
gggaggcggg caaagccggc ctggaggagt gtctggtgac tgaagtacag gtcgtgcaga	1140
aaacttgagc ggccgc	1156

<210> 7

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer Rhe123Fw1

<400> 7

cgccaattgc caccatgacc ctctttggc tgacgctg 38

<210> 8

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

[0008]

<220>		
<223> primer Rhe123Rv1		
<400> 8		
tatattgcgg ccgctcaagt tttctccacc acctgcac		38
<210> 9		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer T7		
<400> 9		
taatacgact cactataggg		20
<210> 10		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer SP6		
<400> 10		
gatttagtg acactata		19
<210> 11		
<211> 1156		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> insert sequence		
<400> 11		
caattgccac catgaccctc ctttggctga cgctgctctt ggtcgccacg ccctgtctcc		60
tgcaaacgaa ggaggatcca aatgcaccaa tcaggaatct aaggatgaaa gaaaaggctc		120

[0009]

agcagttgat	gtgggacctg	aacagaaaacg	tgaccgacgt	ggagtgtatc	aaaggcaccg	180
actattctat	gccggcaatg	aacaacagct	attgccagtt	cggagccatt	tccttatgtg	240
aagtgaccaa	ctacaccgtc	cgagtggcca	gtccccgtt	ctccacgtgg	atcctcttcc	300
ctgagaacag	tgggacgcct	caggcaggcg	cggagaatct	gacctgtgg	gttcatgacg	360
tggatttctt	gagctgcage	tgggtggcag	gcccgccgc	ccccgctgac	gtccagtacg	420
acctgtactt	gaacaatccc	aacagccacg	aacagtacag	gtgccttcac	tacaaaacgg	480
atgctcgggg	aacacagatc	gggtgtcggt	tcgatgacat	cgctcgactc	tcccgcggtt	540
ctcaaagttc	ccacatctg	gtgagggca	ggagcgcage	cgtcagtagtac	ccctgcacag	600
ataagttgt	cttctttca	cagattgaga	gattaactcc	acccaacatg	actggagagt	660
gtaatgagac	acattccttc	atgcactgga	aatgaaaag	tcattcaat	cgcaaattcc	720
gctatgagct	tcggatccaa	aagagaatgc	agcctgtaaag	gacagaacag	gtcagagaca	780
caacccctt	ccagctaccc	aatcctggaa	cgtacacagt	gcaaataaga	gcccgggaaa	840
cagtgtatga	attcttgagt	gcctggagca	ccccccagecg	cttcgagtgc	gaccaggagg	900
agggcgcgag	ctcgctgccc	tggggacgt	cgctgctgat	cgcgctgggg	acgctgctgg	960
ccttgctctg	tgtgttcctc	atctgcagaa	ggtatctggt	gatgcagagg	ctgtttcccc	1020
gcatcccaca	catgaaagac	cccatcggt	acaccttcca	acaggacaag	ctggtgtct	1080
gggaggcggg	caaagccggc	ctggaggagt	gtctgggtc	tgaagtgcag	gtggggaga	1140
aaacttgagc	ggccgc					1156

<210> 12

<211> 1156

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> insert sequence

[0010]

<400> 12
caattgccac catgaccctc ctttgctga cgctgctct ggtcgccacg ccctgtctcc 60
tgc当地 accaa ggaggatcca aatgcaccaa tcaggaatct aaggatgaaa gaaaaggctc 120
agcagttgat gtgggacactg aacagaaaacg tgaccgacgt ggagtgtatc aaaggcaccg 180
actattctat gccggcaatg aacgacagct attgccagtt cggagccatt tccttatgtg 240
aagtgaccaa ctacaccgtc cgagtgccca gtcctccgtt ctccacgtgg atccttcc 300
ctgagaacag tgggacgcct cgggcaggcg cggagaattt gacctgctgg gttcatgacg 360
tggatttctt gagctgcage tgggtggtag gcccggccgc ccccgctgac gtccagta 420
acctgtactt gaacaatccc aacagccacg aacagtacag gtgccttcgc tacaaaacgg 480
atgc当地 ggggg aacacagatc ggggtcggtl tgc当地 acat cgc当地 ggggtl 540
ctcaaagtcc cacatcctg gtgagggca ggagcgcage cgtcagttatc ccctgcacag 600
ataagtttgt ctttttca cagattgaga gattaactcc acccaacatg actggagatg 660
gtaatgagac acattccttc atgcactgga aatgaaaag tcatttcaat cgcaattcc 720
actatgagct tcggatccaa aagagaatgc agcctgtaag gacagaacag gtcagagaca 780
caacccctt ccagctaccc aatcctggaa cgtacacagt gcaaataaga gcccggaaa 840
cagtgatga attttgagt gcctggagca cccccagecg ctgcgatgc gaccaggagg 900
aggcgc当地 ctc当地 gtggc当地 acgt cgc当地 gtggc当地 acgtc当地 gtgg 960
cctgctctg tgtgtccctc atctgcagaa ggtatctggt gatgcagagg ctgttcccc 1020
gc当地 cccaca catgaaagac cccatcggtg acaccccca acaggacaag ctgggtgtct 1080
gggaggcggg caaagccggc ctggaggagt gtctgggtgc tgaagtgcag gtgggtggaga 1140
aaacttgagc ggccgc 1156

<210> 13

[0011]

<211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer hIL-3RAsol-FLAG-NotI

<400> 13
 attgcggccg ctcacttate gtcgtcatcc ttgttagtccc gccaggcacg tgtgtttg 58

<210> 14
 <211> 961
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> insert seqence

<400> 14
 caattgccac catggcttc ctttgctca cgctgtctt gatgccctg ccctgtctcc 60
 tgcaaacgaa ggaagatcca aaccaccaa tcacgaacct aaggatgaaa gcaaaggctc 120
 agcagttgac ctgggacctt aacagaaatg tgaccgatat cgagtgtgtt aaagacgccc 180
 actattctat gccggcagtg aacaatacg attgccagtt tggagcaatt tccttatgtg 240
 aagtgaccaa ctacaccgtc cgagtggcca acccaccatt ctccacgtgg atcctttcc 300
 ctgagaacag tggaaagcct tggcaggtg cggagaatct gacctgtgg attcatgacg 360
 tggatttctt gagctgcage tggcggtag gccgggggc ccccgccgac gtccagtagc 420
 acctgtactt gaacgttgcc aacaggcgta aacagtacgta gtgtttcac tacaaaacgg 480
 atgctcaggaa aacacgtatac gggtgtcgaa tcgatgacat ctctcgactc tccagcggtt 540
 ctcaaagttc ccacatcctg gtgcggggca ggagcgcage cttcggatc ccctgcacag 600
 ataagttgt cgttttca cagattgaga tattaactcc acccaacatg actgcaaagt 660
 gtaataagac acattcctt atgcactgga aaatgagaag tcatttaat cgcaaatttc 720

[0012]

gctatgagct tcagatacaa aagagaatgc agcctgtaat cacagaacag gtcagagaca	780
gaacctcett ccagctactc aatcctggaa cgtacacagt acaaataaga gccggggaaa	840
gagtgttatga attcttgagc gcctggagca ccccccagcg cttcgagtgc gaccaggagg	900
aggcgcaaa cacacgtgcc tggcggact acaaggatga cgacgataag tgagcggccg	960
c	961
<210> 15	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> primer hh-6	
<400> 15	
gttccggag atcatgaggg tgtcctt	27
<210> 16	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> primer hh-3	
<400> 16	
gtgcacggc ctggtcaggg cgcctg	26
<210> 17	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> primer hh-4	
<400> 17	

