



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102791738 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 07

(21) 申请号 201080063488. 2

(22) 申请日 2010. 12. 07

(30) 优先权数据

09015310. 7 2009. 12. 10 EP

10173407. 7 2010. 08. 19 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 08. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2010/069090 2010. 12. 07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/070024 EN 2011. 06. 16

(73) 专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 M. 兰曾多尔弗 N. 蒂莫迪斯

G. 弗尔蒂格 A. 菲德勒 K. 卡鲁扎

M. 皮克尔 C. 里斯 S. 西伯

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 37/00(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2009026303 A1, 2009. 02. 26, 全文.

WO 2009112245 A1, 2009. 09. 17, 全文.

PATEL SHARMILA et al..

Colony-stimulating factor-1 receptor inhibitors for the treatment of cancer and inflammatory disease.. 《CURRENT TOPICS IN MEDICINAL CHEMISTRY》. 2009, 第9卷(第7期), 599-610.

审查员 彭海航

权利要求书2页 说明书40页

序列表34页 附图12页

(54) 发明名称

优先结合人 CSF1R 胞外域 4 的抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及针对人 CSF-1R 的抗体(抗 CSF-1R 抗体), 它们的生产方法, 含有所述抗体的药物组合物, 及其用途。

1. 一种结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于
 - a) 重链可变域为 SEQ ID NO:7 且轻链可变域为 SEQ ID NO:8 ;
或
 - b) a) 的重链可变域和轻链可变域的人源化形式。
2. 一种结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于
 - a) 重链可变域为 SEQ ID NO:23 且轻链可变域为 SEQ ID NO:24, 或
 - b) 重链可变域为 SEQ ID NO:31 且轻链可变域为 SEQ ID NO:32, 或
 - c) 重链可变域为 SEQ ID NO:39 且轻链可变域为 SEQ ID NO:40, 或
 - d) 重链可变域为 SEQ ID NO:47 且轻链可变域为 SEQ ID NO:48, 或
 - e) 重链可变域为 SEQ ID NO:55 且轻链可变域为 SEQ ID NO:56。
3. 一种结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于
 - a) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:1、CDR2 区 SEQ ID NO:2、和 CDR1 区 SEQ ID NO:3, 且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:4、CDR2 区 SEQ ID NO:5、和 CDR1 区 SEQ ID NO:6, 或
 - b) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:17、CDR2 区 SEQ ID NO:18、和 CDR1 区 SEQ ID NO:19, 且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:20、CDR2 区 SEQ ID NO:21、和 CDR1 区 SEQ ID NO:22, 或
 - c) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:25、CDR2 区 SEQ ID NO:26、和 CDR1 区 SEQ ID NO:27, 且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:28、CDR2 区 SEQ ID NO:29、和 CDR1 区 SEQ ID NO:30, 或
 - d) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:33、CDR2 区 SEQ ID NO:34、和 CDR1 区 SEQ ID NO:35, 且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:36、CDR2 区 SEQ ID NO:37、和 CDR1 区 SEQ ID NO:38, 或
 - e) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:41、CDR2 区 SEQ ID NO:42、和 CDR1 区 SEQ ID NO:43, 且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:44、CDR2 区 SEQ ID NO:45、和 CDR1 区 SEQ ID NO:46, 或
 - f) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:49、CDR2 区 SEQ ID NO:50、和 CDR1 区 SEQ ID NO:51, 且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:52、CDR2 区 SEQ ID NO:53、和 CDR1 区 SEQ ID NO:54。
4. 依照权利要求 1 至 3 任一项的抗体,特征在于所述抗体属于人 IgG4 亚类。
5. 依照权利要求 1 至 3 任一项的抗体,特征在于所述抗体属于人 IgG1 亚类。
6. 一种药物组合物,特征在于包含依照权利要求 1 至 3 的抗体。
7. 一种编码权利要求 1 至 3 任一项的抗体的核酸。
8. 一种表达载体,特征在于包含依照权利要求 7 的核酸,用于在原核或真核宿主细胞中表达依照权利要求 1 至 3 的抗体。
9. 一种原核或真核宿主细胞,其包含依照权利要求 8 的载体。
10. 一种用于生产依照权利要求 1 至 3 的抗体的方法,特征在于在原核或真核宿主细胞中表达依照权利要求 7 的核酸并自所述细胞或细胞培养物上清液回收所述抗体。
11. 依照权利要求 1 至 3 的抗体制造用于治疗 CSF-1R 介导的癌症的药物的用途。
12. 依照权利要求 1 至 3 的抗体制造用于治疗 CSF-1R 介导的骨丢失的药物的用途。

13. 依照权利要求 1 至 3 的抗体制造用于治疗 CSF-1R 介导的转移的药物的用途。
14. 依照权利要求 1 至 3 的抗体制造用于治疗 CSF-1R 介导的炎性疾病的药物的用途。

优先结合人 CSF1R 胞外域 4 的抗体及其用途

[0001] 本发明涉及针对人 CSF-1R 的抗体(抗 CSF-1R 抗体),它们的生产方法,含有所述抗体的药物组合物,及其用途。

[0002] 发明背景

[0003] 自 1986 年起就知道人 CSF-1 受体(CSF-1R;集落刺激因子 1 受体;同义词:M-CSF 受体;巨噬细胞集落刺激因子 1 受体,Fms 原癌基因,c-fms,SEQID NO:62)(Coussens, L., 等人,Nature 320 (1986)277-280)。CSF-1R 是一种生长因子且由 c-fms 原癌基因编码(综述见例如 Roth,P.,和 Stanley,E. R.,Curr. Top. Microbiol. Immunol. 181 (1992) 141-67)。

[0004] CSF-1R 是 CSF-1 (集落刺激因子 1,也称作 M-CSF,巨噬细胞集落刺激因子)的受体且介导此细胞因子的生物学效应(Sherr,C. J.,等人,Cell 41 (1985)665-676)。集落刺激因子-1 受体(CSF-1R) (也称作 c-fms)的克隆第一次记载于 Roussel, M. F., 等人, Nature 325 (1987) 549-552。在该出版物中,显示了 CSF-1R 具有依赖于该蛋白的 C 端尾中的变化(包括抑制性酪氨酸 969 磷酸化的丧失,其结合 Cb1 并由此调节受体下调)的转化潜力(Lee, P. S., 等人,Embo J. 18 (1999) 3616-3628)。最近,鉴定出 CSF-1R 的第二种配体,称作白介素-34 (IL-34) (Lin, H., 等人, Science 320 (2008) 807-811)。

[0005] 细胞因子 CSF-1 (集落刺激因子 1,也称作 M-CSF,巨噬细胞)在细胞外作为二硫化物连接的同二聚体找到(Stanley, E. R., 等人, Journal of Cellular Biochemistry 21 (1983) 151-159;Stanley, E. R., 等人, Stem Cells 12 Suppl. 1 (1995) 15-24)。

[0006] CSF-1R 信号传导的主要生物学效应是造血前体细胞至巨噬细胞谱系(包括破骨细胞)的分化、增殖、迁移、和存活。CSF-1R 的活化由其配体 CSF-1 (M-CSF) 和 IL-34 介导。CSF-1 (M-CSF)对 CSF-1R 的结合诱导同二聚体的形成和激酶通过酪氨酸磷酸化的活化(Li, W., 等人, EMBO Journal. 10 (1991) 277-288;Stanley, E. R., 等人, Mol. Reprod. Dev. 46 (1997) 4-10)。

[0007] 生物学活性同二聚体 CSF-1 在 CSF-1 受体胞外域(CSF-1R-ECD)的亚域 D1 至 D3 内结合 CSF-1R。CSF-1R-ECD 包含五个免疫球蛋白样亚域(命名为 D1 至 D5)。胞外域(CSF-1R-ECD)的亚域 D4 至 D5 不涉及 CSF-1 结合(Wang, Z., 等人, Molecular and Cellular Biology 13 (1993) 5348-5359)。亚域 D4 涉及二聚化(Yeung, Y-G., 等人, Molecular&Cellular Proteomics 2 (2003) 1143-1155;Pixley, F. J., 等人, Trends Cell Biol 14 (2004) 628-638)。

[0008] 别的信号传导由分别连接 PI3K/AKT 和 Ras/MAPK 途径的 PI3K 之 p85 亚基和 Grb2 介导。这两种重要信号传导途径能调节增殖、存活和凋亡。其它结合磷酸化 CSF-1R 胞内域的信号传导分子包括 STAT1、STAT3、PLCy、和 Cb1 (Bourette, R. P. 和 Rohrschneider, L. R., Growth Factors 17 (2000) 155-166)。

[0009] CSF-1R 信号传导在免疫应答中、在骨再建中及在生殖系统中具有生理学作用。已经显示了 CSF-1 (Pollard, J. W., Mol. Reprod. Dev. 46 (1997)54-61)或 CSF-1R (Dai, X. M., 等人, Blood 99 (2002)111-120)任一敲除的动物具有骨石化、造血、组织巨噬细胞、和生殖表型,与 CSF-1R 在各种细胞类型中的作用一致。

[0010] Sherr, C. J., 等人, Blood 73 (1989) 1786-1793 涉及一些针对 CSF-1R 的抗体, 它们抑制 CSF-1 活性(参见 Sherr, C. J. 等人, Blood 73 (1989)1786-1793)。Ashmun, R. A., 等人, Blood 73 (1989)827-837 涉及 CSF-1R 抗体。Lenda, D., 等人, Journal of Immunology 170(2003)3254-3262 涉及 CSF-1 缺陷小鼠中降低的巨噬细胞募集, 增殖, 和活化, 导致肾炎症期间降低的管凋亡。Kitaura, H., 等人, Journal of Dental Research 87(2008)396-400 提及一种抗 CSF-1 抗体, 其抑制正牙牙齿移动。WO 2001/030381 提及 CSF-1 活性抑制剂, 包括反义核苷酸和抗体, 虽然仅仅披露 CSF-1 反义核苷酸。WO2004/045532 涉及通过 CSF-1 拮抗剂的转移和骨丢失预防和转移癌治疗, 仅仅披露拮抗性抗 CSF-1 抗体。WO 2005/046657 涉及通过抗 CSF-1 抗体对炎性肠病的治疗。US 2002/0141994 涉及集落刺激因子的抑制剂。WO 2006/096489 涉及通过抗 CSF-1 抗体对类风湿性关节炎的治疗。WO 2009/026303 和 WO2009/112245 涉及某些抗 CSF-1R 抗体, 它们在胞外域(CSF-1R-ECD)的头三个亚域(D1 至 D3)内结合 CSF-1R。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明包含一种结合人 CSF-1R 的抗体, 特征在于该抗体以 1:50 或更低的比率结合人 CSF-1R 片段 de1D4 (SEQ ID NO:65) 和人 CSF-1R 胞外域(SEQ IDNO:64)。

[0013] 本发明进一步包含依照本发明的抗体, 特征在于

[0014] a) 重链可变域为 SEQ ID NO:7 且轻链可变域为 SEQ ID NO:8 ;

[0015] b) 重链可变域为 SEQ ID NO:15 且轻链可变域为 SEQ ID NO:16 ;

[0016] c) 重链可变域为 SEQ ID NO:75 且轻链可变域为 SEQ ID NO:76 ;

[0017] d) 重链可变域为 SEQ ID NO:83 且轻链可变域为 SEQ ID NO:84 ;

[0018] 或其人源化形式。

[0019] 本发明进一步包含依照本发明的抗体, 特征在于

[0020] a) 重链可变域为 SEQ ID NO:7 且轻链可变域为 SEQ ID NO:8 ;

[0021] b) 重链可变域为 SEQ ID NO:15 且轻链可变域为 SEQ ID NO:16 ;

[0022] 或其人源化形式。

[0023] 在一个实施方案中, 依照本发明的抗体特征在于

[0024] a) 重链可变域为 SEQ ID NO:23 且轻链可变域为 SEQ ID NO:24, 或

[0025] b) 重链可变域为 SEQ ID NO:31 且轻链可变域为 SEQ ID NO:32, 或

[0026] c) 重链可变域为 SEQ ID NO:39 且轻链可变域为 SEQ ID NO:40, 或

[0027] d) 重链可变域为 SEQ ID NO:47 且轻链可变域为 SEQ ID NO:48, 或

[0028] e) 重链可变域为 SEQ ID NO:55 且轻链可变域为 SEQ ID NO:56。

[0029] 本发明进一步包含依照本发明的抗体, 特征在于

[0030] a) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:1、CDR2 区 SEQ ID NO:2、和 CDR1 区 SEQ ID NO:3, 且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:4、CDR2 区 SEQ IDNO:5、和 CDR1 区 SEQ ID NO:6, 或

[0031] b) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:9、CDR2 区 SEQ ID NO:10、和 CDR1 区 SEQ ID NO:11, 且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:12、CDR2 区 SEQ ID NO:13、和 CDR1 区 SEQ ID NO:14, 或

[0032] c) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:17、CDR2 区 SEQ ID NO:18、和 CDR1 区 SEQ

ID NO:19,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:20、CDR2 区 SEQ ID NO:21、和 CDR1 区 SEQ ID NO:22,或

[0033] d) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:25、CDR2 区 SEQ ID NO:26、和 CDR1 区 SEQ ID NO:27,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:28、CDR2 区 SEQ ID NO:29、和 CDR1 区 SEQ ID NO:30,或

[0034] e) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:33、CDR2 区 SEQ ID NO:34、和 CDR1 区 SEQ ID NO:35,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:36、CDR2 区 SEQ ID NO:37、和 CDR1 区 SEQ ID NO:38,或

[0035] f) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:41、CDR2 区 SEQ ID NO:42、和 CDR1 区 SEQ ID NO:43,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:44、CDR2 区 SEQ ID NO:45、和 CDR1 区 SEQ ID NO:46,或

[0036] g) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:49、CDR2 区 SEQ ID NO:50、和 CDR1 区 SEQ ID NO:51,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:52、CDR2 区 SEQ ID NO:53、和 CDR1 区 SEQ ID NO:54,或

[0037] h) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:69、CDR2 区 SEQ ID NO:70、和 CDR1 区 SEQ ID NO:71,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:72、CDR2 区 SEQ ID NO:73、和 CDR1 区 SEQ ID NO:74,或

[0038] i) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:77、CDR2 区 SEQ ID NO:78、和 CDR1 区 SEQ ID NO:79,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:80、CDR2 区 SEQ ID NO:81、和 CDR1 区 SEQ ID NO:82。

[0039] 优选地,依照本发明的抗体属于人 IgG1 亚类或人 IgG4 亚类。

[0040] 本发明的又一个实施方案是一种药物组合物,其包含依照本发明的抗体。

[0041] 本发明进一步包含依照本发明的抗体制造用于治疗 CSF-1R 介导的疾病的药物的用途。

[0042] 本发明进一步包含依照本发明的抗体制造用于治疗癌症的药物的用途。

[0043] 本发明进一步包含依照本发明的抗体制造用于治疗骨丢失的药物的用途。

[0044] 本发明进一步包含依照本发明的抗体制造用于治疗转移的药物的用途。

[0045] 本发明进一步包含依照本发明的抗体制造用于治疗炎症性疾病的药物的用途。

[0046] 本发明进一步包含依照本发明的抗体,其用于治疗 CSF-1R 介导的疾病。

[0047] 本发明进一步包含依照本发明的抗体,其用于治疗癌症。

[0048] 本发明进一步包含依照本发明的抗体,其用于治疗骨丢失。

[0049] 本发明进一步包含依照本发明的抗体,其用于治疗转移。

[0050] 本发明进一步包含依照本发明的抗体,其用于治疗炎症性疾病。

[0051] 本发明的又一个实施方案是一种编码依照本发明的抗体的核酸,特征在于

[0052] a) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:1、CDR2 区 SEQ ID NO:2、和 CDR1 区 SEQ ID NO:3,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:4、CDR2 区 SEQ ID NO:5、和 CDR1 区 SEQ ID NO:6,或

[0053] b) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:9、CDR2 区 SEQ ID NO:10、和 CDR1 区 SEQ ID NO:11,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:12、CDR2 区 SEQ ID NO:13、和 CDR1 区 SEQ

ID NO:14,或

[0054] c)重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:17、CDR2 区 SEQ ID NO:18、和 CDR1 区 SEQ ID NO:19,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:20、CDR2 区 SEQ ID NO:21、和 CDR1 区 SEQ ID NO:22,或

[0055] d)重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:25、CDR2 区 SEQ ID NO:26、和 CDR1 区 SEQ ID NO:27,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:28、CDR2 区 SEQ ID NO:29、和 CDR1 区 SEQ ID NO:30,或

[0056] e)重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:33、CDR2 区 SEQ ID NO:34、和 CDR1 区 SEQ ID NO:35,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:36、CDR2 区 SEQ ID NO:37、和 CDR1 区 SEQ ID NO:38,或

[0057] f)重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:41、CDR2 区 SEQ ID NO:42、和 CDR1 区 SEQ ID NO:43,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:44、CDR2 区 SEQ ID NO:45、和 CDR1 区 SEQ ID NO:46,或

[0058] g)重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:49、CDR2 区 SEQ ID NO:50、和 CDR1 区 SEQ ID NO:51,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:52、CDR2 区 SEQ ID NO:53、和 CDR1 区 SEQ ID NO:54,或

[0059] h)重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:69、CDR2 区 SEQ ID NO:70、和 CDR1 区 SEQ ID NO:71,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:72、CDR2 区 SEQ ID NO:73、和 CDR1 区 SEQ ID NO:74,或

[0060] i)重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:77、CDR2 区 SEQ ID NO:78、和 CDR1 区 SEQ ID NO:79,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:80、CDR2 区 SEQ ID NO:81、和 CDR1 区 SEQ ID NO:82。

[0061] 本发明的又一个实施方案是编码依照本发明的抗体的核酸,特征在于

[0062] a)重链可变域为 SEQ ID NO:7 且轻链可变域为 SEQ ID NO:8 ;

[0063] b)重链可变域为 SEQ ID NO:15 且轻链可变域为 SEQ ID NO:16 ;

[0064] c)重链可变域为 SEQ ID NO:75 且轻链可变域为 SEQ ID NO:76 ;

[0065] d)重链可变域为 SEQ ID NO:83 且轻链可变域为 SEQ ID NO:84 ;

[0066] 或其人源化形式。

[0067] 本发明的又一个实施方案是编码依照本发明的抗体的核酸,特征在于

[0068] a)重链可变域为 SEQ ID NO:23 且轻链可变域为 SEQ ID NO:24,或

[0069] b)重链可变域为 SEQ ID NO:31 且轻链可变域为 SEQ ID NO:32,或

[0070] c)重链可变域为 SEQ ID NO:39 且轻链可变域为 SEQ ID NO:40,或

[0071] d)重链可变域为 SEQ ID NO:47 且轻链可变域为 SEQ ID NO:48,或

[0072] e)重链可变域为 SEQ ID NO:55 且轻链可变域为 SEQ ID NO:56。

[0073] 本发明进一步提供含有依照本发明的核酸,能够在原核或真核宿主细胞中表达所述核酸的表达载体,及含有此类载体,用于重组生产依照本发明的抗体的宿主细胞。

[0074] 本发明进一步包含原核或真核宿主细胞,其包含依照本发明的载体。

[0075] 本发明进一步包含一种用于生产依照本发明的重组人或人源化抗体的方法,特征在于在原核或真核宿主细胞中表达依照本发明的核酸并自所述细胞或细胞培养物上清液

回收所述抗体。本发明进一步包含通过此类重组方法获得的抗体。

[0076] 依照本发明的抗体对需要 CSF-1R 靶向疗法的患者显示好处。依照本发明的抗体针对不依赖配体的和依赖配体的增殖显示有效抗增殖活性且因此在癌症和转移的治疗中尤其有用。

[0077] 本发明进一步提供一种用于治疗患有癌症的患者的方法,包括对诊断为具有此类疾病(且因此需要此类疗法)的患者施用有效量的依照本发明的抗体。该抗体优选在药物组合中施用。

[0078] 本发明的又一个实施方案是一种用于治疗患有癌症的患者的方法,特征在于对该患者施用依照本发明的抗体。

[0079] 令人惊讶地,已经发现了使用人 CSF-1R-ECD 的 D4 亚域被删除的人 CSF-1R 片段 de1D4 (SEQ ID NO:65),能选择出依照本发明的新抗 CSF-1R 抗体。这些抗体显示有价值的特性,像对通过逆转录病毒经全长野生型 CSF-1R (SEQ ID NO:62)或突变型 CSF-1R L301S Y969F (SEQ ID NO:63)任一的表达载体感染的 NIH 3T3 细胞卓越的依赖配体的细胞生长抑制和同时不依赖配体的细胞生长抑制,其中突变型 CSF-1R 重组细胞能够不依赖 CSF-1 配体而形成球状体。而且,依照本发明的抗体抑制人和猕猴(二者)巨噬细胞分化,正如它们抑制人和猕猴单核细胞的存活。

[0080] 发明详述

[0081] 本发明包含一种结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于该抗体以 1:50 或更低的比率结合人 CSF-1R 片段 de1D4 (包含胞外亚域 D1-D3 和 D5) (SEQ ID NO:65)和人 CSF-1R 胞外域 (CSF-1R-ECD) (包含胞外亚域 D1-D5) (SEQ ID NO:64)。

[0082] 本发明进一步包含一种依照本发明的抗体,特征在于包含 CDR3 区 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:47 或 SEQ ID NO:55 作为重链可变域 CDR3 区。

[0083] 本发明进一步包含依照本发明的抗体,特征在于

[0084] a) 重链可变域为 SEQ ID NO:7 且轻链可变域为 SEQ ID NO:8 ;

[0085] b) 重链可变域为 SEQ ID NO:15 且轻链可变域为 SEQ ID NO:16 ;

[0086] 或其人源化形式。

[0087] 本发明进一步包含依照本发明的抗体,特征在于

[0088] a) 重链可变域为 SEQ ID NO:7 且轻链可变域为 SEQ ID NO:8 ;

[0089] b) 重链可变域为 SEQ ID NO:15 且轻链可变域为 SEQ ID NO:16 ;

[0090] c) 重链可变域为 SEQ ID NO:75 且轻链可变域为 SEQ ID NO:76 ;

[0091] d) 重链可变域为 SEQ ID NO:83 且轻链可变域为 SEQ ID NO:84 ;

[0092] 或其人源化形式。

[0093] 本发明进一步包含依照本发明的抗体,特征在于

[0094] 重链可变域为 SEQ ID NO:7 且轻链可变域为 SEQ ID NO:8,或其人源化形式。

[0095] 在一个实施方案中,依照本发明的抗体特征在于

[0096] a) 重链可变域为 SEQ ID NO:23 且轻链可变域为 SEQ ID NO:24,或

[0097] b) 重链可变域为 SEQ ID NO:31 且轻链可变域为 SEQ ID NO:32,或

[0098] c) 重链可变域为 SEQ ID NO:39 且轻链可变域为 SEQ ID NO:40,或

- [0099] d) 重链可变域为 SEQ ID NO:47 且轻链可变域为 SEQ ID NO:48, 或
- [0100] e) 重链可变域为 SEQ ID NO:55 且轻链可变域为 SEQ ID NO:56。
- [0101] 在一个实施方案中, 依照本发明的抗体特征在于
- [0102] a) 重链可变域为 SEQ ID NO:23 且轻链可变域为 SEQ ID NO:24, 或
- [0103] b) 重链可变域为 SEQ ID NO:31 且轻链可变域为 SEQ ID NO:32, 或
- [0104] c) 重链可变域为 SEQ ID NO:39 且轻链可变域为 SEQ ID NO:40, 或
- [0105] d) 重链可变域为 SEQ ID NO:47 且轻链可变域为 SEQ ID NO:48。
- [0106] 在一个实施方案中, 依照本发明的抗体特征在于
- [0107] 重链可变域为 SEQ ID NO:23 且轻链可变域为 SEQ ID NO:24。
- [0108] 在一个实施方案中, 依照本发明的抗体特征在于
- [0109] 重链可变域为 SEQ ID NO:31 且轻链可变域为 SEQ ID NO:32。
- [0110] 在一个实施方案中, 依照本发明的抗体特征在于
- [0111] 重链可变域为 SEQ ID NO:39 且轻链可变域为 SEQ ID NO:40。
- [0112] 在一个实施方案中, 依照本发明的抗体特征在于
- [0113] 重链可变域为 SEQ ID NO:47 且轻链可变域为 SEQ ID NO:48。
- [0114] 本发明进一步包含依照本发明的抗体, 特征在于
- [0115] 重链可变域为 SEQ ID NO:15 且轻链可变域为 SEQ ID NO:16 ; 或其人源化形式。
- [0116] 本发明进一步包含依照本发明的抗体, 特征在于
- [0117] 重链可变域为 SEQ ID NO:75 且轻链可变域为 SEQ ID NO:76 ; 或其人源化形式。
- [0118] 本发明进一步包含依照本发明的抗体, 特征在于
- [0119] 重链可变域为 SEQ ID NO:83 且轻链可变域为 SEQ ID NO:84 ; 或其人源化形式。
- [0120] 本发明进一步包含依照本发明的抗体, 特征在于
- [0121] a) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:1、CDR2 区 SEQ ID NO:2、和 CDR1 区 SEQ ID NO:3, 且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:4、CDR2 区 SEQ ID NO:5、和 CDR1 区 SEQ ID NO:6, 或
- [0122] b) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:9、CDR2 区 SEQ ID NO:10、和 CDR1 区 SEQ ID NO:11, 且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:12、CDR2 区 SEQ ID NO:13、和 CDR1 区 SEQ ID NO:14, 或
- [0123] c) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:17、CDR2 区 SEQ ID NO:18、和 CDR1 区 SEQ ID NO:19, 且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:20、CDR2 区 SEQ ID NO:21、和 CDR1 区 SEQ ID NO:22, 或
- [0124] d) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:25、CDR2 区 SEQ ID NO:26、和 CDR1 区 SEQ ID NO:27, 且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:28、CDR2 区 SEQ ID NO:29、和 CDR1 区 SEQ ID NO:30, 或
- [0125] e) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:33、CDR2 区 SEQ ID NO:34、和 CDR1 区 SEQ ID NO:35, 且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:36、CDR2 区 SEQ ID NO:37、和 CDR1 区 SEQ ID NO:38, 或
- [0126] f) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:41、CDR2 区 SEQ ID NO:42、和 CDR1 区 SEQ ID NO:43, 且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:44、CDR2 区 SEQ ID NO:45、和 CDR1 区 SEQ

