

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/00

C07K 16/00 C07K 16/28

C12N 15/11 C12N 15/00

A61K 39/395

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00805856.3

[43] 公开日 2002 年 4 月 17 日

[11] 公开号 CN 1345334A

[22] 申请日 2000.1.28 [21] 申请号 00805856.3

[30] 优先权

[32]1999.1.29 [33]US [31]09/240,736

[32]1999.1.29 [33]US [31]60/117,726

[86] 国际申请 PCT/US00/02180 2000.1.28

[87] 国际公布 WO00/44777 英 2000.8.3

[85] 进入国家阶段日期 2001.9.29

[71] 申请人 伊姆克罗尼系统公司

地址 美国纽约

[72] 发明人 Z·朱 L·维特

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 姜建成

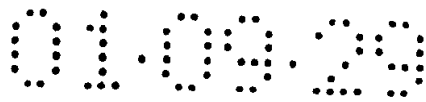
权利要求书 11 页 说明书 20 页 附图页数 11 页

[54] 发明名称 对 KDR 特异的抗体及其应用

[57] 摘要

本发明提供了一种与 SI(KDR)结合的,亲和性和人类 VEGF 可比的,能够中和 KDR 的激活的免疫球蛋白分子。免疫球蛋白分子包括单价单链抗体、多价单链抗体、双体(diabody)、三体(tribody)、抗体、人源化抗体和嵌合抗体。本发明进而提供了编码这些免疫球蛋白分子的核酸分子。本发明还提供了制备上述免疫球蛋白的方法。本发明进而提供了用这样的免疫球蛋白分子中和 KDR 激活的方法,在哺乳动物中抑制血管发生的方法和在哺乳动物中抑制肿瘤生长的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



权 利 要 求 书

1. 一种免疫球蛋白，它与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比，并且它中和 KDR 的激活。

2. 根据权利要求 1 的免疫球蛋白分子，其中该免疫球蛋白分子选自单链抗体，双体，三体或抗体。

3. 一种中和 KDR 的激活的单链抗体，其中该单链抗体含有至少一个重链可变片段，该重链可变片段包含：

CDRH1，具有 SEQ. ID. NO. 1 所列出的氨基酸序列；

CDRH2，具有 SEQ. ID. NO. 2 所列出的氨基酸序列；以及

10 CDRH3，具有 SEQ. ID. NO. 3 所列出的氨基酸序列；

以及至少一个轻链可变片段，该轻链可变片段包含：

CDRL1，具有 SEQ. ID. NO. 4 所列出的氨基酸序列；

CDRL2，具有 SEQ. ID. NO. 5 所列出的氨基酸序列；以及

CDRL3，具有 SEQ. ID. NO. 6 所列出的氨基酸序列。

15 4. 一种中和 KDR 的激活的单链抗体，其中该单链抗体含有：

至少一个重链可变片段，该片段具有 SEQ. ID. NO. 7 所列出的氨基酸序列；以及

至少一个轻链可变片段，该片段具有 SEQ. ID. NO. 8 所列出的氨基酸序列。

20 5. 一种编码权利要求 3 的单链抗体的核酸分子。

6. 权利要求 5 的核酸分子，其由：

SEQ. ID. NO. 9 所列出的编码 CDRH1 的核酸序列；

SEQ. ID. NO. 10 所列出的编码 CDRH2 的核酸序列；

SEQ. ID. NO. 11 所列出的编码 CDRH3 的核酸序列；

25 SEQ. ID. NO. 12 所列出的编码 CDRL1 的核酸序列；

SEQ. ID. NO. 13 所列出的编码 CDRL2 的核酸序列；

以及

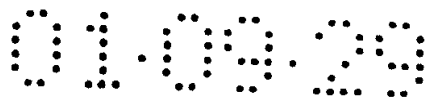
SEQ. ID. NO. 14 所列出的编码 CDRL3 的核酸序列组成。

7. 一种编码权利要求 4 的单链抗体的核酸分子。

30 8. 权利要求 7 的核酸分子，其由：

SEQ. ID. NO. 15 所列出的编码重链可变片段的核酸序列；以及

SEQ. ID. NO. 16 所列出的编码轻链可变片段的核酸序列组成。



9. 权利要求 3 的单链抗体, 其中重链可变片段和轻链可变片段通过至少一个肽接头共价地连接在一起。

10. 权利要求 9 的单链抗体, 其中肽接头含有至少 15 个氨基酸。

5 11. 权利要求 9 的单链抗体, 其中肽接头含有 SEQ. ID. NO. 17 所列出的氨基酸序列。

12. 一种编码权利要求 11 的肽接头的核酸分子。

13. 权利要求 12 的核酸分子, 其由 SEQ. ID. NO. 18 所列出的编码肽接头的核酸序列组成。

10 14. 一种中和 KDR 的激活的双体, 其中该双体含有至少一个重链可变片段, 该重链可变片段包含:

