



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104271603 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 07

(21) 申请号 201380024055. X

C12N 15/13(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 04. 26

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

10-2012-0048805 2012. 05. 08 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 11. 07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2013/003635 2013. 04. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/168918 EN 2013. 11. 14

(71) 申请人 株式会社钟根堂

地址 韩国首尔

(72) 发明人 文昇基 朴昭罗 安基荣

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C07K 16/30(2006. 01)

权利要求书3页 说明书19页

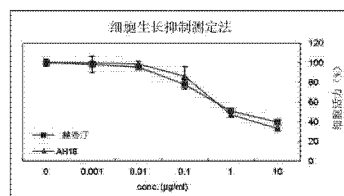
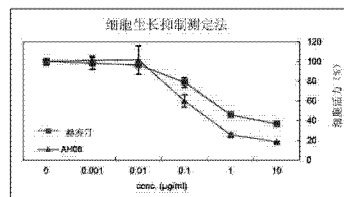
序列表6页 附图6页

(54) 发明名称

抗-ErbB2 抗体变异体

(57) 摘要

本发明涉及抗-ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段、对这些进行编码的核酸分子及它们的用途。本发明的抗体变异体能够以高的亲和力与ErbB2 相结合。因此,上述抗体变异体即使使用少量也能有效地预防或治疗癌。



1. 一种抗 -ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段,其特征在于,包含:

(a) 轻链可变域,以及

(b) 重链可变域,具有选自主要由以下氨基酸取代组成的组中的 2 种以上的氨基酸取代:

在 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列中,基于卡巴特编号系统的

位置 41 的 Pro 被 Arg 取代,

位置 96 的 Gly 被 Asn 取代,

位置 97 的 Gly 被 Ala 取代,

位置 98 的 Asp 被 Trp 取代,

位置 98 的 Asp 被 Lys 取代,

位置 100b 的 Ala 被 Ser 取代,

位置 100c 的 Met 被 Phe 取代,

位置 101 的 Asp 被 Ala 取代,

位置 101 的 Asp 被 Val 取代,

位置 102 的 Tyr 被 His 取代,及

位置 102 的 Tyr 被 Leu 取代。

2. 根据权利要求 1 所述的抗 -ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段,其特征在于,上述重链可变域包含在 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列中,基于卡巴特编号系统的

位置 98 的 Asp 被 Trp 取代,

位置 100c 的 Met 被 Phe 取代,

位置 101 的 Asp 被 Ala 取代,及

位置 102 的 Tyr 被 Leu 取代。

3. 根据权利要求 1 所述的抗 -ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段,其特征在于,上述重链可变域包含在 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列中,基于卡巴特编号系统的

位置 96 的 Gly 被 Asn 取代,

位置 97 的 Gly 被 Ala 取代,

位置 98 的 Asp 被 Lys 取代,

位置 100b 的 Ala 被 Ser 取代,

位置 100c 的 Met 被 Phe 取代,

位置 101 的 Asp 被 Val 取代,及

位置 102 的 Tyr 被 His 取代。

4. 根据权利要求 1 所述的抗 -ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段,其特征在于,上述重链可变域包含在 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列中,基于卡巴特编号系统的

位置 41 的 Pro 被 Arg 取代,

位置 98 的 Asp 被 Trp 取代,

位置 100c 的 Met 被 Phe 取代,

位置 101 的 Asp 被 Ala 取代,及

位置 102 的 Tyr 被 Leu 取代。

5. 根据权利要求 1 所述的抗 -ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段,其特征在于,上述轻链可变域具有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列或选自主要由以下氨基酸取代组成的组中的 2 种以上的氨基酸取代:

在 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列中,基于卡巴特编号系统的

位置 50 的 Ser 被 Thr 取代,
位置 51 的 Ala 被 Thr 取代,
位置 52 的 Ser 被 Thr 取代,
位置 53 的 Phe 被 Trp 取代,
位置 54 的 Leu 被 Pro 取代,
位置 72 的 Thr 被 Ser 取代,
位置 91 的 His 被 Tyr 取代,
位置 93 的 Thr 被 Gln 取代,
位置 93 的 Thr 被 Asn 取代,
位置 96 的 Pro 被 Ala 取代,
位置 96 的 Pro 被 Val 取代,及
位置 97 的 Thr 被 Ser 取代。

6. 根据权利要求 5 所述的抗 -ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段,其特征在于,上述轻链可变域包含在 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列中,基于卡巴特编号系统的

位置 93 的 Thr 被 Gln 取代,
位置 96 的 Pro 被 Ala 取代,及
位置 97 的 Thr 被 Ser 取代。

7. 根据权利要求 5 所述的抗 -ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段,其特征在于,上述轻链可变域包含在 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列中,基于卡巴特编号系统的

位置 50 的 Ser 被 Thr 取代,
位置 51 的 Ala 被 Thr 取代,
位置 52 的 Ser 被 Thr 取代,
位置 53 的 Phe 被 Trp 取代,
位置 54 的 Leu 被 Pro 取代,
位置 72 的 Thr 被 Ser 取代,
位置 91 的 His 被 Tyr 取代,
位置 93 的 Thr 被 Asn 取代,及
位置 96 的 Pro 被 Val 取代。

8. 根据权利要求 1 所述的抗 -ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段,其特征在于,包含以下轻链可变域及重链可变域:

(i) 由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的轻链可变域及由 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列组成的重链可变域;

(ii) 由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的轻链可变域及 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列组成的重链可变域;

(iii) 由 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列组成的轻链可变域及由 SEQ ID NO :3 的氨基酸序

列组成的重链可变域；以及

(iv) 由 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列组成的轻链可变域及由 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列组成的重链可变域。

9. 根据权利要求 1 所述的抗 -ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段,其特征在于,上述抗体为人源化抗体。

10. 一种核酸分子,其特征在于,对权利要求 1 至 9 中任一项所述的抗 -ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段的重链可变域进行编码。

11. 一种核酸分子,其特征在于,对权利要求 1 至 9 中任一项所述的抗 -ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段的轻链可变域进行编码。

12. 一种癌的预防或治疗用药剂学组合物,其特征在于,包含:

(a) 药剂学有效量的权利要求 1 至 9 中任一项所述的抗 -ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段;以及

(b) 药剂学上接受的载体。

13. 根据权利要求 12 所述的癌的预防或治疗用药剂学组合物,其特征在于,上述癌为选自主要由乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、肾癌、直肠癌、胰腺癌、膀胱癌、前列腺癌、头颈癌、子宫内膜癌、涎腺癌、大肠癌及甲状腺癌组成的组中的癌。

14. 一种癌的预防或治疗方法,其特征在于,

包括将药剂学组合物按治疗学有效量给个体用药的步骤;

上述药剂学组合物包含:

(a) 权利要求 1 至 9 中任一项所述的抗 -ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段,以及

(b) 药剂学上接受的载体。

抗 -ErbB2 抗体变异体

【0001】 【相关申请的交叉引用】

【0002】 本申请是 2013 年 4 月 26 日提交的国际申请的国家阶段,其要求 2012 年 5 月 8 日提交的韩国专利申请 No. 2012-0048805 的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

【技术领域】

【0003】 本发明涉及抗 -ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段、对这些进行编码的核酸分子及它们的用途。

【背景技术】

【0004】 众所周知,HER2 (ErbB2) 作为 EGFR (ErbB1)、HER3 (ErbB3) 及 HER4 (ErbB4) 等受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosin kinase) 的一个种类,存在于细胞膜,并对细胞的生长、分化及生存起到重要的作用 (Jaclyn et al. Clin Breast Cancer. 8:38-49(2008))。HER2 与其他 HER 家族蛋白不同,不会以依赖性的方式对配体进行活性化,而是始终以活性化的状态起作用,并且,通常在正常细胞中,在细胞膜中表达约 20000 个左右,但在癌细胞中,过度表达约在正常细胞中的表达量的 100 倍即约 2000000 个左右 (Shepard et al. J Clin Immunol. 11:117-127(1991))。这种 HER2 的过度表达不仅过度诱导 HER2-HER2 同型二聚体 (homodimer),还过度诱导与作为其他 HER 家族的 HER1 或 HER3 的异源二聚体 (heterodimer),其结果,引发细胞的增殖及生长,促进变形为癌细胞 (Mayumi et al. Clin Cancer Res. 12:7242-7251(2006))。

【0005】 到目前为止,在乳腺癌 (25-30%)、卵巢癌 (15-30%)、胃癌 (23%)、肺癌 (11-32%)、肾癌 (30-40%)、直肠癌 (17-90%)、胰腺癌 (26-45%)、膀胱癌 (44%)、前列腺癌 (12%) 及头颈癌 (29-39%) 等多种癌细胞中报告了 HER2 的过度表达 (Cancer Immunol Immunother 53:166-175(2004); Clin Cancer Res 12:4377s-4383s(2006); Br J Cancer 91:1195-1199(2004); Cancer 94:2584-2589(2002); Cancer 98:66-73(2003); Int J Oncol 27:681-685(2005); Int J Pancreatol 17:15-21(1995); Int J Cancer 87:349-359(2000); Ann Oncol 12:S15-S19(2001); J Pathol 204:317-325(2004))。并且,在子宫内膜癌、涎腺癌、结肠癌及甲状腺癌中观察到了 HER2 的过度表达 (Science 229:974(1985); Lancet :1:765-767(1986); Mol Cell Biol. 6:955-958(1986); Oncogene Res. 3:21-31(1988); Oncogene 4:81-88(1989); Cancer Res. 51:1034(1991); Gynecol. Oncol, 38:364(1990); Cancer Res. 50:421-425(1990); Cancer Res. 50:5184(1990); Cancer Res. 49:6605(1989); Mol. Carcinog. 3:254-257(1990); Br. J. Cancer 57:358-363(1988); Pathobiology 59:46-52(1991); Cancer 65:88-92(1990))。

【0006】 将 HER2 作为靶的抗癌治疗剂由美国基因泰克 (Genentech) 公司研发,且唯一的是从 1998 年开始销售的赫赛汀 (**Herceptin**[®], 曲妥珠单抗 (Trastuzumab), 4D5), 适应症为将过度表达 HER2 的转移性乳腺癌或早期乳腺癌与其他抗癌剂一同并用用药 (J. Clin. Oncol. 17:2639-2264(1999))。已知赫赛汀作用于 HER2 的细胞外域 IV, 并抑制 HER2-HER2

之间的同型二聚体的生成,抑制癌细胞的生存和增殖 (Ann Oncol 18:977-984(2007))。

[0007] 但据报告,作为 HER2 靶抗癌治疗剂,虽然赫赛汀已获得成功,但当单独用药时,呈现出 12-34%左右的反应效果,当并用用药时,呈现出 38-50%左右的反应效果,并且,当单独用药时,2-7%呈现出异常的心脏疾病,当并用用药时,11-28%呈现出异常的心脏疾病,而在 10 位女性中的一位左右因担心会增加已具有的心脏疾病的危险而无法接受赫赛汀的药物治疗 (N Engl J Med 357:39-51(2007))。因此,需要研发副作用少于赫赛汀的后续抗体,当前,美国基因泰克 (Genetech) 公司所研发的奥密塔克 (Omnitarg) 在临床第三阶段 (Clin Cancer Res 12:4436s-4440s(2006))。但是,奥密塔克 (Omnitarg) 与赫赛汀相比,虽然在副作用方面具有优点,但存在功效下降的缺点。基于这种理由,急需新的 HER2 抗体或其改善的形态,例如亲和性或功效等得到增加的 4D5 抗体变异体。

[0008] 通常,获得对抗原的高亲和度抗体由于露出的抗原的表面受限而变得困难。尤其,这种现象在从幼稚 (naive) 噬菌体展示文库执行体外筛选 (in vitro selection) 时更容易发生。因此,从幼稚噬菌体展示文库通常所获得的抗体的亲和度仅为 10-100nM 左右 (Iwai et al. Protein Eng Des Sel. 23:185-193(2010))。

[0009] 用于提高抗体的亲和度的方法可分为随机方法 (random approach) 和靶方法 (targeted approach) (Sheedy et al. Biotechnol Adv. 5(4):333-52(2007))。靶突变诱发 (Targeted mutagenesis) 为针对特定 CDR 或 FR,即特定氨基酸给予突变的方法,可利用靶聚合酶链式反应 (targeted PCR)、CDR 步行 (CDR walking)、定点诱变 (site-directed mutagenesis) 及 CDR 靶热点 (CDR target hotspot) 等方法。随机突变诱发 (Random mutagenesis) 为针对可变域给予变异的方法,可利用易错聚合酶链式反应 (error-prone PCR)、DNA 改组及链改组等方法 (Kim et al. Adv Drug Deliv Rev. 58:657-667(2006))。将利用这种方法制备的多种变异体制成文库,并经由通过在噬菌体的表面展示多种变异体文库,来进行筛选的过程。此外,也利用酵母展示及核糖体展示 (Rader et al. Curr Opin Biotechnol. 8:503-508(1997); Zahnd et al. J Biol Chem. 279(18):18870-18877(2004))。

[0010] 在本说明书全文中,参照了多篇论文及专利文献,并表示了其引用。所引用的论文及专利文献的公开内容全部插入于本说明书作为参照,从而更加明确地说明本发明所属的技术领域的水平及本发明的内容。