ID NO:46,或

[0127] g)重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:49、CDR2 区 SEQ ID NO:50、和 CDR1 区 SEQ ID NO:51,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:52、CDR2 区 SEQ ID NO:53、和 CDR1 区 SEQ ID NO:54。

[0128] 本发明进一步包含依照本发明的抗体,特征在于

[0129] a)重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:1、CDR2 区 SEQ ID NO:2、和 CDR1 区 SEQ ID NO:3,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:4、CDR2 区 SEQ ID NO:5、和 CDR1 区 SEQ ID NO:6,或

[0130] b)重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:9、CDR2 区 SEQ ID NO:10、和 CDR1 区 SEQ ID NO:11,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:12、CDR2 区 SEQ ID NO:13、和 CDR1 区 SEQ ID NO:14,或

[0131] c)重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:17、CDR2 区 SEQ ID NO:18、和 CDR1 区 SEQ ID NO:19,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:20、CDR2 区 SEQ ID NO:21、和 CDR1 区 SEQ ID NO:22,或

[0132] d)重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:25、CDR2 区 SEQ ID NO:26、和 CDR1 区 SEQ ID NO:27,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:28、CDR2 区 SEQ ID NO:29、和 CDR1 区 SEQ ID NO:30,或

[0133] e)重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:33、CDR2 区 SEQ ID NO:34、和 CDR1 区 SEQ ID NO:35,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:36、CDR2 区 SEQ ID NO:37、和 CDR1 区 SEQ ID NO:38,或

[0134] f)重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:41、CDR2 区 SEQ ID NO:42、和 CDR1 区 SEQ ID NO:43,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:44、CDR2 区 SEQ ID NO:45、和 CDR1 区 SEQ ID NO:46,或

[0135] g)重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:49、CDR2 区 SEQ ID NO:50、和 CDR1 区 SEQ ID NO:51,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:52、CDR2 区 SEQ ID NO:53、和 CDR1 区 SEQ ID NO:54,或

[0136] h)重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:69、CDR2 区 SEQ ID NO:70、和 CDR1 区 SEQ ID NO:71,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:72、CDR2 区 SEQ ID NO:73、和 CDR1 区 SEQ ID NO:74,或

[0137] i)重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:77、CDR2 区 SEQ ID NO:78、和 CDR1 区 SEQ ID NO:79,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:80、CDR2 区 SEQ ID NO:81、和 CDR1 区 SEQ ID NO:82。

[0138] 在一个实施方案中,依照本发明的抗体特征在于

[0139] a)重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:69、CDR2 区 SEQ ID NO:70、和 CDR1 区 SEQ ID NO:71,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:72、CDR2 区 SEQ ID NO:73、和 CDR1 区 SEQ ID NO:74,或

[0140] b)重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:77、CDR2 区 SEQ ID NO:78、和 CDR1 区 SEQ ID NO:79,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:80、CDR2 区 SEQ ID NO:81、和 CDR1 区 SEQ ID NO:82。

[0141] 在一个实施方案中,依照本发明的抗体特征在于

[0142] a) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:17、CDR2 区 SEQ ID NO:18、和 CDR1 区 SEQ ID NO:19,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:20、CDR2 区 SEQ ID NO:21、和 CDR1 区 SEQ ID NO:22,或

[0143] b) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:25、CDR2 区 SEQ ID NO:26、和 CDR1 区 SEQ ID NO:27,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:28、CDR2 区 SEQ ID NO:29、和 CDR1 区 SEQ ID NO:30,或

[0144] c) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:33、CDR2 区 SEQ ID NO:34、和 CDR1 区 SEQ ID NO:35,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:36、CDR2 区 SEQ ID NO:37、和 CDR1 区 SEQ ID NO:38,或

[0145] d) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:41、CDR2 区 SEQ ID NO:42、和 CDR1 区 SEQ ID NO:43,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:44、CDR2 区 SEQ ID NO:45、和 CDR1 区 SEQ ID NO:46,或

[0146] e) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:49、CDR2 区 SEQ ID NO:50、和 CDR1 区 SEQ ID NO:51,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:52、CDR2 区 SEQ ID NO:53、和 CDR1 区 SEQ ID NO:54。

[0147] 在一个实施方案中,依照本发明的抗体特征在于

[0148] a) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:17、CDR2 区 SEQ ID NO:18、和 CDR1 区 SEQ ID NO:19,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:20、CDR2 区 SEQ ID NO:21、和 CDR1 区 SEQ ID NO:22,或

[0149] b) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:25、CDR2 区 SEQ ID NO:26、和 CDR1 区 SEQ ID NO:27,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:28、CDR2 区 SEQ ID NO:29、和 CDR1 区 SEQ ID NO:30,或

[0150] c) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:33、CDR2 区 SEQ ID NO:34、和 CDR1 区 SEQ ID NO:35,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:36、CDR2 区 SEQ ID NO:37、和 CDR1 区 SEQ ID NO:38,或

[0151] d) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:41、CDR2 区 SEQ ID NO:42、和 CDR1 区 SEQ ID NO:43,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:44、CDR2 区 SEQ ID NO:45、和 CDR1 区 SEQ ID NO:46。

[0152] 在一个实施方案中,依照本发明的抗体特征在于

[0153] 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:17、CDR2 区 SEQ ID NO:18、和 CDR1 区 SEQ ID NO:19,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:20、CDR2 区 SEQ ID NO:21、和 CDR1 区 SEQ ID NO:22。

[0154] 在一个实施方案中,依照本发明的抗体特征在于

[0155] 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:25、CDR2 区 SEQ ID NO:26、和 CDR1 区 SEQ ID NO:27,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:28、CDR2 区 SEQ ID NO:29、和 CDR1 区 SEQ ID NO:30。

[0156] 在一个实施方案中,依照本发明的抗体特征在于

[0157] 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:33、CDR2 区 SEQ ID NO:34、和 CDR1 区 SEQ ID

NO:35,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:36、CDR2 区 SEQ ID NO:37、和 CDR1 区 SEQ ID NO:38。

[0158] 在一个实施方案中,依照本发明的抗体特征在于

[0159] 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:41、CDR2 区 SEQ ID NO:42、和 CDR1 区 SEQ ID NO:43,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:44、CDR2 区 SEQ ID NO:45、和 CDR1 区 SEQ ID NO:46。

[0160] 在一个实施方案中,结合人 CSF-1R,特征在于以 1:50 或更低的比率结合人 CSF-1R 片段 de1D4 (SEQ ID NO:65) 和人 CSF-1R-ECD (SEQ ID NO:64) 的抗体进一步特征在于不结合人 CSF-1R 片段 D1-D3 (SEQ ID NO:66)。

[0161] 术语“抗体”涵盖各种形式的抗体,包括但不限于完整抗体、抗体片段、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、T 细胞表位消减抗体、和别的遗传工程抗体,只要依照本发明的特征性特性得到保留。“抗体片段”包含全长抗体的一部分,优选其可变域,或至少其抗原结合位点。抗体片段的例子包括双抗体、单链抗体分子、和自抗体片段形成的多特异性抗体。scFv 抗体例如记载于 Houston, J. S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-88。另外,抗体片段包含单链多肽,其具有结合 CSF-1R 的 V_H 域(即能够与 V_L 域一起装配)或结合 CSF-1R 的 V_L 域(即能够与 V_H 域一起装配)装配成功能性抗原结合位点并由此提供该特性的特征。

[0162] 如本文中使用的,术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”指单一氨基酸组成的抗体分子的制备物。

[0163] 术语“嵌合抗体”指通常通过重组 DNA 技术制备的,包含来自小鼠的可变区,即结合区和自不同来源或物种衍生的恒定区的至少一部分的单克隆抗体。包含小鼠可变区和人恒定区的嵌合抗体是尤其优选的。此类大鼠/人嵌合抗体是表达的包含编码大鼠免疫球蛋白可变区的 DNA 区段和编码人免疫球蛋白恒定区的 DNA 区段的免疫球蛋白基因的产物。本发明涵盖的“嵌合抗体”的其它形式是那些其中类或亚类已经相对于初始抗体修饰或改变的。此类“嵌合”抗体也称作“类转换抗体”。用于生成嵌合抗体的方法涉及本领域现在公知的常规重组 DNA 和基因转染技术。参见例如 Morrison, S. L., 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855; US 5, 202, 238 和 US 5, 204, 244。

[0164] 术语“人源化”抗体指其中框架或“互补决定区”(CDR)已经修饰成包含特异性与亲本免疫球蛋白不同的免疫球蛋白的 CDR 的抗体。在一个优选的实施方案中,将鼠 CDR 嫁接入人抗体的框架区以制备“人源化抗体”。参见例如 Riechmann, L., 等人, *Nature* 332 (1988) 323-327; 及 Neuberger, M. S., 等人, *Nature* 314 (1985) 268-270。任选地,可以通过别的突变来修饰框架区。而且,可以通过一处或多处突变来修饰 CDR 以生成依照本发明的抗体,例如通过基于分子建模的诱变,如记载于 Riechmann, L., 等人, *Nature* 332 (1988) 323-327 及 Queen, C., 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033, 或其它。特别优选的 CDR 对应于那些呈现识别上文为嵌合抗体所述的抗原的序列的。依照本发明的抗体(其例如是小鼠起源的)的人源化形式指基于小鼠抗体序列,其中 V_H 和 V_L 通过标准技术(包括 CDR 嫁接和任选随后框架区和 CDR 中某些氨基酸的诱变)人源化的抗体。优选地,此类人源化形式是与人恒定区(见例如序列 SEQ ID NO:57-61)嵌合化的。

[0165] 本发明涵盖的“人源化抗体”的其它形式是那些其中恒定区已经相对于初始抗体额外修饰或改变以生成依照本发明的特性的,尤其在 C1q 结合和/或 Fc 受体(FcR)结合方

面。

[0166] 在下面的实施例中,术语“Mab”或“muMab”指鼠单克隆抗体,诸如 Mab 2F11 或 Mab 2E10,而术语“hMab”指此类鼠抗体的人源化单克隆型式,诸如 hMab 2F11-c11、hMab 2F11-d8、hMab 2F11-e7、hMab 2F11-f12、等。

[0167] 如本文中使用的,术语“人抗体”意图包括具有自人种系免疫球蛋白序列衍生的可变和恒定区的抗体。人抗体是本领域现有技术中熟知的(van Dijk, M. A., 和 van de Winkel, J. G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374)。人抗体也可在转基因动物(例如小鼠)中生成,该转基因动物能够在免疫时生成抗体全集或选集,没有内源免疫球蛋白生成。在此类种系突变型小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因系列会导致在抗原攻击时生成抗体(参见例如 Jakobovits, A., 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., 等人, *Nature* 362 (1993) 255-258; Brueggemann, M., 等人, *Year Immunol.* 7(1993)33-40)。人抗体也可在噬菌体展示文库中生成(Hoogenboom, H. R., 和 Winter, G. J. *Mol. Biol.* 227 (1992)381-388; Marks, J. D., 等人, *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597)。Cole 等人, 和 Boerner 等人的技术也可用于制备人单克隆抗体(Cole, S. P. C., 等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77(1985); 及 Boerner, P., 等人, *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95)。正如关于依照本发明的嵌合和人源化抗体早就提及的,如本文中使用的,术语“人抗体”也包含恒定区中经过修饰以生成依照本发明的特性的此类抗体,尤其在 C1q 结合和 / 或 FcR 结合方面,例如通过“类转换”即 Fc 部分的改变或突变(例如自 IgG1 至 IgG4 和 / 或 IgG1/IgG4 突变)。

[0168] 如本文中使用的,术语“重组人抗体”意图包括所有通过重组手段制备、表达、创建或分离的人抗体,诸如自宿主细胞诸如 NS0 或 CHO 细胞或自对于使用转染入宿主细胞中的重组表达载体表达的人免疫球蛋白基因或抗体为转基因的动物(例如小鼠)分离的抗体。此类重组人抗体具有重排形式的可变和恒定区。依照本发明的重组人抗体已经进行体内细胞超突变。如此,重组抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列是如下的序列,虽然自人种系 VH 和 VL 序列衍生及与人种系 VH 和 VL 序列有关,但是在体内可以不天然存在于人抗体种系集合内。

[0169] 另外,依照本发明的抗体包括如下的抗体,其具有“保守序列修饰”,不影响或改变上文所述依照本发明的抗体的特征的核苷酸和氨基酸序列修饰。可以通过本领域已知的标准技术来引入修饰,诸如定点诱变和 PCR 介导的诱变。保守氨基酸替代包括将某个氨基酸残基用具有相似侧链的氨基酸残基替换。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β -分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。如此,优选地,人抗 CSF-1R 抗体中的预测非必需氨基酸残基可以用来自相同侧链家族的另一种氨基酸残基替换。

[0170] 可以基于分子建模通过诱变来实施氨基酸替代,如记载于 Riechmann, L., 等人, *Nature* 332 (1988) 323-327 及 Queen, C., 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033。

[0171] 自 1986 年起就知道人 CSF-1R (CSF-1 受体;同义词:M-CSF 受体;巨噬细胞集落刺激因子 1 受体, Fms 原癌基因, c-fms, SEQ ID NO:22) (Coussens, L., 等人, Nature 320 (1986) 277-280)。CSF-1R 是一种生长因子且由 c-fms 原癌基因编码(综述见例如 Roth, P. 和 Stanley, E. R., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 181 (1992) 141-67)。

[0172] CSF-1R 是 CSF-1 (巨噬细胞集落刺激因子, 也称作 M-CSF) IL-34 的受体且介导这些细胞因子的生物学效应 (Sherr, C. J., 等人, Cell 41 (1985) 665-676 及 Lin, H., 等人, Science 320 (2008) 807-811)。集落刺激因子 -1 受体(也称作 c-fms)的克隆第一次记载于 Roussel, M. F., 等人, Nature 325 (1987) 549-552。在该出版物中, 显示了 CSF-1R 具有依赖于该蛋白的 C 端尾中的变化(包括抑制性酪氨酸 969 磷酸化的丧失, 其结合 Cbl 并由此调节受体下调)的转化潜力 (Lee, P. S., 等人, Embo J. 18 (1999) 3616-3628)。

[0173] CSF-1R 是一种单链, 跨膜受体酪氨酸激酶 (RTK) 及含有免疫球蛋白 (Ig) 基序的 RTK 家族的成员, 特征在于该受体的胞外域 (ECD) 中 5 个重复的 Ig 样亚域 D1-D5 (Wang, Z., 等人, Molecular and Cellular Biology 13 (1993) 5348-5359)。人 CSF-1R 胞外域 (CSF-1R-ECD) (SEQ ID NO:64) 包含所有五个胞外 Ig 样亚域 D1-D5。人 CSF-1R 片段 de1D4 (SEQ ID NO:65) 包含胞外 Ig 样亚域 D1-D3 和 D5, 但是缺失 D4 亚域。人 CSF-1R 片段 D1-D3 (SEQ ID NO:66) 包含各个亚域 D 1-D3。列出了没有信号肽 MGS GPGVLLL LLVATAWHGQG (SEQ ID NO:67) 的序列。

[0174] 胞内蛋白质酪氨酸激酶域被独特的插入域中断, 该插入域也存在于其它相关 RTK III 类家族成员中, 包括血小板衍生生长因子受体 (PDGFR)、干细胞生长因子受体 (c-Kit) 和 fins 样细胞因子受体 (FLT3)。不管这个生长因子受体家族中的结构同源性, 它们具有截然不同的组织特异性功能。

[0175] CSF-1R 主要在单核细胞谱系的细胞上及在雌性生殖道和胎盘中表达。另外, 已经报告了皮肤中的 Langerhans 细胞 (一个平滑肌细胞子集) (Inaba, T., 等人, J. Biol. Chem. 267 (1992) 5693-5699)、B 细胞 (Baker, A. H., 等人, Oncogene 8 (1993) 371-378) 和小胶质细胞 (Sawada, M., 等人, Brain Res. 509 (1990) 119-124) 中的 CSF-1R 表达。已知具有突变型人 CSF-1R (SEQ ID NO:23) 的细胞增殖不依赖配体刺激。

[0176] 如本文中使用的, “结合人 CSF-1R” 或 “特异性结合人 CSF-1R” 指抗体在 35° C 以 K_D 值 1.0×10^{-8} mol/l 或更低 (在一个实施方案中, 在 35° C 以 K_D 值 1.0×10^{-9} mol/l 或更低) 的结合亲和力特异性结合人 CSF-1R 抗原。结合亲和力在 35° C 用标准结合测定法测定, 诸如表面等离子共振技术 (Biacore®, GE-Healthcare, Uppsala, Sweden)。实施例 9 中描述了一种用于测定结合亲和力的 K_D 值的方法。如此, 如本文中使用的, “结合人 CSF-1R 的抗体” 指在 35° C 以 K_D 1.0×10^{-8} mol/l 或更低 (优选地, 1.0×10^{-8} mol/l- 1.0×10^{-12} mol/l), 优选地, 在 35° C 以 K_D 1.0×10^{-9} mol/l 或更低 (优选地, 1.0×10^{-9} mol/l- 1.0×10^{-12} mol/l) 的结合亲和力特异性结合人 CSF-1R 抗原的抗体。

[0177] 如本文中使用的, 通过实施例 4 中描述的表面等离子共振测定法 (Biacore 测定法) 测量 “对人 CSF-1R 片段 de1D4 (SEQ ID NO:65) 和对人 CSF-1R 胞外域 (SEQ ID NO:64) 的结合”。分别将人 CSF-1R 片段 de1D4 (SEQ ID NO:65) 或人 CSF-1R 胞外域 (SEQ ID NO:64) 捕捉至表面 (各自至分开的表面) 并添加测试抗体 (各自在分开的测量中) 并测定各自结合信号 (响应单位 (RU))。减去参照信号 (空白表面)。如果非结合性测试抗体的信号略微低于

0,那么将该数值设置为0。然后,确定各自结合信号(对人 CSF-1R 片段 de1D4 的结合信号(RU) / 对人 CSF-1R 胞外域(CSF-1R-ECD)的结合信号(RU))的比值。依照本发明的抗体具有 1:50 或更低,优选 1:100 或更低的结合信号比(RU (de1D4) /RU (CSF-1R-ECD)) (包括的下限为 0 (例如如果 RU 为 0,那么比值为 0:50 或 0:100))。

[0178] 这意味着此类依照本发明的抗 CSF-1R 抗体不结合人 CSF-1R 片段 de1D4(像抗 CCR5 抗体 m<CCR5>Pz03.1C5(于 2004 年 8 月 18 日作为 DSM ACC 2683 保藏于 DSMZ))且对于对人 CSF-1R 片段 de1D4 的结合具有抗 CCR5 抗体 m<CCR5>Pz03.1C5 的范围中的结合信号,其在实施例 4 所示表面等离子共振(BIAcore)测定法中低于 20RU (响应单位),优选低于 10RU。

[0179] 术语“结合人 CSF-1R 片段 D1-D3”指通过表面等离子共振测定法(Biacore 测定法)进行的结合亲和力测定。将测试抗体捕捉至表面,添加人 CSF-1R 片段 D1-D3 (SEQ ID NO:66),并测定各自结合亲和力。术语“不结合人 CSF-1R 片段 D1-D3”表示在此类测定法中,检测到的信号在不超过背景信号的 1.2 倍的范围中,且因此检测不到显著的结合及无法测定结合亲和力(见实施例 10)。

[0180] 本发明的一个实施方案是用于选择依照本发明的抗体的筛选方法,包括下述步骤:

[0181] a) 通过表面等离子共振测定法(Biacore 测定法)测定抗 CSF-1R 抗体对人 CSF-1R 片段 de1D4 (SEQ ID NO:65)和人对人 CSF-1R 胞外域(CSF-1R-ECD) (SEQ ID NO:64)的结合信号(响应单位(RU))。

[0182] b)选择结合信号比值(人 CSF-1R 片段 de1D4/ 人 CSF-1R 胞外域(CSF-1R-ECD))为 50:1 或更低的抗体。

[0183] 在一个实施方案中,该测定在 25° C 实施。

[0184] 在一个实施方案中,作为额外的步骤,该筛选方法包括测量抗 CSF-1R 抗体对人 CSF-1R 片段 D1-D3 (SEQ ID NO:66) (D1-D3)的结合并选择显示出结合所述片段的抗体。

[0185] 术语“表位”表示人 CSF-1R 中能够特异性结合抗体的蛋白质决定簇。表位通常由分子诸如氨基酸或糖侧链的化学活性表面聚组组成,而且表位通常具有特定的三维结构特征,以及特定的电荷特征。构象性和非构象性表位的区别在于对前者而非后者的结合在变性溶剂存在下丧失。优选地,依照本发明的抗体特异性结合天然的 CSF-1R 和变性的 CSF-1R。

[0186] 如本文中使用的,“可变域”(轻链的可变域(V_L),重链的可变域(V_H))表示轻和重链域对中的每一个,它们直接涉及抗体对抗原的结合。可变轻和重链域具有相同的整体结构,而且每个域包含四个框架(FR)区,它们的序列是广泛保守的,由三个“高变区”(或互补决定区,CDR)连接。框架区采取 β -片层构象,而且 CDR 可以形成连接 β -片层结构的环。每条链中的 CDR 通过框架区保持其三维结构,并且与来自另一条链的 CDR 一起形成抗原结合位点。抗体的重和轻链 CDR3 区在依照本发明的抗体的结合特异性 / 亲和力中发挥特别重要的作用,而且因此提供本发明的又一个目的。

[0187] 术语“抗体的抗原结合部分”在本文中使用时指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。抗体的抗原结合部分包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基。“框架”或“FR”区是可变域中那些与本文中定义的高变区残基不同的区。因此,抗体的轻和重链可变域自 N 至 C 端包含域 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、和 FR4。尤其地,重链的 CDR3 是对抗原结

合贡献最大且限定抗体特性的区。CDR 和 FR 区依照 Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 的标准定义和 / 或那些来自“高变环”的残基来确定。

[0188] 如本文中使用的, 术语“核酸”或“核酸分子”意图包括 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链的或双链的, 但是优选是双链 DNA。

[0189] 如本本申请内使用的, 术语“氨基酸”表示天然存在的羧基 α -氨基酸组, 包括丙氨酸(三字母代码 :ala, 单字母代码 :A)、精氨酸(arg, R)、天冬酰胺(asn, N)、天冬氨酸(asp, D)、半胱氨酸(cys, C)、谷氨酰胺(gln, Q)、谷氨酸(glu, E)、甘氨酸(gly, G)、组氨酸(his, H)、异亮氨酸(ile, I)、亮氨酸(leu, L)、赖氨酸(lys, K)、甲硫氨酸(met, M)、苯丙氨酸(phe, F)、脯氨酸(pro, P)、丝氨酸(ser, S)、苏氨酸(thr, T)、色氨酸(trp, W)、酪氨酸(try, Y)、和缬氨酸(val, V)。

[0190] 在一个实施方案中, 依照本发明的抗体抑制 CSF-1 结合 CSF-1R。在一个实施方案中, 具有 200ng/ml 或更低的 IC₅₀, 在一个实施方案中, 具有 50ng/ml 或更低的 IC₅₀。可以如实施例 2 中所示测定对 CSF-1 结合 CSF-1R 的抑制的 IC₅₀。

[0191] 在一个实施方案中, 依照本发明的抗体抑制 CSF-1 诱导的 CSF-1R 磷酸化(在 NIH3T3-CSF-1R 重组细胞中)。

[0192] 在一个实施方案中, 具有 800ng/ml 或更低的 IC₅₀, 在一个实施方案中, 具有 600ng/ml 或更低的 IC₅₀, 在一个实施方案中, 具有 250ng/ml 或更低的 IC₅₀。可以如实施例 3 中所示测定 CSF-1 诱导的 CSF-1R 磷酸化的 IC₅₀。

[0193] 在一个实施方案中, 依照本发明的抗体抑制表达人 CSF-1R (SEQ ID NO:62) 的重组 NIH3T3 细胞的生长。在一个实施方案中, 具有 10 μ g/ml 或更低的 IC₅₀, 在一个实施方案中, 具有 5 μ g/ml 或更低的 IC₅₀, 在一个实施方案中, 具有 2 μ g/ml 或更低的 IC₅₀。在一个实施方案中, 具有 10 μ g/ml 或更低的 IC₃₀, 在一个实施方案中, 具有 5 μ g/ml 或更低的 IC₃₀, 在一个实施方案中, 具有 2 μ g/ml 或更低的 IC₃₀。如实施例 5 中所示测定 IC₅₀ 值、IC₃₀ 值或 % 生长抑制。

[0194] 在一个实施方案中, 依照本发明的抗体抑制表达人突变型 CSF-1R L301SY969F (SEQ ID NO:63) 的重组 NIH3T3 细胞的生长。在一个实施方案中, 具有 15 μ g/ml 或更低的 IC₅₀, 在一个实施方案中, 具有 10 μ g/ml 或更低的 IC₅₀。在一个实施方案中, 具有 10 μ g/ml 或更低的 IC₃₀, 在一个实施方案中, 具有 5 μ g/ml (ng/ml) 或更低的 IC₅₀; 在一个实施方案中, 具有 2 μ g/ml 或更低的 IC₅₀。如实施例 5 中所示测定 IC₅₀ 值、IC₃₀ 值或 % 生长抑制。

[0195] 在一个实施方案中, 依照本发明的抗体将 BeWo 肿瘤细胞(ATCCCL-98) 的生长抑制 65% 或更多(在 10 μ g/ml 的抗体浓度; 而且与抗体缺失下相比)。如实施例 8 中所示测定 % 生长抑制。例如, Mab 2F11 显示 70% 的对 BeWo 肿瘤细胞的生长抑制。