[0013]

ggtgccaggg ggaagaccga tgg	23
---------------------------	----

<210> 18
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer Fw specific for Old4 Heavy chain

<400> 18
 agagagagag gtcgaccacc atggactgga cctggagggtt cctctttgt

49

<210> 19
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer Rv specific for Old4 heavy chain

<400> 19
 agagagagag gctagctgaa gagacgggtga ccattgtccc

40

<210> 20
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer Fw specific for Old5 heavy chain

<400> 20
 agagagagag gtcgaccacc atggactgga cctggagggtt cctctttgt

49

<210> 21
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial

[0014]

<220>		
<223>	primer Rv specific for Old5 heavy chain	
<400>	21	
	agagagagag gcttagctgaa gagacggta ccattgtccc	40
<210>	22	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer Fw specific for Old17 Heavy chain	
<400>	22	
	agagagagag gtgcaccacc atggactgga cctggagggtt ccttttgt	49
<210>	23	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer Rv specific for Old 17 heavy chain	
<400>	23	
	agagagagag gcttagctgag gagacggta caagggttcc c	41
<210>	24	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer Fw specific for Old19 heavy chain	
<400>	24	
	agagagagag gtgcaccacc atggactgga cctggagggtt ccttttgt	49
<210>	25	
[0015]		

<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer Rv specific for Old19 heavy chain	
<400>	25	
	agagagagag gctagctgag gagacggta ccagggtc	39
<210>	26	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer Fw specific for New102 Heavy chain	
<400>	26	
	agagagagag gtgcaccacc atggactgga cctggagggtt cctctttgt	49
<210>	27	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer Rv specific for New102 heavy chain	
<400>	27	
	agagagagag gctagctgag gagacggta ccagggtt	38
<210>	28	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer Fw specific for Old6 heavy chain	
<400>	28	

[0016]

agagagagag gtcgaccac catggactg gggctccgtc g	41
---	----

<210> 29

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer Rv specific for Old6 heavy chain

<400> 29

agagagagag gctagctgag gagacgggtga ccagggttc	39
---	----

<210> 30

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer mH_Rv1

<400> 30

attttgtcga cckyggtsyt gctggcyggg tg	32
-------------------------------------	----

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer mH_Rv2

<400> 31

gcacacryct ggacagggat ccagagttcc	30
----------------------------------	----

<210> 32

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

[0017]

<220>

<223> primer Fw specific for 7G3 heavy chain

<400> 32

agagagagag gtgcaccacc atggatgga gctggatctt tctc 44

<210> 33

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer Rv specific for 7G3 heavy chain

<400> 33

agagagagag gctagctgca gagacagtga ccagagtccc 40

<210> 34

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer hk-2

<400> 34

gttgaagctc tttgtgacgg gcgagc 26

<210> 35

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer hk 6

<400> 35

tgcgggaag atgaagacag atggtg 26

<210> 36

[0018]

<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer Fw specific for Old4 light chain	
<400>	36	
	agagagagag atctctcacc atggacatga gggccccgc tcage	45
<210>	37	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer Rv specific for Old4 light chain	
<400>	37	
	agagagagag cgtacgtttg atctccagct tggccccctg	40
<210>	38	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer Fw specific for Old5 light chain	
<400>	38	
	agagagagag atctctcacc atggacatga gggccccgc tcage	45
<210>	39	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer Rv specific for Old5 light chain	
<400>	39	

[0019]

agagagagag cgtacgttt atctccagct tggcccctg	40
---	----

<210> 40
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer Fw specific for Old17 light chain

<400> 40 agagagagag atctctcacc atggacatga gggtcctcg tcag	44
---	----

<210> 41
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer Rv specific for light chain

<400> 41 agagagagag cgtacgttt atctccagct tggcccctg	40
---	----

<210> 42
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer Fw specific for Old19 light chain

<400> 42 agagagagag atctctcacc atggacatga gggtcctcg tcag	44
---	----

<210> 43
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial

[0020]

<220>

<223> primer Rv specific for Old19 light chain

<400> 43

agagagagag cgtacgtttg atttccacct tggcccttg gc 42

<210> 44

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer Fw specific for New102 light chain

<400> 44

agagagagag atctcteacc atggacatga gggtcctcgc tcag 44

<210> 45

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer Rv specific for New102 light chain

<400> 45

agagagagag cgtacgtttg atctccagct tggcccttg 40

<210> 46

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer Fw specific for Old6 light chain

<400> 46

gagagagaga tctcteacca tggacatgag ggtccccgtc cagc 44

<210> 47

[0021]

<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer Rv specific for 01d6 light chain	
<400>	47	
	agagagagag cgtacgttt atatccactt tggcccagg gc	42
<210>	48	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer mK_Rv1	
<400>	48	
	ttgaagctct tgacaatggg tgaagttgat	30
<210>	49	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer mK_Rv2	
<400>	49	
	gttagtgtctg tccttgctgt cctgatcagt	30
<210>	50	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer Fw specific for 7G3 light chain	
<400>	50	

[0022]

agagagagag agatctcacc atggaatcac agactcaggt cctc	44
--	----

<210> 51
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer Rv specific for 7G3 light chain

<400> 51
 agagagagag cgtacgtttt atttccagct tggccccccc

40

<210> 52
 <211> 443
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 52
 gacccgtcga ccaccatgga ctggacctgg aggttcctct ttgtggtggc agcagctaca

60

ggtgtccagt cccaggtcca gctgctacag tctggggctg aggtgaagaa gcctgggtcc

120

tcggtgaagg tctcatgcaa ggcttctgga ggcaccttca gcacctatgc tatcagctgg

180

gtgcgcacagg cccctggaca agggcttgag tggatggag ggatcatccc tatcttggt

240

atagtaaact acgcacagaa gttccaggc agagtcacga ttaccgcgga cgaatccacg

300

agtacagect acatggaact gagcagcctg agatctgagg acacggccgt gtattattgt

360

gcatgggggg ggggctcggg cccagatgtt ctgtatatct gggccaagg gacaatggtc

420

accgtctttt cagctagcac caa

443

<210> 53
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

[0023]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (143)..(143)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 53

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe
 35 40 45

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

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Val Asn Tyr Ala
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Ser Gly Pro Asp Val Leu Asp Ile
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Xaa
 130 135 140

<210> 54

[0024]

<211> 412
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 54

cacagatctc tcaccatgga catgagggtc cccgcgtcage tcctgggctt cctgtgttc	60
tggctcccg gtgccagatg tgtcatctgg atgaccctgt ctccatcctt actctctgca	120
tctacaggag acagagtcac catcagttgt cgatgtgtc agggcatttt gagttattta	180
gcctggtatac agcaaaaacc agggaaagcc cctgagctcc tgcatctatgc tgcatccact	240
ttgcaaagtgggtccatc aagggttcagt ggcagtggat ctggacaga tttcactctc	300
accatcagca gcctgcagtc tgaagatttt gcaacttattt actgtcaaca gtattatagt	360
ttcccgataca cttttggcca ggggaccaag ctggagatca aacgtacggt gg	412