[0011] 【发明概述】

[0012] 本发明人为了研发抗原亲和度及癌细胞增殖抑制活性比对 ErbB2 的人源化抗体的 4D5 得到改善的抗体变异体而努力。结果,制备了与母源抗体相比,表达更高的抗原亲和度和癌细胞增殖抑制活性的抗 -ErbB2 抗体变异体。

[0013] 因此,本发明的目的在于,提供抗 -ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段。

[0014] 本发明的再一目的在于,提供对上述抗体变异体或其抗原结合片段的重链可变域进行编码的核酸分子。

[0015] 本发明的另一目的在于,提供对上述抗体变异体或其抗原结合片段的轻链可变域进行编码的核酸分子。

[0016] 本发明的还有一目的在于,提供癌的预防或治疗用药剂学组合物。

[0017] 本发明的又一目的在于,提供癌的预防或治疗方法。

[0018] 发明内容、发明要求保护范围及附图使本发明的其他目的及优点更加明确。

【附图说明】

[0019] 图 1 表示表达用于展示 scFv 的额外的转录体的载体的一部分。可读框可对 OmpA 分泌信号序列、轻链可变域 (V_L)、连接序列 (L)、重链可变域 (V_H)、c-myc 标签序列及病毒衣壳蛋白进行编码。

[0020] 图 2 为用于筛选生产与 ErbB2 相结合的 scFv-pIII 分子的 E. coli 克隆的单克隆 ELISA 结构的图表。

[0021] 图 3 对人源化抗体 4D5 的重链可变域 (SEQ ID NO :1)、AH06 和 A058 的重链可变域 (SEQ ID NO :3)、AH16 的重链可变域 (SEQ ID NO :4) 及 A091 的重链可变域 (SEQ ID NO :6) 的氨基酸序列进行比较并示出。

[0022] 图 4 对人源化抗体 4D5、AH06、AH16 的轻链可变域 (SEQ ID NO :2)、A058 的轻链可变域 (SEQ ID NO :5) 及 A091 的轻链可变域 (SEQ ID NO :7) 的氨基酸序列进行比较并示出。

[0023] 图 5 表示在动物细胞中生产及纯化的本发明的抗 -ErbB2 抗体变异体的 SDS-PAGE 结果。

[0024] 图 6 至图 8 表示对抗 -ErbB2 抗体变异体的细胞增殖抑制活性的分析结果。图 6 : D98W ;图 7 :A058 和 A091 ;图 8 :AH06 和 AH16。在 NCI-N87 细胞中经 6 天的时间评价了纯化的 IgG。

【发明详述】

[0026] 根据本发明的一实施方式,本发明提供抗 -ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段,上述供抗 -ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段包含:(a) 轻链可变域,以及 (b) 重链可变域,具有选自主要由以下氨基酸取代组成的组中的 2 种以上的氨基酸取代:在 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列中,基于卡巴特编号系统 (Kabat numbering system) 的位置 41 的 Pro 被 Arg 取代,位置 96 的 Gly 被 Asn 取代,位置 97 的 Gly 被 Ala 取代,位置 98 的 Asp 被 Trp 取代,位置 98 的 Asp 被 Lys 取代,位置 100b 的 Ala 被 Ser 取代,位置 100c 的 Met 被 Phe 取代,位置 101 的 Asp 被 Ala 取代,位置 101 的 Asp 被 Val 取代,位置 102 的 Tyr 被 His 取代,位置 102 的 Tyr 被 Leu 取代。

[0027] 本发明人为了研发抗原亲和度及癌细胞增殖抑制活性比对 ErbB2 的人源化抗体的 4D5 得到改善的抗体变异体而努力。结果,制备了与母源抗体相比,表达更高的抗原亲和度和癌细胞增殖抑制活性的抗 -ErbB2 抗体变异体。

[0028] 以下,进行详细说明。

【I. 抗 -ErbB2 抗体变异体及其抗原结合片段】

[0030] 本发明的抗体变异体对 ErbB2 具有特异性结合力。

[0031] 在本说明书中所使用的术语“抗体变异体 (antibody variant)”是指包含对 ErbB2 的人源化抗体 4D5 的重链可变域和 / 或轻链可变域中的分别取代 2 种以上的氨基酸的可变域的氨基酸取代变异体。即,本发明通过取代母源抗体 4D5 的重链和 / 或轻链可变域中的特定位置的氨基酸,来提供抗原亲和力及癌细胞增殖抑制活性得到改善的抗体变异体。

[0032] 如在以下实施例中所确认,本发明的抗体变异体与作为母源抗体的 4D5 相比,对 ErbB2 的亲合力最大提高 8 倍 (表 5),并且与 4D5 相比,以优秀约 3.5 倍的活性来抑制胃癌细胞的增殖 (图 8)。

[0033] 上述 4D5 抗体的重链可变域包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列,4D5 抗体的轻链可变域包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列。

[0034] 本发明的抗体变异体不仅包含完整的抗体形态,还包含抗体分子的抗体片段。

[0035] 完整的抗体为具有 2 个整体长度的轻链及 2 个整体长度的重链的结构,各轻链以二硫键方式与重链相连接。重链恒定区具有 γ 、 μ 、 α 、 δ 及 ϵ 类型,作为亚类具有 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 、 $\alpha 1$ 及 $\alpha 2$ 。轻链的恒定区具有 κ 及 λ 类型。

[0036] 抗体分子的抗原结合片段或抗体片段是指保持抗原结合功能的片段,包含 Fab、F(ab')、F(ab')₂ 及 Fv 等。抗体片段中的 Fab 作为具有轻链及重链的可变域和轻链的恒定区及重链的第一个恒定区(C_{H1})的结构,具有 1 个抗原结合部位。Fab' 在重链 C_{H1} 域的 C-末端包含具有 1 种以上的半胱氨酸残基的铰链区(hinge region),在这一方面与 Fab 有所不同。Fab' 的铰链区的半胱氨酸残基形成二硫键,并生成 F(ab')₂ 抗体。Fv 为仅具有重链可变域及轻链可变域的最小的抗体片,用于生成 Fv 片段的重组技术公开于 PCT 国际公开专利申请 W088/10649、W088/106630、W088/07085、W088/07086 及 W088/09344 中。双链 Fv(two-chain Fv) 以非共价键方式连接重链可变域与轻链可变域,单链 Fv(single-chain Fv) 一般通过连接肽将重链的可变域与单链的可变域以共价键方式相连接,或者在 C-末端直接连接,从而可像双链 Fv 一样形成如同二聚体的结构。这种抗体片段可利用蛋白水解酶获得(例如,若利用木瓜蛋白酶限制切割整个抗体,则可获得 Fab,若利用胃蛋白酶切割,则可获得 F(ab')₂ 片段),优选地,可通过基因重组技术制备。

[0037] 在本发明中,抗体优选为 Fv 形态或完整的抗体形态。并且,重链恒定区可选自 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ 中的一种同型。恒定区优选为 $\gamma 1$ (IgG1)、 $\gamma 3$ (IgG3) 或 $\gamma 4$ (IgG4)。轻链恒定区可以为 κ 或 λ 型。

[0038] 在本说明书中所说明的术语“重链”是指包含用于对抗原赋予特异性的具有充分的可变域序列的氨基酸序列的可变域 V_H 及包含 3 个恒定域 C_{H1}、C_{H2} 及 C_{H3} 的整体长度重链及其片段。并且,在本说明书中所说明的术语“轻链”是指包含用于对抗原赋予特异性的具有充分的可变域序列的氨基酸序列的可变域 V_L 及恒定域 C_L 的整体长度轻链及其片段。

[0039] 根据本发明的优选实例,上述重链可变域包含以下氨基酸取代:

[0040] (i) 在 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列中,基于卡巴特编号系统的位置 98 的 Asp 被 Trp 取代,位置 100c 的 Met 被 Phe 取代,位置 101 的 Asp 被 Ala 取代,位置 102 的 Tyr 被 Leu 取代(SEQ ID NO :3);

[0041] (ii) 在 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列中,基于卡巴特编号系统的位置 96 的 Gly 被 Asn 取代,位置 97 的 Gly 被 Ala 取代,位置 98 的 Asp 被 Lys 取代,位置 100b 的 Ala 被 Ser 取代,位置 100c 的 Met 被 Phe 取代,位置 101 的 Asp 被 Val 取代,位置 102 的 Tyr 被 His 取代(SEQ ID NO :4);或

[0042] (iii) 在 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列中,基于卡巴特编号系统的位置 41 的 Pro 被 Arg 取代,位置 98 的 Asp 被 Trp 取代,位置 100c 的 Met 被 Phe 取代,位置 101 的 Asp 被 Ala 取代,位置 102 的 Tyr 被 Leu 取代(SEQ ID NO :6)。

[0043] 在本说明书中,在说明上述重链可变域的氨基酸取代的过程中所提及的基于卡巴特编号系统的位置 41 是指 SEQ ID NO :1 的第 41 位氨基酸,即 Pro,位置 96 是指 SEQ ID NO :1 的第 100 位氨基酸,即 Gly,位置 97 是指 SEQ ID NO :1 的第 101 位氨基酸,即 Gly,位置 98

是指 SEQ ID NO :1 的第 102 位氨基酸,即 Asp,位置 100b 是指 SEQ ID NO :1 的第 106 位氨基酸,即 Ala,位置 100c 是指 SEQ ID NO :1 的第 107 位氨基酸,即 Met,位置 101 是指 SEQ ID NO :1 的第 108 位氨基酸,即 Asp,位置 102 是指 SEQ ID NO :1 的第 109 位氨基酸,即 Tyr。

[0044] 根据本发明的优选实例,上述轻链可变域包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列或包含以下氨基酸取代:2 种以上的氨基酸取代选自主要由以下取代组成的组中,在 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列中,基于卡巴特编号系统的位置 50 的 Ser 被 Thr 取代,位置 51 的 Ala 被 Thr 取代,位置 52 的 Ser 被 Thr 取代,位置 53 的 Phe 被 Trp 取代,位置 54 的 Leu 被 Pro 取代,位置 72 的 Thr 被 Ser 取代,位置 91 的 His 被 Tyr 取代,位置 93 的 Thr 被 Gln 取代,位置 93 的 Thr 被 Asn 取代,位置 96 的 Pro 被 Ala 取代,位置 96 的 Pro 被 Val 取代,位置 97 的 Thr 被 Ser 取代。

[0045] 根据本发明的更优选实例,上述轻链可变域包含以下氨基酸取代:

[0046] (i) 在 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列中,基于卡巴特编号系统的位置 93 的 Thr 被 Gln 取代,位置 96 的 Pro 被 Ala 取代,位置 97 的 Thr 被 Ser 取代 (SEQ ID NO :5);或

[0047] (ii) 在 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列中,基于卡巴特编号系统的位置 50 的 Ser 被 Thr 取代,位置 51 的 Ala 被 Thr 取代,位置 52 的 Ser 被 Thr 取代,位置 53 的 Phe 被 Trp 取代,位置 54 的 Leu 被 Pro 取代,位置 72 的 Thr 被 Ser 取代,位置 91 的 His 被 Tyr 取代,位置 93 的 Thr 被 Asn 取代,位置 96 的 Pro 被 Val 取代 (SEQ ID NO :7)。

[0048] 在本说明书中,在说明上述轻链可变域的氨基酸取代的过程中所提及的基于卡巴特编号系统的位置 50 是指 SEQ ID NO :2 的第 50 位氨基酸,即 Ser,位置 51 是指 SEQ ID NO :2 的第 51 位氨基酸,即 Ala,位置 52 是指 SEQ ID NO :2 的第 52 位氨基酸,即 Ser,位置 53 是指 SEQ ID NO :2 的第 53 位氨基酸,即 Phe,位置 54 是指 SEQ ID NO :2 的第 54 位氨基酸,即 Leu,位置 72 是指 SEQ ID NO :2 的第 72 位氨基酸,即 Thr,位置 91 是指 SEQ ID NO :2 的第 91 位氨基酸,即 His,位置 93 是指 SEQ ID NO :2 的第 93 位氨基酸,即 Thr,位置 96 是指 SEQ ID NO :2 的第 96 位氨基酸,即 Pro,位置 97 是指 SEQ ID NO :2 的第 97 位氨基酸,即 Thr。

[0049] 根据本发明的优选实例,本发明的抗体变异体或其抗原结合片段包含:(a) 重链可变域,选自主要由 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4 及 SEQ ID NO :6 组成的组中;以及 (b) 轻链可变域,选自主要由 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :5 及 SEQ ID NO :7 组成的组中。

[0050] 根据本发明的更优选实例,本发明的抗体变异体或其抗原结合片段包含以下轻链可变域及重链可变域:

[0051] (i) SEQ ID NO :2 的轻链可变域及 SEQ ID NO :3 的重链可变域;

[0052] (ii) SEQ ID NO :2 的轻链可变域及 SEQ ID NO :4 的重链可变域;

[0053] (iii) SEQ ID NO :5 的轻链可变域及 SEQ ID NO :3 的重链可变域;或

[0054] (iv) SEQ ID NO :7 的轻链可变域及 SEQ ID NO :6 的重链可变域。

[0055] 本发明的抗体包含单一克隆抗体、多特异性抗体、人类抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链 Fvs(scFV)、单链抗体、Fab 片段、F(ab') 片段、二硫键 Fvs(sdFV) 及抗-独特型(抗-Id)抗体和上述抗体的表位结合片段等,但并不局限于此。