[0196] 在一个实施方案中, 依照本发明的抗体抑制人和猕猴(二者) 巨噬细胞分化(通过实施例 7 和 8 中所示对人和猕猴单核细胞的存活的抑制来表示)。在一个实施方案中, 依照本发明的抗体以 0.15 μ g/ml 或更低的 IC₅₀, 在一个实施方案中, 以 0.10 μ g/ml 或更低的 IC₅₀ 抑制人单核细胞的存活。如实施例 7 中所示测定对人单核细胞的存活的抑制。在一个实施方案中, 依照本发明的抗体将猕猴单核细胞的存活抑制 80% 或更多, 在一个实施方案

中,90%或更多(在5 μg/ml的抗体浓度;而且与抗体缺失下相比)。如实施例8中所示测定对人单核细胞的存活的抑制。

[0197] 本发明的又一个实施方案是用于生成针对CSF-1R的抗体的方法,特征在于将编码依照本发明的结合人CSF-1R的人IgG1类抗体的重链的核酸(所述经修饰核酸)和编码所述抗体的轻链的核酸的序列插入表达载体中,将所述载体插入真核宿主细胞中,表达编码的蛋白质并自宿主细胞或上清液回收。

[0198] 优选地,通过重组手段来生成依照本发明的抗体。因此,优选地,抗体是分离的单克隆抗体。此类重组方法是本领域现有技术中广泛知道的,而且包括原核和真核细胞中的蛋白质表达及随后分离抗体多肽和通常纯化至药学可接受纯度。为了蛋白质表达,通过标准方法将编码轻和重链或其片段的核酸插入表达载体中。在适宜的原核或真核宿主细胞中实施表达,像CHO细胞、NS0细胞、SP2/0细胞、HEK293细胞、COS细胞、酵母、或大肠杆菌细胞,并自细胞(上清液或细胞,在裂解后)回收抗体。

[0199] 抗体的重组生成是本领域现有技术中公知的,而且记载于例如综述性论文Makrides, S. C., *Protein Expr. Purif.* 17(1999)183-202; Geisse, S., 等人, *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R. J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R. G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880。

[0200] 抗体可以存在于完整细胞中、细胞溶胞物中、或部分纯化的或实质性纯的形式。通过标准技术,包括碱/SDS处理、CsCl成带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳、和本领域公知的其它技术实施纯化,以消除其它细胞成分或其它污染物,例如其它细胞核酸或蛋白质。参见Ausubel, F., 等人编, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。

[0201] NS0细胞中的表达记载于例如Barnes, L. M., 等人, *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; 及 Barnes, L. M., 等人, *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270。瞬时表达记载于例如Durocher, Y., 等人, *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9。可变域的克隆记载于Orlandi, R., 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; 及 Norderhaug, L., 等人, *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87。一种优选的瞬时表达系统(HEK 293)记载于Schlaeger, E.-J., 和 Christensen, K., *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83 及 Schlaeger, E.-J., *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199。

[0202] 适合于原核生物的控制序列包括例如启动子、任选的操纵基因序列、和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、增强子和聚腺苷酸化信号。

[0203] 在将核酸放置在与另一种核酸序列的功能性关系中时,它是“可操作连接的”。例如,若前序列或分泌前导的DNA以参与多肽分泌的前蛋白表达,则它与多肽的DNA可操作连接;若启动子或增强子影响序列的转录,则它与编码序列可操作连接;或者若核糖体结合位点定位为使得便于翻译,则它与编码序列可操作连接。一般而言,“可操作连接的”意指所连接的DNA序列是连续的,而且在分泌前导的情况中,是连续的且在读码框中。然而,增强子不必是连续的。通过在方便的限制性位点处的连接来实现连接。若不存在此类位点,则依照常规的实践使用合成的寡核苷酸接头或接头。

[0204] 通过常规免疫球蛋白纯化规程,诸如例如蛋白A-Sepharose、羟磷灰石层析、凝胶

电泳、透析、或亲和层析,恰当地将单克隆抗体与培养液分开。使用常规规程,容易分离编码单克隆抗体的 DNA 和 RNA 及测序。杂交瘤细胞可充当此类 DNA 和 RNA 的来源。一旦分离,可以将该 DNA 插入表达载体中,然后将该表达载体转染入不另外生成免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞(诸如 HEK 293 细胞、CHO 细胞、或骨髓瘤细胞)中,以获得该宿主细胞中重组单克隆抗体的合成。

[0205] 如本文中使用的,表述“细胞”、“细胞系”、和“细胞培养物”可互换使用,而且所有此类名称包括后代。如此,词语“转化子”和“经转化细胞”包括原代受试细胞及自其衍生的培养物,不管转移的次数。还理解,由于有意的或无意的突变,所有后代的 DNA 内容可以不是精确相同的。包括具有在初始转化细胞所筛选的相同功能或生物学活性的变异后代。

[0206] 抗体的“Fc 部分”不直接涉及抗体对抗原的结合,但是展现出多种效应器功能。“抗体的 Fc 部分”是熟练技术人员公知的术语,而且基于木瓜蛋白酶对抗体的切割定义。根据其重链恒定区的氨基酸序列,抗体或免疫球蛋白分成类:IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,并且这些中的数种可以进一步分成亚类(同种型),例如 IgG1、IgG2、IgG3、和 IgG4、IgA1、和 IgA2。依照重链恒定区,不同类的免疫球蛋白分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、和 μ 。抗体的 Fc 部分直接涉及基于补体激活、C1q 结合和 Fc 受体结合的 ADCC (抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)和 CDC (补体依赖性细胞毒性)。补体激活(CDC)是通过补体因子 C1q 结合大多数 IgG 抗体亚类的 Fc 部分启动的。虽然抗体对补体系统的影响依赖于某些条件,但是对 C1q 的结合是由 Fc 部分中的限定结合位点引起的。此类结合位点是本领域现有技术中已知的,而且记载于例如 Boackle, R. J., 等人, Nature 282 (1979) 742-743, Lukas, T. J., 等人, J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560, Brunhouse, R., 和 Cebra, J. J., Mol. Immunol. 16(1979) 907-917, Burton, D. R., 等人, Nature 288 (1980) 338-344, Thommesen, J. E., 等人, Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004, Idusogie, E. E., 等人, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184, Hezareh, M., 等人, J. Virology 75 (2001) 12161-12168, Morgan, A., 等人, Immunology 86 (1995) 319-324, EP 0307434。此类结合位点是例如 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331 和 P329 (依照 Kabat, E. A. 的 EU 索引的编号方式,参见下文)。亚类 IgG1、IgG2 和 IgG3 的抗体通常显示补体激活及 C1q 和 C3 结合,而 IgG4 不激活补体系统,而且不结合 C1q 和 C3。

[0207] 在一个实施方案中,依照本发明的抗体包含自人起源衍生的 Fc 部分和优选地,人恒定区的所有其它部分。如本文中使用的,术语“自人起源衍生的 Fc 部分”表示如下的 Fc 部分,其是属于亚类 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的人抗体的 Fc 部分,优选来自人 IgG1 亚类的 Fc 部分、来自人 IgG1 亚类的突变型 Fc 部分(优选具有 L234A+L235A 上的突变)、来自人 IgG4 亚类的 Fc 部分或来自人 IgG4 亚类的突变型 Fc 部分(优选具有 S228P 上的突变)。最优选人重链恒定区 SEQ ID NO:58 (人 IgG1 亚类)、SEQ ID NO:59 (具有突变 L234A 和 L235A 的人 IgG1 亚类)、SEQ ID NO:60 (人 IgG4 亚类)、或 SEQ ID NO:61 (具有突变 S228P 的人 IgG4 亚类)。

[0208] 优选地,依照本发明的抗体属于人 IgG1 亚类或人 IgG4 亚类。在一个实施方案中,依照本发明的抗体属于人 IgG1 亚类。在一个实施方案中,依照本发明的抗体属于人 IgG4 亚类。

[0209] 在一个实施方案中,依照本发明的抗体特征在于恒定链是人起源的。此类恒定链是本领域现有技术公知的,而且记载于例如 Kabat, E. A., (参见例如 Johnson, G. 和 Wu,

T. T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218)。例如,一种有用的人重链恒定区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:58。例如,一种有用的人轻链恒定区包含 κ 轻链恒定区氨基酸序列 SEQ ID NO:57。

[0210] 本发明的另一个方面是结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于

[0211] a) 重链可变域为 SEQ ID NO:7 且轻链可变域为 SEQ ID NO:8,

[0212] b) 重链可变域为 SEQ ID NO:15 且轻链可变域为 SEQ ID NO:16;

[0213] 或其人源化形式。

[0214] 本发明的另一个方面是结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于

[0215] a) 重链可变域为 SEQ ID NO:7 且轻链可变域为 SEQ ID NO:8,

[0216] b) 重链可变域为 SEQ ID NO:15 且轻链可变域为 SEQ ID NO:16;

[0217] c) 重链可变域为 SEQ ID NO:75 且轻链可变域为 SEQ ID NO:76;

[0218] d) 重链可变域为 SEQ ID NO:83 且轻链可变域为 SEQ ID NO:84;

[0219] 或其人源化形式。

[0220] 本发明的另一个方面是结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于

[0221] 重链可变域为 SEQ ID NO:7 且轻链可变域为 SEQ ID NO:8,或其人源化形式。

[0222] 本发明的另一个方面是结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于

[0223] a) 重链可变域为 SEQ ID NO:23 且轻链可变域为 SEQ ID NO:24,或

[0224] b) 重链可变域为 SEQ ID NO:31 且轻链可变域为 SEQ ID NO:32,或

[0225] c) 重链可变域为 SEQ ID NO:39 且轻链可变域为 SEQ ID NO:40,或

[0226] d) 重链可变域为 SEQ ID NO:47 且轻链可变域为 SEQ ID NO:48,或

[0227] e) 重链可变域为 SEQ ID NO:55 且轻链可变域为 SEQ ID NO:56。

[0228] 本发明的另一个方面是结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于

[0229] a) 重链可变域为 SEQ ID NO:23 且轻链可变域为 SEQ ID NO:24,或

[0230] b) 重链可变域为 SEQ ID NO:31 且轻链可变域为 SEQ ID NO:32,或

[0231] c) 重链可变域为 SEQ ID NO:39 且轻链可变域为 SEQ ID NO:40,或

[0232] d) 重链可变域为 SEQ ID NO:47 且轻链可变域为 SEQ ID NO:48。

[0233] 本发明的另一个方面是结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于

[0234] 重链可变域为 SEQ ID NO:23 且轻链可变域为 SEQ ID NO:24,或

[0235] 本发明的另一个方面是结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于

[0236] 重链可变域为 SEQ ID NO:31 且轻链可变域为 SEQ ID NO:32。

[0237] 本发明的另一个方面是结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于

[0238] 重链可变域为 SEQ ID NO:39 且轻链可变域为 SEQ ID NO:40。

[0239] 本发明的另一个方面是结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于

[0240] 重链可变域为 SEQ ID NO:47 且轻链可变域为 SEQ ID NO:48。

[0241] 本发明的另一个方面是结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于

[0242] 重链可变域为 SEQ ID NO:15 且轻链可变域为 SEQ ID NO:16,或其人源化形式。

[0243] 本发明的另一个方面是结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于

[0244] 重链可变域为 SEQ ID NO:75 且轻链可变域为 SEQ ID NO:76;

[0245] 或其人源化形式。

[0246] 本发明的另一个方面是结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于

[0247] 重链可变域为 SEQ ID NO:83 且轻链可变域为 SEQ ID NO:84;

[0248] 或其人源化形式。

[0249] 本发明的另一个方面是结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于

[0250] a) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:1、CDR2 区 SEQ ID NO:2、和 CDR1 区 SEQ ID NO:3,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:4、CDR2 区 SEQ ID NO:5、和 CDR1 区 SEQ ID NO:6,或

[0251] b) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:9、CDR2 区 SEQ ID NO:10、和 CDR1 区 SEQ ID NO:11,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:12、CDR2 区 SEQ ID NO:13、和 CDR1 区 SEQ ID NO:14,或

[0252] c) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:17、CDR2 区 SEQ ID NO:18、和 CDR1 区 SEQ ID NO:19,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:20、CDR2 区 SEQ ID NO:21、和 CDR1 区 SEQ ID NO:22,或

[0253] d) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:25、CDR2 区 SEQ ID NO:26、和 CDR1 区 SEQ ID NO:27,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:28、CDR2 区 SEQ ID NO:29、和 CDR1 区 SEQ ID NO:30,或

[0254] e) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:33、CDR2 区 SEQ ID NO:34、和 CDR1 区 SEQ ID NO:35,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:36、CDR2 区 SEQ ID NO:37、和 CDR1 区 SEQ ID NO:38,或

[0255] f) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:41、CDR2 区 SEQ ID NO:42、和 CDR1 区 SEQ ID NO:43,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:44、CDR2 区 SEQ ID NO:45、和 CDR1 区 SEQ ID NO:46,

[0256] g) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:49、CDR2 区 SEQ ID NO:50、和 CDR1 区 SEQ ID NO:51,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:52、CDR2 区 SEQ ID NO:53、和 CDR1 区 SEQ ID NO:54,

[0257] h) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:69、CDR2 区 SEQ ID NO:70、和 CDR1 区 SEQ ID NO:71,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:72、CDR2 区 SEQ ID NO:73、和 CDR1 区 SEQ ID NO:74,或

[0258] i) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:77、CDR2 区 SEQ ID NO:78、和 CDR1 区 SEQ ID NO:79,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:80、CDR2 区 SEQ ID NO:81、和 CDR1 区 SEQ ID NO:82。

[0259] 本发明的另一个方面是结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于

[0260] a) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:17、CDR2 区 SEQ ID NO:18、和 CDR1 区 SEQ ID NO:19,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:20、CDR2 区 SEQ ID NO:21、和 CDR1 区 SEQ ID NO:22,或

[0261] b) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:25、CDR2 区 SEQ ID NO:26、和 CDR1 区 SEQ ID NO:27,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:28、CDR2 区 SEQ ID NO:29、和 CDR1 区 SEQ ID NO:30,或

[0262] c) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:33、CDR2 区 SEQ ID NO:34、和 CDR1 区 SEQ

ID NO:35,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:36、CDR2 区 SEQ ID NO:37、和 CDR1 区 SEQ ID NO:38,或

[0263] d) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:41、CDR2 区 SEQ ID NO:42、和 CDR1 区 SEQ ID NO:43,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:44、CDR2 区 SEQ ID NO:45、和 CDR1 区 SEQ ID NO:46,或

[0264] e) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:49、CDR2 区 SEQ ID NO:50、和 CDR1 区 SEQ ID NO:51,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:52、CDR2 区 SEQ ID NO:53、和 CDR1 区 SEQ ID NO:54。

[0265] 本发明的另一个方面是结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于

[0266] a) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:17、CDR2 区 SEQ ID NO:18、和 CDR1 区 SEQ ID NO:19,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:20、CDR2 区 SEQ ID NO:21、和 CDR1 区 SEQ ID NO:22,或

[0267] b) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:25、CDR2 区 SEQ ID NO:26、和 CDR1 区 SEQ ID NO:27,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:28、CDR2 区 SEQ ID NO:29、和 CDR1 区 SEQ ID NO:30,或

[0268] c) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:33、CDR2 区 SEQ ID NO:34、和 CDR1 区 SEQ ID NO:35,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:36、CDR2 区 SEQ ID NO:37、和 CDR1 区 SEQ ID NO:38,或

[0269] d) 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:41、CDR2 区 SEQ ID NO:42、和 CDR1 区 SEQ ID NO:43,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:44、CDR2 区 SEQ ID NO:45、和 CDR1 区 SEQ ID NO:46。

[0270] 本发明的另一个方面是结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于

[0271] 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:17、CDR2 区 SEQ ID NO:18、和 CDR1 区 SEQ ID NO:19,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:20、CDR2 区 SEQ ID NO:21、和 CDR1 区 SEQ ID NO:22。

[0272] 本发明的另一个方面是结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于

[0273] 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:25、CDR2 区 SEQ ID NO:26、和 CDR1 区 SEQ ID NO:27,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:28、CDR2 区 SEQ ID NO:29、和 CDR1 区 SEQ ID NO:30。

[0274] 本发明的另一个方面是结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于

[0275] 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:33、CDR2 区 SEQ ID NO:34、和 CDR1 区 SEQ ID NO:35,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:36、CDR2 区 SEQ ID NO:37、和 CDR1 区 SEQ ID NO:38。

[0276] 本发明的另一个方面是结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于

[0277] 重链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:41、CDR2 区 SEQ ID NO:42、和 CDR1 区 SEQ ID NO:43,且轻链可变域包含 CDR3 区 SEQ ID NO:44、CDR2 区 SEQ ID NO:45、和 CDR1 区 SEQ ID NO:46。

[0278] 本发明包含用于治疗需要治疗的患者的方法,特征在于对该患者施用治疗有效量的依照本发明的抗体。

[0279] 本发明包含依照本发明的抗体用于治疗用途。

[0280] 本发明的一个优选实施方案是本发明的 CSF-1R 抗体,其用于治疗“CSF-1R 介导的疾病”,或本发明的 CSF-1R 抗体,其用于制备治疗“CSF-1R 介导的疾病”的药物,可以如下描述:

[0281] CSF-1R 信号传导有可能通过 3 种独特机制涉及肿瘤生长和转移。第一种是在源自雌性生殖系统(乳房/乳腺、卵巢、子宫内膜、宫颈)的肿瘤细胞中找到 CSF 配体和受体的表达(Scholl, S. M., 等人, *J. Natl. Cancer Inst.* 86 (1994) 120-126; Kacinski, B. M., *Mol. Reprod. Dev.* 46 (1997) 71-74; Ngan, H. Y., 等人, *Eur. J. Cancer* 35 (1999) 1546-1550; Kirma, N., 等人, *Cancer Res* 67 (2007) 1918-1926), 而且该表达与乳腺癌异种移植生长以及乳腺癌患者中的较差预后有关。在一项研究中测试的急性髓细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病和脊髓发育不良患者的约 10-20% 中看到 CSF-1R 中的两处点突变, 而且发现突变之一破坏受体周转(Ridge, S. A., 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87 (1990) 1377-1380)。然而, 没能在稍后的研究中确认突变的发生率(Abu-Duhier, F. M., 等人, *Br. J. Haematol.* 120(2003)464-470)。还在一些肝细胞癌(Yang, D. H., 等人, *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 3 (2004) 86-89) 和特发性骨髓纤维变性(Abu-Duhier, F. M., 等人, *Br. J. Haematol.* 120 (2003)464-470) 病例中发现突变。最近, 在骨髓单核母细胞性白血病患者衍生的 GDM-1 细胞系中鉴定出 CSF-1R 中的 Y571D 突变(Chase, A., 等人, *Leukemia* 23 (2009) 358-364)。

[0282] 色素沉着绒毛结节性滑膜炎(PVNS)和腱鞘巨细胞瘤(TGCT)可以因使 M-CSF 基因与胶原基因 COL6A3 融合并导致 M-CSF 过表达的易位而发生(West, R. B., 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006)690-695)。有人提出景观效应(landscape effect)负责由受表达 M-CSF 的细胞吸引的单核细胞组成的所致肿瘤块。TGCT 是较小的肿瘤, 能相对容易地自指(主要发生处)切除。PVNS 更具攻击性, 因为它能在大关节中重现, 而且不易通过手术来控制。

[0283] 第二种机制基于阻断骨中的转移位点处经由 M-CSF/CSF-1R 的信号传导, 其诱导破骨细胞发生、骨再吸收和溶骨性骨损害。乳腺癌、多发性骨髓瘤和肺癌是已经发现转移至骨并引起溶骨性骨病导致骨骼并发症的癌症的例子。由肿瘤细胞和基质释放的 M-CSF 与受体活化剂核因子 κ -B 配体 -RANKL 合作诱导造血髓样单核细胞祖先分化成成熟破骨细胞。在此过程中, M-CSF 通过给予破骨细胞以存活信号来起许可因子的作用(Tanaka, S., 等人, *J. Clin. Invest.* 91 (1993) 257-263)。在破骨细胞分化和成熟期间用抗 CSF-1R 抗体抑制 CSF-1R 活性有可能预防转移性疾病中引起溶骨性疾病及有关骨骼相关事件的破骨细胞活性失衡。虽然乳腺癌、肺癌和多发性骨髓瘤通常导致溶骨性损害, 但是在前列腺癌中, 转移至骨最初具有成骨细胞性外观, 其中升高的骨形成活性产生与正常骨的典型层状结构不同的“编织骨”。在疾病进展期间, 骨损害展示显著的溶骨成分以及高血清水平的骨再吸收, 而且提示抗再吸收疗法可能是有用的。二磷酸盐已经显示出抑制溶骨性损害形成及减少骨骼相关事件数目(只在具有激素不应性转移性前列腺癌的患者中), 但是在这点上, 它们对成骨细胞损害的效果是有争议的, 而且二磷酸盐至今未显示在预防骨转移或激素响应性前列腺癌中是有益的。抗再吸收剂在混合型溶骨/成骨细胞前列腺癌中的效果仍在进行临床研究(Choueiri, M. B., 等人, *Cancer Metastasis Rev.* 25 (2006) 601-609; Vessella, R. L. 和

Corey, E., Clin. Cancer Res. 12 (20Pt 2) (2006) 6285s-6290s)。

[0284] 第三种机制基于最近在乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌和宫颈癌的实体瘤中找到的肿瘤相关巨噬细胞(TAM)与较差的预后有关联的观察结果(Bingle, L., 等人, J. Pathol. 196 (2002) 254-265 ;Pollard, J. W., Nat. Rev. Cancer 4 (2004) 71-78)。巨噬细胞被 M-CSF 和其它趋化因子募集至肿瘤。然后巨噬细胞可经由分泌血管发生性因子、蛋白酶和其它生长因子和细胞因子来促进肿瘤进展,而且可通过抑制 CSF-1R 信号传导来阻断。最近,Zins 等人(Zins, K., 等人, Cancer Res. 67 (2007) 1038-1045) 显示了肿瘤坏死因子 α (TNF α)、M-CSF 或二者组合的 siRNA 的表达会在小鼠异种移植模型中在肿瘤内注射相应 siRNA 后将肿瘤生长降低 34% 到 50%。由人 SW620 细胞分泌的靶向 TNF α 的 siRNA 降低小鼠 M-CSF 水平并导致肿瘤中的巨噬细胞减少。另外,用针对 M-CSF 的抗原结合片段处理 MCF7 肿瘤异种移植在与化疗剂组合给予时确实导致 40% 肿瘤生长抑制,逆转对化疗剂的抗性及改善小鼠存活(Paulus, P., 等人, Cancer Res. 66 (2006) 4349-4356)。

[0285] TAM 是慢性炎症和癌症之间出现的联系的唯一例子。炎症和癌症之间的联系有别的证据,如许多慢性病与升高的癌症风险有关,在慢性炎症位点处发生癌症,在许多癌症中发现炎症的化学介导体;消除炎症的细胞或化学介导体则抑制实验性癌症的发生,而且长期使用抗炎剂降低一些癌症的风险。许多炎性状况存在与癌症的联系,其中有幽门螺旋杆菌(*H. pylori*)诱导的胃炎对于胃癌,血吸虫病对于膀胱癌,HHV8 对于卡波西(Kaposi)氏肉瘤,子宫内膜异位对于卵巢癌和前列腺炎对于前列腺癌(Balkwill, F., 等人, Cancer Cell 7 (2005) 211-217)。巨噬细胞是慢性炎症中的关键细胞且有差异地响应其微环境。有两类巨噬细胞被认为是连续的功能状态的极端:M1 巨噬细胞涉及 1 型反应。这些反应涉及微生物产物引起的激活及因此对致病性微生物的杀伤,产生反应氧中介物。另一个极端是 M2 巨噬细胞,其涉及 2 型反应,促进细胞增殖,调节炎症和适应性免疫及促进组织重塑、血管发生和修复(Mantovani, A., 等人, Trends Immunol. 25 (2004) 677-686)。导致瘤形成建立的慢性炎症通常与 M2 巨噬细胞有关。介导炎性反应的一种关键细胞因子是 TNF α , 顾名思义能在高剂量刺激抗肿瘤免疫和出血性坏死,但最近还发现由肿瘤细胞表达且起肿瘤促进物的作用(Zins, K., 等人, Cancer Res. 67 (2007) 1038-1045 ;Balkwill, F., Cancer Metastasis Rev. 25 (2006) 409-416)。仍然需要更好地了解巨噬细胞关于肿瘤的具体作用,包括对其功能的潜在空间和时间依赖性及与特定肿瘤类型的关联。

[0286] 如此,本发明的一个实施方案是本发明的 CSF-1R 抗体,用于治疗癌症。如本文中使用的,术语“癌症”可以是例如肺癌、非小细胞肺(NSCL)癌、支气管肺泡细胞肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤或眼内黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区癌、胃癌、胃的癌症、结肠癌、乳腺癌、子宫的癌症、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、阴门癌、何杰金(Hodgkin)氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、间皮瘤、肝细胞癌、胆囊癌、中枢神经系统(CNS)新生物、脊柱轴肿瘤、脑干胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、施旺细胞瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、脑脊膜瘤、鳞状细胞癌、垂体腺瘤、淋巴瘤、淋巴细胞性白血病,包括任何上述癌症的顽固形式,或一种或多种上述癌症的组合。优选地,此类癌症是乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌或前列腺癌。优选地,此类癌症进一步特征在于 CSF-1 或 CSF-1R 表达或过表达。本发明的又一个实施方案是本发明的 CSF-1R 抗体,用