<210> 55
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (133)..(133)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 55

Met	Asp	Met	Arg	Val	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Trp
1														

Leu	Pro	Gly	Ala	Arg	Cys	Val	Ile	Trp	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Leu

Leu	Ser	Ala	Ser	Thr	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Met	Ser

[0025]

Gln Gly Ile Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

50 55 60

Ala Pro Glu Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val

65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

100 105 110

Tyr Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

115 120 125

Lys Arg Thr Val Xaa

130

<210> 56

<211> 433

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 56

gtcgaccacc atggactgga cctggagggtt cctctttgtg gtggcagcag ctacaggtgt 60

ccagtcccag gtccagctgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg ggtcctcggt 120

gaaggctctca tgcaaggctt ctggaggcac cttcagcacc tatgctatca gctgggtgcg 180

acagggccct ggacaagggc ttgagtgat gggagggctc atccctatct ttgatata 240

aaactacgca cagaagttcc agggcagagt cacgattacc gcggacgaat ccacgacac 300

agtcttatatg gaactgagca gcctgagatc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcgag 360

aggggggggt tcggccctg atgttcttga tatctgggc caagggacaa tggtcaccgt 420

[0026]

ctttcagct agc	433
---------------	-----

<210> 57
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 57

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly			
1	5	10	15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys		
20	25	30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe		
35	40	45

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

Glu Trp Met Gly Gly Leu Ile Pro Ile Phe Asp Ile Glu Asn Tyr Ala			
65	70	75	80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser		
85	90	95

Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met		
100	105	110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Ser Gly Pro Asp Val Leu Asp Ile		
115	120	125

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

[0027]

130

135

140

<210> 58

<211> 412

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 58

cacagatctc tcaccatgga catgagggtc cccgctcagc tcctgggct cctgctgcte 60

tggctccag gtgccagatg tgtcatctgg atgaccagg ctccatcctt actctctgca 120

tctacaggag acagagtac catcagttgt cgatgagtc agggcattag gagttattta 180

gcctggtatac agcaaaaacc agggaaagcc cctgagctcc tgcatccact 240

ttgcaaagtgggtccatc aaggltcaagt ggcagtgat ctggacaga ttctactctc 300

accatcagca gcctgcagtc tgaagatttt gcaacttatt actgtcaaca gtattatagt 360

ttcccgataca cttttggcca ggggaccaag ctggagatca aacgtacggg gg 412

<210> 59

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (133)..(133)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 59

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp

1

5

10

15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Val Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu

20

25

30

[0028]

Leu Ser Ala Ser Thr Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Met Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Glu Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Tyr Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Thr Val Xaa
 130

<210> 60

<211> 438

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 60

gaccggcgtcga ccaccatggc ctggacactgg aggttcctct ttgtgggtgc agcagctaca 60

ggtgtccagt cccagggtcca gctgggtgcag tctggggctg aggtgaagaaa gcctgggtcc 120

tcggtgaagg ttcctgcaa gacttctggc ggcacattca gcaactttgc tatcagctgg 180

gtgcgcacagg cccctggaca agggcttgag tggatgggag ggatcatccc tatctttgg 240

tcaacaaact acgcacagaa gttccagggc agagtcacga ttaacgcgga cgaatccacg 300

[0029]

agcacagcct acatggagct gagcagtctg agatctgagg acacggccgt gtattactgt 360

gccccgtggag acaaatatgg tccttactac tttcaactact gggccaggg aacccttgc 420

accgtctcct cagctagc 438

<210> 61

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Gly Thr Phe

35 40 45

Ser Asn Phe Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ser Thr Asn Tyr Ala

65 70 75 80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Asn Ala Asp Glu Ser Thr Ser

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Asp Lys Tyr Gly Pro Tyr Tyr Phe His Tyr

[0030]

115	120	125
-----	-----	-----

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140

<210> 62

<211> 407

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 62

agatctctca ccatggacat gagggtcctc gtcagtcg tggggctct gctgtctgt 60

ttcccgaggc ccagatgtga catccagatg acccagtctc catcctcaact gtctgcatact 120

gttggagaca gagtcaccat cacttgtgg gcgagtcagg gtatttagcag ctggtttagcc 180

tggtatcagc agaaaccaga gaaagcccct aagtccctga tctatgtgc atccagttt 240

caaagtgggg tcccatcaag gttcagcggc agtggatctg ggacagattt cactctacc 300

atcagcagcc tgcagcctga agatttgca acttattact gccaacagta taatagttac 360

ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac gtacggt 407

<210> 63

<211> 132

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (132)..(132)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 63

Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Cys
 1 5 10 15

[0031]

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Thr Xaa
 130

<210> 64

<211> 437

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 64

tcgacccat ggactggacc tggaggttcc tctttgttgtt ggcagcagct acaggtgtcc 60

agtccccagg cttagtgggt cagtctgggg ctgaggtgaa gaagcctggg tcctcggtga 120

aggctcttg caaggcttct ggaggcacct tcagcagcta tgcttatcagc tgggtgcac 180

[0032]

aggcccctgg acaaggcctt gagtggttgg gagggatcat ccctatctt ggtacagcaa	240
actacgcaca gaagttccag ggcagagtca cgattaccgc ggacgaatcc acgagcacag	300
cctacatgga gctgagcagc ctgagatctg aggacacggc cgtgtattac tgtgcgagag	360
gacacaaata tggcccctac tacttgact actggggcca gggAACCTG gtcaccgtct	420
cctcagctag caccaag	437

<210> 65
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 65

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly			
1	5	10	15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys		
20	25	30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe		
35	40	45

Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu		
50	55	60

Glu Trp Val Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala			
65	70	75	80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser		
85	90	95

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

[0033]

100

105

110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly His Lys Tyr Gly Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

<210> 66

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 66

agatctctca ccatggacat gagggtcctc gtcagctcc tggggctct gctgctgt 60

ttcccagggtg ccagatgtga catccagatg acccagtctc catcctcaact gtctgcatact 120

gtaggagaca gagtcaccat cacttgtcgg gcgagtcagg gtattagcag ctggttagec 180

tggtatcagc agaaaccaga gaaagccct aagtccctga tctatgetgc atccagttt 240

caaagtgggg tccccatcaag gttcagcggc agtggatctg ggacagattt cactctacc 300

atcagcagcc tgeagectga agatttgca acttattact gccAACAGTA taatagttac 360

cctcggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaAC gtacggtgGC t 411

<210> 67

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Cys

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

[0034]

20	25	30
----	----	----

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala
 130

<210> 68
 <211> 435
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 68
 tcgaccacca tggactggac ctggaggttc ctctttgtgg tggeagecage tacaggtgtc 60

cagtcccagg tccagctggc gcagtcgtgg gctgagggtga agaagectgg atcctcggtg 120

aagggtcttct gcatggcttc aggaggeacc gtcagecaget acgtatcag ctgggtgcga 180

caggccccctg gacaagggtc tgagtggatg ggagagatca tccctatattt tggtatagta 240

[0035]

aactacgcac agaagttcca gggcagagtc acgattaccg cggacgaatc cacgaacaca 300

gcctacatgg agctgagcag cctgagatct gaggacacgg ccatatatta ctgtgcgaga 360

gagacagcag tggctggtat tcttggttac tggggccagg gaaccctggc caccgtctcc 420

tcaagtagca ccaag 435

<210> 69

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Met Ala Ser Gly Gly Thr Val

35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Met Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Val Asn Tyr Ala