[0056] 根据本发明的优选实例,本发明的抗体为人源化抗体(humanized antibody)。

[0057] 本发明的抗体变异体或抗体片段在可特异性地识别 HER2 的范围内,包含在本说明书中所记载的本发明的抗-ErbB2 抗体变异体序列,还包含其生物学等同物。例如,为了

更加改善抗体的结合亲和度和 / 或其他生物学特性,可使抗体的氨基酸序列发生追加的变化。这种变形包含例如抗体的氨基酸序列残基的缺失、插入和 / 或取代。这种氨基酸变异可基于氨基酸侧链取代体的相对类似性,例如,疏水性、亲水性、电荷、大小等实现。根据氨基酸侧链取代体的大小、形状及种类的分析,可知精氨酸、赖氨酸和组氨酸全部为带有阳电荷的残基;丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸的大小类似;苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸的形状类似。因此,基于这种考虑事项,可将精氨酸、赖氨酸和组氨酸、丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸视为生物学功能等同物。

[0058] 在导入变异的过程中,可考虑氨基酸的疏水性指数 (hydropathic index)。各氨基酸根据疏水性和电荷赋予疏水性指数:异亮氨酸 (+4.5)、缬氨酸 (+4.2)、亮氨酸 (+3.8)、苯丙氨酸 (+2.8)、半胱氨酸 / 胱氨酸 (+2.5)、蛋氨酸 (+1.9)、丙氨酸 (+1.8)、甘氨酸 (-0.4)、苏氨酸 (-0.7);丝氨酸 (-0.8)、色氨酸 (-0.9)、酪氨酸 (-1.3)、脯氨酸 (-1.6)、组氨酸 (-3.2)、谷氨酸 (-3.5)、谷氨酰胺 (-3.5)、天冬氨酸 (-3.5)、天冬酰胺 (-3.5)、赖氨酸 (-3.9) 及精氨酸 (-4.5)。

[0059] 在赋予蛋白质的相互的生物学功能 (interactive biological function) 的过程中,疏水性氨基酸指数非常重要。只有利用具有类似的疏水性指数的氨基酸取代,才能保持类似的生物学活性,这是公知的事实。在参照疏水性指数导入变异的情况下,在呈现优选为 ≤ 2 以内,更优选为 ≤ 1 以内,尤其优选为 ≤ 0.5 以内的疏水性指数差异的氨基酸之间进行取代。

[0060] 另一方面,众所周知,具有类似的亲水性值 (hydrophilicity value) 的氨基酸之间的取代引起具有等同的生物学活性的蛋白质。如美国专利第 4554101 号所公开,将以下亲水性值赋予各氨基酸残基:精氨酸 (+3.0)、赖氨酸 (+3.0)、天冬氨酸 (+3.0 \pm 1)、谷氨酸 (+3.0 \pm 1)、丝氨酸 (+0.3)、天冬酰胺 (+0.2)、谷氨酰胺 (+0.2)、甘氨酸 (0)、苏氨酸 (-0.4)、脯氨酸 (-0.5 \pm 1)、丙氨酸 (-0.5)、组氨酸 (-0.5)、半胱氨酸 (-1.0)、蛋氨酸 (-1.3)、缬氨酸 (-1.5)、亮氨酸 (-1.8)、异亮氨酸 (-1.8)、酪氨酸 (-2.3)、苯丙氨酸 (-2.5) 及色氨酸 (-3.4)。

[0061] 使分子的活性在整体上不会发生变更的蛋白质中的氨基酸交换已公知于该领域中 (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979)。最普遍发生的交换为氨基酸残基 Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Thr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu 及 Asp/Gly 之间的交换。

[0062] 若考虑如上所述的具有生物学等同活性的变异,则本发明的抗体或对这些进行编码的核酸分子被解释为包含记载于序列表的序列和呈现实质上的等同性 (substantial identity) 的序列。上述的实质上的等同性进行比对,使得如上所述的本发明的序列尽可能与任意的其他序列相对应,在利用该领域中通常所使用的算法来分析比对的情况下,是指呈现最小 61% 的同源性,更优选为 70% 的同源性,尤其优选为 80% 的同源性,最优选为 90% 的同源性的序列。用于比较序列的比对方法公知在该领域中。对于比对的多种方法及算法公开在 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24:307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and

Sharp, CABIOS 5:151-3(1989);Corpet et al., Nuc.Acids Res.16:10881-90(1988); Huang et al., Comp. Appl. BioSci. 8:155-65(1992) 及 Pearson et al., Meth. Mol. Biol. 24:307-31(1994).NCBI BasicLocal Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10(1990)) 可在 NCBI 等中访问,可在互联网上以与 blastp、blastn、blastx、tblastn 及 tblastx 之类的序列分析程序联动的方式利用。BLSAT 可在 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ 中访问。利用该程序的序列同源性比较方法可在 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html 中确认。

[0063] 根据本发明,本发明的抗体变异体或抗体片段可以为与功能性分子相结合的免疫接合体。HER2 为在癌细胞的表面表达的分子,因而本发明的免疫接合体,即抗体变异体-功能性分子可利用于过度表达 HER2 的癌的预防、治疗及诊断。上述功能性分子包含化学物质、放射性核素、免疫治疗剂、细胞因子、趋化因子、毒素、生物作用剂及酶抑制物质等。

[0064] 用于与本发明的抗体变异体或其片段耦合的优选的功能性分子为化学物质、细胞因子或趋化因子,更优选为化学物质。上述化学物质为抗癌剂,例如,阿雪维菌素、阿柔比星、阿考达唑、山油柑碱、阿多来新、阿拉诺新、阿地白介素、别嘌醇钠、六甲蜜胺、氨鲁米特、氨茶非特、聚肌胞、安吡啶、雄激素、蛇形菌素、阿非迪霉素甘氨酸、亮氨酸溶肉瘤素、天冬酰胺酶、5-阿扎胞苷、硫唑嘌呤、卡介苗 (BCG)、贝克叶酸拮抗剂、 β -2-硫代鸟嘌呤脱氧核式、盐酸比生群、硫酸博莱霉素、白消安、丁硫氨酸亚砷胺、BWA773U82、BW 502U83/HCl、BW 7U85 甲磺酸、脑酰胺酶 (ceracemide)、卡贝替姆、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、氯喹啉磺酰胺、氯脲霉素、色霉素 A3、顺铂、克拉屈滨、皮质类固醇、短小棒状杆菌、CPT-11、克立那托、环胞苷、环磷酰胺、阿糖胞苷、色他巴、道比什马来酸酯、达卡巴嗪、更生霉素、盐酸柔红霉素、地西他滨、右丙亚胺、卫康醇、地吡醌、二溴卫矛醇、膜海鞘素 B、二乙基二硫代氨基甲酸酯、肌苷二醛、二氢-5-氮杂胞苷、阿霉素、棘霉素、依达曲沙、依地福新、依氟鸟氨酸、埃利奥特氏溶液、依沙芦星、表柔比星、依索比星、磷酸雌二醇氮芥、雌激素、依他硝唑、氨磷汀、依托泊苷、法徕唑、法扎拉滨、芬维 A 胺、非格司亭、非那雄胺、黄酮醋酸、氟尿苷、磷酸氟达拉滨、5-氟尿嘧啶滨、全氟碳TM(FluosolTM)、氟他胺、硝酸镓、吉西他滨、醋酸戈舍瑞林、七磺酰胺 (hepsulfam)、六亚甲基二乙酰胺、高三尖杉酯碱、硫酸胍、4-羟雄甾烯二酮、羟基脲、盐酸伊达比星、异环磷酰胺、干扰素 α 、干扰素 β 、干扰素 γ 、白细胞介素 -L α 和 β 、白细胞介素 -3、白细胞介素 -4、白细胞介素 -6、4-甘薯苦醇、异丙铂、异维甲酸、亚叶酸钙、醋酸亮丙瑞林、左旋咪唑、柔红霉素脂质体、脂质体荚膜的阿霉素、洛莫司汀、氯尼达明、美登素、盐酸氮芥、美法仑、美诺立尔、美巴龙、6-巯基嘌呤、美司钠、卡介苗的甲醇提取残渣、氨甲喋呤、N-甲基甲酰胺、米非司酮、米托胍脞、丝裂霉素 -C、米托坦、盐酸米托蒽醌、单核细胞/巨噬细胞菌落-刺激因子、大麻隆、萘福昔定、新制癌菌素、醋酸奥曲肽、奥马铂、奥沙利铂、紫杉醇、铲形跗、喷司他丁、哌嗪双酮、哌泊溴烷、吡柔比星、吡曲克辛、盐酸吡罗蒽醌、PIXY-321、普卡霉素、吡吩姆钠、泼尼莫司汀、甲基苄胍、孕酮、吡唑喹菌素、雷佐生、沙格司亭、司莫司汀、锗螺胺、螺莫司汀、链黑菌素、链佐星、磺氯苯脲、苏拉明钠、他莫昔芬、替加氟、替尼泊苷、对苯二甲酰胺 (terephthalamidine)、替罗昔隆、硫鸟嘌呤、噻替派、胸腺嘧啶核苷注射液、噻唑呋林、拓扑替康、托瑞米芬、维甲酸、盐酸三氟拉嗪、曲氟尿苷、三甲曲沙、肿瘤坏死因子、乌拉莫司汀、硫酸长春碱、硫酸长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、长春利定、吉雄 864 (Yoshi864)、佐柔比星、阿糖胞苷、依托泊苷、美法仑、泰索帝、紫杉醇及它们的混合

物,但并不局限于此。

[0065] 【II. 核酸分子及重组载体】

[0066] 根据本发明的再一实施方式,本发明提供对本发明的抗体变异体或其抗原结合片段的重链可变域进行编码的核酸分子。

[0067] 根据本发明的另一实施方式,本发明提供对本发明的抗体变异体或其抗原结合片段的轻链可变域进行编码的核酸分子。

[0068] 在本说明书中所说明的术语“核酸分子”具有包含 DNA(gDNA 及 cDNA) 及 RNA 分子的含义,在核酸分子中,作为基本组成单位的核苷酸不仅包含天然的核苷酸,还包含糖或碱基部位发生变形的类似物 (analogue) (Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 及 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990))。本发明的对重链及轻链可变域进行编码的核酸分子的序列可发生变形。上述变形包括核苷酸的添加、缺失或非保守取代或保守取代。

[0069] 根据本发明的一实例,对上述重链可变域进行编码的核酸分子为对由 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列组成的重链可变域进行编码的核酸分子,对上述轻链可变域进行编码的核酸分子为对由 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列组成的轻链可变域进行编码的核酸分子。

[0070] 根据本发明的一实例,本发明的核酸分子可以为包含于对整个重链区域进行编码的核酸分子或对整个轻链区域进行编码的核酸分子内的形态。

[0071] 本发明的核酸分子解释为还包含对如上所述的核苷酸序列呈现出实质上的等同性的核苷酸序列。上述的实质上的等同性以使上述的本发明的核苷酸序列尽可能与任意其他序列相对应的方式进行比对,利用该领域中通常所使用的算法来分析所比对的序列的情况下,是指呈现出最小 80% 的同源性,更优选为最小 90% 的同源性,最优选为最小 95% 的同源性的核苷酸序列。

[0072] 根据本发明的还有一实施方式,本发明提供重组载体,上述重组载体包含 (a) 对本发明的重链可变域进行编码的核酸分子以及 (b) 对本发明的轻链可变域进行编码的核酸分子。

[0073] 在本说明书中所说明的术语“载体”作为在宿主细胞中用于表达靶基因的方式,包含质粒载体、粘粒载体、噬菌体载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体及腺相关病毒载体之类的病毒载体等,优选为质粒载体。

[0074] 根据本发明的优选实例,在本发明的载体中,对轻链可变域进行编码的核酸分子及对重链可变域进行编码的核酸分子与启动子有效地结合 (operatively linked)。

[0075] 在本说明书中所说明的术语“有效地结合”是指核酸表达调节序列 (例如,启动子、信号序列或转录调节因子结合位置的阵列) 和其他核酸序列之间的功能性结合,由此,上述调节序列调节其他上述核酸序列的转录和 / 或翻译。

[0076] 根据本发明的优选实例,本发明的重组载体包含 (a) 对选自主要由 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4 及 SEQ ID NO :6 组成的组中的重链可变域进行编码的核酸分子以及 (b) 对选自主要由 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :5 及 SEQ ID NO :7 组成的组中的轻链可变域进行编码的核酸分子。

[0077] 根据本发明的更优选实例,本发明的重组载体包含以下核酸分子 :

[0078] (i) 对 SEQ ID NO :3 的重链可变域进行编码的核酸分子以及对 SEQ ID NO :2 的轻链可变域进行编码的核酸分子 ;

[0079] (ii) 对 SEQ ID NO :4 的重链可变域进行编码的核酸分子以及对 SEQ ID NO :2 的轻链可变域进行编码的核酸分子 ;

[0080] (iii) 对 SEQ ID NO :3 的重链可变域进行编码的核酸分子以及对 SEQ ID NO :5 的轻链可变域进行编码的核酸分子 ;或

[0081] (iv) 对 SEQ ID NO :6 的重链可变域进行编码的核酸分子以及对 SEQ ID NO :7 的轻链可变域进行编码的核酸分子。

[0082] 本发明的重组载体系统可通过该领域中公知的多种方法构建,与其相关的具体方法公开于 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001),该文献作为参照插入于本说明书中。