于同时治疗原发性肿瘤和新转移。

[0287] 如此,本发明的另一个方面是本发明的 CSF-1R 抗体,用于治疗牙周炎、组织细胞增多病 X、骨质疏松症、佩吉特(Paget)氏骨病(PDB)、癌症治疗所致骨丢失、假体周围骨质溶解、糖皮质激素诱导的骨质疏松、类风湿性关节炎、银屑病关节炎、骨关节炎、炎性关节病(inflammatory arthritides)、和炎症。

[0288] Rabello, D., 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347 (2006) 791-796 证明了 CSF1 基因中的 SNP 展现与攻击性牙周炎(由于牙槽骨的再吸收引起牙丧失的一种牙周组织炎性疾病)的正关联。

[0289] 组织细胞增多病 X (也称作朗格汉斯(Langerhans)氏细胞组织细胞增多病, LCH)是朗格汉斯树突细胞(其表现出在骨和额外的骨 LCH 损伤中分化成破骨细胞)的一种增殖性疾病。朗格汉斯细胞衍生自循环中的单核细胞。发现在血清和损伤中测量到的升高的 M-CSF 水平与疾病严重性有关联(da Costa, C. E., 等人, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 687-693)。该疾病主要发生于儿科患者群,而且在该疾病变成系统性或复发时不得不用化疗来治疗。

[0290] 骨质疏松的病理生理学是由形成骨的成骨细胞损失和破骨细胞依赖性骨再吸收升高介导的。支持性数据记载于 Cenci 等人,显示了抗 M-CSF 抗体注射在切除了卵巢的小鼠中保持骨密度且抑制骨再吸收(Cenci, S., 等人, *J. Clin. Invest.* 105 (2000) 1279-1287)。最近,鉴定出雌激素缺乏所致绝经后骨丢失之间的一种潜在联系,而且发现生成 TNF α 的 T 细胞的存在影响骨代谢(Roggia, C., 等人, *Minerva Med.* 95 (2004) 125-132)。一种可能的机制是在体内 TNF α 对 M-CSF 的诱导。M-CSF 在 TNF- α 诱导的破骨细胞发生中的重要作用得到了下述效果的证实,即针对 M-CSF 的抗体在小鼠中阻断 TNF α 诱导的骨质溶解,由此使得 CSF-1R 信号传导的抑制剂成为性关节炎的潜在靶物(Kitaura, H., 等人, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 3418-3427)。

[0291] 佩吉特氏骨病(PDB)是骨质疏松之后第二位最常见的骨代谢病症,其中骨周转升高的灶性异常导致并发症诸如骨痛、畸形、病理性骨折和耳聋。已经鉴定了四种基因中的突变调节正常破骨细胞功能且使个体易患 PDB 及相关病症:编码核因子(NF) κ B 的受体激活物(RANK)-(破骨细胞功能的关键调节物)的 TNFRSF11A 中的插入突变,编码骨保护素(RANK 配体的的诱饵受体)的 TNFRSF11B 的失活突变,编码 NF κ B 途径中的一种重要支架蛋白的隔离体(sequestosome)1 基因(SQSTM1)的突变,和含缬酪肽蛋白(VCP)基因中的突变。此基因编码 VCP,其在使 NF κ B 抑制剂靶向蛋白酶体所致降解中具有作用(Daroszewska, A. 和 Ralston, S. H., *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2 (2006) 270-277)。靶向 CSF-1R 抑制剂提供机会来间接阻断 RANKL 信号传导的失调及对当前使用的二膦酸盐添加另外的治疗选项。

[0292] 癌症治疗诱导的骨丢失(尤其是在乳腺癌和前列腺癌患者中)是靶向 CSF-1R 抑制剂能预防骨丢失的另一种适应证(Lester, J. E., 等人, *Br. J. Cancer* 94 (2006) 30-35)。随着早期乳腺癌的预后改善,辅助疗法的长期后果变得更加重要,因为一些疗法(包括化疗、照射、芳香酶抑制剂和卵巢切除)通过降低骨矿物质密度而影响骨代谢,导致骨质疏松及相关骨折风险升高(Lester, J. E., 等人, *Br. J. Cancer* 94 (2006) 30-35)。与乳腺癌中的辅助芳香酶抑制剂疗法等同的是前列腺癌中的雄激素消融疗法,其导致骨矿物质密度损失和骨质疏松相关骨折风险显著升高(Stoch, S. A., 等人, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001) 2787-2791)。

[0293] CSF-1R 信号传导的靶向抑制在其它适应证中以及在靶定细胞类型包括破骨细胞和巨噬细胞(例如治疗响应类风湿性关节炎所致关节置换术的特定并发症)时可能是有益的。假体周骨丢失及因此假体松动所致植入失败是关节置换术的一种主要并发症,而且需要反复手术,给患者个人和保健系统带来较高的社会经济负担。至今,没有批准的药物治疗法来预防或抑制假体周骨质溶解(Drees, P., 等人, *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 3 (2007) 165-171)。

[0294] 糖皮质激素诱导的骨质疏松(GIOP)是另一种适应证,其中 CSF-1R 抑制剂能预防因各种状况(例如慢性阻塞性肺病、哮喘和类风湿性关节炎)而给予长期使用糖皮质激素后的骨丢失(Guzman-Clark, J. R., 等人, *Arthritis Rheum.* 57 (2007)140-146 ;Feldstein, A. C., 等人, *Osteoporos. Int.* 16 (2005) 2168-2174)。

[0295] 类风湿性关节炎、银屑病关节炎和炎性关节病本身是 CSF-1R 信号传导抑制剂的潜在适应证,原因在于它们由巨噬细胞成分组成及不同程度的骨破坏(Ritchlin, C. T., 等人, *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 821-831)。骨关节炎和类风湿性关节炎是由巨噬细胞在结缔组织中积累和巨噬细胞浸润入滑液(这至少部分是由 M-CSF 介导的)引起的炎性自身免疫病。Campbell, I., K., 等人, *J. Leukoc. Biol.* 68 (2000) 144-150 证明了 M-CSF 在体外由人关节组织细胞(软骨细胞、滑液成纤维细胞)生成,而且发现于类风湿性关节炎患者的滑液,提示它有助于滑膜组织增殖和巨噬细胞浸润,这与该疾病的发病机制有关。抑制 CSF-1R 信号传导有可能控制关节中的巨噬细胞数目及减轻来自有关骨破坏的疼痛。为了使不利影响最小化及进一步了解 CSF-1R 信号传导在这些适应证中的影响,一种方法是特异性抑制 CSF-1R,而不靶向无数的其它激酶,诸如 Raf 激酶。

[0296] 最近的文献报告将升高的循环 M-CSF 与慢性冠状动脉病中的动脉粥样硬化进展和较差的预后关联起来(Saitoh, T., 等人, *J. Am. Coll. Cardiol.* 35 (2000) 655-665 ; Ikonomidis, I., 等人, *Eur. Heart. J.* 26 (2005) p. 1618-1624);M-CSF 通过帮助形成表达 CSF-1R 且代表初始斑的泡沫细胞(摄入了氧化型 LDL 的巨噬细胞)来影响动脉粥样硬化过程(Murayama, T., 等人, *Circulation* 99 (1999) 1740-1746)。

[0297] 在激活的小胶质中发现 M-CSF 和 CSF-1R 的表达和信号传导。小胶质(即中枢神经系统的驻留巨噬细胞)可被多种损伤激活,包括感染和外伤。M-CSF 被认为是脑中炎症应答的一种关键调节物,而且 M-CSF 水平在 HIV-1、脑炎、阿尔茨海默(Alzheimer)氏病(AD)和脑瘤中升高。小胶质增生(microgliosis)(作为通过 M-CSF/CSF-1R 的自分泌信号传导的后果)导致对炎性细胞因子和氮氧化物释放的诱导,如通过例如使用实验性神经元损害模型证明的(Hao, A. J., 等人, *Neuroscience* 112 (2002) 889-900 ;Murphy, G. M., Jr., 等人, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 20967-20971)。发现 CSF-1R 表达升高的小胶质在 AD 中及在 AD 的淀粉样前体蛋白 V717F 转基因小鼠模型的中包围斑(Murphy, G. M., Jr., 等人, *Am. J. Pathol.* 157 (2000) 895-904)。另一方面脑中小胶质较少的 op/op 小鼠导致与正常对照相比 A- β 的小纤维沉积和神经元损失,提示小胶质确实是在 op/op 小鼠中的 AD 缺失的发生中具有神经保护功能(Kaku, M., 等人, *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 12 (2003) 104-108)。

[0298] M-CSF 和 CSF-1R 的表达和信号传导与炎性肠病(IBD)有关(WO2005/046657)。术语“炎性肠病”指严重的、慢性的肠道病症,特征在于胃肠道中多个位点处的慢性炎症,而且具体包括溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩(Crohn)氏病。

[0299] 本发明包含结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于上文所述表位结合特性或在于上文所述氨基酸序列和氨基酸序列片段,用于治疗癌症。

[0300] 本发明包含结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于上文所述表位结合特性或在于上文所述氨基酸序列和氨基酸序列片段,用于治疗骨丢失。

[0301] 本发明包含结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于上文所述表位结合特性或在于上文所述氨基酸序列和氨基酸序列片段,用于预防或治疗转移。

[0302] 本发明包含结合人 CSF-1R 的抗体,特征在于上文所述表位结合特性或在于上文所述氨基酸序列和氨基酸序列片段,用于治疗炎症性疾病。

[0303] 本发明包含抗体(特征在于包含结合人 CSF-1R 的抗体,其特征在于上文所述表位结合特性或在于上文所述氨基酸序列和氨基酸序列片段)用于治疗癌症或用于制备治疗癌症的药物的用途。

[0304] 本发明包含抗体(特征在于包含结合人 CSF-1R 的抗体,其特征在于上文所述表位结合特性或在于上文所述氨基酸序列和氨基酸序列片段)用于治疗骨丢失或用于制备治疗骨丢失的药物的用途。

[0305] 本发明包含抗体(特征在于包含结合人 CSF-1R 的抗体,其特征在于上文所述表位结合特性或在于上文所述氨基酸序列和氨基酸序列片段)用于预防或治疗转移或用于制备预防或治疗转移的药物的用途。

[0306] 本发明包含抗体(特征在于包含结合人 CSF-1R 的抗体,其特征在于上文所述表位结合特性或在于上文所述氨基酸序列和氨基酸序列片段)用于治疗炎症性疾病或用于制备治疗炎症性疾病的药物的用途。

[0307] 本发明的又一个实施方案是用于生产针对 CSF-1R 的抗体的方法,特征在于将编码依照本发明的结合人 CSF-1R 的人 IgG1 类抗体的重链的核酸(所述经修饰核酸)和编码所述抗体的轻链的核酸的序列插入表达载体中,将所述载体插入真核宿主细胞中,表达并自宿主细胞或上清液回收编码的蛋白质。

[0308] 优选通过重组手段来生产依照本发明的抗体。此类方法是现有技术广泛知道的,而且包括原核和真核细胞中的蛋白质表达,随后分离抗体多肽且通常纯化至药学可接受纯度。为了蛋白质表达,通过标准方法将编码轻和重链或其片段的核酸插入表达载体中。在适宜的原核或真核宿主细胞中实施表达,诸如 CHO 细胞、NS0 细胞、SP2/0 细胞、HEK293 细胞、COS 细胞、酵母、或大肠杆菌细胞,并自细胞(自上清液或在细胞裂解后)回收抗体。

[0309] 抗体的重组生产是现有技术公知的,而且记载于例如综述性论文 Makrides, S. C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999)183-202 ;Geisse, S., 等人, *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282 ;Kaufman, R. J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161 ;Werner, R. G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880。

[0310] 抗体可以存在于完整细胞中、细胞裂解物中、或部分纯化的或实质性纯的形式。通过标准技术实施纯化以消除其它细胞成分或其它污染物,例如其它细胞核酸或蛋白质,标准技术包括碱/SDS 处理、CsCl 成带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳、和本领域公知的其它技术。参见 Ausubel, F., 等人, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。

[0311] NS0 细胞中的表达记载于例如 Barnes, L. M., 等人, *Cytotechnology* 32 (2000)

109-123 ;Barnes, L. M., 等人, Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270。瞬时表达记载于例如 Durocher, Y., 等人, Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9。可变域的克隆记载于 Orlandi, R., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837 ;Carter, P., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289 ;Norderhaug, L., 等人, J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87。一种优选的瞬时表达系统(HEK 293)记载于 Schlaeger, E.-J. 和 Christensen, K., Cytotechnology 30 (1999) 71-83, 及 Schlaeger, E.-J., J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199。

[0312] 通过本领域已知的多种技术来制备编码抗 CSF-1R 抗体氨基酸序列变体的核酸分子。这些方法包括但不限于自天然来源分离(在天然存在氨基酸序列变体的情况中)或通过对先前制备的变体或非变体形式的人源化抗 CSF-1R 抗体进行的寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR 诱变、和盒式诱变来制备。

[0313] 将依照本发明的重和轻链可变域与启动子、翻译起始、恒定区、3' 非翻译区、聚腺苷酸化、和翻译终止的序列组合以形成表达载体构建物。可以将重和轻链表达构建物组合入单一载体中, 共转染, 序贯转染, 或分开转染入宿主细胞中, 然后融合以形成表达双链的单一宿主细胞。

[0314] 在另一个方面, 本发明提供含有一种或一组本发明的单克隆抗体或其抗原结合部分, 与药学可接受载体一起配制的组合物, 例如药物组合物。

[0315] 如本文中使用的, “药学可接受载体” 包括任何和所有生理学相容的溶剂、分散介质、涂层、抗细菌和抗真菌剂、等张和吸收 / 再吸收延迟剂、等等。优选地, 载体适合于注射或输注。

[0316] 可以通过本领域已知的多种方法来施用本发明的组合物。正如技术人员会领会的, 施用的路径和 / 或模式会随期望的结果而变化。

[0317] 药学可接受载体包括无菌水溶液或分散体和用于制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。此类介质和药剂对药学活性物质的使用是本领域已知的。在水之外, 载体可以是例如等张缓冲盐水溶液。

[0318] 不管选择的施用路径, 通过本领域技术人员知道的常规方法将可以以合适水合形式使用的本发明的化合物和 / 或本发明的药物组合物配制成药学可接受剂量形式。

[0319] 本发明的药物组合物中活性组分的实际剂量水平可以变化以获得对特定患者、组合物、和施用模式有效实现期望治疗响应, 对患者没有毒性的活性组分量(有效量)。选择的剂量水平会取决于多种药动学因素, 包括采用的本发明特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性、施用路径、施用时间、采用的特定化合物的排泄速率、与采用的特定组合物组合使用的其它药物、化合物和 / 或材料、治疗的患者的年龄、性别、重量、状况、一般健康和在先医学史、及医学领域公知的类似因素。

[0320] 本发明包含依照本发明的抗体用于治疗患有癌症(尤其是结肠、肺或胰腺癌)的患者的用途。

[0321] 本发明还包含一种用于治疗患有此类疾病的患者的方法。

[0322] 本发明进一步提供一种用于制备包含有效量的依照本发明的抗体以及药学可接受载体的药物组合物的方法及依照本发明的抗体对此类方法的用途。

[0323] 本发明进一步提供有效量的依照本发明的抗体用于制备药物制剂的用途, 优选

地,与药学可接受载体一起,用于治疗患有癌症的患者。

[0324] 本发明还提供有效量的依照本发明的抗体用于制备药物制剂的用途,优选地,与药学可接受载体一起,用于治疗患有癌症的患者。

[0325] 提供下面的实施例、序列表和附图来帮助理解本发明,所附权利要求书列出本发明的真实范围。本领域技术人员理解,可以在所列规程中进行更改而不偏离本发明的精神。

[0326] 序列表说明

- [0327] SEQ ID NO:1 重链 CDR3, Mab 2F11
[0328] SEQ ID NO:2 重链 CDR2, Mab 2F11
[0329] SEQ ID NO:3 重链 CDR1, Mab 2F11
[0330] SEQ ID NO:4 轻链 CDR3, Mab 2F11
[0331] SEQ ID NO:5 轻链 CDR2, Mab 2F11
[0332] SEQ ID NO:6 轻链 CDR1, Mab 2F11
[0333] SEQ ID NO:7 重链可变域, Mab 2F11
[0334] SEQ ID NO:8 轻链可变域, Mab 2F11
[0335] SEQ ID NO:9 重链 CDR3, Mab 2E10
[0336] SEQ ID NO:10 重链 CDR2, Mab 2E10
[0337] SEQ ID NO:11 重链 CDR1, Mab 2E10
[0338] SEQ ID NO:12 轻链 CDR3, Mab 2E10
[0339] SEQ ID NO:13 轻链 CDR2, Mab 2E10
[0340] SEQ ID NO:14 轻链 CDR1, Mab 2E10
[0341] SEQ ID NO:15 重链可变域, Mab 2E10
[0342] SEQ ID NO:16 轻链可变域, Mab 2E10
[0343] SEQ ID NO:17 重链 CDR3, hMab 2F11-c11
[0344] SEQ ID NO:18 重链 CDR2, hMab 2F11-c11
[0345] SEQ ID NO:19 重链 CDR1, hMab 2F11-c11
[0346] SEQ ID NO:20 轻链 CDR3, hMab 2F11-c11
[0347] SEQ ID NO:21 轻链 CDR2, hMab 2F11-c11
[0348] SEQ ID NO:22 轻链 CDR1, hMab 2F11-c11
[0349] SEQ ID NO:23 重链可变域, hMab 2F11-c11
[0350] SEQ ID NO:24 轻链可变域, hMab 2F11-c11
[0351] SEQ ID NO:25 重链 CDR3, hMab 2F11-d8
[0352] SEQ ID NO:26 重链 CDR2, hMab 2F11-d8
[0353] SEQ ID NO:27 重链 CDR1, hMab 2F11-d8
[0354] SEQ ID NO:28 轻链 CDR3, hMab 2F11-d8
[0355] SEQ ID NO:29 轻链 CDR2, hMab 2F11-d8
[0356] SEQ ID NO:30 轻链 CDR1, hMab 2F11-d8
[0357] SEQ ID NO:31 重链可变域, hMab 2F11-d8
[0358] SEQ ID NO:32 轻链可变域, hMab 2F11-d8
[0359] SEQ ID NO:33 重链 CDR3, hMab 2F11-e7

[0360]	SEQ ID NO:34	重链 CDR2, hMab 2F11-e7
[0361]	SEQ ID NO:35	重链 CDR1, hMab 2F11-e7
[0362]	SEQ ID NO:36	轻链 CDR3, hMab 2F11-e7
[0363]	SEQ ID NO:37	轻链 CDR2, hMab 2F11-e7
[0364]	SEQ ID NO:38	轻链 CDR1, hMab 2F11-e7
[0365]	SEQ ID NO:39	重链可变域, hMab 2F11-e7
[0366]	SEQ ID NO:40	轻链可变域, hMab 2F11-e7
[0367]	SEQ ID NO:41	重链 CDR3, hMab 2F11-f12
[0368]	SEQ ID NO:42	重链 CDR2, hMab 2F11-f12
[0369]	SEQ ID NO:43	重链 CDR1, hMab 2F11-f12
[0370]	SEQ ID NO:44	轻链 CDR3, hMab 2F11-f12
[0371]	SEQ ID NO:45	轻链 CDR2, hMab 2F11-f12
[0372]	SEQ ID NO:46	轻链 CDR1, hMab 2F11-f12
[0373]	SEQ ID NO:47	重链可变域, hMab 2F11-f12
[0374]	SEQ ID NO:48	轻链可变域, hMab 2F11-f12
[0375]	SEQ ID NO:49	重链 CDR3, hMab 2F11-g1
[0376]	SEQ ID NO:50	重链 CDR2, hMab 2F11-g1
[0377]	SEQ ID NO:51	重链 CDR1, hMab 2F11-g1
[0378]	SEQ ID NO:52	轻链 CDR3, hMab 2F11-g1
[0379]	SEQ ID NO:53	轻链 CDR2, hMab 2F11-g1
[0380]	SEQ ID NO:54	轻链 CDR1, hMab 2F11-g1
[0381]	SEQ ID NO:55	重链可变域, hMab 2F11-g1
[0382]	SEQ ID NO:56	轻链可变域, hMab 2F11-g1
[0383]	SEQ ID NO:57	人 κ 轻链恒定区
[0384]	SEQ ID NO:58	自 IgG1 衍生的人重链恒定区
[0385]	SEQ ID NO:59	L234A 和 L235A 上突变的自 IgG1 衍生的人重链恒定区
[0386]	SEQ ID NO:60	自 IgG4 衍生的人重链恒定区
[0387]	SEQ ID NO:61	S228P 上突变的自 IgG4 衍生的人重链恒定区
[0388]	SEQ ID NO:62	人野生型 CSF-1R (wt CSF-1R)
[0389]	SEQ ID NO:63	人突变型 CSF-1R L301S Y969F
[0390]	SEQ ID NO:64	人 CSF-1R 胞外域
[0391]	SEQ ID NO:65	人 CSF-1R 片段 de1D4
[0392]	SEQ ID NO:66	人 CSF-1R 片段 D1-D3
[0393]	SEQ ID NO:67	信号肽
[0394]	SEQ ID NO:68	引物
[0395]	SEQ ID NO:69	重链 CDR3, Mab 1G10
[0396]	SEQ ID NO:70	重链 CDR2, Mab 1G10
[0397]	SEQ ID NO:71	重链 CDR1, Mab 1G10
[0398]	SEQ ID NO:72	轻链 CDR3, Mab 1G10

- [0399] SEQ ID NO:73 轻链 CDR2, Mab 1G10
[0400] SEQ ID NO:74 轻链 CDR1, Mab 1G10
[0401] SEQ ID NO:75 重链可变域, Mab 1G10
[0402] SEQ ID NO:76 轻链可变域, Mab 1G10
[0403] SEQ ID NO:77 重链 CDR3, Mab 2H7
[0404] SEQ ID NO:78 重链 CDR2, Mab 2H7
[0405] SEQ ID NO:79 重链 CDR1, Mab 2H7
[0406] SEQ ID NO:80 轻链 CDR3, Mab 2H7
[0407] SEQ ID NO:81 轻链 CDR2, Mab 2H7
[0408] SEQ ID NO:82 轻链 CDR1, Mab 2H7
[0409] SEQ ID NO:83 重链可变域, Mab 2H7
[0410] SEQ ID NO:84 轻链可变域, Mab 2H7

[0411] 提供下面的实施例、序列和附图来帮助理解本发明,所附权利要求书列出本发明的真实范围。本领域技术人员理解,可以在所列规程中进行更改而不偏离本发明的精神。

附图说明

[0412] 图 1 10 μ g/ml 浓度的不同抗 CSF-1R 单克隆抗体的处理下对 3D 培养物中 BeWo 肿瘤细胞的生长抑制。

[0413] X 轴:与细胞的 ATP 含量(CellTiterGlo 测定法)对应的存活力标准化均值相对光单位(RLU)。

[0414] Y 轴:测试探针:极限培养基(0.5%FBS),小鼠 IgG1(mIgG1, 10 μ g/ml),小鼠 IgG2a(mIgG2a 10 μ g/ml),仅 CSF-1, Mab 2F11, Mab 2E10, Mab 2H7, Mab 1G10 和 SC 2-4A5。

[0415] 用依照本发明的抗 CSF-1R 抗体观察到最高的对 CSF-1 诱导的生长的抑制。

[0416] 图 2a 不同抗 CSF-1R 抗体对固定化人 CSF-1R 片段 de1D4(包含胞外亚域 D1-D3 和 D5)(SEQ ID NO:65)的结合的 Biacore 传感图(y 轴:结合信号,以响应单位(RU)计,基线=0RU, x 轴:时间,以秒(s)计):虽然抗体 Mab 3291 和 sc 2-4A5 清楚地显示结合此 de1D4 片段,依照本发明的抗体例如 Mab 2F11 和 Mab 2E10 不结合 CSF-1R 片段 de1D4。对照抗 CCR5 抗体 m<CCR5>Pz03.1C5 也不结合 CSF-1R 片段 de1D4。

[0417] 图 2b 不同抗 CSF-1R 抗体对固定化人 CSF-1R 胞外域(CSF-1R-ECD)(包含胞外亚域 D1-D5)(SEQ ID NO:64)的结合的 Biacore 传感图(y 轴:结合信号,以响应单位(RU)计,基线=0RU, x 轴:时间,以秒(s)计):所有抗 CSF-1R 抗体显示结合 CSF-1R-ECD。对照抗 CCR5 抗体 m<CCR5>Pz03.1C5 不结合 CSF-1R-ECD。

[0418] 图 2c 不同抗 CSF-1R 抗体对固定化人 CSF-1R 片段 de1D4(包含胞外亚域 D1-D3 和 D5)(SEQ ID NO:65)的结合的 Biacore 传感图(y 轴:结合信号,以响应单位(RU)计,基线=0RU, x 轴:时间,以秒(s)计):Mab 1G10、Mab 2H7 和人源化 hMab 2F11-e7 不结合 CSF-1R 片段 de1D4。对照抗 CCR5 抗体 m<CCR5>Pz03.1C5 也不结合 CSF-1R 片段 de1D4。

[0419] 图 2d 不同抗 CSF-1R 抗体对固定化人 CSF-1R 胞外域(CSF-1R-ECD)(包含 the 胞外亚域 D1-D5)(SEQ ID NO:64)的结合的 Biacore 传感图(y 轴:结合信号,以响应单位(RU)计,基线=0RU, x 轴:时间,以秒(s)计):所有抗 CSF-1R 抗体 Mab 1G10、Mab 2H7 和

人源化 hMab 2F11-e7 显示结合 CSF-1R-ECD。对照抗 CCR5 抗体 m<CCR5>Pz03.1C5 不结合 CSF-1R-ECD。

[0420] 图 2e 不同抗 CSF-1R 抗体对固定化人 CSF-1R 片段 de1D4 (包含胞外亚域 D1 - D3 和 D5) (SEQ ID NO:65) 的结合的 Biacore 传感图(y 轴 :结合信号,以响应单位(RU)计,基线 =0RU, x 轴 :时间,以秒(s)计):所有抗 CSF-1R 抗体 1. 2. SM、CXIIG6、ab10676 和 MAB3291 显示结合 CSF-1R 片段 de1D4。对照抗 CCR5 抗体 m<CCR5>Pz03.1C5 也不结合 CSF-1R 片段 de1D4。