65 70 75 80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn

85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile

100 105 110

[0036]

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Thr Ala Val Ala Gly Ile Leu Gly Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

<210> 70

<211> 414

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 70

agatctctca ccatggacat gagggtcctc gctcagctcc tggggctct gctgctctgt 60

tteccaggtg ccagatgtga catccagatg acccagtctc catcctcaact gtctgcatact 120

gtaggagaca gagtcaccat cacttgtcgg gcgagtcagg gtattagcag ctggtagcc 180

tggtatcagc agaaaccaga gaaagcccct aagtccctga tctatgctgc atccagttt 240

caaagtgggg tcccatcaag gttcagcggc agtggatctg ggacagattt cactctacc 300

atcageagcc tgcagcctga agatttgca acttattact gccaacagta taatagttac 360

ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac gtacggggc tgca 414

<210> 71

<211> 134

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Cys
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

[0037]

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala
 130

<210> 72

<211> 423

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 72

cgaccacca tggaaactggg gctccgctgg gtttccttg ttgctatttt agaagggtgc 60

cagtgtgagg tgcagtttgt ggagtctggg ggaggcctgg tcaaggctgg ggggtccctg 120

agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagcc ataacatgaa ctgggtccgc 180

caggctccag ggaaggggct ggagtgggtc tcatccatta gtagtagtag tagttacata 240

tattatgcag actcagtgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaactca 300

[0038]

ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcgaga 360

gaggactggg gctactttga ctactgggc cagggAACCC tggtcaccgt ctcctcagct 420

agc 423

<210> 73

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser His Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Trp Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

[0039]

115	120	125
-----	-----	-----

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

<210> 74

<211> 407

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 74

agatctctca ccatggacat gagggteccc gtcagctcc tggggttct ctgtctgg 60

ctcccgaggc ccagatgtgc catccagttg acccagtctc catcctccct gtctgcattct 120

gttaggagaca gagtcaccat cacttgcgg gcaagtcagg gcattagcag tgatttagcc 180

tggtatcagc agaaaccagg gaaagctctt aagctctga tctatgtgc ctccagttt 240

gaaagtgggg tccccatcaag gttcageggc agtggatctg ggacagattt cacttcacc 300

atcagcagcc tgeagectga agatttgca acttattact gtcaacagtt taatagttac 360

ccattcaatt tggccctgg gaccaaagtg gatataaac gtacggt 407

<210> 75

<211> 134

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

[0040]

35	40	45
----	----	----

Gln Gly Ile Ser Ser Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys	50	55	60
---	----	----	----

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val	65	70	75	80
---	----	----	----	----

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr	85	90	95
---	----	----	----

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln	100	105	110
---	-----	-----	-----

Phe Asn Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile	115	120	125
---	-----	-----	-----

Lys Arg Thr Val Ala Ala	130
-------------------------	-----

<210> 76

<211> 433

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 76

gtcgaccacc atggatgga gctggatctt tcttttcgt gtgtcaggaa ctggaggtgt	60
---	----

cctctctgag gtccagctgc aacagtctgg acctgagctg gtgaagectg gggcttcagt	120
---	-----

aaagatgtcc tgcaggattt ctggatacac ctcaactgac tactacatga agtgggtgaa	180
---	-----

acagagccat ggaaagagcc ttgagtgat tggagatatt attcctagca atgggccac	240
---	-----

tttttacaac cagaaggatca agggcaaggc cactttgact gtggacagat cctccagcac	300
--	-----

agcctacatg caccteaaca gcctgacate tgaggactct gcagtttattt actgtacaag	360
--	-----

[0041]

atcgcattta ctgcgggcct cctggttgc ttactgggc caagggactc tggtcactgt 420

ctctgeagct agc 433

<210> 77

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Val Ser Gly Thr Gly Gly
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Tyr Met Lys Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr
115 120 125

[0042]

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser
 130 135 140

<210> 78

<211> 412

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 78

agatcteacc atggaatcac agactcaggt cctcatgtcc ctgctgttct gggtatctgg 60

tacctgtggg gactttgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga 120

gaaggtcaact atgagctgca agtcttagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa 180

ctacttgacc tggtatctgc agaaaccagg gcagcctctt aaattgttga tctattggc 240

atccactagg gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt 300

cactctcacc atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga 360

ttatagttat ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaaac gt 412

<210> 79

<211> 134

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr
 20 25 30

Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

[0043]

Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Leu Gln
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 130

<210> 80

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer hCD116Fw-MfeI

<400> 80

cggcaattgc caccatgctt ctccctggta caaggct

37

<210> 81

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer hCD116Rv-NotI

[0044]

<400> 81	
attgcggccg ctcaggtaat ttccttcacg g	31
<210> 82	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> primer hCD116Fw-MfeI	
<400> 82	
cggcaattgc caccatgctt ctcctggta caaggct	37
<210> 83	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> primer hCD116Rv-NotI	
<400> 83	
attgcggccg ctcaggtaat ttccttcacg g	31
<210> 84	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> primer hCD116Fw-MfeI	
<400> 84	
cggcaattgc caccatgctt ctcctggta caaggct	37
<210> 85	
<211> 31	
<212> DNA	

[0045]

<213> Artificial

<220>

<223> primer hCD116Rv-NotI

<400> 85

attgcggccg ctcaggtaat ttccttcacg g

31

<210> 86

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer hCD116SeqFw1

<400> 86

tgaactgtac ctggcgagg

20

<210> 87

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer hCD116SeqFw2

<400> 87

ctggcacgga aaacctactg

20

<210> 88

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer hCD116SeqRv1

<400> 88

cctgaatttg gataaaggcag

20

[0046]

<210>	89	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer T7	
<400>	89	
taatacgact cactatagg		20
<210>	90	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer hCD123-C-FLAG-R1	
<400>	90	
tgcgtatgtt ccttgtagtc agtttctgc acgacctgta		40
<210>	91	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer IL-3RA_Fw	
<400>	91	
cggcaattgc caccatggc ctccttggc tcac		34
<210>	92	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer C-FLAG-NotR2	

[0047]

<400> 92
aaaagcgccc gctcaacttgt cgtcatcgtc ctgttagtc

39

<210> 93
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer pEGFP-N1-Fw

<400> 93
cgtgtacggt gggagggtcta

20

<210> 94
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer pEGFP-N1-Re

<400> 94
tttatgttcc aggttcagg

19

<210> 95
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer pEGFP-N1-Fw

<400> 95
cgtgtacggt gggagggtcta

20

<210> 96
<211> 19
<212> DNA

[0048]

<213> Artificial		
<220>		
<223> primer pEGFP-N1-Re		
<400> 96		
tttatgttcc aggttcagg		19
<210> 97		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer CD123R11pEGFPN1		
<400> 97		
aaaggtaccg aattcgaagc ttgagctc		28
<210> 98		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer CD123F11		
<400> 98		
aaaggtaccg ggaagccttg ggcaggt		27
<210> 99		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer CD123R12-2		
<400> 99		
aaaggtacca ctgttcttag ggaagaggat		30

[0049]

<210> 100

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer CD123F12 2

<400> 100

aaaggtaccc agattgagat attaactcc

29

<210> 101

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer CD123R13

<400> 101

aaaggtacct gaaaagacga caaactt

27

<210> 102

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer CD123F13

<400> 102

aaaggtacct cgctgctgat cgcgctg

27

<210> 103

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer pEGFP-N1-Fw

[0050]