[0083] 典型地,本发明的载体可由用于克隆的载体或用于表达的载体构建。并且,本发明的载体可将原核细胞或真核细胞作为宿主来构建。例如,在本发明的载体为表达载体,且将原核细胞作为宿主的情况下,通常包含可使转录进行的强力的启动子(例如,tac 启动子、lac 启动子、lacUV5 启动子、lpp 启动子、pL λ 启动子、pR λ 启动子、rac5 启动子、amp 启动子、recA 启动子、SP6 启动子、trp 启动子及 T7 启动子等)、用于开始翻译的核糖体结合位置及转录 / 翻译结束序列。在利用 E. coli(例如,HB101、BL21、DH5 α 等)作为宿主细胞的情况下,可以利用 E. coli 色氨酸生物合成途径的启动子及操纵子部位(Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, (1984)158:1018-1024)和噬菌体 λ 的向左启动子(pL λ 启动子、Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, (1980)14:399-445)作为调节部位。在利用芽孢杆菌作为宿主细胞的情况下,可以利用能够在苏云金杆菌的毒素蛋白基因的启动子(*Appl. Environ. Microbiol.* (1998)64:3932-3938 ;*Mol. Gen. Genet.* (1996)250:734-741)或芽孢杆菌中表达的任何启动子作为调节部位。

[0084] 另一方面,本发明的重组载体能够以操作该领域中常使用的质粒(例如,pCL、pSC101、pGV1106、pACYC177、ColE1、pKT230、pME290、pBR322、pUC8/9、pUC6、pBD9、pHC79、pIJ61、pLAFR1、pHV14、pGEX 系列、pET 系列及 pUC19 等)、噬菌体(例如, λ gt4. λ B、 λ -Charon、 λ Δ z1 及 M13 等)或病毒(例如,SV40 等)的方式制成。

[0085] 根据本发明的优选实例,本发明的重组载体能够以操作 pCL 表达载体,优选地,操作 pCLS05(韩国申请号第 10-2011-0056685 号)表达载体的方式制成。

[0086] 另一方面,本发明的载体为表达载体,且在将真核细胞作为宿主的情况下,可利用来源于哺乳动物细胞的基因组的启动子(例如:金属硫蛋白启动子、 β -肌动蛋白启动子、人血红蛋白启动子及人肌酸启动子)或来源于哺乳动物病毒的启动子(例如:腺病毒后期启动子、牛痘病毒 7.5K 启动子、SV40 启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、HSV 的 tk 启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、HIV 的 LTR 启动子、莫洛尼病毒的启动子、EB 病毒(EBV)的启动子及劳斯肉瘤病毒(RSV)的启动子),且通常具有多聚腺苷酸化序列作为转录结束序列。在一实例中,本发明的重组载体包含 CMV 启动子。

[0087] 本发明的重组载体为了使从其表达的抗体的纯化变得容易,也可与其他序列相融合。融合的序列例如有谷胱甘肽-S-转移酶(美国法玛西亚公司(Pharmacia,USA))、麦芽糖结合蛋白(美国 NEB 公司(NEB, USA))、FLAG(美国 IBI 公司(ABI, USA))及 6x His(六

聚组氨酸 (hexahistidine) ;美国 Quiagen 公司 (Quiagen, USA)) 等。并且,由于借助本发明的载体所表达的蛋白质为抗体,因而即使没有用于纯化的追加的序列,所表达的抗体也可通过蛋白 A 柱等容易纯化。

[0088] 另一方面,本发明的重组载体包含该领域中通常所利用的抗生素抗性基因作为选择标记,例如,具有对于氨苄西林、庆大霉素、羧苄青霉素、氯霉素、链霉素、卡那霉素、遗传霉素、新霉素及四环素的抗性基因。

[0089] 表达本发明的抗体变异体的载体可使用使轻链和重链在一个载体一同表达的载体系统或使轻链和重链分别在单独的载体中表达的系统。在后者的情况下,两个载体通过共转化 (co-transformation) 及靶转化 (targeted transformation) 向宿主细胞导入。共转化为向宿主细胞一同导入对轻链及重链进行编码的各载体 DNA 之后,筛选对轻链和重链都进行表达的细胞的方法。靶转化为对转化为包含轻链 (或重链) 的载体的细胞进行筛选,并再次将表达轻链的所筛选的细胞转化为包含重链 (或轻链) 的载体,从而最终筛选对轻链及重链都进行表达的细胞的方法。在以下实施例中,利用在一个载体中一同表达轻链和重链的载体系统,来制备了抗体。

[0090] 【III. 转化体】

[0091] 根据本发明的又一实施方式,本发明提供转化为本发明的重组载体的宿主细胞。

[0092] 能够稳定且连续地克隆及表达本发明的载体的宿主细胞公知于该领域中,从而可利用任何宿主细胞,例如,包含大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌及苏云金杆菌之类的芽孢杆菌属菌株、链霉菌 (*Streptomyces*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*) (例如,恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*))、奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*) 或葡萄球菌 (*Staphylococcus*) (例如,肉葡萄球菌 (*Staphylococcus carnosus*)) 之类的原核宿主细胞,但并不局限于此。

[0093] 上述载体的适合的真核细胞宿主细胞可利用曲霉菌 (*Aspergillus species*) 之类的真菌、毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces*) 及粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 之类的酵母、其余低等真核细胞、来源于昆虫的细胞之类的高等真核生物的细胞和来源于植物或哺乳动物的细胞。优选地,宿主细胞可以为猴肾细胞 7 (COS7 :monkey kidney cells)、NS0 细胞、SP2/0、中国仓鼠卵巢 (CHO :Chinese hamster ovary) 细胞、W138、幼仓鼠肾 (BHK :baby hamster kidney) 细胞、MDCK、骨髓瘤细胞系、HuT 78 细胞或 293 细胞,更优选为中国仓鼠卵巢细胞。

[0094] 在利用 *E. coli* 等微生物的情况下,生产率与动物细胞等相比相对高,但由于糖基化 (glycosylation) 问题而在完整 (intact) 的 Ig 形态的抗体生产中并不优选,但可使用于 Fab 及 Fv 等的生产。

[0095] 在本说明书中,作为宿主细胞的“转化”和 / 或“转染”包括向有机体、细胞、组织或器官导入核算的任何方法,能够选择如该领域中所公知的适合不同宿主细胞的标准技术来执行。作为这种方法,包括电穿孔 (electroporation)、原生质体融合、磷酸钙 (CaPO_4) 沉淀、氯化钙 (CaCl_2) 沉淀、利用碳化硅纤维的搅拌、农杆菌介导的转化、PEG、硫酸葡聚糖、脂质体及干燥 / 抑制介导的转化方法等,但并不局限于此。

[0096] 【IV. 抗 -ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段的制备方法】

[0097] 根据本发明的又一实施方式,本发明提供抗 -ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片

段的制备方法,上述抗-ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段的制备方法包括:步骤(a),培养转化为本发明的重组载体的宿主细胞,以及步骤(b),在上述宿主细胞中表达抗-ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段。

[0098] 制备在上述抗体的过程中得到转化的宿主细胞的培养可根据该领域中公知的适当的培养基和培养条件来实现。有关这种培养过程,只要是本发明所属技术领域的普通技术人员,就能根据所选择的菌株容易地调整并使用。这种多样的培养方法公开于多个文献(例如,James M. Lee, Biochemical Engineering, Prentice-Hall International Editions, 138-176)中。细胞培养根据细胞的生长方式区分为悬浮培养和附着培养,并根据培养方法区分为分批式、补料分批式及连续培养式的方法。使用于培养的培养基需适当地满足特定的菌株的要求条件。

[0099] 就动物细胞培养而言,上述培养基包含多种碳源、氮源及微量元素成分。可使用的碳源的例包含葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、淀粉及纤维素之类的碳水化合物、大豆油、葵花籽油、蓖麻油及椰子油之类的脂肪、棕榈酸、硬脂酸及亚油酸之类的脂肪酸、甘油及乙醇之类的酒精和乙酸之类的有机酸。这些碳源可单独或组合使用。可使用的氮源的例包含蛋白胨、酵母提取物、麦芽提取物、玉米浸渍液(CSL)及大豆小麦之类的有机氮源及尿素、硫酸铵、氯化铵、磷酸铵、碳酸铵及硝酸铵之类的无机氮源。这些氮源可单独或组合使用。上述培养基可包含 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 及对应的含钠盐作为磷源。并且,可包含硫酸镁或硫酸铁之类的金属盐。此外,可包含氨基酸、维生素及适当的前体等。

[0100] 在培养的过程中,能够以适当的方式向培养液添加氢氧化铵、氢氧化钾、氨、磷酸及硫酸之类的化合物,从而调整培养液的 pH。并且,在培养的过程中,可使用聚乙二醇酯(polyglycol ester)之类的消泡剂,来抑制气泡的生成。并且,为了维持培养液的有氧状态,向培养液内注入氧或含氧气体(例如,空气)。培养液的温度通常在 20°C 至 45°C 范围内,优选在 25°C 至 40°C 范围内。

[0101] 通过培养转化的宿主细胞来获得的抗体能够以未纯化的状态使用,并且还能利用多种通常的方法,例如透析、盐沉淀及色谱法等,来纯化为高纯度并使用。其中,最常使用利用色谱法的方法,柱的种类和顺序可根据抗体的特性、培养方法等,选自离子交换色谱法、尺寸排阻色谱、亲和性色谱法等。

[0102] **【V. 癌的预防或治疗用药剂学组合物】**

[0103] 根据本发明的又一实施方式,本发明提供癌的预防或治疗用药剂学组合物,上述癌的预防或治疗用药剂学组合物包含:(a) 药剂学有效量的本发明的抗-ErbB2 抗体变异体或其抗原结合片段,以及 (b) 药剂学上接受的载体。

[0104] 根据本发明的又一实施方式,本发明提供癌的预防或治疗方法,上述癌的预防或治疗方法包括将治疗学有效量的上述药剂学组合物给个体用药的步骤。

[0105] 在本说明书中所使用的术语“预防”使用为包括完全或部分抑制或延迟疾病的进行且延迟转换为更严重的疾病的情况的最广的含义,术语“治疗”包括癌细胞的部分或整体破坏,还包括癌生长的部分或完全的抑制。

[0106] 根据本发明的一实例,上述癌为过度表达 HER2 的癌。在一特定例中,上述癌选自主要由乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、肾癌、直肠癌、胰腺癌、膀胱癌、前列腺癌、头颈癌、子宫内膜癌、涎腺癌、大肠癌及甲状腺癌组成的组中。在其他实例中,上述癌为乳腺癌或胃癌。在

本说明书中所说明的术语“过度表达 HER2 的癌”为与相同组织类型的非 - 癌性细胞相比, 在癌细胞的表面具有显著且更高水平的 HER2 的癌。这种过度表达可根据基因扩增或转录或翻译的增加而发生。

[0107] 包含于本发明的药剂学组合物的药剂学上接受的载体作为在进行制剂时, 通常所利用的载体, 包含乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone)、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素 (methyl cellulose)、羟苯甲酯 (methyl hydroxybenzoate)、羟苯丙酯 (propyl hydroxybenzoate)、滑石、硬脂酸镁及矿物油等, 但并不局限于此。本发明的药剂学组合物除了上述成分之外还可以包含润滑剂、润湿剂、甜味剂、香味剂、乳化剂、悬浮剂、保存剂等。药剂学上接受的适合的载体及制剂已在 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995) 中进行了详细的记载。

[0108] 本发明的药剂学组合物能够以口服或非口服方式进行用药, 非口服用药的情况下, 能够以静脉内注入、皮下注入、肌肉注入、腹腔注入、内皮用药、局部用药、脾内用药、肺内用药及直肠内用药等方式进行用药。当口服用药时, 由于蛋白质或肽被消化, 因而口服组合物需涂敷活性药剂或以从胃的分解中得到保护的方式进行剂型化。并且, 药剂学组合物可借助能够使活性物质向靶细胞移动的任意装置进行用药。

[0109] 本发明的药剂学组合物的适当的用药量可根据制剂化方法、用药方式、患者的年龄、体重、性别、病态、饮食、用药时间、用药途径、排泄速度及反应灵敏性之类的因素而不同, 通常, 熟练的医生可针对所需的治疗或预防容易地决定或处方有效的用药量。根据本发明的优选实例, 本发明的药剂学组合物的一天的用药量为 0.001-100mg/kg (体重)。在本说明书中, 术语“药剂学有效量”是指针对预防或治疗癌充分的量。

[0110] 本发明的药剂学组合物可根据本发明所属技术领域的普通技术人员能够容易地实施的方法, 利用药剂学上接受的载体和 / 或赋形剂, 来进行制剂化, 从而制备为单位容量形态, 或者装入大容量容器内而制备。此时, 剂型也可以为油性或水性介质中的溶液、悬浮液或乳化液形态, 浸膏剂、散剂、粉剂、颗粒剂、片剂或胶囊剂形态, 还可包含分散剂或稳定剂。

[0111] 本发明的组合物可作为个别治疗剂进行用药, 或者以与其他治疗剂并用的方式进行用药, 且能够与现有的治疗剂依次或一同进行用药。

[0112] 抗体变异体能够以抗体变异体 - 治疗剂 (功能性分子) 结合体形态向生物体内投入, 从而利用于癌的治疗, 而相关说明见上述内容。向特异性靶部位进行药剂的靶向化时适当且优选的多种条件已在例如文献 Trouet et al., Plenum Press, New York and London, (1982) 19-30 中进行了报告。