[0421] 图 2f 不同抗 CSF-1R 抗体对固定化人 CSF-1R 胞外域(CSF-1R-ECD) (包含胞外亚域 D1 - D5) (SEQ ID NO:64) 的结合的 Biacore 传感图(y 轴 :结合信号,以响应单位(RU)计,基线 =0RU, x 轴 :时间,以秒(s)计):所有抗 CSF-1R 抗体 1. 2. SM, CXIIG6, ab10676 和 MAB3291 显示结合 CSF-1R-ECD。对照抗 CCR5 抗体 m<CCR5>Pz03.1C5 不结合 CSF-1R-ECD。

[0422] 图 3a-d 应用不同剂量的依照本发明的抗 CSF-1R 抗体后猕猴中的 CSF-1 水平

[0423] 图 4 体内功效 - 乳腺癌 BT20 异种移植物中依照本发明的抗 CSF-1R 抗体所致肿瘤生长抑制

[0424] 实施例 1

[0425] 生成抗 CSF-1R 抗体的杂交瘤细胞系的产生

[0426] NMRI 小鼠的免疫规程

[0427] 利用电穿孔用编码 huCSF-1R 之胞外域的表达载体 pDisplay™ (Invitrogen, USA) 免疫 NMRI 小鼠。每只小鼠用 100 μg DNA 免疫 4 次。当发现抗 huCSF-1R 的血清滴度足够时,在融合前 4 天和 3 天另外用 200 μl PBS 中的 50 μg 的 huCSF-1R ECD/huCSF-1R ECDhuFc 嵌合体 1 : 1 混合物对小鼠进行静脉内(i. v.)增强免疫一次。

[0428] 抗原特异性 ELISA

[0429] 通过抗原特异性 ELISA 测定受免疫小鼠的血清中的抗 CSF-1R 滴度。

[0430] 用 0.1mg/ml 生物素化的抗 Fc γ (Jackson ImmunoResearch, Cat. No. 109-066-098) 将 0.3 μg/ml huCSF-1R-huFc 嵌合体(可溶性胞外域)捕捉到链霉亲和素板 (MaxiSorb ;MicroCoat, DE, Cat. No. 11974998/MC1099) 上,然后加入 1/800 稀释于 PBS/0.05%Tween20/0.5%BSA 中的辣根过氧化物酶(HRP)-缀合的 F(ab')₂抗小鼠 IgG (GE Healthcare, UK, Cat. No. NA9310V)。将来自所有取血(tap)的血清 1/40 稀释于 PBS/0.05%Tween20/0.5%BSA 并系列稀释至 1/1638400。将稀释后的血清加入孔中。取血前的(pre-tap)血清用作阴性对照。从 500ng/ml 至 0.25ng/ml 的小鼠抗人 CSF-1R Mab3291 (R&D Systems, UK)系列稀释液用作阳性对照。将所有组分一起保温 1.5 小时。将孔用 PBST (PBS/0.2%Tween20)清洗 6 次,然后用新鲜制备的 ABTS®溶液(1mg/ml) (ABTS :2, 2'-连氨基 - 双(3-乙基苯并噻唑啉 -6-磺酸))对测定进行室温显色 10 分钟。测量 405nm 的吸光度。

[0431] 杂交瘤产生

[0432] 可基于产生杂交瘤的标准方案将小鼠淋巴细胞分离并用 PEG 与小鼠骨髓瘤细胞系融合。然后针对抗原特异抗体的产生筛选所产生的杂交瘤。例如,用 50%PEG 将来自受免疫小鼠之脾衍生淋巴细胞的单细胞悬浮液与 Ag8 非分泌性小鼠骨髓瘤细胞 P3X63Ag8.653 (ATCC, CRL-1580)融合。将细胞以大约 10⁴ 接种于平底 96 孔微量滴定板,然后在选择性培

培养基上保温约两周。然后通过针对人抗 CSF-1R 单克隆 IgM 和 IgG 抗体的 ELISA 筛选各个孔。一旦出现广泛的杂交瘤生长,就将分泌抗体的杂交瘤重接种,再次筛选,然后若对于人 IgG,抗 CSF-1R 单克隆抗体仍然是阳性的,则可通过 FACS 进行亚克隆。然后将稳定的亚克隆体外培养以在组织培养基中产生抗体供表征。可通过如实施例 4 中所述测定抗 CSF-1R 抗体对人 CSF-1R 片段 de1D4 和对人 CSF-1R 胞外域(CSF-1R-ECD)的结合以及如实施例 5 中所述在用抗 CSF-1R 单克隆抗体处理的条件下测定对以野生型 CSF-1R (配体依赖性信号传导)或突变型 CSF-1R L301S Y969F (配体不依赖性信号传导)转染的 NIH3T3 细胞的生长抑制来选择依照本发明的抗体。

[0433] 杂交瘤的培养

[0434] 将所产生的 muMAb 杂交瘤在补充有 2mM L-谷氨酰胺(GIBCO-Cat. No. 35050-038)、1mM 丙酮酸钠(GIBCO-Cat. No. 11360-039)、1xNEAA (GIBCO-Cat. No. 11140-035)、10%FCS (PAA-Cat. No. A15-649)、1xPenStrep (Roche-Cat. No. 1074440)、1xNutridoma CS (Roche-Cat. No. 1363743)、50 μ M 巯基乙醇(GIBCO-Cat. No. 31350-010)和 50U/ml 小鼠 IL-6 (Roche-Cat. No. 1444581)的 RPMI 1640 (PAN-Cat. No. P04-17500)中于 37 $^{\circ}$ C 和 5%CO₂ 进行培养。所产生小鼠抗体中的一些已被人源化(例如 Mab 2F11)并重组表达。

[0435] 实施例 2

[0436] 对 CSF-1 结合 CSF-1R 的抑制(ELISA)

[0437] 通过建立此测定法以便首先使得抗 CSF-1R 抗体结合 CSF-1R-ECD,随后检测不与受体结合的配体,可测试取代配体的抗体和二聚化抑制物抗 CSF-1R 抗体二者。在 384 孔微量滴定板(MicroCoat, DE, Cat. No. 464718)上于室温进行测试。在每一保温步骤之后平板均用 PBST 清洗 3 次。

[0438] 开始,用 0.5mg/ml 山羊 F(ab')₂生物素化抗 Fc γ (Jackson ImmunoResearch, Cat. No. 109-006-170)包被平板 1 小时(h)。

[0439] 此后将孔用补充有 0.2% Tween®-20 和 2%BSA (Roche Diagnostics GmbH, DE)的 PBS 封闭 0.5 小时。将 75ng/ml 的 huCSF-1R-huFc 嵌合体(它形成了 huCSF-1R 的二聚可溶性胞外域)固定化至平板上 1 小时。然后将稀释于 PBS/0.05%Tween20/0.5%BSA 中的纯化抗体保温 1 小时。在加入 3ng/mlCSF-1 (Biomol, DE, Cat. No. 60530)、50ng/ml 生物素化抗 CSF-1 克隆 BAF216 (R&D Systems, UK)和 1:5000 稀释之链霉亲和素 HRP (Roche Diagnostics GmbH, DE, Cat. No. 11089153001)的混合物 1 小时后,将平板用 PBST 清洗 6 次。抑制配体-受体相互作用的抗 CSF-1R SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, US)被用作阳性对照。将平板用新鲜配制的 BM blue® POD 底物溶液(BM blue® :3, 3' -5, 5' -四甲基联苯胺, Roche Diagnostics GmbH, DE, Cat. No. 11484281001)在室温显色 30 分钟。测量 370nm 处的吸光度。若抗 CSF-1R 抗体引起 CSF-1 从二聚复合物中释放,则会发现吸光度降低。所有的抗 CSF-1R 抗体均显示了对 CSF-1 与 CSF-1R 的相互作用的显著抑制(见表 1)。抑制配体-受体相互作用的抗 CSF-1R SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, US, 也可参阅 Sherr, C. J. 等人, Blood 73 (1989) 1786-1793)被用作参照对照。

[0440] 表 1 :对 CSF-1/CSF-1R 相互作用的抑制的 IC50 计算值

[0441]

CSF-1R Mab	IC ₅₀ CSF-1/CSF-1R 抑制 [ng/ml]
Mab 2F11	19.3
Mab 2E10	20.6
Mab 2H7	18.2
Mab 1G10	11.8
SC-2-4A5	35.2

[0442] 实施例 3

[0443] 对 NIH3T3-CSF-1R 重组细胞中 CSF-1- 诱导之 CSF-1R 磷酸化的抑制

[0444] 4.5x10³个用全长 CSF-1R 的表达载体以逆转录病毒方式感染的 NIH 3T3 细胞在 DMEM (PAA Cat.No. E15-011)、2mM L- 谷氨酰胺 (Sigma, Cat.No. G7513)、2mM 丙酮酸钠、1x 非必需氨基酸、10%FKS (PAA, Cat.No. A15-649) 和 100 μg/ml PenStrep (Sigma, Cat.No. P4333 [10mg/ml]) 中培养至它们达到汇合。此后用补充有亚硒酸钠 [5ng/ml] (Sigma, Cat.No. S9133)、运铁蛋白 [10 μg/ml] (Sigma, Cat.No. T8158)、BSA [400 μg/ml] (Roche Diagnostics GmbH, Cat.No. 10735078)、4mM L- 谷氨酰胺 (Sigma, Cat.No. G7513)、2mM 丙酮酸钠 (Gibco, Cat.No. 11360)、1x 非必需氨基酸 (Gibco, Cat:11140-035)、2- 巯基乙醇 [0, 05mM] (Merck, Cat.No. M7522)、100 μg/ml 和 PenStrep (Sigma, Cat.No. P4333) 的无血清 DMEM 培养液 (PAA Cat.No. E15-011) 清洗细胞并在 30 μl 相同培养基中保温 16 小时以使受体上调。将 10 μl 的已稀释抗 CSR-1R 抗体加至细胞中 1.5 小时。然后用 10 μl 的 100ng/ml huM-CSF-1 (Biomol Cat.No. 60530) 刺激细胞 5 分钟。保温后, 去除上清液, 将细胞用 80 μl 的冰冷 PBS 漂洗 2 次并加入 50 μl 新鲜配制的冰冷裂解缓冲液 (150mM NaCl/20mM Tris pH 7.5/1mM EDTA/1mM EGTA/1% TritonX-100/1 片蛋白酶抑制剂片剂 (Roche Diagnostics GmbH, Cat.No. 1836170) 每 10ml 缓冲液 /10 μl/ml 磷酸酶抑制剂鸡尾酒 1 (Sigma, Cat.No. P-2850, 100x 储液)/10 μl/ml 蛋白酶抑制剂 1 (Sigma, Cat.No. P-5726, 100x 储液)/10 μl/ml 1M NaF)。冰置 30 分钟后, 将平板在平板摇床上剧烈振荡 3 分钟, 然后以 2200rpm 离心 10 分钟 (Heraeus Megafuge 10)。

[0445] 用 ELISA 分析细胞裂解物中磷酸化的和总的 CSF-1 受体的存在。使用来自 R&D Systems (Cat.No. DYC3268-2) 的试剂盒依照供应商的说明书检测磷酸化的受体。为了检测总的 CSF-1R, 用试剂盒中所包含的捕捉抗体将 10 μl 的裂解物固定化在平板上。之后加入 1:750 稀释的生物素化抗 CSF-1R 抗体 BAF329 (R&D Systems) 和 1 : 1000 稀释的链霉亲和素 -HRP 缀合物。60 分钟后将平板用新鲜配制的 **ABTS®** 溶液显色并检测吸光度。数据计算为无抗体下阳性对照的百分率和所表达的磷酸化 / 总受体比例值。阴性对照限定为不加入 M-CSF-1。抗 CSF-1R SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, US, 也可参阅 Sherr, C. J. 等人, Blood 73 (1989) 1786-1793), 抑制配体 - 受体相互作用, 被用作参照对照。

[0446] 表 2 : 对 CSF-1 受体磷酸化的抑制的 IC₅₀ 计算值。

[0447]

CSF-1R Mab	IC50 CSF-1R 磷酸化 [ng/ml]
Mab 2F11	219.4
Mab 2E10	752.0
Mab 2H7	703.4
Mab 1G10	56.6
SC-2-4A5	1006.6

[0448] 实施例 4

[0449] 抗 CSF-1R 抗体对人 CSF-1R 片段 de1D4 和对人 CSF-1R 胞外域 (CSF-1R-ECD) 之结合的测定

[0450] SEQ ID NO:64 之人 CSF-1R 胞外域 (CSF-1R-ECD) (包含胞外亚域 D1 - D5, hCSF-1R-ECD) 的制备:

[0451] pCMV-preS-Fc-hCSF-1R-ECD (7836bp) 编码人 CSF-1R 之完整 ECD (SEQID NO:64), 其 C-末端与 PreScission 蛋白酶切割位点融合, 随后是人 IgG1 的第 100-330 位氨基酸和 6xHis 标签, 在 CMV 启动子的控制之下。为了建立 BamHI 限制性位点, 已通过第一个 M 之后插入氨基酸 G 和 S 改变了天然信号肽。

[0452] SEQ ID NO:65 之人 CSF-1R 片段 de1D4 (包含胞外亚域 D1 - D3 和 D5, hCSF-1R-de1D4) 的制备:

[0453] 通过 Stratagene QuikChange XL 定点诱变方案从 pCMV-preS-Fc-hCSF-1R-ECD 克隆 hCSF1R-de1D4-V1-PreSc-hFc-His, 使用具有序列 CACCTCCATGTTCTTCCGGTACCCCCAGAGG TAAG (SEQ ID NO:68) 的 de1D4-for 作为正向引物而具有反向互补序列的 de1D4-rev 作为反向引物。用 BioTechniques 26 (1999)680 中公布的方案变化来在常规 Stratagene 方案之前的三个循环中在分开的反应中延伸这两个引物:

[0454] 依照制造商的指南建立两份分开的 50 μ l 反应混合物, 每一份含有 10ng 质粒 pCMV-preS-Fc-hCS F1R-ECD 作为模板以及 10pM 的引物 de1D4-for 或 de1D4-rev 之一, 以及试剂盒所提供的 0.5 μ l Pfu DNA 聚合酶。进行三个 PCR 循环 95° C 30 秒钟 / 55° C 60 秒钟 / 68° C 8 分钟, 然后将这两种反应混合物各 25 μ l 在一新的管中合并, 然后加入 0.5 μ l 新鲜的 Pfu DNA 聚合酶。如 Stratagene 在试剂盒指南中所详列的进行 18 个温度循环的常规 PCR 方案, 随后用试剂盒所提供的 Dpn1 限制酶最终消化 2 小时。用 Cel II 和 Not I 消化来检测携带删除的克隆并通过测序证实。

[0455] 依照制造商的说明书通过在 Hek293FreeStyle 悬浮细胞系统 (Invitrogen) 中进行瞬时转染制备蛋白质。1 周后过滤 500ml 上清液并加载至 1ml HiTrap MabSelect Xtra (GE healthcare) 蛋白 A 柱 (0.2ml/min) 上。首先用 PBS 然后用 50mM Tris/150mM NaCl/1mM EDTA/pH 7.3 清洗柱子。将稀释于 375 μ l 相同缓冲液中的 75 μ l PreScission 蛋白酶 (GE#27-0843-01) 加载到柱子上并关闭柱子在 4° C 转动保温过夜。将柱子安装到 1ml GSTrap FF 柱 (GE healthcare) 的顶端, 洗脱目的蛋白 (0.2ml/min, 0.2ml 级分)。将合并的

级分通过 3kNanosep 离心超滤从 1.8ml 浓缩至 0.4ml 并在 PBS 中经过 S200HR SEC 进行层析(0.5ml/min)。

[0456] 在两个级分中作为二聚物分子(合并 1, V=1.5ml ;c=0.30mg/ml ;在 SDS PAGE 上的表观质量是 83kDa, 还原 62kDa)以及作为单体(合并 2, V=1.4ml ;c=0.25mg/ml, 在 SDS PAGE 上的表观质量是 62kDa)获得人 CSF-1R 片段 de1D4。将二聚形式用于所有实验中。

[0457] 抗 CSF-1R 抗体对人 CSF-1R 片段 de1D4 和对人 CSF-1R 胞外域(CSF-1R-ECD)之结合测定(结合信号作为响应单位(RU)):

[0458] 仪器 :Biacore T100 (GE Healthcare)

[0459] 软件 :T100 控制, 版本 2.0.1

[0460] T100 评估, 版本 2.0.2

[0461] 测定格式芯片 :CM5

[0462] 温度 :25° C

[0463] 通过胺偶联固定化 CSF-1R 片段。为了比较依照本发明的不同抗 CSF-1R 抗体的结合, 注射一个浓度的测试抗体。抗 CSF-1R Mab3291 (R&D-Systems) 和 SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, US- 还可参见 Sherr, C. J. 等人, Blood73 (1989) 1786-1793) 用作参照对照, 抗 CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 (2004 年 8 月 18 日以 DSM ACC 2683 保藏于 DSMZ) 作为阴性对照, 所有均处于与本发明抗 CSF-1R 抗体相同的条件之下。

[0464] CSF-1R 片段的胺偶联

[0465] 依照制造商的说明书进行标准的胺偶联: 运行缓冲液 :PBS-T (Roche : 11666789+0.05%Tween20 :11332465), 通过 EDC/NHS 混合物活化, 以流速 10 μ l/min 注射人 CSF-1R 片段 de1D4 (包含胞外亚域 D1 - D3 和 D5) (SEQ IDNO:65) 和人 CSF-1R 胞外域 (CSF-1R-ECD) (包含胞外亚域 D1-D5) (SEQ ID NO:64) 600 秒; 稀释于偶联缓冲液 NaAc pH 5.0 中, c=10 μ g/mL ;通过注射 1M 乙醇胺封闭最终残余的活化羧基。

[0466] 在 25° C<CSF-1R>Mab 2F11、Mab 2E10、Mab 3291 和 sc2-4A5 和其它抗 CSF-1R 抗体对人 CSF-1R 片段 de1D4 和人 CSF-1R 胞外域(CSF-1R-ECD) 的结合

[0467] 运行缓冲液 :PBS-T (Roche :11666789+0.05%Tween20 :11332465)

[0468] 分析物样品 :

[0469] 通过以流速 30 μ L/min 注射浓度 c=10nM 的分析物来对结合进行测量。(在第二个实验中是针对 Mab 1G10、Mab 2H7 和人源化 hMab 2F11-e7)每次注射时长是 700 秒, 随后是 180 秒的解离期。每个循环后用 50mM NaOH 进行最后的再生, 接触时间 60 秒, 流速 30 μ L/min。

[0470] 以注射结束后 10 秒的报告点测量信号。扣除参照信号(来自空白参照流动室(只用 EDC/NHS 和乙醇胺处理)) 以得到结合信号(作为 RU)。若非结合抗体的结合信号稍微低于 0(Mab 2F11=-3 ;Mab 2E10=-2 ;Mab 1G10=-6, Mab 2H7=-9 ;及人源化 hMab 2F11-e7=-7), 则将所述数值设为 0。

[0471] 表 3a :在 25° C<CSF-1R>Mab 对人 CSF-1R 片段 de1D4 和 CSF-1R-ECD 的结合及比例, 通过 SPR 测量

[0472]

	结合de1D4 [RU]	结合CSF-1R-ECD [RU]	抗CSF1R抗体 对CSF1R片段de1D4 / 对CSF-1R-ECD 的结合比例
Mab 3291	1015	627	1015/627 = 1.61
sc2-4A5	374	249	374/249 = 1.50
Mab 2F11	0	176	0/176 = 0
hMab 2F11-e7	0	237	0/237 = 0
Mab 2E10	0	120	0/120 = 0
Mab 1G10	0	2708	0/2708 = 0
Mab 2H7	0	147	0/147 = 0
m<CCR5>Pz03.1C5	2	5	-

[0473] Mab 2F11 和 Mab 2E10 显示了结合人 CSF-1R 胞外域 (CSF-1R-ECD) (见图 2b); 不过未检测到对 CSF-1R 片段 de1D4 的结合 (见图 2a)。

[0474] Sc2-4A5 和 MAB3291 显示出结合 CSF-1R-ECD 和 de1 D4 (见图 2b 和 2a)。

[0475] 因此抗 CSF1R 抗体 Mab 2F11 和 Mab 2E10 对 CSF1R 片段 de1D4/ 对 CSF-1R-ECD 的结合比例明显低于 1:50 (=0.02), 而 MAB3291 和 Sc2-4A5 的结合比例分别是 1.61 和 1.50, 并且远高于 1:50 (=0.02)。阴性对照抗体 m<CCR5>Pz03.1C5 未显示任何结合 (如所预期的)。

[0476] Mab 1G10、Mab 2H7 和人源化 hMab 2F11-e7 显示出结合人 CSF-1R 胞外域 (CSF-1R-ECD) (见图 2d); 不过未检测到对 CSF-1R 片段 de1D4 的结合。(见图 2c)。因此抗 CSF1R 抗体 Mab 1G10、Mab 2H7 和人源化 hMab 2F11-e7 对 CSF1R 片段 de1D4/ 对 CSF-1R-ECD 的结合比例明显低于 1:50 (=0.02)。

[0477] 在进一步的实验中调查了抗 CSF-1R 抗体 1.2.SM (W02009026303 中所述的配体置换性 CSF-1R 抗体)、CXIIIG6 (W0 2009/112245 中所述的配体置换性 CSF-1R 抗体)、山羊多克隆抗 CSF-1R 抗体 ab10676 (abcam)。抗 CSF-1R 抗体 Mab3291 (R&D-Systems) 用作参照对照。抗 CCR5m<CCR5>Pz03.1C5 (2004 年 8 月 18 日以 DSM ACC 2683 保藏于 DSMZ) 用作阴性对照。

[0478] 表 3b : 在 25° C<CSF-1R>Mab 对人 CSF-1R 片段 de1D4 和 CSF-1R-ECD 的结合及比例, 通过 SPR 测量

[0479]

	结合delD4 [RU]	结合CSF-1R-ECD [RU]	抗CSF1R抗体 对CSF1R片段delD4 / 对CSF-1R-ECD的 结合比例
MAB3291	1790	1222	1790/1222 = 1.47
1.2.SM	469	704	469/704 = 0.67
CXIIG6	1983	1356	1983/1356 = 1.46
ab10676	787	547	787/547 = 1.44
m<CCR5>Pz03.1C5	0	0	-

[0480] 1.2.SM、CXIIG6、ab10676 和 MAB3291 显示出结合 CSF-1R-ECD 和 del D4 (见图 2f 和 2e)。

[0481] 1.2.SM、CXIIG6、ab10676 和 MAB3291 的结合比例远高于 1:50 (=0.02)。阴性对照抗体 m<CCR5>Pz03.1C5 未显示出任何结合(如所预期的)。

[0482] 实施例 5

[0483] 在用抗 CSF-1R 单克隆抗体处理下对 3D 培养中的 NIH3T3-CSF-1R 重组细胞的生长抑制(CellTiterGlo 测定法)

[0484] 用全长野生型 CSF-1R (SEQ ID NO:62) 或突变型 CSF-1R L301S Y969F (SEQ ID NO:63) 的表达载体经逆转录病毒感染的 NIH 3T3 细胞在 poly-HEMA (聚甲基丙烯酸-2-羟乙酯(poly(2-hydroxyethylmethacrylate))) (Polysciences, Warrington, PA, USA) 包被(以防止粘附至塑料表面)的平皿上培养于补充有 2mM L-谷氨酰胺、2mM 丙酮酸钠和非必需氨基酸和 10% 胎牛血清(Sigma, Taufkrchen, Germany) 的 DMEM 高葡萄糖培养基(PAA, Pasching, Austria)中。细胞接种于用 5ng/ml 亚硒酸钠、10mg/ml 运铁蛋白、400 μg/ml BSA 和 0.05mM 2-巯基乙醇替换血清的培养基中。在用 100ng/ml huCSF-1 (Biomol, Hamburg, Germany) 处理时,表达 wtCSF-1R 的细胞形成三维生长的密集椭球体,被称为停泊独立的特性。这些椭球体近似于原位实体肿瘤的三维结构和组织。突变型 CSF-1R 重组细胞能够不依赖于 CSF-1 配体而形成椭球体。在不同浓度的抗体存在下将椭球体培养物保温 3 天以测定 IC50 (细胞生存能力被 50% 抑制的浓度)。用 CellTiterGlo 测定法通过测量细胞的 ATP 含量来检测细胞的生存能力。

[0485] 表 5a :

[0486]

CSF-1R Mab	野生型CSF-1R IC ₅₀ [μg/ml]	突变型CSF-1R IC ₅₀ [μg/ml]
Mab 2F11	1.1	8.0
Mab 2E10	0.49	4.9
Mab 2H7	0.31	5.3
Mab 1G10	0.29	14.2
SC 2-4A5	10.0	10.0

[0487] 参照对照 Mab R&D-Systems 3291 未显示对突变型 CSF-1R 重组细胞增殖的抑制。

[0488] 在进一步的实验中调查了依照本发明的抗 CSF-1R 抗体 hMab 2F11-e7 和抗 CSF-1R 抗体 1.2.SM (WO2009026303 中所述的配体置换性 CSF-1R 抗体)、CXIIIG6 (WO 2009/112245 中所述的配体置换性 CSF-1R 抗体)、山羊多克隆抗 CSF-1R 抗体 ab10676 (abcam)、和 SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, US- 还可参见 Sherr, C. J. 等人, Blood 73 (1989) 1786-1793)。

[0489] 在不同浓度的抗体存在下将椭球体培养物保温 3 天以测定 IC₃₀(细胞生存能力被 30% 抑制的浓度)。最大浓度是 20 μg/ml。用 CellTiterGlo 测定法通过测量细胞的 ATP 含量来检测细胞的生存能力。