<400> 103	
cgtgtacggt gggaggtcta	20
<210> 104	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> primer pEGFP-N1-Re	
<400> 104	
tttatgttcc aggttcagg	19
<210> 105	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> primer GM-CSFRF11	
<400> 105	
aaaggtaccg ccaccatgct tctcctggtg aca	33
<210> 106	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> primer GM-CSFRR11	
<400> 106	
aaaggtacct gaatttggat aaagcag	27
<210> 107	
<211> 27	
<212> DNA	

[0051]

<213> Artificial

<220>

<223> primer GM-CSFRF12

<400> 107

aaaggtacgg gaagggaggg taccgct

27

<210> 108

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer GM-CSFRR12

<400> 108

aaaggtaccc tttgtgtcca aaagtga

27

<210> 109

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer GM-CSFRF13

<400> 109

aaaggtacca aaatagaacg attcaac

27

<210> 110

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer GM-CSFRR13

<400> 110

aaaggtacca atgtacacag agccgag

27

[0052]

<210>	111	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer pEGFP N1 Fw	
<400>	111	
	cgtgtacggt gggaggtctta	20
<210>	112	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer pEGFP-N1-Re	
<400>	112	
	tttatgttcc aggttcagg	19
<210>	113	
<211>	5	
<212>	PRT	
<213>	Homo sapiens	
<400>	113	
Thr Tyr Ala Ile Ser		
1	5	
<210>	114	
<211>	17	
<212>	PRT	
<213>	Homo sapiens	
<400>	114	
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Val Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln		
[0053]		

1

5

10

15

Gly

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Gly Gly Gly Ser Gly Pro Asp Val Leu Asp Ile

1

5

10

<210> 116

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Thr Tyr Ala Ile Ser

1

5

<210> 117

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Gly Leu Ile Pro Ile Phe Asp Ile Glu Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1

5

10

15

Gly

[0054]

<210> 118
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 118

Gly Gly Gly Ser Gly Pro Asp Val Leu Asp Ile
1 5 10

<210> 119
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 119

Asn Phe Ala Ile Ser
1 5

<210> 120
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 120

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 121
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 121

[0055]

Gly Asp Lys Tyr Gly Pro Tyr Tyr Phe His Tyr
1 5 10

<210> 122
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 122

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 123
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 123

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

Gly

<210> 124
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 124

Gly His Lys Tyr Gly Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 125
<211> 5
<212> PRT

[0056]

<213> Homo sapiens

<400> 125

Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 126

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Val Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 127

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Glu Thr Ala Val Ala Gly Ile Leu Gly Tyr

1 5 10

<210> 128

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Ser His Asn Met Asn

1 5

[0057]

<210> 129
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 129

Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 130
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 130

Glu Asp Trp Gly Tyr Phe Asp
1 5

<210> 131
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 131

Arg Met Ser Gln Gly Ile Arg Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 132
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 132

[0058]

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 133
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 133

Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 134
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 134

Arg Met Ser Gln Gly Ile Arg Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 135
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 135

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 136

[0059]

Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 137
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 137

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 138
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 138

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 139
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 139

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 140
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 140

[0060]

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 141
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 141

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 142
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 142

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 143
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 143

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 144
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 144

[0061]

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 145
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 145

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 146
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 146

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asp Leu Ala
1 5 10

<210> 147
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 147

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 148
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 148

[0062]

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 149

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer CD123-Fw21

<400> 149

cgtggaaccc gcagtgaaaca atagctatt

29

<210> 150

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer CD123-Re21

<400> 150

actctgttct tttaacaca ctcgatatcg

30

<210> 151

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer CD123-Fw22

<400> 151

ctttatccaa ataacagtgg gaagccttg

29

<210> 152

<211> 31

<212> DNA

[0063]

<213> Artificial	
<220>	
<223> primer CD123-Re22	
<400> 152	
cagtttctgt tggaatggtg gttggccac t	31
<210> 153	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> primer CD123-Fw23	
<400> 153	
agggagggta ccgtgcggaa gaatctgacc tgct	34
<210> 154	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> primer CD123-Re23	
<400> 154	
tcctgaattt ggatagaaga gatatccacgt gg	32
<210> 155	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> primer CD123-Fw24	
<400> 155	
ggccgcacgg ccccgccgaa cgtccagta	29

[0064]

<210>	156	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer CD123 Re24	
<400>	156	
	cctcgccca g t a c a g c t c a a g a a a t c c a c g t	32
<210>	157	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer CD123-Fw25	
<400>	157	
	a c g g a a c c a g c g c a g c t t c g g t a t c c c t	30
<210>	158	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer CD123-Re25	
<400>	158	
	t a a c c a g a a a g t g g g a a c t t t g a g a a c c	28
<210>	159	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer CD123-Fw26	

[0065]

<400> 159	
tcttgattc atttgcgtc tttcaca	28
<210> 160	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> primer CD123-Re26	
<400> 160	
atggatgcc gaaggctgct ctcctgcc	29