[0113] 归纳本发明的特征及优点如下。

[0114] (a) 本发明的抗体变异体以高的亲和力与 ErbB2 相结合。尤其, 本发明的抗体变异体对 ErbB2 的亲和力与现有的市场上所销售的抗体治疗剂, 即 4D5 相比, 改善了最多 8 倍。

[0115] (b) 本发明的抗体变异体呈现优秀的癌细胞增殖抑制活性。尤其, 本发明的抗体变异体的胃癌细胞株增殖抑制活性与 4D5 相比, 优秀约 3.5 倍。

[0116] (c) 因此, 本发明的抗体变异体即使使用少量, 也能有效地预防或治疗癌。

[0117] 以下, 将通过实施例对本发明进行更为详细的说明。这些实施例仅用于更加具体

地说明本发明,根据本发明的要点,本发明的范围并不局限于这些实施例,而这对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说是显而易见的。

【实施例】

[0118] 【实施例 1:具有多种 CDR 残基的噬菌体-展示的 scFv 文库制作】

[0119] 使用以 scFv 与 pIII 相结合的形态生成展示的噬菌粒载体,制作了噬菌体-展示的 scFv 文库。将上述载体的大致结构图示在了图 1 中。上述载体包含在 IPTG-诱导性 Plac 启动子的控制下的抗体的可变域,连接序列为 GGGSGGGSGGSS(SEQ ID NO:8)。成为母源抗体的抗-ErbB2 抗体(4D5)的制备方法及可变域序列公知在美国专利第 5821337 号及第 6054297 号中。

[0120] 使用 scFv 展示载体的唯一的“停止模板”版本来生成了文库。在本实施例中,使用了 TGA 终止密码子插入于轻链的卡巴特残基 48 的模板 pCMTG 噬菌粒载体(韩国 IG 治疗公司(Therapy Co.))。重链 CDR3 中未导入终止密码子。在实现多样化的位置,使用具有 NNK 密码子的引发突变的寡核苷酸(oligonucleotide)来导入 CDR 多样性,并去除了终止密码子。由此,生成了对与同种二聚物化 c-myc 及 pIII 相融合的 scFv 文库成员进行编码的可读框。

[0121] 使重链 CDR3 及轻链 CDR3 区优先发生变化。为了使重链 CDR3 区发生变化,使用 HF(序列号 19)和 LN01_R 引物(序列号 9)、HF(序列号 19)和 LN02_R 引物(序列号 10)来执行了聚合酶链式反应。使用 C1000 热循环仪(Thermal cycler)(美国伯乐(Bio-Rad)公司),根据制造商的说明,利用 Ex taq(日本塔卡拉(Takara)公司)进行扩增过程如下:循环实施了 27 次的在 95°C 温度下变性 20 秒钟,在 57°C 温度下引物结合 30 秒钟,并在 72°C 温度下延伸 45 秒钟的扩增过程。并且,为了改变轻链 CDR3 区,利用 LN03_F(序列号 11)和 LR 引物(序列号 17)、LN04_F(序列号 12)和 LR 引物对,实施聚合酶链式反应如下:循环实施了 27 次的在 95°C 温度下变性 20 秒钟,在 57°C 温度下引物结合 30 秒钟,并在 72°C 温度下延伸 45 秒钟的扩增过程。

[0122] 为了制作将重链 CDR3 和轻链 CDR3 变异体中筛选的抗体作为模板,将轻链 CDR2 作为靶,并使用 NNK 密码子来随机诱导突变的文库,执行了两次聚合酶链式反应过程。聚合酶链式反应循环实施了 27 次的在 95°C 温度下变性 20 秒钟,在 57°C 温度下引物结合 30 秒钟,并在 72°C 温度下延伸 45 秒钟的扩增过程。使用 LF(序列号 18)作为正向引物,使用以 1:1 的比率混合 LN05_R(序列号 13)和 LN06_R(序列号 14)的引物作为反向引物,来获得 A 片段,并使用 LN0506_F(序列号 15)和 HR 引物(序列号 20)来获得了 B 片段。将 A 片段和 B 片段作为模板,利用 LF(序列号 18)和 HR 引物(序列号 20)对执行了聚合酶链式反应。此外,将在重链 CDR3 和两个轻链(CDRL2、CDRL3)变异体中筛选的抗体作为模板,使用 LF(序列号 18)和 LN07_R 引物(序列号 16)追加制作了文库。

[0123] 为了将从上述文库筛选的重链 CDR3、轻链 CDR3、轻链 CDR2 变异抗体作为模板,将 CDR 和构架区全部作为靶,来随机诱导突变而执行易错聚合酶链式反应,为了通过执行易错聚合酶链式反应来制作抗体文库,分两次执行了如下的聚合酶链式反应过程:第一个聚合酶链式反应使用 GeneMorpII 随机突变试剂盒(Random mutagenesis kit,美国斯特拉塔根(Stratagene)公司),来循环执行了 32 次的在 95°C 温度下变性 20 秒钟,在 57°C 温度下引

物结合 30 秒钟,并在 72°C 温度下延伸 45 秒钟的扩增过程,第二个聚合酶链式反应使用 Ex taq(日本塔卡拉(Takara)公司),来循环执行了 20 次的在 95°C 温度下变性 20 秒钟,在 58°C 温度下引物结合 30 秒钟,并在 72°C 温度下延伸 45 秒钟的扩增过程;首先,使用 LF(序列号 18)和 LR(序列号 17),利用包含轻链的片段和 HF(序列号 19)和 HR 引物(序列号 20)对,通过聚合酶链式反应分别扩增了包含重链的片段。将轻链和重链两个片段利用 LF(序列号 18)和 HR 引物(序列号 20)对实施聚合酶链式反应,从而获得 scFv 形态的片段并制作了文库。将用于聚合酶链式反应的引物的序列表示在表 1 中。

[0124] 【表 1】

[0125]

引物名	序列	序列号
LN01_R	ACTAGTGCTACTCACGGTCACCAGAGTCCCTGTCCCC AGTAATCCATGGCGTAMNNGCCMNNMNNMNNMNNNTCT AGAGCAGTAGTAC	第 9 序列
LN02_R	ACTAGTGCTACTCACGGTCACCAGAGTCCCTGTCCCC AMNNMNNMNNMNNGTAGAAAGCCATCACC	第 10 序列
LN03_F	GACTTCGCTACGTACTACTGCNNKNNKNNKNNKACCAC TCCTCCGAC	第 11 序列
LN04_F	GACTTCGCTACGTACTACTGCCAACAGCACTACNNKAC TNNKNNKNNKTTCCGGACAAGGCAC	第 12 序列
LN05_R	TGAATCTAGATGGCACACCMNNMNNMNNMNGAAMNNMN NMNNGTAGATCAGCAGCTTC	第 13 序列
LN06_R	TGAATCTAGATGGCACACCMNNMNNMNNMNNCCAMNNMN NMNNGTAGATCAGCAGCTTC	第 14 序列
LN0506_F	GGTGTGCCATCTAGATTCAGTG	第 15 序列
LN07_R	ACTAGTGCTACTCACGGTCACCAGAGTCCCTGTCCCC AGTAATCCATMNNGTAMNNGCCMNNMNNMNNMNNNTC TAGAGCAGTAGTAC	第 16 序列
LR	GCGCGCTACTCACGGTC	第 17 序列
LF	GGCCAGGCGGCCGATATCCAGATGAC	第 18 序列
HF	GAGCTCATGGATATCCAGATGACCCAGAG	第 19 序列
HR	GCGCGCTACTCACGGTC	第 20 序列

[0126] 母源抗体包含人源化抗体 4D5 的可变域的氨基酸序列 (SEQ ID NO :1 的重链可变域、SEQ ID NO :2 的轻链可变域) (表 2)。

[0127] 【表 2】

[0128]

	氨基酸序列	序列表
重链可变域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVSS	第 1 序列
轻链可变域	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQHYTTPPTFGQGTKVEIK	第 2 序列

[0129] 文库 LN01 及文库 LN02 利用从 1 个重链 CDR (CDRH3) 中随机化的残基制成, 文库 LN03 及文库 LN04 利用从 1 个轻链 CDR (CDRL3) 中随机化的残基制成。并且, 文库 LN05、文库 LN06 及文库 LN07 利用从 2 个轻链 CDR (CDRL2、CDRL3) 及重链 CDR3 中随机化的残基制成。将随机化的特定残基表示在表 3 中。CDR 位置根据卡巴特命名法进行编号。将通过易错聚合酶链式反应制成的 CDR 和包含构架区的文库命名为 LN08。

[0130] 【表 3】

[0131]

文库	随机化的位置		
	CDRL2	CDRL3	CDRH3
LN01	—	—	95、96、97、98、100
LN02	—	—	100b、100c、101、102
LN03	—	89、90、91、92	—
LN04	—	93、95、96、97	—
LN05	50、51、52、54、55、56	93、95、96、97	95、96、97、98、100
LN06	50、51、52、54、55、56	93、95、96、97	100b、100c、101、102
LN07	50、51、52、54	93、96、97	96、97、98、100b、100c、101、102

[0132] 上述文库对大肠杆菌 XL1- 蓝 (200158, 美国斯特拉塔根 (Stratagene) 公司) (Sidhu et al. (2000) Methods Enzymol. 328:333-363) 进行电穿孔, 使转化的细胞在 Ex12 辅助噬菌体 (韩国 IG 治疗 (therapy) 公司) 的存在下通宵生长, 从而将噬菌粒 DNA 荚膜化, 并在该噬菌粒 DNA 的表面上生产了展示 scFv 片段的噬菌体粒子。各文库包含大于 5 × 10⁸ 个的成员。

[0133] 【实施例 2: 从文库选择 ErbB2 特异性抗体】

[0134] 从实施例 1 的抗体文库筛选了 ErbB2 特异性抗体。在 4°C 温度下利用捕捉靶 (2 μg/ml), 通宵涂敷了 NUNC 96- 孔 Maxisorp 免疫板, 并利用超级块 Tris 缓冲盐水 (Superblock Tris buffered saline, 皮尔斯公司 (Pierce)) 阻断了 2 小时。在 37°C 温度下通宵生长后, 利用 PEG/NaCl 进行沉淀, 浓缩噬菌体, 并重新悬浮于超级块 Tris 缓冲盐水和 0.05% 吐温 (Tween) 20 (希格玛 (Sigma) 公司)。之后, 将噬菌体溶液 (约 10¹² 噬菌体 / ml) 添加于涂敷的免疫板。为了噬菌体的结合, 培养 2 小时之后, 利用磷酸盐缓冲液 (PBS)、0.05% 吐温 20 将板清洗了 10 次。利用 0.1M 的甘氨酸 (pH2.2) 来洗脱结合的噬菌体 10 分钟, 并利用 1M 的 Tris/Cl (pH9.0) 中和了洗脱液。使洗脱的噬菌体在大肠杆菌 XL1- 蓝中扩增。

[0135] 母源抗体的 KD 值为皮摩尔水平, 是与抗原的亲和力非常高的水平, 因而难以筛选亲和力得到提高的抗体。因此, 本发明人为了筛选亲和力高于母源抗体的抗体而使用了大致 3 种方法。作为第一个方法, 将清洗时间处理至最大 44 小时, 从而筛选解离率 (off-rate) 得到提高的抗体 (Chen et al. J Mol Biol. 293:865-81 (1999))。作为第二个方法, 使用了在使用 0.1M 的甘氨酸 (pH2.2) 来执行预-洗脱 (pre-elution) 过程之后, 最终进行洗脱 (Bruin et al. Nat Biotechnol. 17(4):397-9 (1999)) 的方法, 作为第三个方法, 使用了在洗脱之前, 处理硫氰酸铵 (ammonium thiocyanate), 从而去除了微弱地结合的抗体的方法 (Macdonald et al. J Immunol Methods 106:191-4 (1988); Wang et al. J Immunol

Methods. 241(1-2):171-84(2000);Hur et al. Immunol Lett. 134(1):55-61(2010))。

[0136] 在补充了羧苄青霉素及氨苄西林的 2YT 液体培养基 500 μ l 中,使通过上述实验选择的个别克隆在 96-孔格式中生长,并将培养上清液直接用于噬菌体 ELISA,从而检测出与用靶蛋白质涂敷的板相结合,但不与用牛血清白蛋白 (BSA) 涂敷的板相结合的噬菌体-展示的 scFv (图 2)。与涂敷牛血清白蛋白的板相比,涂敷靶蛋白质的板上的 OD 值为 0.5 以上,将即使处理 1.0M 的硫氰酸铵,也维持结合力的克隆定义为对 ErbB2 的特异性结合体(变异体)。在 4-5 次的反复实验后,筛选个别克隆,并从文库中筛选了对靶蛋白质 ErbB2 的结合体。

[0137] 分析了上述特异性结合体的 DNA 序列。根据分析结果,一个特异性结合体 (AH06) 根据基于卡巴特的编号赋予系统在母源抗体 4D5 的重链可变域的 98、100c、101 及 102 位置上确认了氨基酸被取代。根据除了上述 AH06 之外的结合体的序列的确认结果,确认了除了卡巴特残基 98、100c、101 及 102 之外,还在重链可变域中的卡巴特残基 41、96、97 或 100b、在轻链可变域中的卡巴特残基 50、51、52、53、54、72、91、93、96 或 97 位置的氨基酸被取代。