[0490] 表 5b:

[0491]

CSF-1R Mab	野生型CSF-1R IC ₃₀ [μg/ml]	突变型CSF-1R IC ₃₀ [μg/ml]
hMab 2F11-e7	4.91	0.54
1.2.SM	1.19	> 20 μg/ml (在 20 μg/ml 有 -19%抑制 = 19%刺激)
CXIIIG6	> 20 μg/ml (在 20 μg/ml 有 21%抑制)	> 20 μg/ml (在 20 μg/ml 有 -36%抑制 = 36%刺激)
ab10676	14.15	> 20 μg/ml (在 20 μg/ml 有 0%抑制)
SC 2-4A5	16.62	2.56

[0492] 实施例 6

[0493] 在用抗 CSF-1R 单克隆抗体处理下对 3D 培养中的 BeWo 肿瘤细胞的生长抑制 (CellTiterGlo- 测定法)

[0494] 将 BeWo 绒毛膜癌细胞(ATCC CCL-98)培养于补充有 10%FBS (Sigma)和 2mM L- 谷氨酰胺的 F12K 培养基(Sigma, Steinheim, Germany)中。将 5x10⁴个细胞 / 孔接种于装有

补充了 0.5%FBS 和 5%BSA 之 F12K 培养基的 96 孔 poly-HEMA (聚甲基丙烯酸-2-羟乙酯) 包被的平板中。伴随地加入 200ng/ml huCSF-1 和 10 μ g/ml 不同抗 CSF-1R 单克隆抗体并保温 6 天。用 CellTiterGlo 测定法通过以相对光单位 (RLU) 测量细胞的 ATP 含量来检测细胞的生存能力。当用不同抗 CSF-1R 抗体 (10 μ g/ml) 处理 BeWo 椭球体培养物时, 观察到了对 CSF-1 诱导的生长的抑制。为了计算抗体介导的抑制作用, 从所有样品中减去未刺激 BeWo 细胞的 RLU 均值。CSF-1 刺激细胞的 RLU 均值任意设置为 100%。将用 CSF-1 刺激和用抗 CSF-1R 抗体处理的细胞的 RLU 均值计算为 CSF-1 刺激 RLU 的百分率。表 6 显示了在用抗 CSF-1R 单克隆抗体处理下对 3D 培养中的 BeWo 肿瘤细胞的生长抑制的计算数据; 图 1a 和 b 描述了标准化 RLU 均值。

[0495] 表 6:

[0496]

CSF-1R Mab	% 抑制 10 μ g/ml 抗体浓度
只用 CSF-1	0
Mab 2F11	70
Mab 2E10	102
Mab 2H7	103
Mab 1G10	99
SC 2-4A5	39

[0497] 实施例 7

[0498] 在用抗 CSF-1R 单克隆抗体处理下对人巨噬细胞分化的抑制 (CellTiterGlo 测定法)

[0499] 用 RosetteSep™ 人单核细胞富集鸡尾酒 (Stemcell Tech. -Cat. No. 15028) 从外周血中分离人单核细胞。将富集的单核细胞群在 37° C 和 5%CO₂ 的增湿气氛中接种于 96 孔微量滴定板 (2.5x10⁴ 个细胞 / 孔) 内补充了 10%FCS (GIBCO-Cat. No. 011-090014M)、4mM L-谷氨酰胺 (GIBCO-Cat. No. 25030) 和 1x PenStrep (Roche Cat. No. 1074440) 的 100 μ l RPMI 1640 (Gibco-Cat. No. 31870) 中。当在培养基中加入 150ng/ml huCSF-1 时, 可观察到清楚地分化成粘附性巨噬细胞。此分化通过添加抗 CSF-1R 抗体可被抑制。此外, 单核细胞的生存受影响并可通过 CellTiterGlo (CTG) 分析进行分析。从抗体处理对单核细胞生存的程度依赖性抑制, 计算 IC₅₀ (见表 7)。

[0500] 表 7:

[0501]

CSF-1R Mab	IC ₅₀ [μ g/ml]
Mab 2F11	0.08

Mab 2E10	0.06
Mab 2H7	0.03
Mab 1G10	0.06
SC 2-4A5	0.36

[0502] 在分开的测试中,系列人源化形式的 Mab 2F11,例如 hMab 2F11-c11、hMab 2F11-d8、hMab 2F11-e7、hMab 2F11-f12,显示了 0.07 $\mu\text{g/ml}$ (hMab2F11-c11)、0.07 $\mu\text{g/ml}$ (hMab 2F11-d8)、0.04 $\mu\text{g/ml}$ (hMab 2F11-e7) 和 0.09 $\mu\text{g/ml}$ (hMab 2F11-f12) 的 IC50 值。

[0503] 实施例 8

[0504] 在用抗 CSF-1R 单克隆抗体处理下对猕猴巨噬细胞分化的抑制(CellTiterGlo 测定法)

[0505] 用 CD14 微珠非人灵长类动物试剂盒(Miltenyi Biotec-Cat.No.130-091-097)依照制造商的说明从外周血中分离猕猴单核细胞。将富集的单核细胞群在 37° C 和 5%CO₂ 的增湿气氛中接种于 96 孔微量滴定板(1-3x10⁴个细胞/孔)内补充有 10%FCS (GIBCO-Cat.No.011-090014M)、4mM L-谷氨酰胺(GIBCO-Cat.No.25030)和 1x PenStrep (Roche Cat.No.1074440)的 100 μl RPMI 1640 (Gibco-Cat.No.31870)中。当在培养基中加入 150ng/mlhuCSF-1 时,可观察到清楚地分化成粘附性巨噬细胞。此分化通过添加抗 CSF-1R 抗体可被抑制。此外,单核细胞的生存受影响并可通过 CellTiterGlo (CTG)分析进行分析。在浓度 5 $\mu\text{g/ml}$ 抗体处理下分析生存能力(见表 8)。

[0506] 表 8 :

[0507]

CSF-1R Mab	% 生存	% 抑制(生存的) = (100%- % 生存)
Mab 2F11	4*	96
Mab 2E10	17**	83
Mab 2H7	8	92
Mab 1G10	2	98
SC 2-4A5	31	69

[0508] * 四次实验的均值(3 次实验用鼠的,1 次实验用嵌合的 mAb)

[0509] ** 只用鼠 mAb 的两次实验的均值

[0510] 实施例 9

[0511] 抗 CSF-1R 抗体对人 CSF-1R 的结合亲和力的测定

[0512] 仪器 :BIACORE® A100

[0513] 芯片 :CM5 (Biacore BR-1006-68)

[0514] 偶联 :胺偶联

[0515] 缓冲液 :PBS (Biacore BR-1006-72), pH 7.4, 35° C

[0516] 为了亲和力测量,将 36 μ g/ml 抗小鼠 Fc γ 抗体(来自山羊, Jackson Immuno Reasearch JIR115-005-071)偶联至芯片表面上以捕捉针对 CSF-1R 的抗体。以溶液中不同浓度添加人 CSF-1R 胞外域(CSF-1R-ECD) (包含胞外亚域 D1 - D5) (SEQ ID NO:64) (R&D-Systems 329-MR 或亚克隆的 pCMV-presS-HisAvitag-hCSF-1R-ECD)。通过在 35° C 1.5 分钟的 CSF-1R 注射测量结合 ;通过在 35° C 用缓冲液清洗芯片表面 10 分钟来测量解离。为了计算动力学参数使用了 Langmuir 1:1 模型。

[0517] 表 9 :

[0518] 通过 SPR 测量的亲和力数据

[0519]

CSF-1R Mab	K_D (nM)	k_a (1/MS)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (min)
Mab 2F11	0.29	1.77E ⁺⁰⁵	5.18E ⁻⁰⁵	223
Mab 2E10	0.2	1.52E ⁺⁰⁵	2.97E ⁻⁰⁵	389
Mab 2H7	0.21	1.47E ⁺⁰⁵	3.12E ⁻⁰⁵	370
Mab 1G10	0.36	1.75E ⁺⁰⁵	6.28E ⁻⁰⁵	184

[0520] 在使用 CSF-1R ECD 的单独的 Biacore 结合测定中(数据未显示),显示了抗体 Mab 2F11 和 Mab 2E10 与抗体 Ab SC-2-4A5 的一些竞争。不过 Mab2F11/Mab 2E10 不结合人 CSF-1R 片段 de1D4,而 Ab SC-2-4A5 结合此 de1D4 片段(见实施例 4 和图 2a)。因此 Mab 2F11/Mab 2E10 的结合区显然不同于 AbSC-2-4A5 的结合区,但可能位于邻近的区域内。在此类竞争测定法中,抗体 Mab 2F11 和 Mab 2E10 二者均不与来自 R&D-Systems 的 Mab3291 竞争(数据未显示)。

[0521] 实施例 10

[0522] 抗 CSF-1R 抗体对人 CSF-1R 片段 D1-D3 的结合的测定

[0523] 仪器 :Biacore T100 (GE Healthcare)

[0524] 软件 :T100 控制,版本 1.1.11

[0525] B3000 评估,版本 4.01

[0526] Scrubber,版本 2.0a

[0527] 测定格式芯片 :CM5- 芯片

[0528] 通过胺偶联的捕捉分子捕捉针对 CSF-1R 的抗体。利用单循环动力学注射 5 个逐渐增加之浓度的人 CSF-1R 片段 D1-D3(SEQ ID NO:66)。将人 CSF-1R 片段 D1-D3 亚克隆入 pCMV-presS-HisAvitag 表达载体中。

[0529] 将抑制配体 - 受体相互作用的抗 CSF-1R SC 2-4A5(Santa Cruz Biotechnology, US ;Sherr,C. J. 等人,Blood 73 (1989) 1786-1793) 和 Mab 3291 (R&D-Systems) 用作参照对照。

[0530] 捕捉分子 :抗小鼠 Fc γ 抗体(来自山羊, Jackson Immuno Reasearch,JIR115-005-

071)针对依照本发明的抗体和R&D-Systems对照Mab 3291,而抗大鼠Fc γ 抗体(来自山羊, Jackson Immuno Reasearch JIR112-005-071)针对参照对照抗CSF-1R SC 2-4A5。

[0531] 捕捉分子的胺偶联

[0532] 依照制造商说明书进行标准胺偶联:运行缓冲液:HBS-N缓冲液,用EDC/NHS混合物活化,目标是2000RU的配体密度;将捕捉抗体稀释于偶联缓冲液NaAc pH 4.5中, $c=10\mu\text{g/mL}$;通过注射1M乙醇胺封闭最终残余的活化羧基。

[0533] 在37°C人CSF-1R片段D1-D3结合Mab<CSF-1R>的动力学表征

[0534] 运行缓冲液:PBS (Biacore BR-1006-72)

[0535] 在流动室2至4上捕捉Mab<CSF-1R>:流速 $20\mu\text{L/min}$,接触时间90秒, $c(\text{Ab}<\text{CSF-1R}>)=50\text{nM}$,用运行缓冲液+ 1mg/mL BSA稀释;

[0536] 分析物样品:

[0537] 以 $30\mu\text{L/min}$ 的流速通过5次连续注射浓度 $c=7.8, 31.25, 125, 500$ 和 2000nM 的分析物来测量单循环动力学,无再生。每次注射是30秒时长,随后是用于头四次注射的120秒解离期,及最终用于最高浓度(=最后一次注射)的1200秒解离期。

[0538] 在每一循环后用10mM甘氨酸pH 1.5 (Biacore BR-1003-54)进行最后的再生,接触时间60秒,流速 $30\mu\text{L/min}$ 。

[0539] 通过使用通常的双重参照(对照参照:分析物对捕捉分子的结合;流动室:亚域CSF-1R浓度“0”作为空白)及用模型“滴定动力学1:1结合负荷物(draft)”的计算来计算动力学参数。

[0540] 表10:

[0541] 通过SPR测量的关于人CSF-1R片段D1-D3结合的亲和力数据

[0542]

CSF-1R Mab	亚域	$K_D(\text{nM})$	$k_a(1/\text{Ms})$	$k_d(1/\text{s})$	$t_{1/2}(\text{min})$
Mab 2F11	D1-D3	无结合			
Mab 2E10	D1-D3	无结合			
Mab 2H7	D1-D3	未测定			
Mab 1G10	D1-D3	无结合			
SC-2-4A5	D1-D3	无结合			
R&D-Systems 3291	D1-D3	5.4	2.2E^{+5}	1.2E^{-3}	9.6

[0543] 抗体Mab 2F11、Mab 2E10和Mab 1G10显示出不结合人CSF-1R片段D1-D3。

[0544] 参照对照Ab SC-2-4A5也不结合人CSF-1R片段D1-D3。

[0545] 参照对照Mab R&D-Systems 3291显示出结合人CSF-1R片段D1-D3。

[0546] 实施例11

[0547] 猕猴中CSF-1R抑制期间CSF-1的水平升高

[0548] 血清 CSF-1 水平提供了抗人 CSF-1R 二聚化抑制物 hMab 2F11-e7 之 CSF-1R 中和活性的药效标志。对每一剂量组(1 和 10mg/kg)一只雄性和一只雌性猕猴静脉内施用抗 CSF1R 抗体 hMab 2F11-e7。在处理之前(用药前)、用药后 2、24、48、72、96、168 小时以及另外再两周的每周收集血液样品,供分析 CSF-1 水平。用商品化的 ELISA 试剂盒(Quantikine® 人 M-CSF)依照制造商的说明书(R&D Systems,UK)测定 CSF-1 水平。通过与试剂盒中所提供的 CSF-1 标准曲线样品进行比较来确定猴 CSF-1 水平。

[0549] 施用 hMab 2F11-e7 诱导 CSF-1 显著升高约 1000 倍,这取决于持续 48 小时(1mg/kg)或 15 天(10mg/kg)施用的剂量。因此,与配体置换性抗体相反,针对 CSF-1R 的二聚化抑制物提供的优势在于不直接与显著上调的配体竞争对受体的结合。

[0550] 实施例 12

[0551] 体内功效 - 在 SCID 米色小鼠中乳腺癌 BT20 异种移植物肿瘤细胞中抗 CSF-1R 抗体的肿瘤生长抑制作用

[0552] 人乳腺癌细胞系 BT-20 表达人 CSF-1R 但没有 CSF-1 表达(Sapi, E. 等人, Cancer Res 59 (1999) 5578-5585)。由于小鼠衍生 CSF-1 不能活化肿瘤细胞上的人 CSF-1R,经由渗透压微泵(ALZET, Cupertino, CA)以 2 μ g/天的速率提供连续的 CSF-1 输注补充重组人 CSF-1 (Biomol, Hamburg, Germany) (Martin, T. A., Carcinogenesis 24 (2003) 1317-1323)。

[0553] 为了将干扰 CSF-1R 二聚化之抗体的功效与配体置换性 CSF-1R 抗体进行直接比较,我们在 BT-20 异种移植物模型中测试了嵌合抗 CSF-1R Mab 2F11 (干扰 CSF-1R 二聚化的抗体)和 1.2.SM (W02009026303 中所述的配体置换性 CSF-1R 抗体)。

[0554] 给 SCID 米色小鼠(Charles River, Sulzfeld, Germany)皮下共注射 1×10^7 个细胞的 BT-20 细胞(ATCC HTB-19)和 100 μ l 的 Matrigel。在平均肿瘤体积 100mm³时随机化日开始动物的处理。用在 20mM 组氨酸、140mM NaCl pH6.0 缓冲液中的各抗体(见图 4)每周腹腔内(i.p.)处理小鼠一次。在分级日开始并且随后在整个处理期期间每周两次用测径器测量肿瘤尺寸。依照 NCI 方案计算肿瘤体积(肿瘤重量 = $1/2ab^2$,其中“a”和“b”分别是肿瘤的长和短直径)。

[0555] 肿瘤生长分析如图 4 中所示。嵌合抗 CSF-1R Mab 2F11 对肿瘤细胞上人 CSF-1R 的抑制作用就统计学而言在介导肿瘤生长抑制上比抗 CSF-1R 抗体 1.2.SM (W02009026303 中所述的 CSF-1R 抗体)更有效。

[0001]

序列表

<110> 霍夫曼-拉罗奇有限公司 (F. Hoffmann-La Roche AG)
 <120> 优先结合人 CSF1R 胞外域 4 的抗体及其用途
 <130> 26143 WO
 <150> EP09015310
 <151> 2009-12-10
 <150> EP10173407
 <151> 2010-08-19
 <160> 84
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <400> 1
 Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
 1 5
 <210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <400> 2
 Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met Ser
 1 5 10 15
 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <400> 3
 Thr Tyr Asp Ile Ser
 1 5
 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <400> 4
 Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
 1 5
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <400> 5
 Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5
 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <400> 6

[0002]

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

 <210> 7
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)

 <400> 7

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

 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
 20 25 30

 Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

 Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met
 50 55 60

 Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

 Lys Met Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val
 85 90 95

 Arg Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val
 100 105 110

 Thr Val Ser Ser
 115

 <210> 8
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)

 <400> 8

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

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

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

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

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

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

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

 <210> 9
 <211> 7

[0003]

<212> PRT
 <213> 小鼠(Mus musculus)
 <400> 9
 Asp Pro Arg Leu Tyr Phe Asp
 1 5

<210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 小鼠(Mus musculus)
 <400> 10
 Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Gly Phe Met Ser
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小鼠(Mus musculus)
 <400> 11
 Ser Phe Asp Ile Ser
 1 5

<210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 小鼠(Mus musculus)
 <400> 12
 Gly Gln Thr Phe Ser Tyr Pro Thr
 1 5

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小鼠(Mus musculus)
 <400> 13
 Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 小鼠(Mus musculus)
 <400> 14
 Lys Ala Ser Glu Asp Val Val Thr Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 15
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 小鼠(Mus musculus)
 <400> 15
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Leu Asp Ser Phe
 20 25 30

Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

[0004]

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

<210> 16
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 重链 CDR3, hMab 2F11-c11

<400> 17

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
 1 5

<210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 重链 CDR2, hMab 2F11-c11

[0005]

<400> 18

Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met Ser
1 5 10 15

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链 CDR1, hMab 2F11-c11

<400> 19

Thr Tyr Asp Ile Ser
1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链 CDR3, hMab 2F11-c11

<400> 20

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链 CDR2, hMab 2F11-c11

<400> 21

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链 CDR1, hMab 2F11-c11

<400> 22

Arg Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 23

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链可变区, hMab 2F11-c11

<400> 23

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

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

[0006]

Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met
 50 55 60

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

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

Arg Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 24
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 轻链可变区, hMab 2F11-c11

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 重链 CDR3, hMab 2F11-d8

<400> 25

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
 1 5

<210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工的

[0007]

<220>
 <223> 重链 CDR2, hMab 2F11-d8
 <400> 26
 Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 重链 CDR1, hMab 2F11-d8
 <400> 27
 Thr Tyr Asp Ile Ser
 1 5

<210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 轻链 CDR3, hMab 2F11-d8
 <400> 28
 Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
 1 5

<210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 轻链 CDR2, hMab 2F11-d8
 <400> 29
 Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 轻链 CDR1, hMab 2F11-d8
 <400> 30
 Lys Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 31
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 重链可变区, hMab 2F11-d8
 <400> 31
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

[0008]

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 50 55 60
 Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80
 Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 32
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 轻链可变区, hMab 2F11-d8
 <400> 32
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 33
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 重链 CDR3, hMab 2F11-e7
 <400> 33
 Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
 1 5

[0009]

<210> 34
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 重链 CDR2, hMab 2F11-e7

 <400> 34
 Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly
 1 5 10 15

 <210> 35
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 重链 CDR1, hMab 2F11-e7

 <400> 35
 Ser Tyr Asp Ile Ser
 1 5

 <210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 轻链 CDR3, hMab 2F11-e7

 <400> 36
 Gln Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
 1 5

 <210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 轻链 CDR2, hMab 2F11-e7

 <400> 37
 Ala Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

 <210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 轻链 CDR1, hMab 2F11-e7

 <400> 38
 Arg Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser
 1 5 10

 <210> 39
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 重链可变区, hMab 2F11-e7

 <400> 39

[0010]

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

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

Asp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
 50 55 60

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

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

Arg Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 40
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 轻链可变区, hMab 2F11-e7

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

<210> 41
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 重链 CDR3, hMab 2F11-f12

<400> 41

[0011]

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 42
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重链 CDR2, hMab 2F11-f12

<400> 42

Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met Ser
1 5 10 15

<210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重链 CDR1, hMab 2F11-f12

<400> 43

Thr Tyr Asp Ile Ser
1 5

<210> 44
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 轻链 CDR3, hMab 2F11-f12

<400> 44

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
1 5

<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 轻链 CDR2, hMab 2F11-f12

<400> 45

Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 轻链 CDR1, hMab 2F11-f12

<400> 46

Arg Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 47
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

[0012]

<223> 重链可变区, hMab 2F11-f12
 <400> 47
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Thr Lys Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80
 Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val
 85 90 95
 Arg Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 48
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 轻链可变区, hMab 2F11-f12
 <400> 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 49
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>

[0013]

<223> 重链 CDR3, hMab 2F11-g1
 <400> 49
 Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
 1 5

<210> 50
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 重链 CDR2, hMab 2F11-g1
 <400> 50
 Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 51
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 重链 CDR1, hMab 2F11-g1
 <400> 51
 Thr Tyr Asp Ile Ser
 1 5

<210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 轻链 CDR3, hMab 2F11-g1
 <400> 52
 Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
 1 5

<210> 53
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 轻链 CDR2, hMab 2F11-g1
 <400> 53
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 轻链 CDR1, hMab 2F11-g1
 <400> 54
 Arg Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 55
 <211> 116

[0014]

<212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 重链可变区, hMab 2F11-g1

 <400> 55

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

 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
 20 25 30

 Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Leu Lys
 50 55 60

 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

 Arg Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

 Thr Val Ser Ser
 115

 <210> 56
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 轻链可变区, hMab 2F11-g1

 <400> 56

 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

[0015]

```

<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 57
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1          5          10          15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20          25          30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35          40          45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50          55          60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65          70          75          80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85          90          95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100         105

<210> 58
<211> 330
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 58
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1          5          10          15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20          25          30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35          40          45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50          55          60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65          70          75          80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85          90          95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100         105         110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115         120         125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130         135         140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145         150         155         160

```

[0016]

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 59
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 自 IgG1 衍生的人重链恒定区, 在 L234A 和 L235A 上突变 (human heavy chain constant region derived from IgG1 mutated on L234A and L235A)
 <400> 59
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

[0017]

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 60
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)
 <400> 60
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

[0018]

<400> 61
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

[0020]

305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 62
<211> 972
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 62

Met Gly Pro Gly Val Leu Leu Leu Leu Val Ala Thr Ala Trp His
1 5 10 15

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

Lys Pro Gly Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val
35 40 45

Glu Trp Asp Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly
50 55 60

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

Thr Tyr Arg Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala
85 90 95

Ile His Leu Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala
100 105 110

Gln Glu Val Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu
115 120 125

Leu Thr Asp Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg
130 135 140

Gly Arg Pro Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His
145 150 155 160

Gly Phe Thr Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln
165 170 175

Cys Ser Ala Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg
180 185 190

Leu Lys Val Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val
195 200 205

Pro Ala Glu Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys
210 215 220

Ser Ala Ser Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn
225 230 235 240

Asn Thr Lys Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg
245 250 255

Tyr Gln Lys Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His
260 265 270

[0021]

Ala Gly Asn Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser
275 280 285

Thr Ser Met Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser
290 295 300

Ser Glu Gln Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn
305 310 315 320

Leu Lys Val Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp
325 330 335

Thr Tyr Leu Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala
340 345 350

Asn Ala Thr Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu
355 360 365

Pro Arg Leu Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg
370 375 380

Asn Pro Gly Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr
385 390 395 400

Pro Pro Glu Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr
405 410 415

Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu
420 425 430

Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln
435 440 445

Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His
450 455 460

Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn
465 470 475 480

Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp
485 490 495

Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu
500 505 510

Phe Leu Phe Thr Pro Val Val Val Ala Cys Met Ser Ile Met Ala Leu
515 520 525

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Tyr Lys Gln Lys Pro
530 535 540

Lys Tyr Gln Val Arg Trp Lys Ile Ile Glu Ser Tyr Glu Gly Asn Ser
545 550 555 560

Tyr Thr Phe Ile Asp Pro Thr Gln Leu Pro Tyr Asn Glu Lys Trp Glu
565 570 575

Phe Pro Arg Asn Asn Leu Gln Phe Gly Lys Thr Leu Gly Ala Gly Ala
580 585 590

[0022]

Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala Phe Gly Leu Gly Lys Glu Asp
 595 600 605
 Ala Val Leu Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ser Thr Ala His Ala
 610 615 620
 Asp Glu Lys Glu Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Ser His Leu
 625 630 635 640
 Gly Gln His Glu Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr His Gly
 645 650 655
 Gly Pro Val Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu
 660 665 670
 Asn Phe Leu Arg Arg Lys Ala Glu Ala Met Leu Gly Pro Ser Leu Ser
 675 680 685
 Pro Gly Gln Asp Pro Glu Gly Gly Val Asp Tyr Lys Asn Ile His Leu
 690 695 700
 Glu Lys Lys Tyr Val Arg Arg Asp Ser Gly Phe Ser Ser Gln Gly Val
 705 710 715 720
 Asp Thr Tyr Val Glu Met Arg Pro Val Ser Thr Ser Ser Asn Asp Ser
 725 730 735
 Phe Ser Glu Gln Asp Leu Asp Lys Glu Asp Gly Arg Pro Leu Glu Leu
 740 745 750
 Arg Asp Leu Leu His Phe Ser Ser Gln Val Ala Gln Gly Met Ala Phe
 755 760 765
 Leu Ala Ser Lys Asn Cys Ile His Arg Asp Val Ala Ala Arg Asn Val
 770 775 780
 Leu Leu Thr Asn Gly His Val Ala Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala
 785 790 795 800
 Arg Asp Ile Met Asn Asp Ser Asn Tyr Ile Val Lys Gly Asn Ala Arg
 805 810 815
 Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asp Cys Val Tyr
 820 825 830
 Thr Val Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile
 835 840 845
 Phe Ser Leu Gly Leu Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Leu Val Asn Ser Lys
 850 855 860
 Phe Tyr Lys Leu Val Lys Asp Gly Tyr Gln Met Ala Gln Pro Ala Phe
 865 870 875 880
 Ala Pro Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Met Gln Ala Cys Trp Ala Leu Glu
 885 890 895
 Pro Thr His Arg Pro Thr Phe Gln Gln Ile Cys Ser Phe Leu Gln Glu
 900 905 910