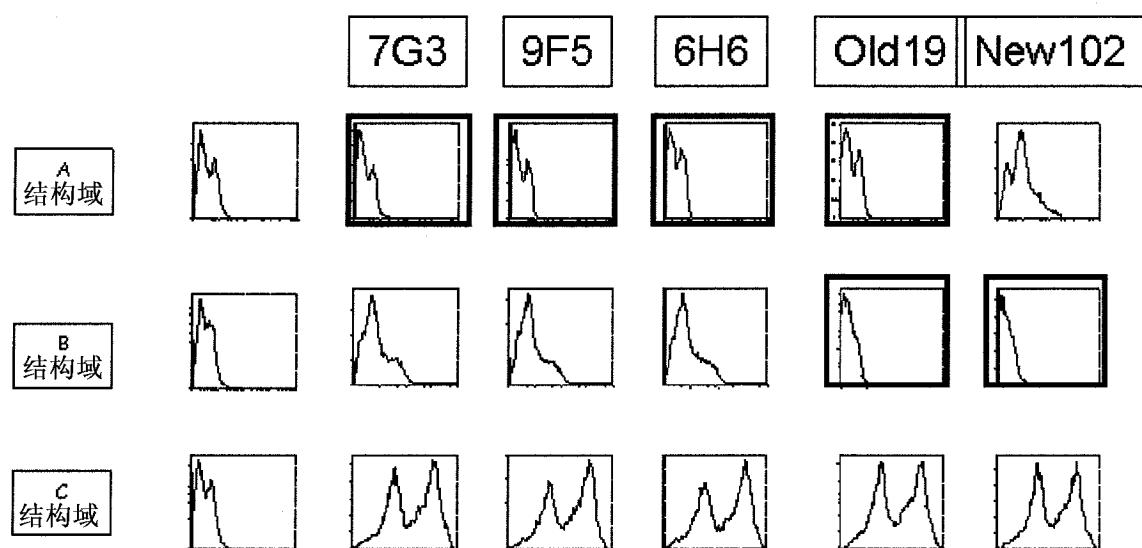


图 1

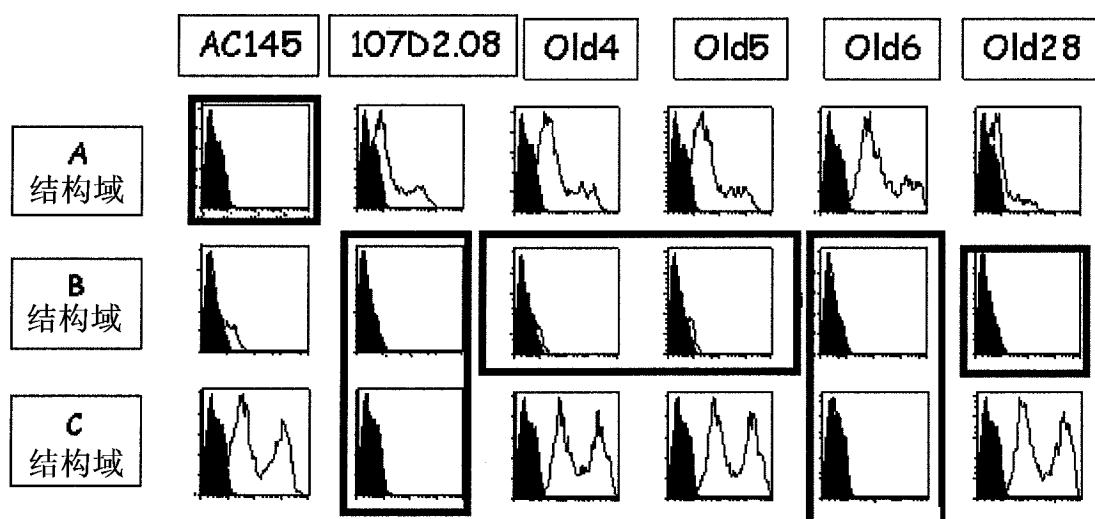


图 2

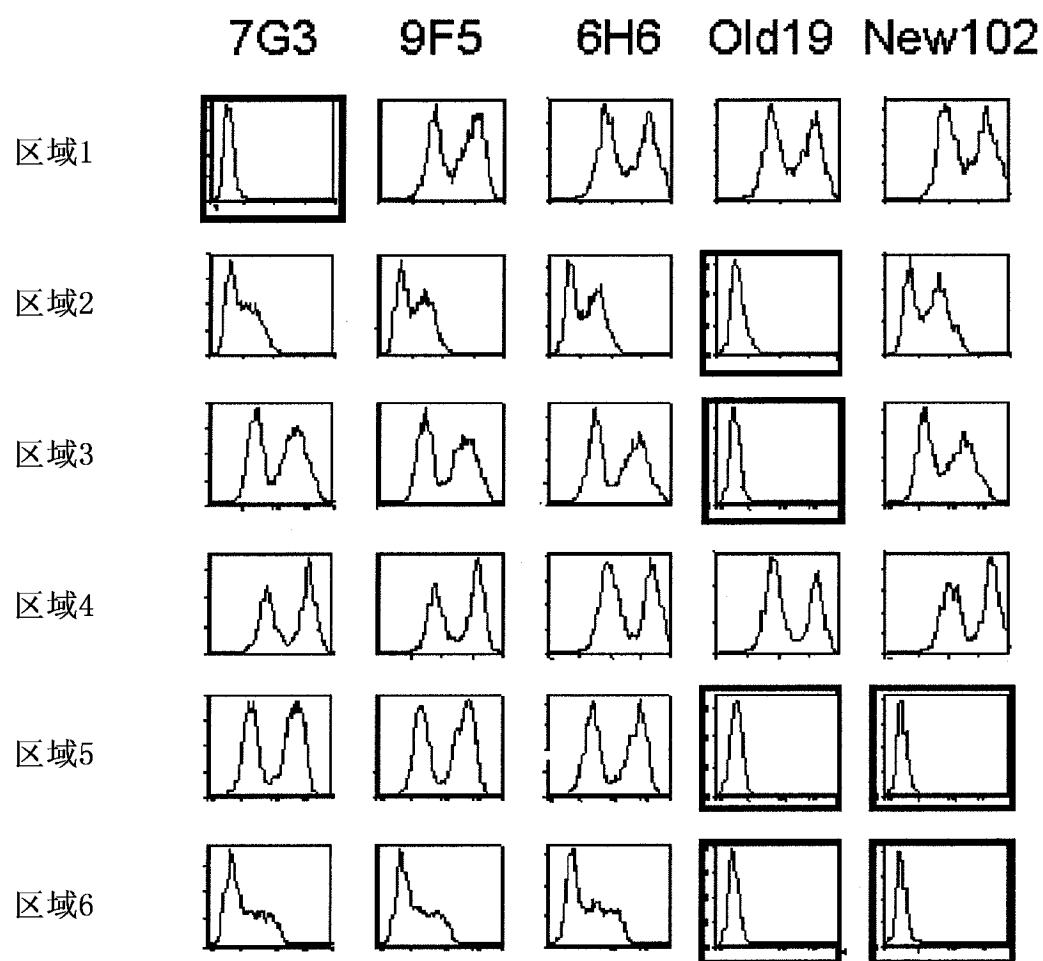


图 3

	10	20	30	40	50	
	ATGGTCTCCTTTGGCTCACGCTGCTCTGATCGCCCTGCCCTGTCCTGCAAACGAAG					60
	M V L L W L T L L I A L P C L L Q T K					20
	GAAGATCCAACCCACCAATCACGAACCTAACGGATGAAAGCAAAGGCTCAGCAGTTGACC					120
	E D P N P P I T N L R M K A K A Q Q L T					40
	TGGGACCTAACAGAAATGTGACCGATATCGAGTGTGTTAAATGATGCCGACTATTCTATG					180
区域2	W D L N R N Y T D I E C Y K D A D P Y S M					60
	CCCGCAATGAAACAATAGCTATTGCCAGTTGGAGCAATTTCCTTATGTGAAGTGACCAAC					240
	P A Y N N S Y C Q F G A I S L C E Y T N					80
	TACACCGTCCAGTGCCAACCCACCATTCACCGTGGATCCTCTCCCTCACAAACAGT					300
	Y T V R V A N P P F S T W I L F P E N S					100
	GGCAACCTTGGCAGCTCCGAAATCTGACCTGCTGGATTCTGACCTGCTTCTTG					260
	G K P W A G A E N L T C W I H D Y D F L					120
	A G C T G C A G C T G G G C G G T A G G C C C G G G G G C C C C G G G A C G T C C A G T A C C G A C C T G T A C T T G					420
区域5	S C S W A V G P G A P A D Y Q Y D L Y L					140
	AACGTTGCCAACAGGGCTAACAGTACGGAGTGTCTTCACTACAAAACGGATCCTCAGGGA					480
	N V A N R R Q Q Y E C L H Y K T D A Q G					160
	ACACGTATCGGTGTCGTTGATGACATCTCTCGACTCTCCAGCGTTCTCAAAGTTCC					540
区域6	T R I G C R F D D I S R L S S G S Q S S					180
	CAGATCCTGGTGGGGCAGGAGCCAGCTTGGTATCCCTGCACAGATAAGTTGTC					600
	H I L V R G R S A A F G I P C T D K F V					200
	GTCTTTCA					
	V E S					
	区域7					