[0138] 为了寻找最佳的特异性结合体,将通过对被取代的各残基进行组合,来最终筛选的特异性结合体命名为 AH06、AH16、A058 及 A091。人源化抗体 AH06 的重链为人源化 4D5 抗体重链的变异体,包含 SEQ ID NO:2 及 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列。人源化抗体 AH16 包含 SEQ ID NO:2 及 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列。人源化抗体 A058 包含 SEQ ID NO:3 及 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列。人源化抗体 A091 包含 SEQ ID NO:6 及 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列。将上述抗体的重链及轻链可变域的氨基酸序列表示在表 4 中。并且,比较母源抗体 4D5 和上述抗体的重链及轻链可变域的氨基酸序列,并呈现在图 3 及图 4 中。

[0139] 【表 4】

[0140]

	氨基酸序列	序列表
重链可变域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCSRWGGWGFYAFALWGQGTLTVSS	第 3 序列
重链可变域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCSRWNAKGFYSFVHWGQGTLTVSS	第 4 序列
轻链可变域	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFSLTISSLPEDFATYYC QQHYQTPASFGQGTKVEIK	第 5 序列
重链可变域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQARG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCSRWGGWGFYAFALWGQGTLTVSS	第 6 序列
轻链可变域	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKA PKLLIYTTTWPYSGVPSRFSGRSGTDFSLTISSLPEDFATYYC QQYYNTPVTFGQGTKVEIK	第 7 序列

[0141] 【实施例 3:抗 -ErbB2 抗体的轻链及重链整体基因表达载体的制备】

[0142] 为了将在实施例 2 中制备的 scFv 形态的人源化抗体的可变域基因制备成人源化抗体的整体基因,使用了 pCLS05 表达载体(韩国申请号第 2011-0056685 号)。首先,为了将上述抗体的重链可变域基因插入于表达载体 pCLS05,使重链可变域基因与限制酶 EcoRI/

XhoI (NEB, 美国) 在 37°C 温度下反应 2 小时并进行切割, 之后通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色确认了约 1.4kb 的基因片段。同样, 表达载体 pCLS05 也利用限制酶 EcoRI/XhoI 来进行切割, 从而确认了约 7.5kb 的切割的表达载体。之后, 利用 QIA 凝胶提取试剂盒 (美国凯杰 (Qiagen) 公司) 来回收各基因片段, 再利用 T4DNA 连接酶 (DNA ligase, Takara Holdings, 日本) 在 16°C 温度下反应一宿之后, 使大肠杆菌 DH5 α 转化, 从而获得了转化体。使获得的转化体在包含 100 μ g/ml 的氨苄西林的 LB 培养基中培养一宿后, 回收质粒, 之后通过序列分析确认了重链整体基因已插入于载体内。

[0143] 为了向包含人源化抗体的重链整体基因的上述 pCLS05 表达载体插入轻链整体基因, 使轻链整体基因与限制酶 HindIII/BamHI (NEB, 美国) 在 37°C 温度下反应 2 小时并进行切割, 之后通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色确认了约 0.7kp 的基因片段。同样, 表达载体 pCLS05 也利用限制酶 EcoRI/XhoI 进行切割, 从而确认了约 8.8Kb 的切割的表达载体。之后, 利用 QIA 凝胶提取试剂盒 (美国凯杰 (Qiagen) 公司) 来回收各基因片段后, 利用 T4DNA 连接酶 (Takara Holdings, 日本) 在 16°C 温度下反应一宿之后, 使大肠杆菌 DH5 α 转化, 从而获得了转化体。使获得的转化体在包含 100 μ g/ml 的氨苄西林的 LB 培养基中培养一宿后, 回收质粒, 之后通过序列分析确认了整体轻链基因已插入于载体内。

[0144] 【实施例 4: 用于人源化抗体的表达的 CHO 细胞的转化】

[0145] 为了测定人源化抗体的动物细胞中的活性, 利用在上述实施例 3 中分别制成的表达载体使 FreeStyle™ CHO-s 细胞 (#R800-07, 美国英杰 (Invitrogen) 公司) 转化。首先, 为了培养 CHO 细胞, 利用了向 FreeStyle™ CHO 表达 (Expression) 培养基 (美国英杰 (Invitrogen) 公司) 添加 8mM L-谷氨酰胺 (25030-081, Gibco, 美国) 的培养基。在供给 5% 二氧化碳的 37°C 培养基 (humidified CO₂ incubator) 中培养 2 天至 3 天的上述细胞之后, 在常温 (25°C) 条件下以 1200rpm 的速度离心分离 5 分钟, 从而回收了细胞。然后, 利用 0.4% 台盼蓝 (美国福禄克 (Fluka) 公司) 溶液, 对所回收的 CHO-s 细胞进行染色, 并利用血细胞计数器 (hemacytometer) 测定了细胞数。

[0146] 以使细胞浓度成为 5×10^5 cells/ml, 生存力 (viability) > 95% 的方式利用新的培养基传代培养了 CHO-s 细胞。使 132 μ g 的表达载体和 130 μ l 的 FreeStyle™ MAX Reagent (#16447-100, 美国英杰 (Invitrogen) 公司) 反应 10 分钟后, 与准备的细胞相混合, 并在 CO₂ 培养基 (37°C, 5% CO₂, 110rpm 速度的定轨振荡器 (Orbital shaker)) 中培养了 5 天。

[0147] 【实施例 5: 人源化抗体的纯化】

[0148] 以如下方式培养在上述实施例 4 中获得的转化体之后, 通过纯化抗体来获得人源化抗体。具体地, 在装在 500ml 的三角烧瓶的 100ml 的 FreeStyle™ CHO 表达 (Expression) 培养基中, 将 5×10^7 个的细胞在 5% CO₂、37°C 温度湿润培养基中培养了 5 天。回收上述细胞培养液并离心分离后, 通过进行过滤, 仅获得了包含抗体的培养液。并且, 为了在培养液中仅使抗体纯化, 以使具有 30mg 的人类 (human) IgG/ml 的结合力的树脂 (resin), 即单抗纯化凝胶 (Mabselect, 17-5199-01, 英国 GE 医疗 (GE Healthcare) 公司) 1ml 填充于一次性的色谱柱 (disposable chromatography column) (732-1010, BIO-RAD, 美国) 的方式使用。为了使抗体与蛋白质 A 相结合, 使表达抗体的上述细胞培养液通过单抗纯化凝胶柱之后, 并通过 0.1M 的柠檬酸钠 (Sodium Citrate) 缓冲液, 从

而溶出了与蛋白质-A相结合的人源化抗体。之后,以上述抗体回收液的1/10体积添加Tris-Cl(pH9.0)缓冲液,从而中和了抗体溶出液的pH。

[0149] 利用磷酸盐缓冲液(pH 7.4)对纯化的抗体进行了缓冲交换(buffer change)。利用磷酸盐缓冲液使作为MWC030000的VIVASPIN(Sartorius, Cat.No.VS2021)湿润(wetting)之后,放入纯化的抗体试样,并以3000rpm的速度在4℃温度下离心分离了30分钟。以成为5ml的方式向浓缩成0.5ml的试样添加10倍体积的磷酸盐缓冲液,并反复进行3次离心分离,由此实现1000倍以上的缓冲交换。

[0150] 使用NuPAGE Novex Bis-Tris Mini Gels 4~12%梯度(gradient)(Invitrogen, Cat.No.NP0321)确认了纯化的抗体的蛋白质。结果,如图5所示,可全部确认纯化的抗体的重链蛋白质带(50000Da(道尔顿,Dalton)分子量位置)及轻链蛋白质带(25000Da分子量位置)(图5)。

[0151] 【实施例6:测定对抗-ErbB2抗体的ErbB2的亲合力】

[0152] 测定了本发明的对抗-ErbB2抗体变异体的ErbB2的亲合度。首先,根据文献(Chen et al. J Mol Biol. 293(4):865-81(1999))获得了BIAcore数据。根据使用BIAcore™-2000表面等离子体共振系统(BIAcore, Inc.)来测定的结合及解离速率常数,计算出了对ErbB2的上述抗体变异体的结合亲合度。在M5传感器芯片的表面使用氨基耦合方法来固定了抗原(Analyt. Biochem. (1991)198:268-277)。使用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide)盐酸盐(EDC)及N-羟基丁二酰亚胺(NHS, N-Hydroxysuccinimide)来使生物传感器芯片活性化,使得ErbB2共价耦合。利用10mM的乙酸钠在pH4.8的条件下对ErbB2进行缓冲液交换,并稀释成约30μg/ml。以5μl/分钟的流速注入ErbB2分取液,从而实现了耦合的蛋白质的约250-300反应单元(RU)。注入1M的乙醇胺溶液作为阻断剂。为了药动学测定,以100、50、25、12.5、6.25及3.125nM稀释并使用,而且从低浓度开始依次注入。以10μl/分钟的流速注入5分钟并进行结合,经30分钟的时间注入电泳缓冲液进行解离。以k_{off}/k_{on}计算了来自表面等离子体共振的测定的平衡解离常数、K_D值。以归纳方式将BIAcore™数据表示在表5中。

[0153] 【表5】

[0154]

	结合常数 (k _{on} , 1/Ms)	解离常数 (k _{off} , 1/s)	对抗原的亲合度 (K _D , M)
4D5	2.09 × 10 ⁵	8.82 × 10 ⁻⁵	4.22 × 10 ⁻¹⁰
D98W	3.97 × 10 ⁵	8.89 × 10 ⁻⁵	2.24 × 10 ⁻¹⁰
AH06	8.80 × 10 ⁵	4.42 × 10 ⁻⁵	5.02 × 10 ⁻¹¹
AH16	4.04 × 10 ⁵	1.20 × 10 ⁻⁴	2.97 × 10 ⁻¹⁰
A058	5.22 × 10 ⁵	2.78 × 10 ⁻⁴	5.33 × 10 ⁻¹⁰
A091	6.44 × 10 ⁵	6.88 × 10 ⁻⁴	1.07 × 10 ⁻⁹

[0155] 如表5所示,报告在文献(Resi et al. (2002)21:851-862)中的D98W变异体的

亲和度的 K_D 值为 224pM, 这与母源抗体 4D5 的 K_D 值 422pM 相比, 提高了约 2 倍, 但本发明的抗 -ErbB2 抗体变异体 AH06 的 K_D 值为 50.2pM, 这与母源抗体 4D5 相比, 呈现出提高 8 倍的亲和度。并且, 本发明的 AH16 的 K_D 值为 297pM, 这与母源抗体 4D5 相比, 呈现出提高约 2 倍的亲和度 (表 5)。

[0156] 这种结果表示本发明的 4D5 变异体与作为母源抗体的 4D5 相比, 对抗原的亲和度得到显著改善。

[0157] 【实施例 7: 抗 -ErbB2 抗体的生物体外细胞增殖抑制活性试验】

[0158] 为了确认各抗 -ErbB2 抗体变异体的 ErbB2 介导的疾病抑制效果, 使用胃癌细胞株 NCI-N87 细胞 (ATCC 登录号 CRL-5822), 来试验了抗体的细胞增殖抑制能力。为了评价细胞增殖抑制活性, 在使用 0.05% 胰蛋白酶 -EDTA 使 NCI-N87 细胞解吸之后, 以成为 0.75×10^4 cells/ml 浓度的方式悬浮于培养基, 从而以 0.1ml 接种于 96-孔细胞培养用板。接种之后, 在 37°C、5% CO_2 条件下, 以使细胞附着的方式进行培养, 并在细胞中处理了人源化抗体。以 10、1、0.1、0.01 及 0.001 μ g/ml 浓度处理了抗体, 且当处理抗体时, 使用了 RPMI1640/2% FBS 培养基。在培养约 6 天之后, 处理 WST-8 (同仁化学研究所 (Dojindo)), 来进行 3-4 小时的显色反应, 之后测定了 450nm 的波长值。

[0159] 将对 NCI-N87 细胞的抗 -ErbB2 抗体变异体及 4D5 抗体的细胞增殖抑制活性表示在图 6-图 8 中。如图 7 及图 8 所示, 本发明的抗 -ErbB2 抗体变异体相对于母源抗体 4D5, 细胞增殖抑制活性增加约 3.5 倍。相反, 在上述实施例 6 中, 相对于母源抗体 4D5 的亲和度提高 2 倍左右的 D98W 的细胞增殖抑制活性止步于相对 4D5 呈现出等同水平的活性 (图 6)。具体地, 本发明的 A091 的 IC_{50} 为 10.3nM (4D5 的 IC_{50} 为 25.4nM), 这与 4D5 相比提高了约 2 倍功效, 对 A058 的 IC_{50} 为 4.3nM (对 4D5 的 IC_{50} 为 10.4nM), 这与 4D5 相比提高了约 2.5 倍功效 (图 7)。并且, 对 AH06 的 IC_{50} 为 3.4nM (对 4D5 的 IC_{50} 为 11.6nM), 这与 4D5 相比提高约 3.5 倍功效 (图 8)。