[0023]

Gln Ala Gln Glu Asp Arg Arg Glu Arg Asp Tyr Thr Asn Leu Pro Ser
 915 920 925

Ser Ser Arg Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Glu Leu Glu Glu
 930 935 940

Glu Ser Ser Ser Glu His Leu Thr Cys Cys Glu Gln Gly Asp Ile Ala
 945 950 955 960 965

Gln Pro Leu Leu Gln Pro Asn Asn Tyr Gln Phe Cys
 965 970

<210> 63
 <211> 972
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 突变体 CSF-1R L301S Y969F

<400> 63

Met Gly Pro Gly Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Ala Thr Ala Trp His
 1 5 10 15

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

Lys Pro Gly Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val
 35 40 45

Glu Trp Asp Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly
 50 55 60

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

Thr Tyr Arg Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala
 85 90 95

Ile His Leu Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala
 100 105 110

Gln Glu Val Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu
 115 120 125

Leu Thr Asp Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg
 130 135 140

Gly Arg Pro Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His
 145 150 155 160

Gly Phe Thr Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln
 165 170 175

Cys Ser Ala Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg
 180 185 190

Leu Lys Val Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val
 195 200 205

[0024]

Pro Ala Glu Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys
 210 215 220
 Ser Ala Ser Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn
 225 230 235 240
 Asn Thr Lys Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg
 245 250 255
 Tyr Gln Lys Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His
 260 265 270
 Ala Gly Asn Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser
 275 280 285
 Thr Ser Met Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Ser Asn Leu Ser
 290 295 300
 Ser Glu Gln Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn
 305 310 315 320
 Leu Lys Val Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp
 325 330 335
 Thr Tyr Leu Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala
 340 345 350
 Asn Ala Thr Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu
 355 360 365
 Pro Arg Leu Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg
 370 375 380
 Asn Pro Gly Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr
 385 390 395 400
 Pro Pro Glu Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr
 405 410 415
 Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu
 420 425 430
 Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln
 435 440 445
 Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His
 450 455 460
 Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn
 465 470 475 480
 Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp
 485 490 495
 Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu
 500 505 510
 Phe Leu Phe Thr Pro Val Val Val Ala Cys Met Ser Ile Met Ala Leu
 515 520 525

[0025]

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Tyr Lys Gln Lys Pro
 530 535 540
 Lys Tyr Gln Val Arg Trp Lys Ile Ile Glu Ser Tyr Glu Gly Asn Ser
 545 550 555 560
 Tyr Thr Phe Ile Asp Pro Thr Gln Leu Pro Tyr Asn Glu Lys Trp Glu
 565 570 575
 Phe Pro Arg Asn Asn Leu Gln Phe Gly Lys Thr Leu Gly Ala Gly Ala
 580 585 590
 Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala Phe Gly Leu Gly Lys Glu Asp
 595 600 605
 Ala Val Leu Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ser Thr Ala His Ala
 610 615 620
 Asp Glu Lys Glu Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Ser His Leu
 625 630 635 640
 Gly Gln His Glu Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr His Gly
 645 650 655
 Gly Pro Val Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu
 660 665 670
 Asn Phe Leu Arg Arg Lys Ala Glu Ala Met Leu Gly Pro Ser Leu Ser
 675 680 685
 Pro Gly Gln Asp Pro Glu Gly Gly Val Asp Tyr Lys Asn Ile His Leu
 690 695 700
 Glu Lys Lys Tyr Val Arg Arg Asp Ser Gly Phe Ser Ser Gln Gly Val
 705 710 715 720
 Asp Thr Tyr Val Glu Met Arg Pro Val Ser Thr Ser Ser Asn Asp Ser
 725 730 735
 Phe Ser Glu Gln Asp Leu Asp Lys Glu Asp Gly Arg Pro Leu Glu Leu
 740 745 750
 Arg Asp Leu Leu His Phe Ser Ser Gln Val Ala Gln Gly Met Ala Phe
 755 760 765
 Leu Ala Ser Lys Asn Cys Ile His Arg Asp Val Ala Ala Arg Asn Val
 770 775 780
 Leu Leu Thr Asn Gly His Val Ala Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala
 785 790 795 800
 Arg Asp Ile Met Asn Asp Ser Asn Tyr Ile Val Lys Gly Asn Ala Arg
 805 810 815
 Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asp Cys Val Tyr
 820 825 830
 Thr Val Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile
 835 840 845

[0026]

Phe Ser Leu Gly Leu Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Leu Val Asn Ser Lys
 850 855 860
 Phe Tyr Lys Leu Val Lys Asp Gly Tyr Gln Met Ala Gln Pro Ala Phe
 865 870 875 880
 Ala Pro Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Met Gln Ala Cys Trp Ala Leu Glu
 885 890 895
 Pro Thr His Arg Pro Thr Phe Gln Gln Ile Cys Ser Phe Leu Gln Glu
 900 905
 Gln Ala Gln Glu Asp Arg Arg Glu Arg Asp Tyr Thr Asn Leu Pro Ser
 915 920 925
 Ser Ser Arg Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Glu Leu Glu Glu
 930 935 940
 Glu Ser Ser Ser Glu His Leu Thr Cys Cys Glu Gln Gly Asp Ile Ala
 945 950 955 960
 Gln Pro Leu Leu Gln Pro Asn Asn Phe Gln Phe Cys
 965 970
 <210> 64
 <211> 493
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 人 CSP-1R 胞外域(human CSP-1R Extracellular Domain)
 <400> 64
 Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val Lys Pro Gly
 5 10 15
 Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val Glu Trp Asp
 20 25 30
 Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Ser
 35 40 45
 Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly Thr Tyr Arg
 50 55 60
 Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ile His Leu
 65 70 75 80
 Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala Gln Glu Val
 85 90 95
 Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp
 100 105 110
 Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro
 115 120 125
 Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr
 130 135 140
 Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala
 145 150 155 160

[0027]

Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val
 165 170 175

Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu
 180 185 190

Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser
 195 200 205

Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys
 210 215 220

Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys
 225 230 235 240

Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn
 245 250 255

Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met
 260 265 270

Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Glu Gln
 275 280 285

Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn Leu Lys Val
 290 295 300

Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp Thr Tyr Leu
 305 310 315 320

Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala Asn Ala Thr
 325 330 335

Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu Pro Arg Leu
 340 345 350

Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg Asn Pro Gly
 355 360 365

Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr Pro Pro Glu
 370 375 380

Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr Leu Leu Cys
 385 390 395 400

Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu Gln Cys Ser
 405 410 415

Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln Val Trp Asp
 420 425 430

Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His Lys Val Thr
 435 440 445

Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn Gln Thr Tyr
 450 455 460

Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp Ala Phe Ile
 465 470 475 480

[0028]

Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu
 485 490

<210> 65
 <211> 388
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人 CSF-1R 片段 de1D4

<400> 65

Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15

Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val Glu Trp Asp
 20 25 30

Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Ser
 35 40 45

Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly Thr Tyr Arg
 50 55 60

Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ile His Leu
 65 70 75 80

Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala Gln Glu Val
 85 90 95

Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp
 100 105 110

Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro
 115 120 125

Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr
 130 135 140

Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala
 145 150 155 160

Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val
 165 170 175

Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu
 180 185 190

Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser
 195 200 205

Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys
 210 215 220

Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys
 225 230 235 240

Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn
 245 250 255

[0029]

Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met
 260 265 270
 Phe Phe Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn
 275 280 285
 Gly Ser Gly Thr Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn
 290 295 300
 Val Thr Trp Leu Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala
 305 310 315 320
 Gln Val Leu Gln Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln
 325 330 335
 Glu Pro Phe His Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr
 340 345 350
 Leu Glu His Asn Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly
 355 360 365
 Ser Gly Ser Trp Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His
 370 375 380
 Pro Pro Asp Glu
 385
 <210> 66
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 人 CSF-1R 片段 D1-D3
 <400> 66
 Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val Glu Trp Asp
 20 25 30
 Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Ser
 35 40 45
 Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly Thr Tyr Arg
 50 55 60
 Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ile His Leu
 65 70 75 80
 Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala Gln Glu Val
 85 90 95
 Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp
 100 105 110
 Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro
 115 120 125
 Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr
 130 135 140

[0030]

Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala
 145 150 155 160

Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val
 165 170 175

Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu
 180 185 190

Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser
 195 200 205

Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys
 210 215 220

Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys
 225 230 235 240

Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn
 245 250 255

Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met
 260 265 270

Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Glu Gln
 275 280 285

Asn Leu Ile Gln
 290

<210> 67
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 信号肽

<400> 67

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

Trp His Gly Gln Gly
 20

<210> 68
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 引物

<400> 68
 caccctccatg ttcttccggf accccccaga ggtaag 36

<210> 69
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 69
 Asp Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Val

[0031]

1 5

<210> 70
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 70

Val Ile Trp Ser Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met Ser
 1 5 10 15

<210> 71
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 71

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Asp Ile Ser
 1 5 10

<210> 72
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 72

Gly Gln Ser Phe Thr Tyr Pro Thr
 1 5

<210> 73
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 73

Gly Ser Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 74
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 74

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

<210> 75
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 75

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met
 50 55 60

[0032]

Ser Arg Leu Arg Ile Ser Lys Asp Asp Ser Arg Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Val Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val
85 90 95

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 76
<211> 106
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 76

Lys Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 77
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 77

Asp Pro Arg Leu Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 78
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 78

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

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 79

[0033]

Gly Ser Ser Leu Asp Ser Phe Asp Ile Ser
1 5 10

<210> 80
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)
<400> 80

Gly Gln Thr Phe Ser Tyr Pro Thr
1 5

<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)
<400> 81

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 82
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)
<400> 82

Lys Ala Ser Glu Asp Val Val Thr Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 83
<211> 116
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)
<400> 83

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Leu Asp Ser Phe
20 25 30

Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Gly Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Arg Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Ser Ser Leu Gln Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val
85 90 95

Arg Asp Pro Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 84
<211> 106
<212> PRT

[0034]