图 4

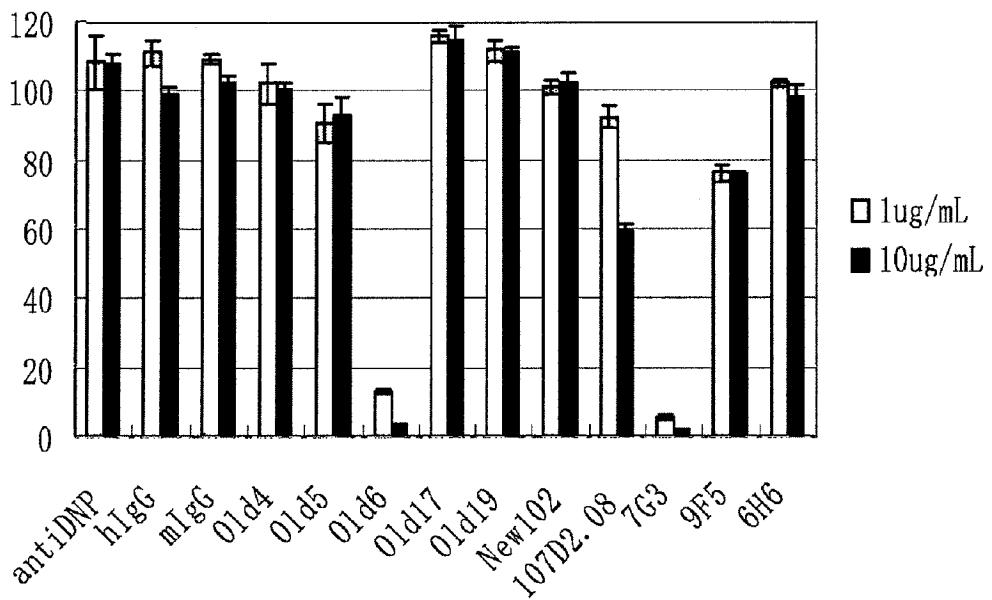


图 5

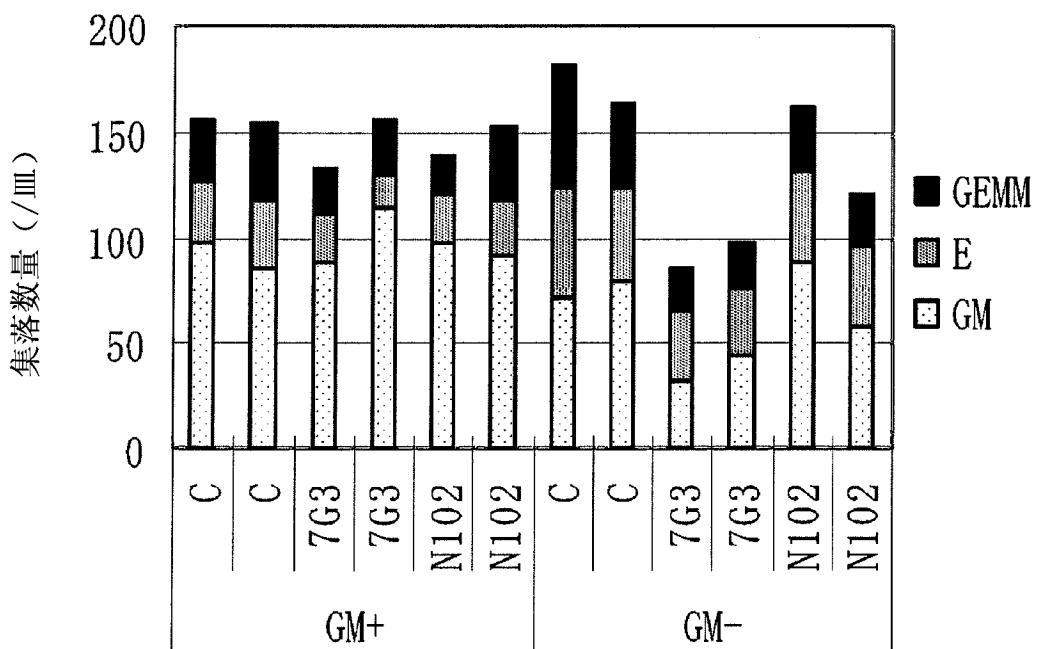


图 6

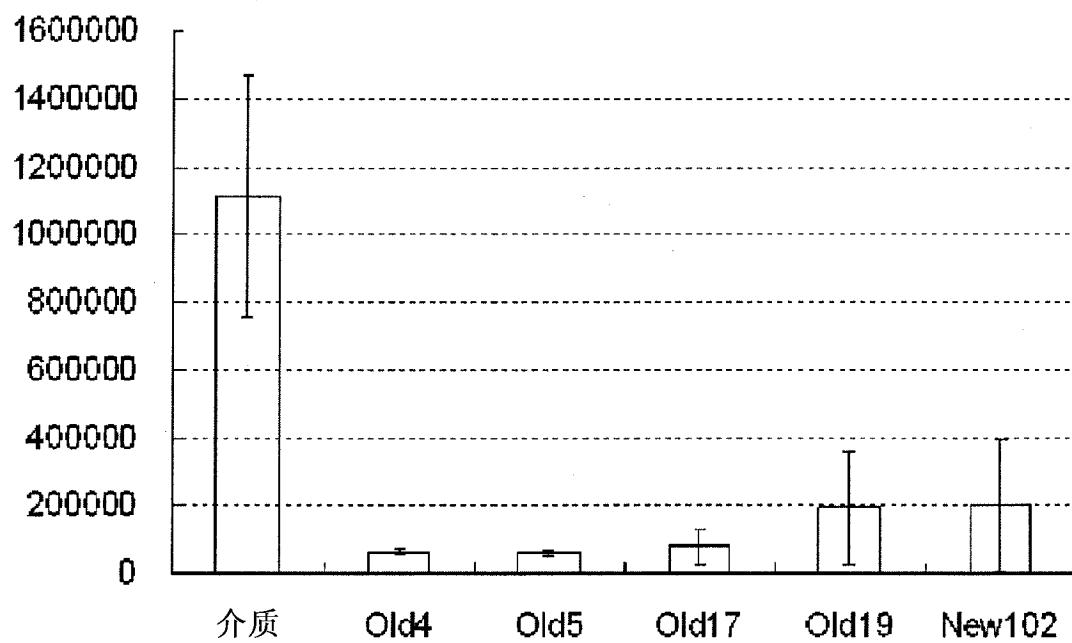


图 7

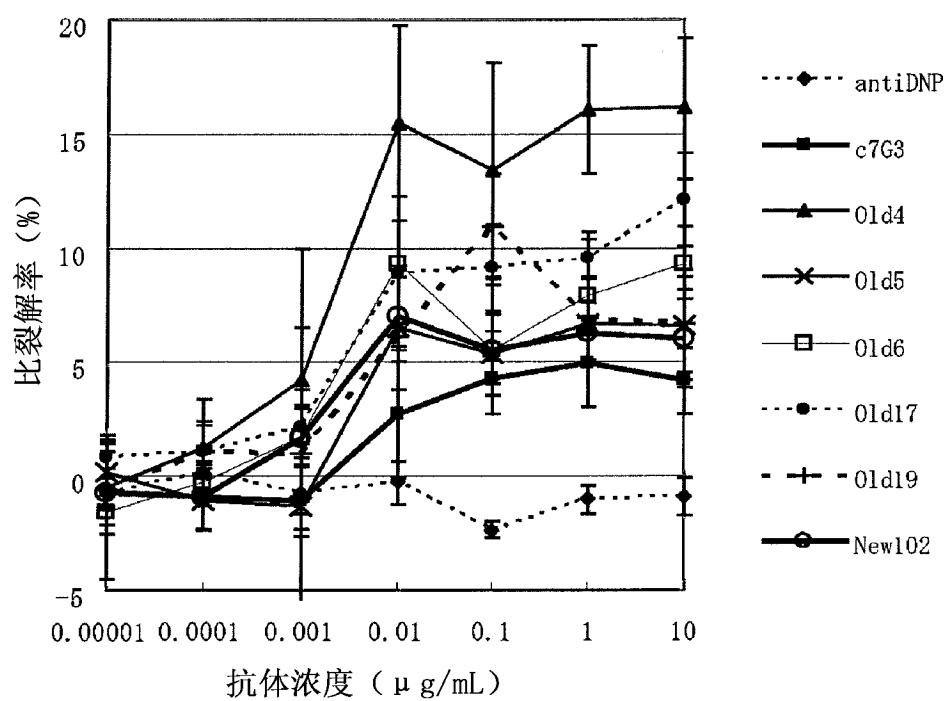


图 8

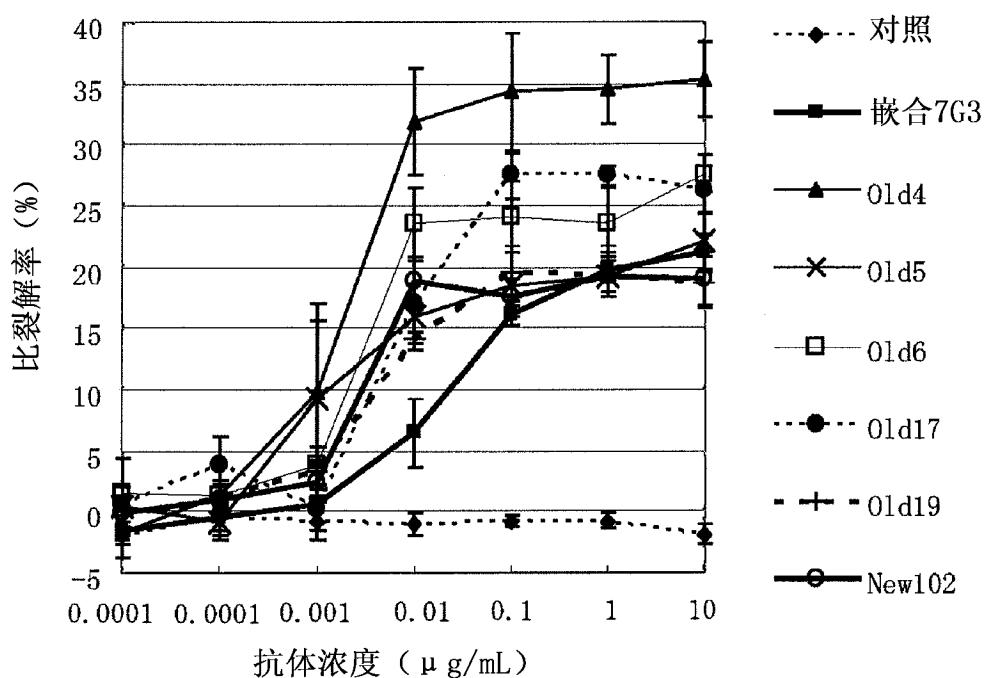


图 9

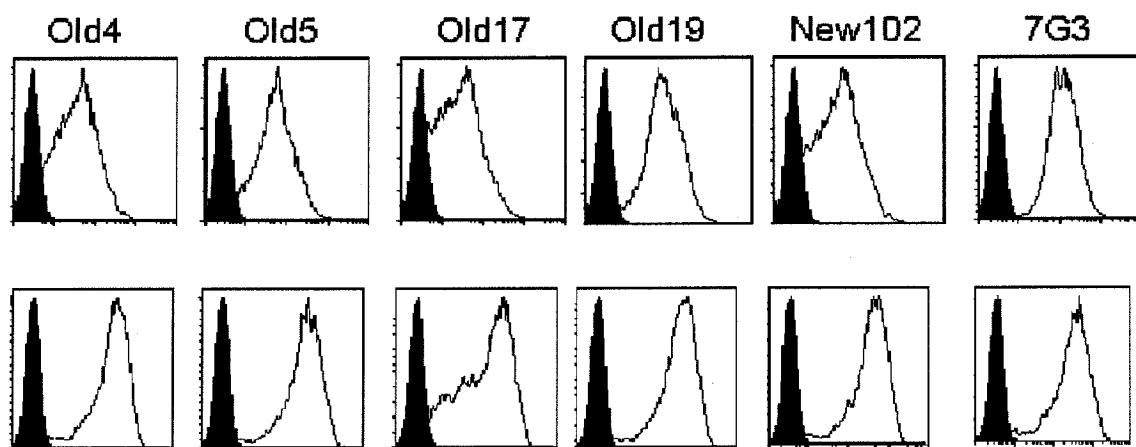


图 10

专利名称(译)	用于治疗血液肿瘤的抗IL-3RA抗体		
公开(公告)号	CN102459342A	公开(公告)日	2012-05-16
申请号	CN201080027383.1	申请日	2010-04-27
申请(专利权)人(译)	协和发酵麒麟株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	协和发酵麒麟株式会社		
[标]发明人	俵知纪 高柳晋一郎 稻垣好昌		
发明人	俵知纪 高柳晋一郎 稻垣好昌		
IPC分类号	C07K16/28 A61K39/395 A61P35/02 C07K16/46 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/577 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 C12R1/91		
CPC分类号	C07K16/2866 C07K16/3061 G01N33/57426 C07K2317/75 C07K2317/732 G01N33/57407 G01N33/57492 C07K2317/21 C07K2317/33 C07K2317/51 C07K2317/515 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/92 G01N2333/7155		