[0160] 这种结果表示本发明的 4D5 变异体与母源抗体 4D5 及在文献中所公开的 D98W 相比, 亲和度和细胞增殖抑制活性均显著提高。

[0161] 以上, 详细记述了本发明的特定部分, 能够明确的是, 对于本发明所属技术领域的普通技术人员而言, 这种具体记述仅属于优选实例, 本发明的范围并不局限于此。因此, 本发明的实质性的范围根据所附的发明要求保护范围和与其等同的技术方案来定义。

[0001]

序列表

<110> Chongkundang
 <120> 抗-ErbB2抗体变异体
 <130> PP130038
 <150> KR 10-2012-0048805
 <151> 2012-05-08
 <160> 20
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 4D5的VH 氨基酸序列
 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 2
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 4D5的VL 氨基酸序列
 <400> 2
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro

[0002]

	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	100	105	
<210>	3		
<211>	120		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	4D5 变体的VH 氨基酸序列		
<400>	3		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	1	5	10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr	20	25	30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35	40	45
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr	65	70	75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
Ser Arg Trp Gly Gly Trp Gly Phe Tyr Ala Phe Ala Leu Trp Gly Gln	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	115	120	
<210>	4		
<211>	120		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	4D5 变体的VH 氨基酸序列		
<400>	4		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	1	5	10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr	20	25	30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35	40	45
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr	65	70	75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
Ser Arg Trp Asn Ala Lys Gly Phe Tyr Ser Phe Val His Trp Gly Gln	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	115	120	

[0003]

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 4D5 变体的VL 氨基酸序列

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

 <210> 6
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 4D5 变体的VH 氨基酸序列

 <400> 6
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Trp Gly Phe Tyr Ala Phe Ala Leu Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 7
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 4D5 变体的VL 氨基酸序列

[0004]

<400> 7
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Thr Thr Thr Trp Pro Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Thr Pro Val
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 8
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 接头序列

<400> 8
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser
 1 5 10

<210> 9
 <211> 88
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> LN01_引物

<400> 9
 actagtgcta ctcacggcca ccagagtcc ctgtcccag taatccatgg cgtamngcc 60
 mmmmmmmmm nntctagagc agtagtac 88

<210> 10
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> LN02_引物

<400> 10
 actagtgcta ctcacggcca ccagagtcc ctgtcccacm mmmmmmmmm ngtagaagcc 60
 atcacc 66

<210> 11
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> LN03_引物

[0005]

<400> 11 gacttcgcta cgtactactg cnnknknknk nmkaccaactc ctccgac	47
<210> 12 <211> 62 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> LN04_F引物	
<400> 12 gacttcgcta cgtactactg ccaacagcac tacnkkactn nknknknktt cggacaaggc ac	60 62
<210> 13 <211> 56 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> LN05_R引物	
<400> 13 tgaatctaga tggcacacccm nnnnnnnnga amnnnnnnnn gtagatcage agettc	56
<210> 14 <211> 56 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> LN06_R引物	
<400> 14 tgaatctaga tggcacacccm nnnnnnnncc amnnnnnnnn gtagatcage agettc	56
<210> 15 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> LN0506_F引物	
<400> 15 ggtgtgcat ctagattcag tg	22
<210> 16 <211> 88 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> LN07_R引物	
<400> 16 actagtcta ctcaaggtea ccagagltcc ctgtccccag taatccatnn ngtamngcc nnnnnnnnnn nntctagage agtagtac	60 88
<210> 17 <211> 17 <212> DNA	

[0006]

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	LR引物	
<400>	17	
	gcgcgtact caeggtc	17
<210>	18	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	LF引物	
<400>	18	
	ggcccaggcg gccgatatec agatgac	27
<210>	19	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	HF引物	
<400>	19	
	gagctcatgg atatccagat gaccagag	29
<210>	20	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	HR引物	
<400>	20	
	gcgcgtact cacggtc	17

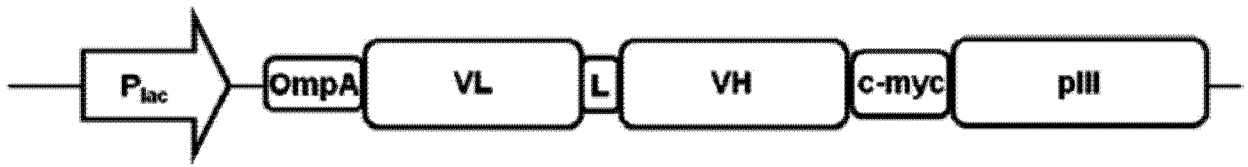


图 1

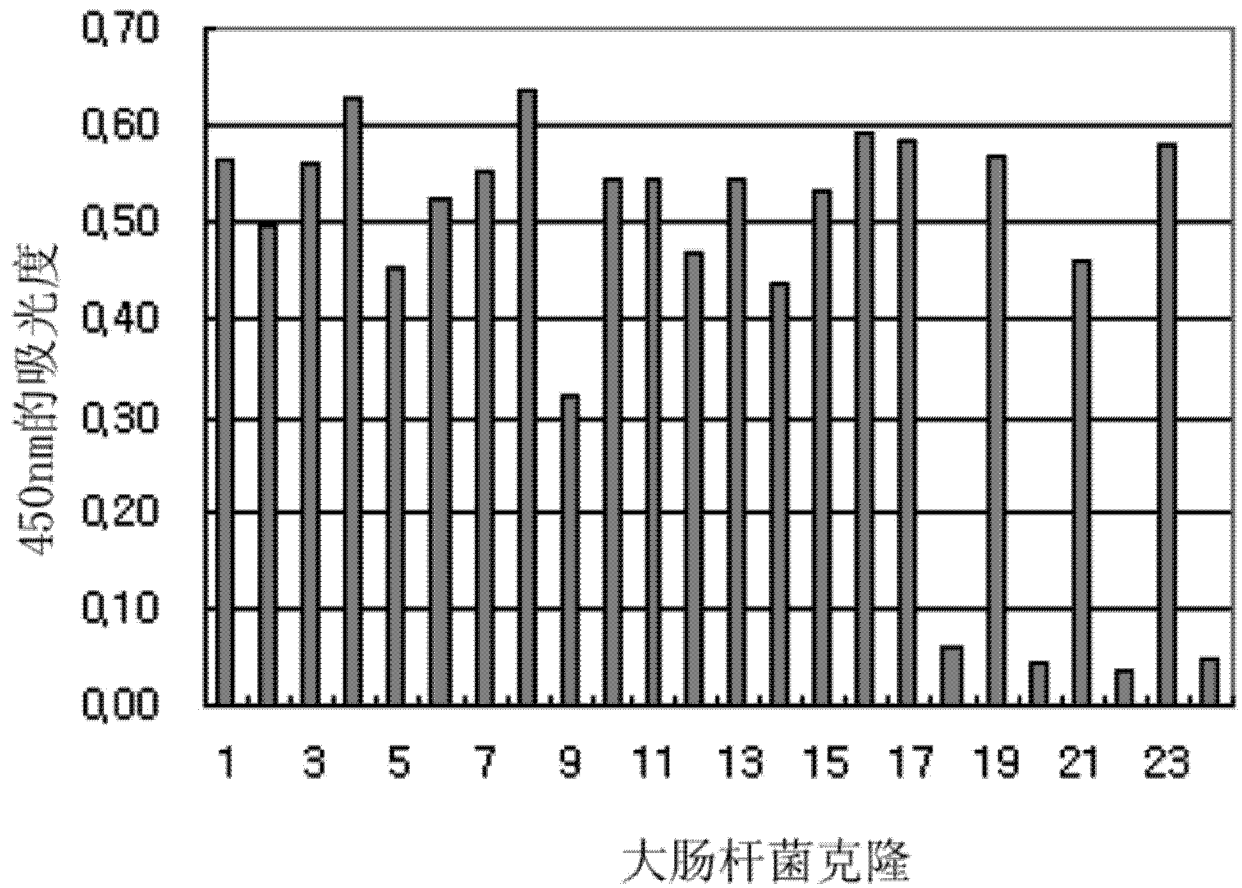


图 2

SEQ ID NO:1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDITYIHWVRQAPGKGLEWVAR YPTNGYTRY	60
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDITYIHWVRQAPGKGLEWVAR YPTNGYTRY	
SEQ ID NO:3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDITYIHWVRQAPGKGLEWVAR YPTNGYTRY	60
	ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGGFYAMDYWGQGTLLTVSS	120
	ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGG GFYA WGGGTLTVSS	
	ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGGFYAFALWGQGTLLTVSS	120
SEQ ID NO:1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDITYIHWVRQAPGKGLEWVAR YPTNGYTRY	60
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDITYIHWVRQAPGKGLEWVAR YPTNGYTRY	
SEQ ID NO:4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDITYIHWVRQAPGKGLEWVAR YPTNGYTRY	60
	ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGGFYAMDYWGQGTLLTVSS	120
	ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GFY+ +WGGGTLTVSS	
	ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWNKGFYSFVHWGGGTLTVSS	120
SEQ ID NO:1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDITYIHWVRQAPGKGLEWVAR YPTNGYTRY	60
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDITYIHWVRQA GKGLEWVAR YPTNGYTRY	
SEQ ID NO:6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDITYIHWVRQARGKLEWVAR YPTNGYTRY	60
	ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGGFYAMDYWGQGTLLTVSS	120
	ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGG GFYA WGGGTLTVSS	
	ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGGFYAFALWGQGTLLTVSS	120

图 3

SEQ ID NO:2 DIQMTQSPSSLASVGRVT | TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS 60
 DIQMTQSPSSLASVGRVT | TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
 SEQ ID NO:5 DIQMTQSPSSLASVGRVT | TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS 60
 DIQMTQSPSSLASVGRVT | TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS

RFSGRSRSGTDFLT | SSLQPEDFATYCCQHYTTPPTFGGQTKVEIK 107
 RFSGRSRSGTDFLT | SSLQPEDFATYCCQHY TP +FGGQTKVEIK
 RFSGRSRSGTDFLT | SSLQPEDFATYCCQHYQTPASFGGQTKVEIK 107

SEQ ID NO:2 DIQMTQSPSSLASVGRVT | TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS 60
 DIQMTQSPSSLASVGRVT | TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIY+ ++ YSGVPS
 SEQ ID NO:7 DIQMTQSPSSLASVGRVT | TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYTTTWPYSGVPS 60
 DIQMTQSPSSLASVGRVT | TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYTTTWPYSGVPS

RFSGRSRSGTDFLT | SSLQPEDFATYCCQHYTTPPTFGGQTKVEIK 107
 RFSGRSRSGTDF+LT | SSLQPEDFATYCCQ+Y TP TFGGQTKVEIK
 RFSGRSRSGTDFSLT | SSLQPEDFATYCCQYNTPTVTFGGQTKVEIK 107