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 84

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

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

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

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

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

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

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

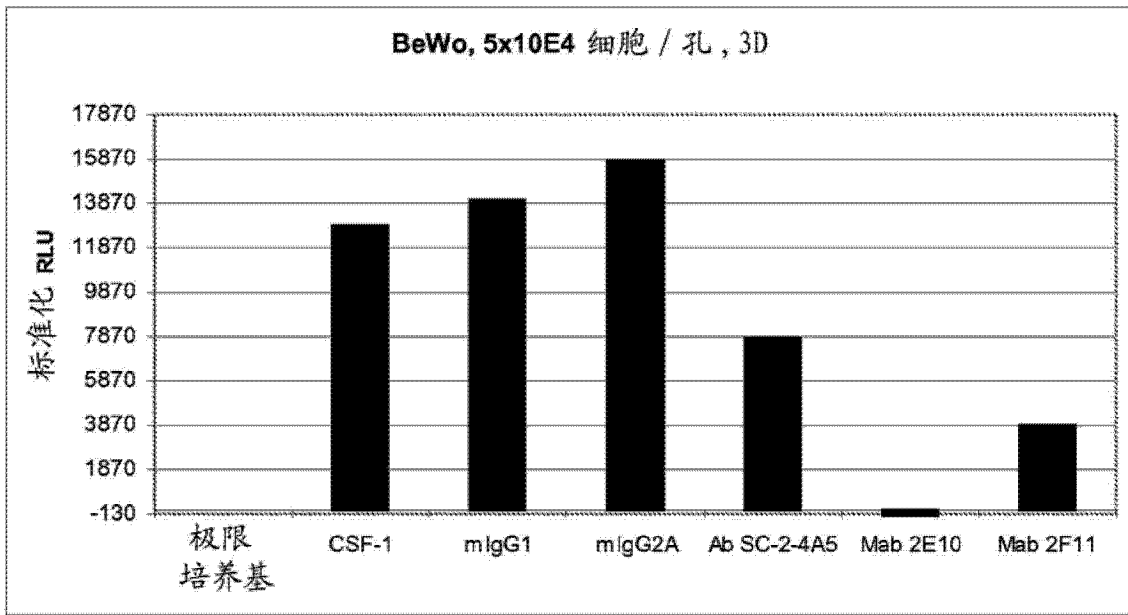


图 1a

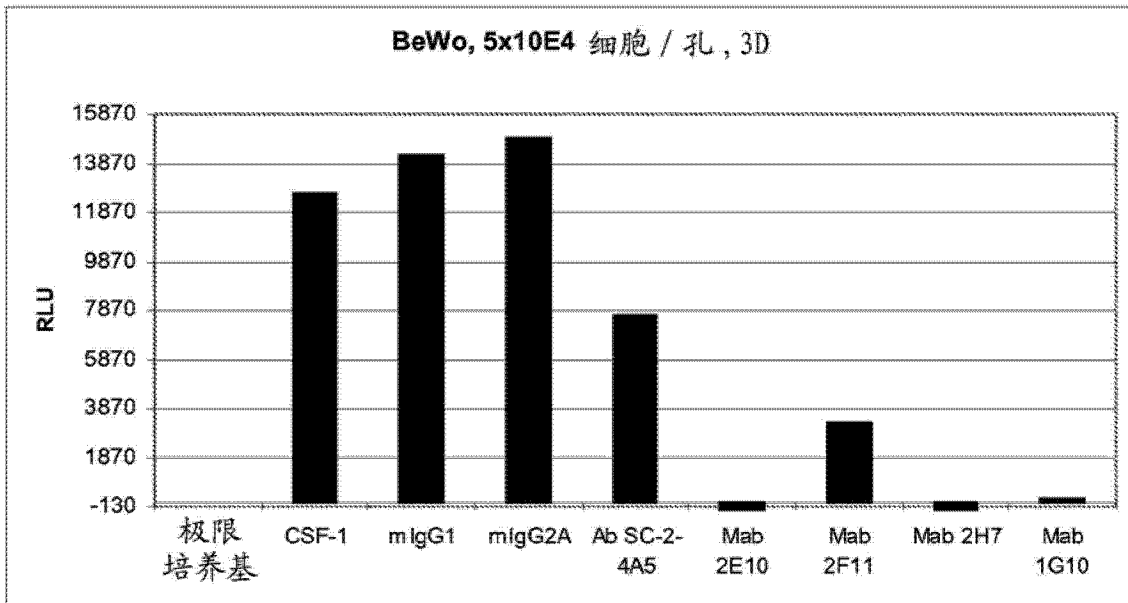


图 1b

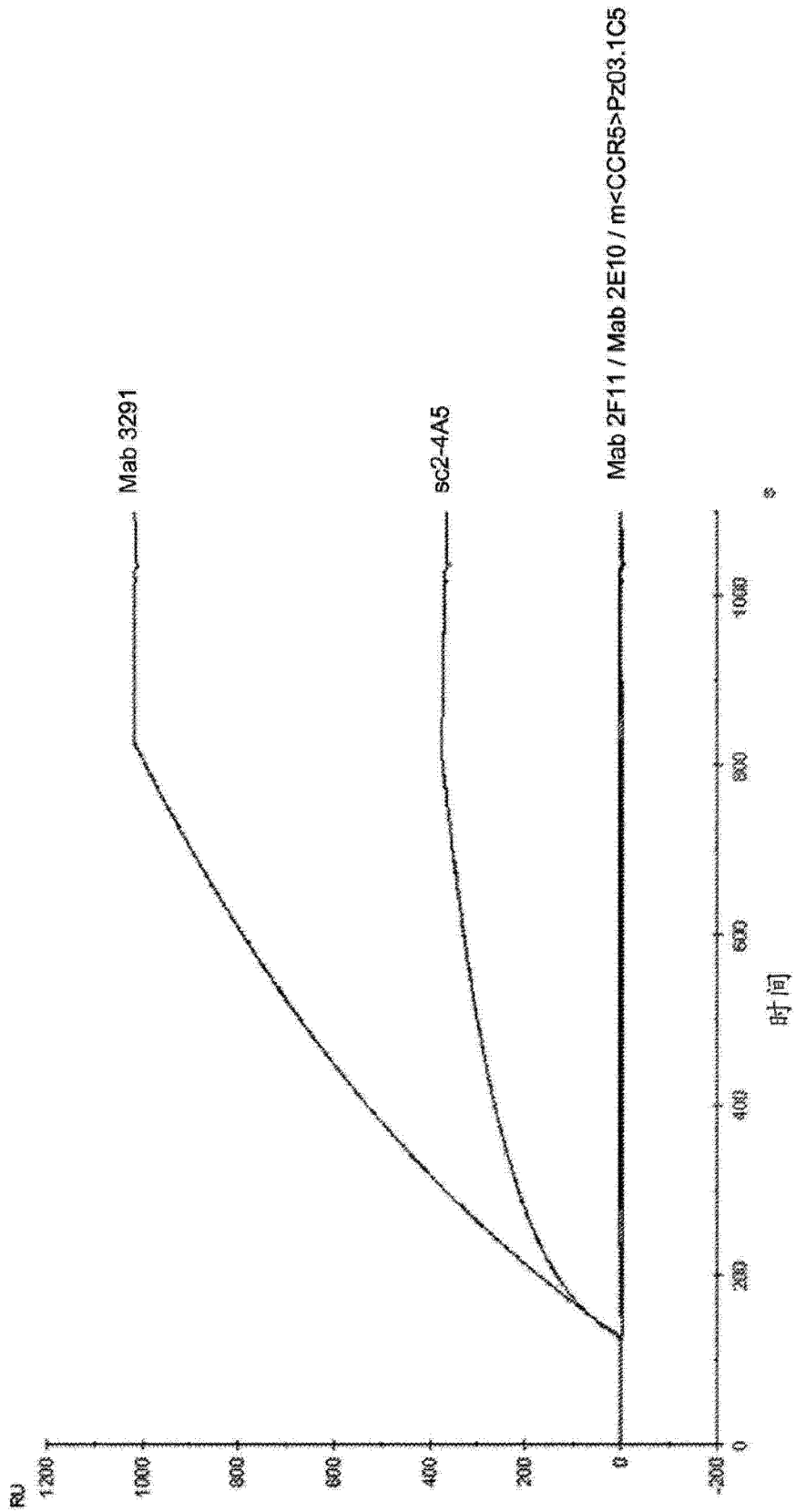


图 2a

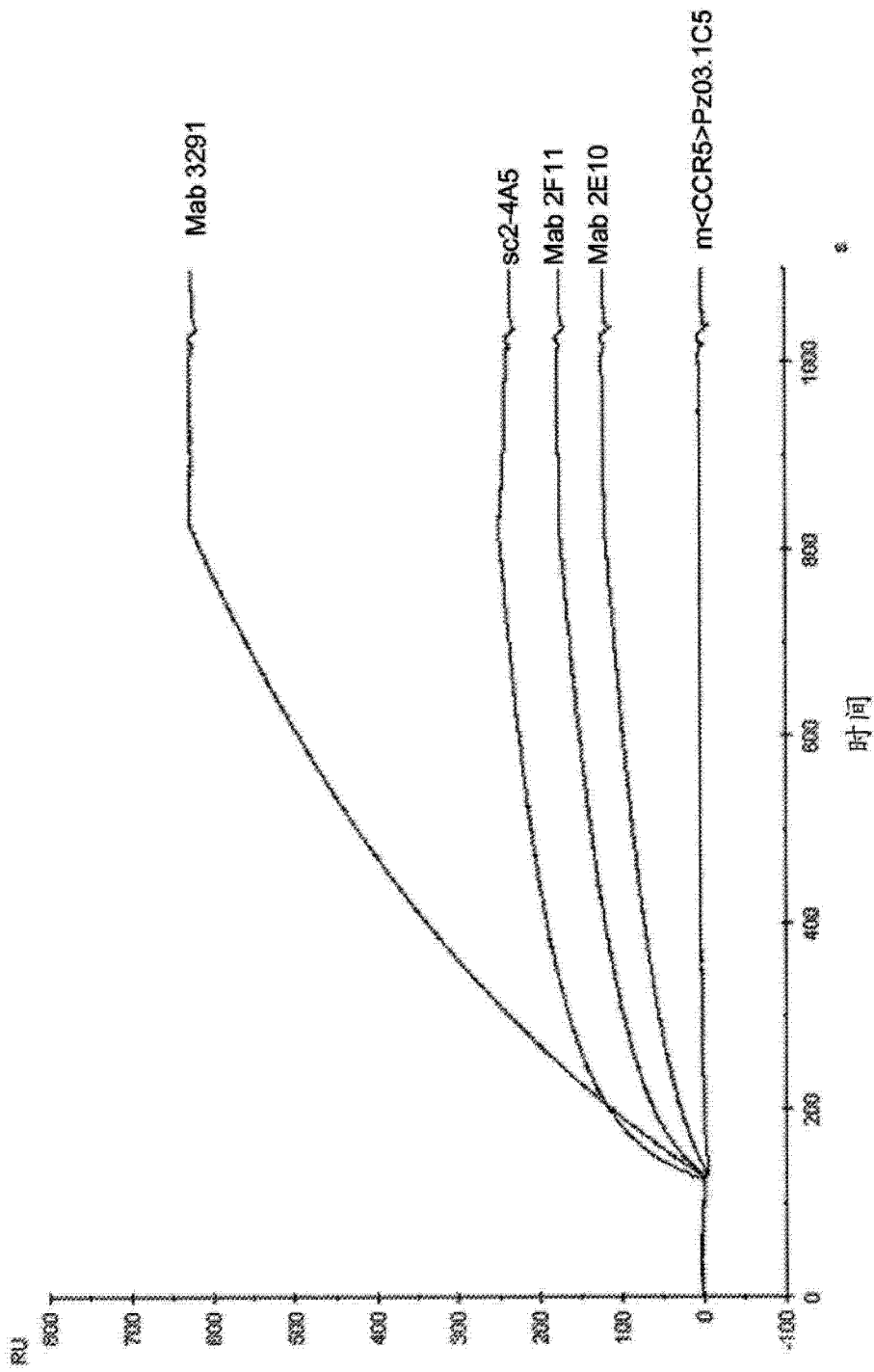


图 2b

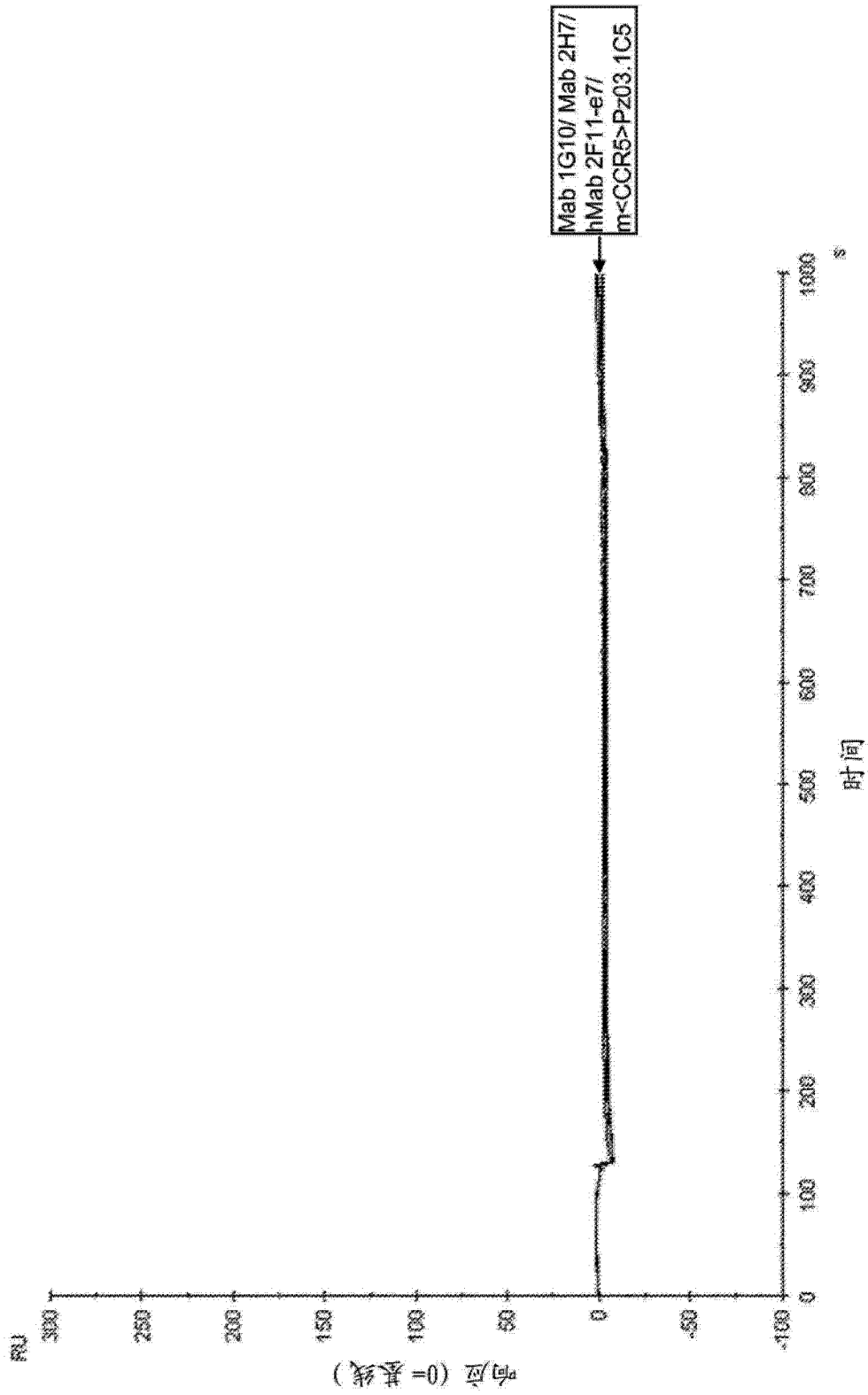


图 2c

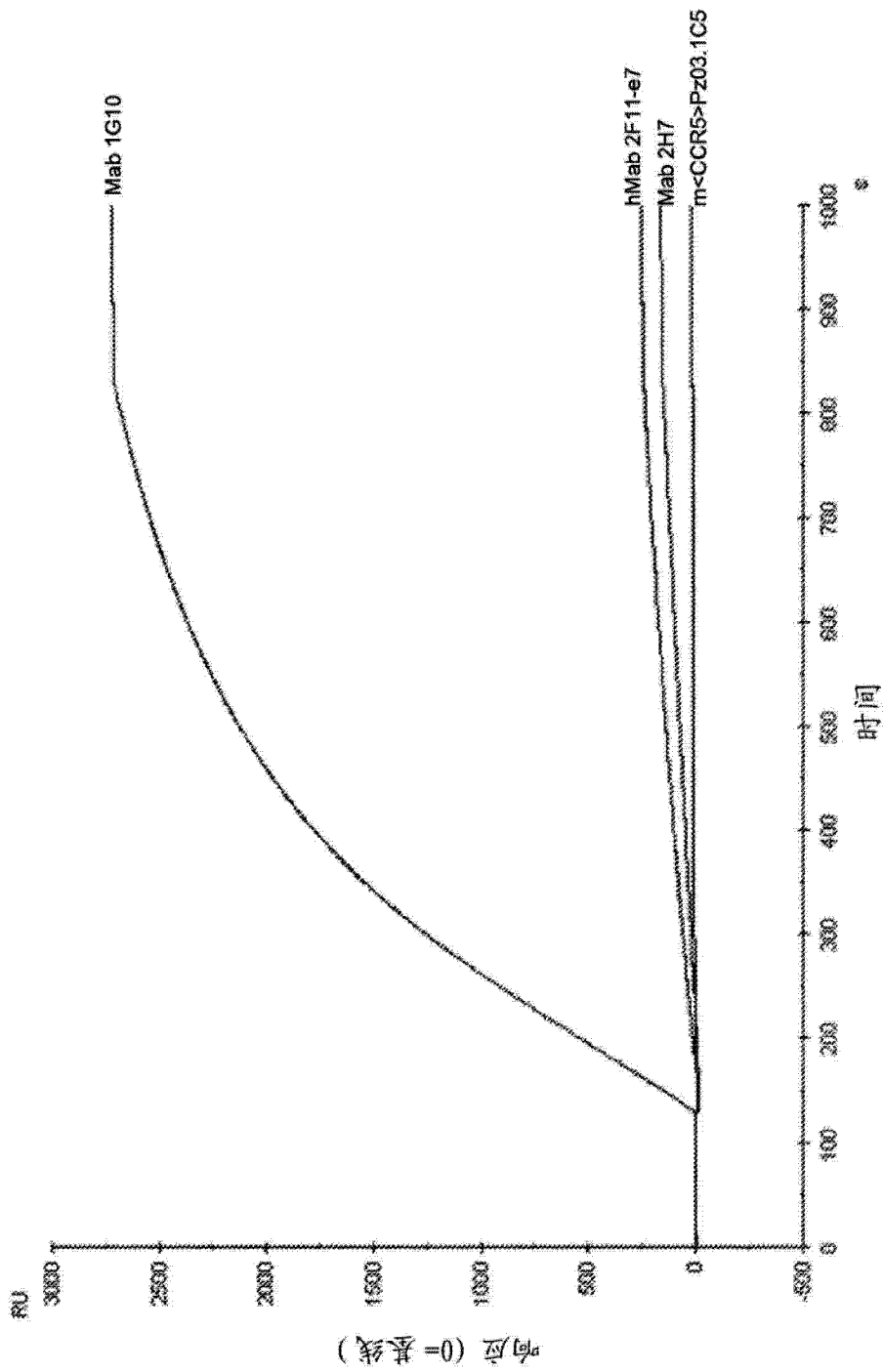


图 2d

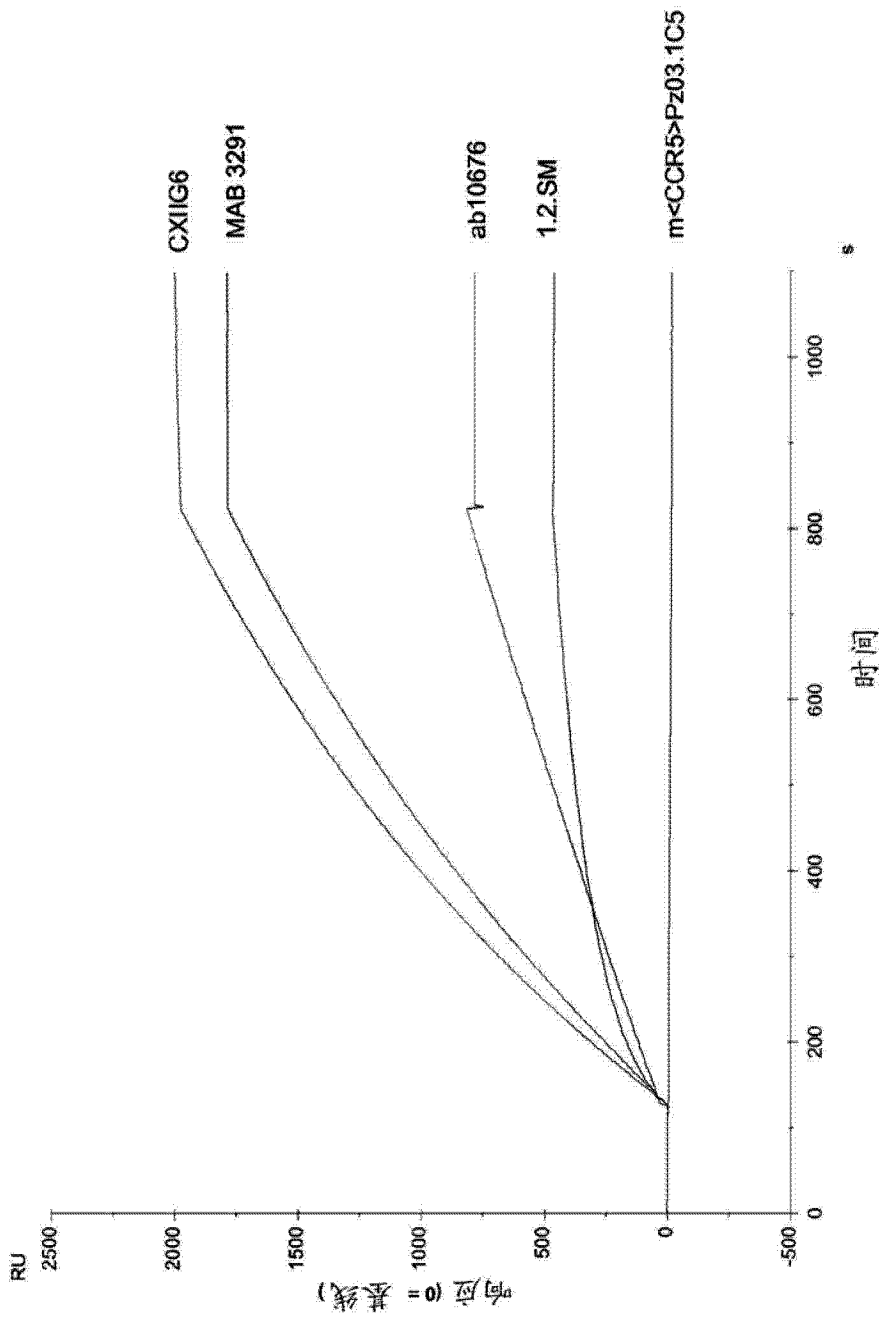


图 2e

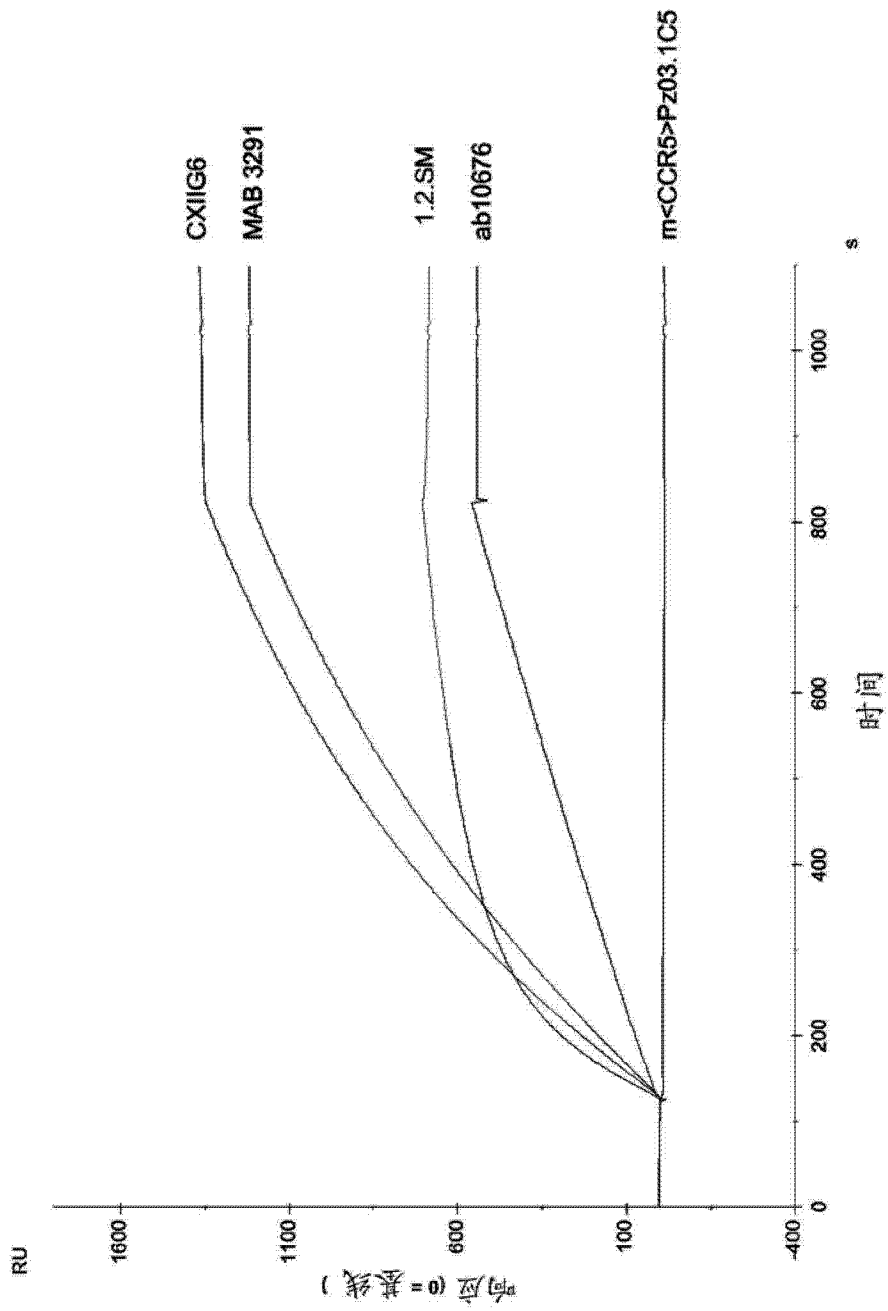


图 2f

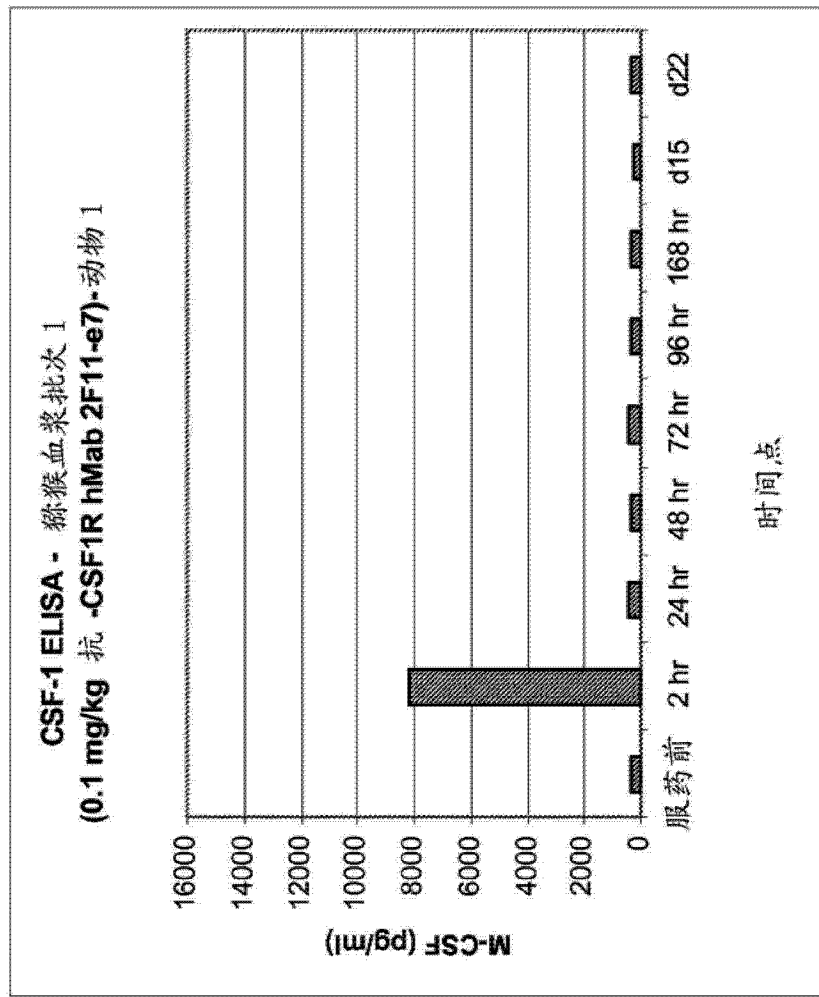


图 3a

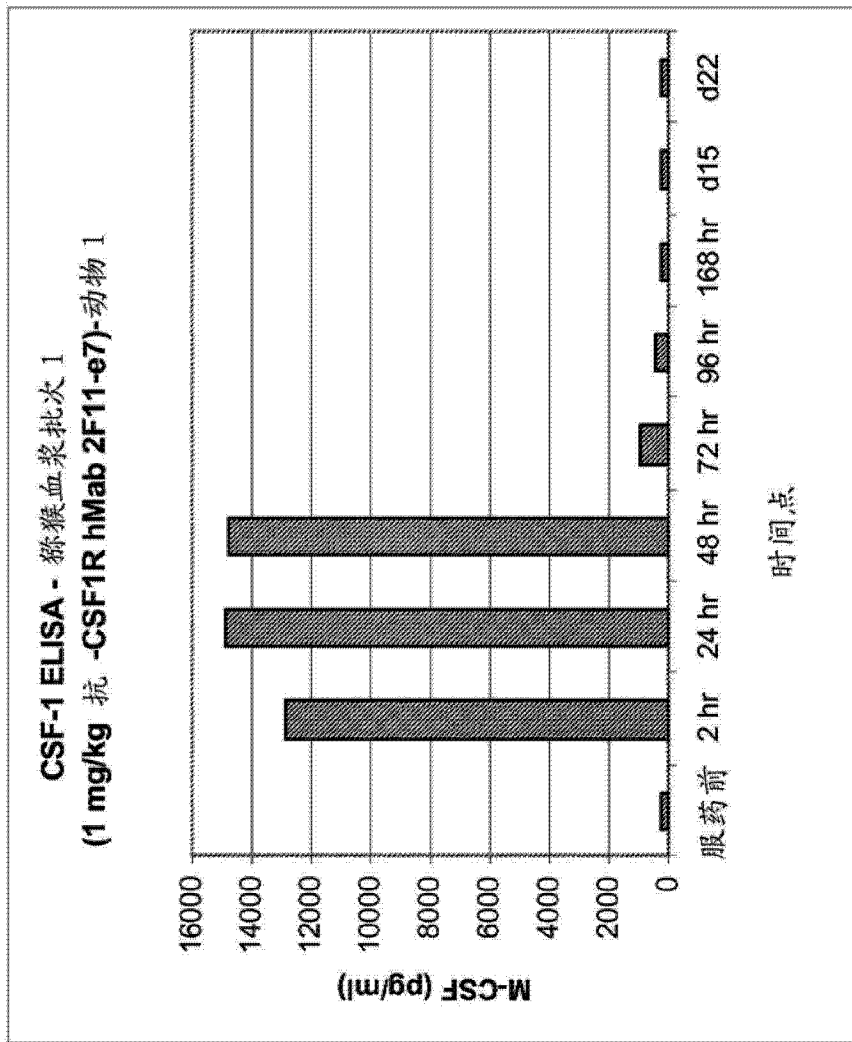


图 3b

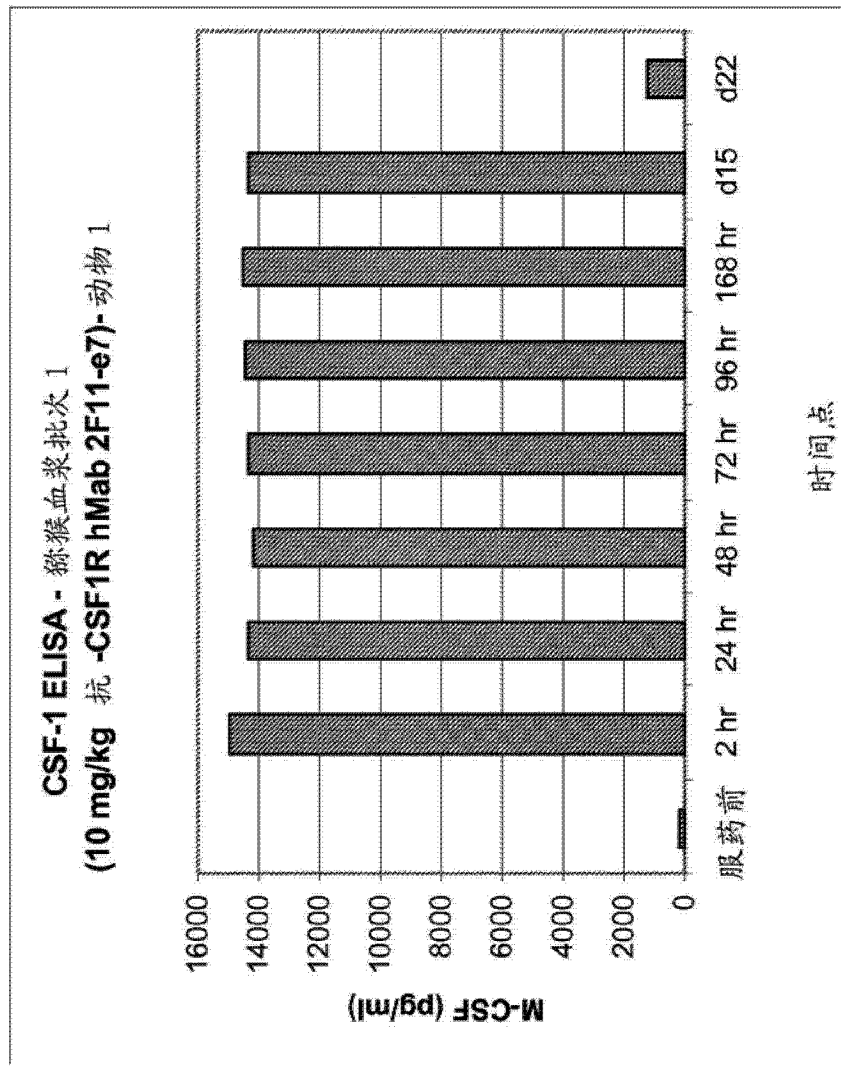


图 3c

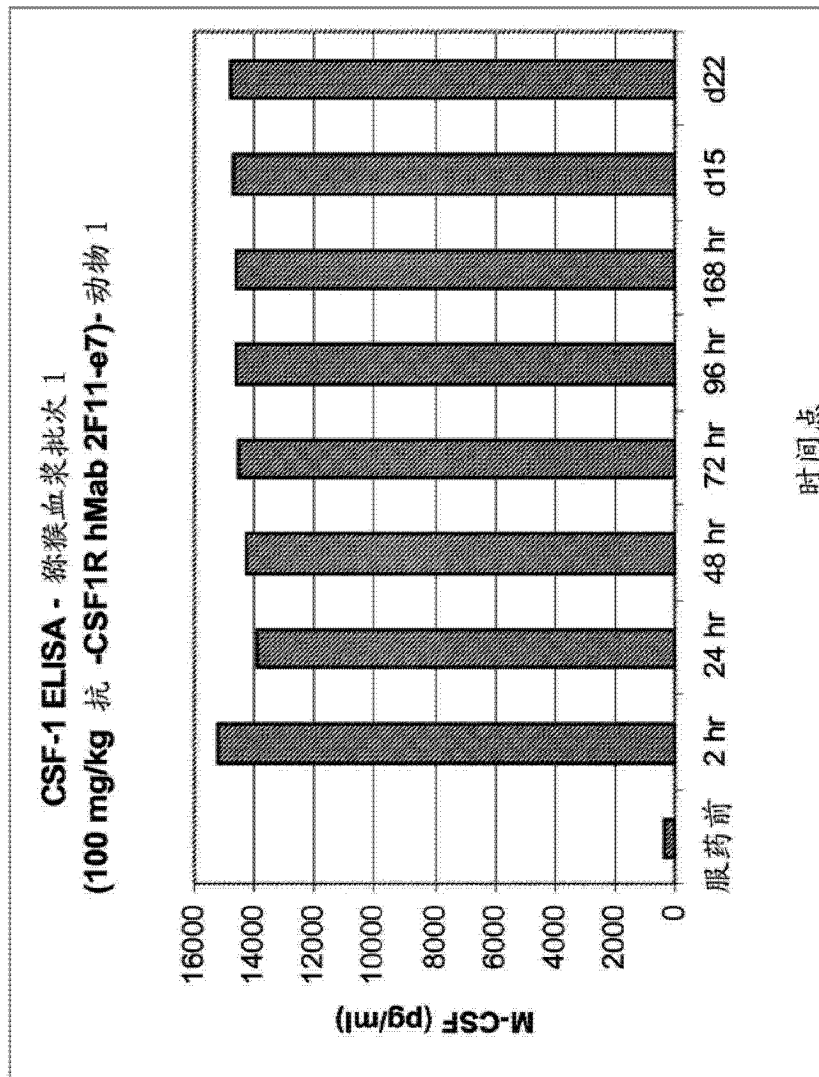


图 3d

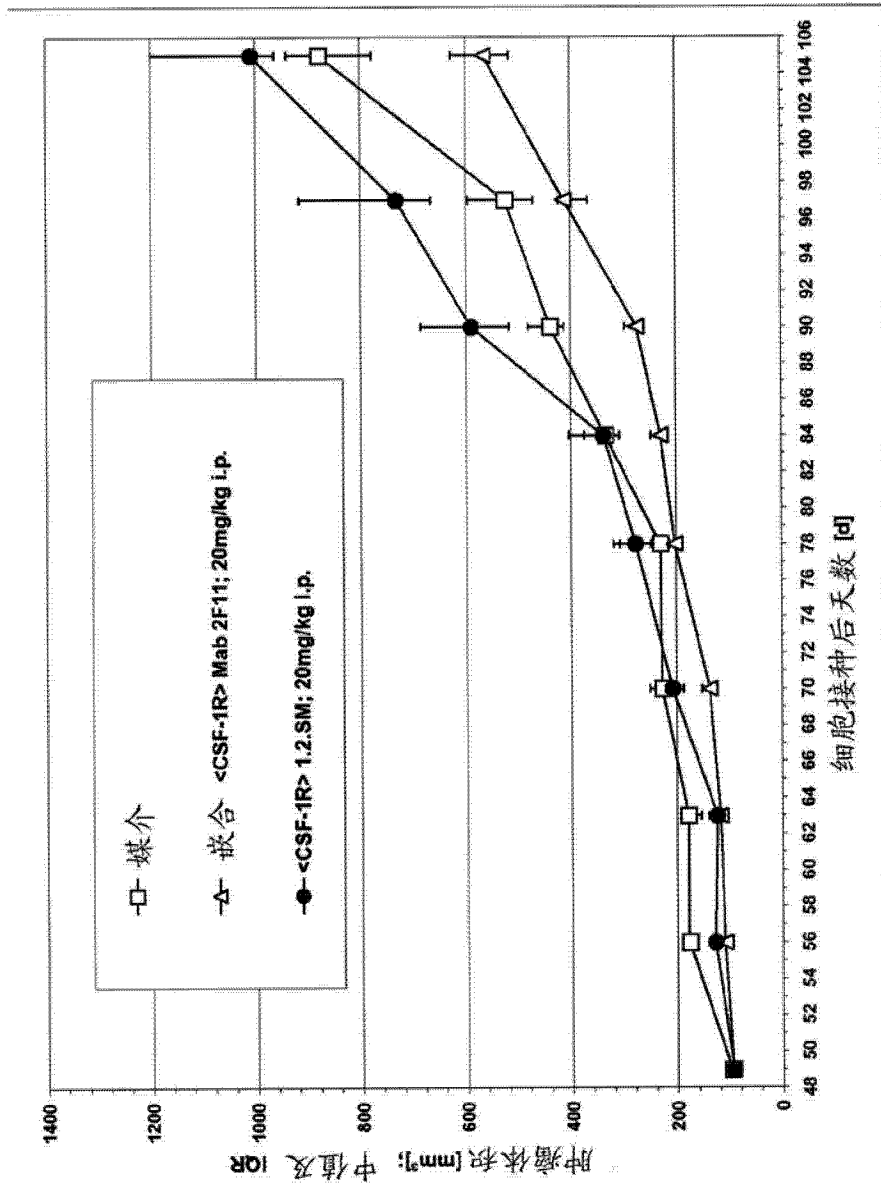


图 4