代理人(译)	张颖		
优先权	61/172923 2009-04-27 US		
其他公开文献	CN102459342B		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本申请提供了针对人类IL-3Ra链的抗体，其不抑制IL-3信号传导并与人类IL-3Ra链的B结构域结合，但是不结合人类IL-3Ra链的C结构域；用于预防或治疗血液肿瘤的组合物，在所述血液肿瘤中在对象的骨髓或外周血中发现了表达IL-3Ra的细胞，所述组合物的特征在于包含人类IL-3Ra抗体作为活性成分；以及用于治疗血液肿瘤的方法，在所述血液肿瘤中在骨髓或外周血中发现了表达IL-3Ra的细胞，所述方法的特征在于包含向对象给药包含人类IL-3Ra抗体作为活性成分的组合物。

SEQ ID NO	CDR1			CDR2			CDR3		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
014	IVI14115	TVAS	GIPFEGVYAKFG	GGSSGPVDL					
015	IVI17118	TVAS	GIPFDEVYAKFG	GGSSGPVDL					
017	IVI19121	NEAS	GIPFESTVYAKFG	GDAXGPVTHV					
019	I22123124	SYAS	GIPFCTVYAKFG	GHAYGPVYEV					
New02	I25126127	SYAS	EIPFEGVYAKFG	ETAVAGLGV					
066	I28129130	SHANN	SISSSSTVYADSKW	EDNGYED					

[表]