图 4

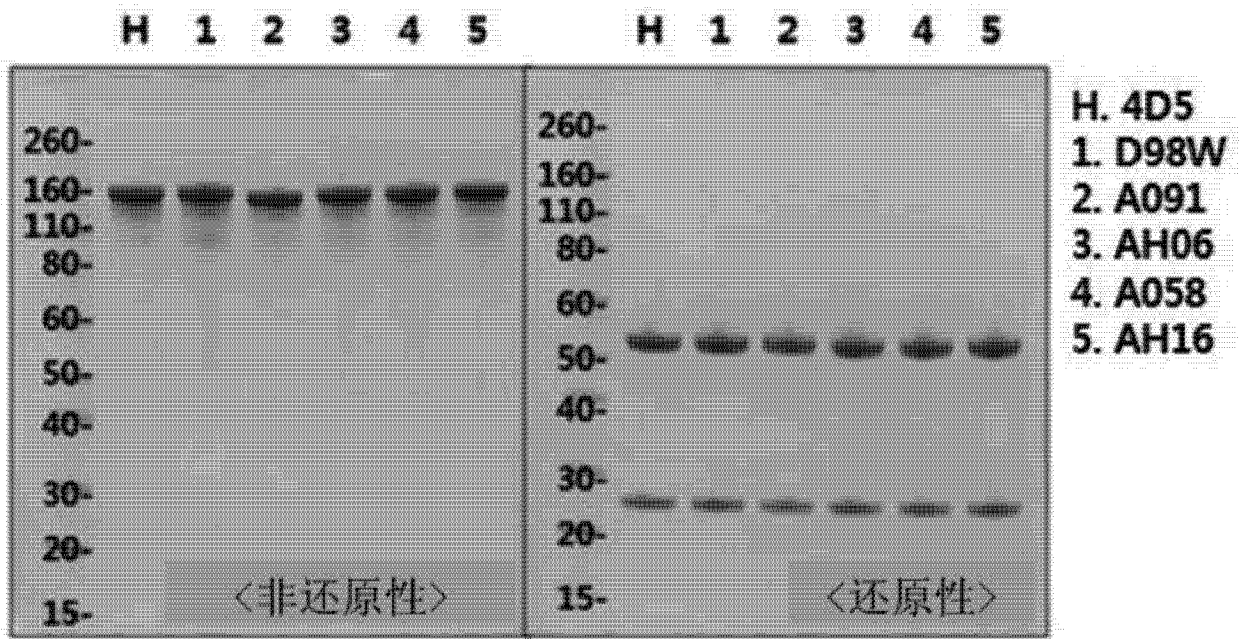


图 5

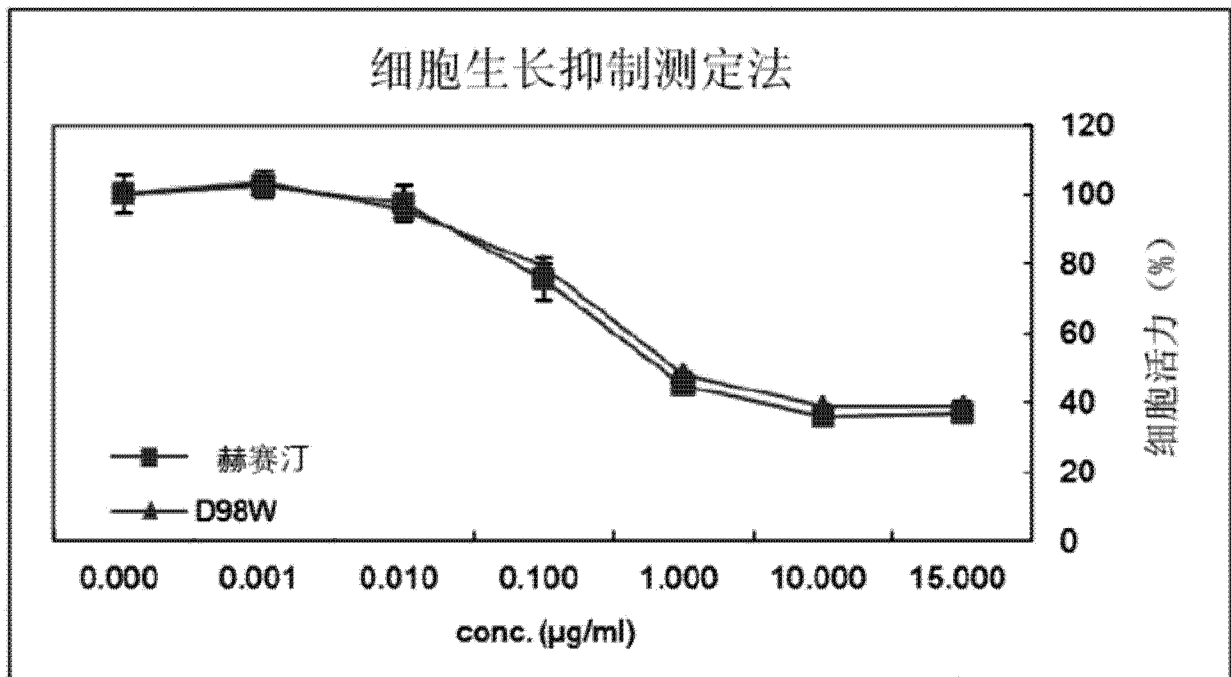


图 6

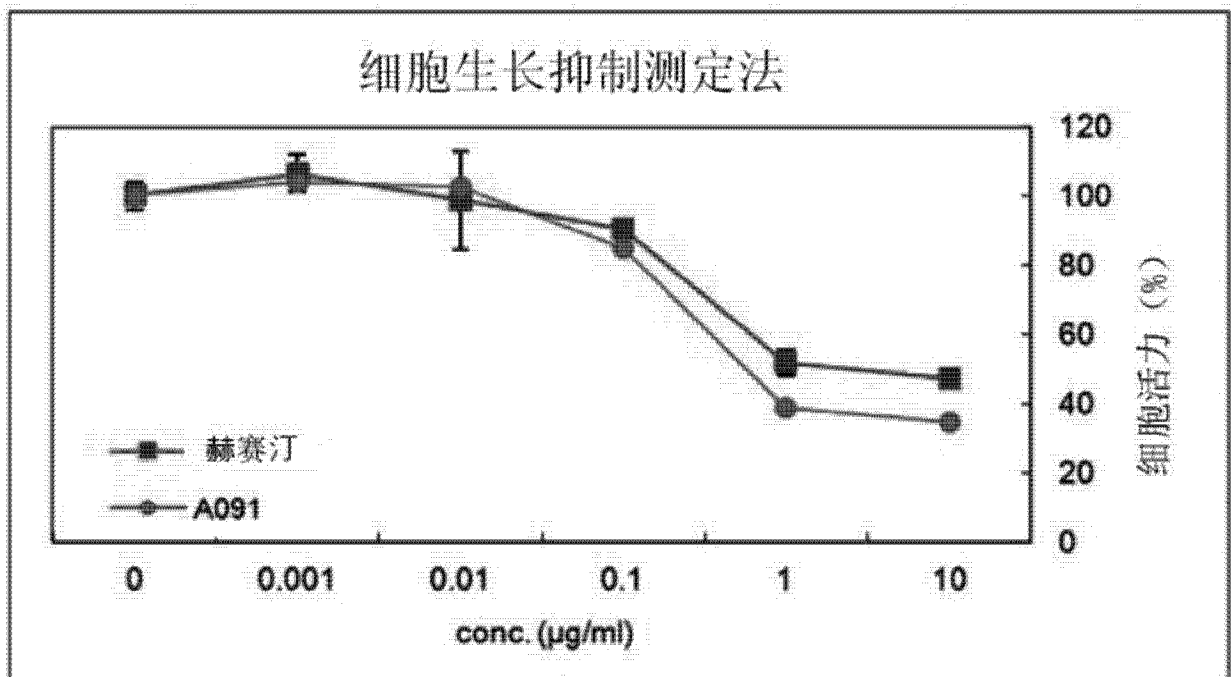
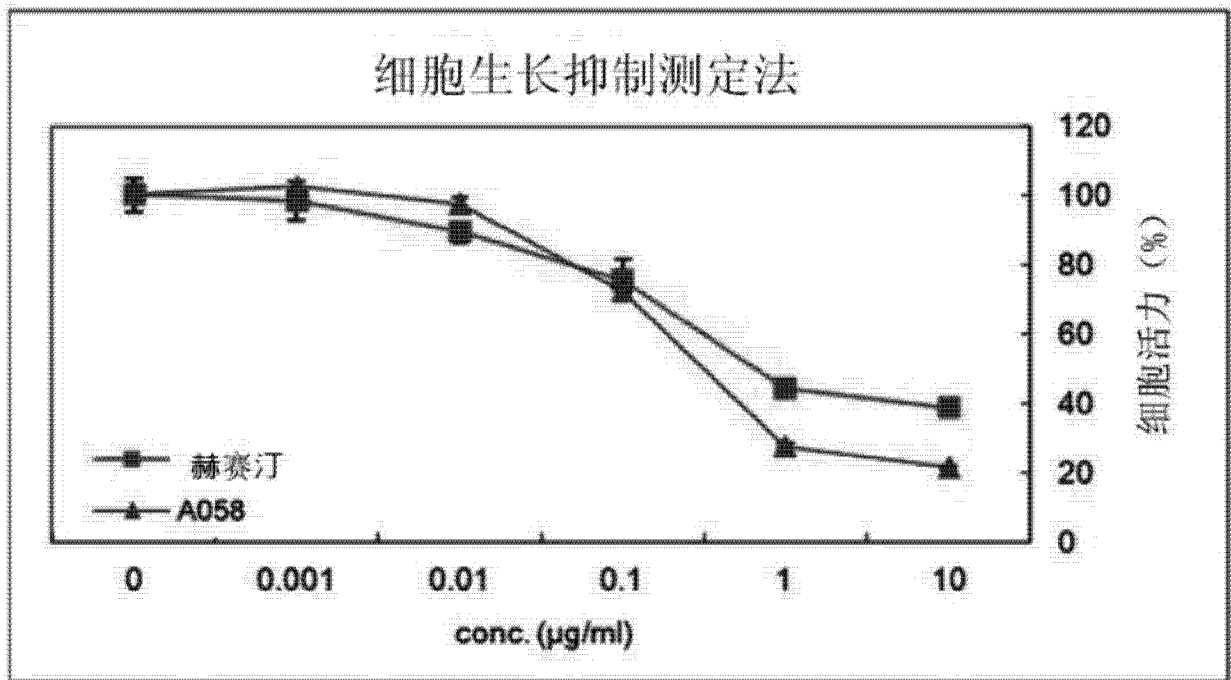


图 7

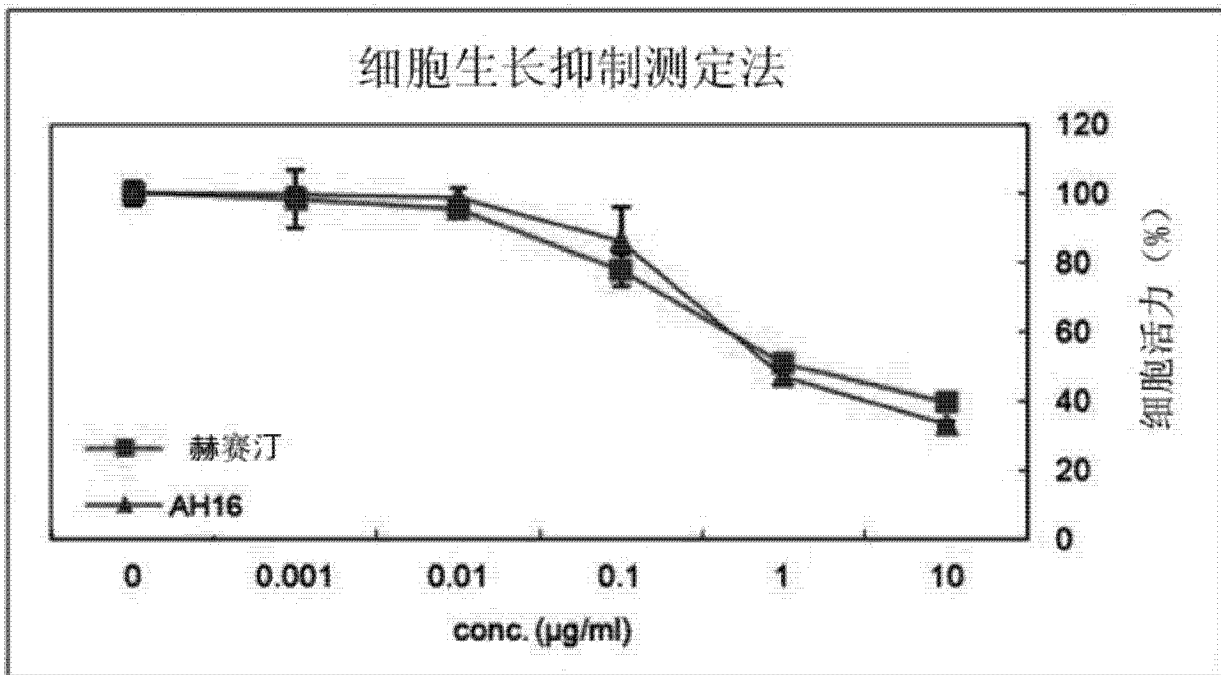
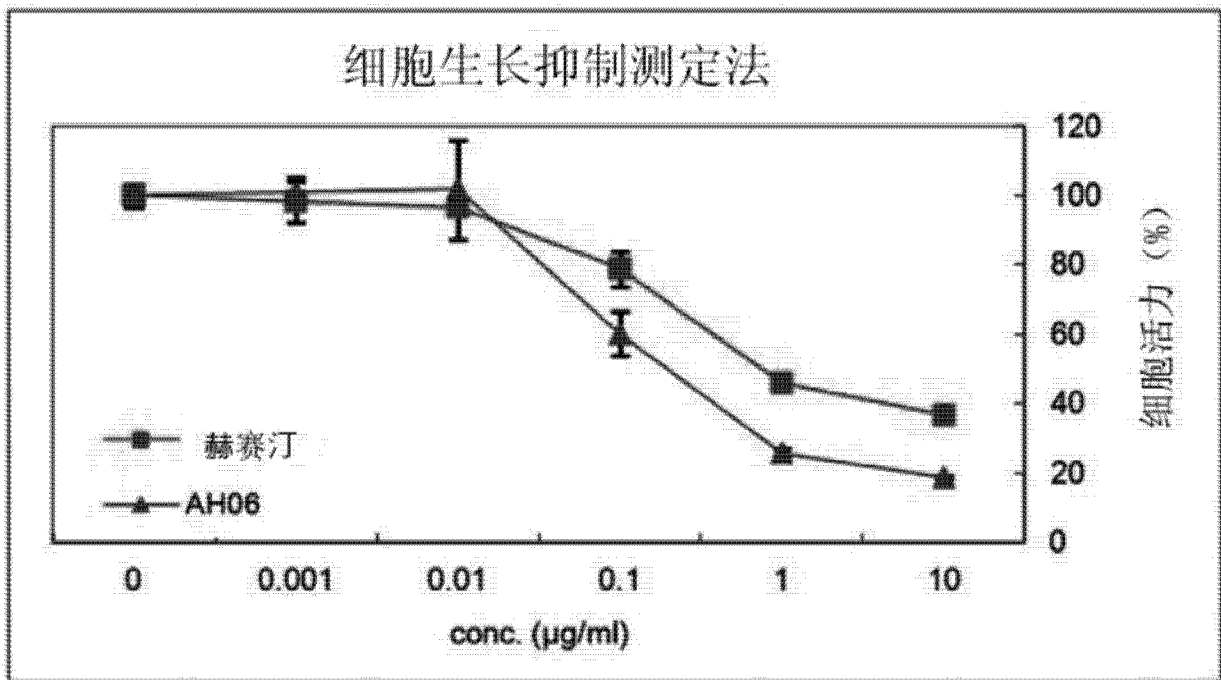


图 8