CDRH1, 具有 SEQ. ID. NO. 1 所列出的氨基酸序列;

CDRH2, 具有 SEQ. ID. NO. 2 所列出的氨基酸序列; 以及

CDRH3, 具有 SEQ. ID. NO. 3 所列出的氨基酸序列;

以及至少一个轻链可变片段, 该轻链可变片段包含:

15 CDRL1, 具有 SEQ. ID. NO. 4 所列出的氨基酸序列;

CDRL2, 具有 SEQ. ID. NO. 5 所列出的氨基酸序列; 以及

CDRL3, 具有 SEQ. ID. NO. 6 所列出的氨基酸序列。

15. 一种中和 KDR 的激活的双体, 其中该双体含有:

一个重链可变片段, 它具有 SEQ. ID. NO. 7 所列出的氨基酸序列;

20 以及

一个轻链可变片段, 它具有 SEQ. ID. NO. 8 所列出的氨基酸序列。

16. 一种编码权利要求 14 的双体的核酸分子。

17. 权利要求 16 的核酸分子, 其由:

SEQ. ID. NO. 9 所列出的编码 CDRH1 的核酸序列;

25 SEQ. ID. NO. 10 所列出的编码 CDRH2 的核酸序列;

SEQ. ID. NO. 11 所列出的编码 CDRH3 的核酸序列;

SEQ. ID. NO. 12 所列出的编码 CDRL1 的核酸序列;

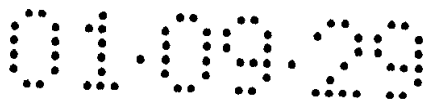
SEQ. ID. NO. 13 所列出的编码 CDRL2 的核酸序列;

以及

30 SEQ. ID. NO. 14 所列出的编码 CDRL3 的核酸序列组成。

18. 一种编码权利要求 15 的双体的核酸分子。

19. 权利要求 18 的核酸分子, 其由:



SEQ. ID. NO. 15 所列出的编码重链可变片段的核酸序列；以及
SEQ. ID. NO. 16 所列出的编码轻链可变片段的核酸序列组成。

20. 权利要求 14 的双体，其中重链可变片段和轻链可变片段通过至少一个肽接头共价地连接在一起。

5 21. 权利要求 20 的双体，其中肽接头含有至少 5 个氨基酸并且不多于 10 个氨基酸。

22. 权利要求 21 的双体，其中肽接头含有 SEQ. ID. NO. 19 所列出的氨基酸序列。

23. 一种编码权利要求 22 的肽接头的核酸分子。

10 24. 权利要求 23 的核酸分子，其由编码 SEQ. ID. NO. 20 所列出的肽接头的核酸序列组成。

25. 权利要求 14 的双体，其中所述的双体是单一特异性的。

26. 权利要求 14 的双体，其中所述的双体是双特异性的并且该双体与 KDR 上至少一个表位结合。

15 27. 一种中和 KDR 的激活的三体，其中该三体含有至少一个重链可变片段，该重链可变片段包含：

CDRH1，具有 SEQ. ID. NO. 1 所列出的氨基酸序列；

CDRH2，具有 SEQ. ID. NO. 2 所列出的氨基酸序列；以及

CDRH3，具有 SEQ. ID. NO. 3 所列出的氨基酸序列；

20 以及至少一个轻链可变片段，该轻链可变片段包含：

CDRL1，具有 SEQ. ID. NO. 4 所列出的氨基酸序列；

CDRL2，具有 SEQ. ID. NO. 5 所列出的氨基酸序列；以及

CDRL3，具有 SEQ. ID. NO. 6 所列出的氨基酸序列。

28. 一种中和 KDR 的激活的三体，其中该三体含有：

25 至少一个重链可变片段，它具有 SEQ. ID. NO. 7 所列出的氨基酸序列；以及

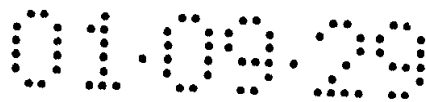
至少一个轻链可变片段，它具有 SEQ. ID. NO. 8 所列出的氨基酸序列。

29. 一种编码权利要求 27 的三体的核酸分子。

30 30. 权利要求 29 的核酸分子，其由：

SEQ. ID. NO. 9 所列出的编码 CDRH1 的核酸序列；

SEQ. ID. NO. 10 所列出的编码 CDRH2 的核酸序列；



SEQ. ID. NO. 11 所列出的编码 CDRH3 的核酸序列;
SEQ. ID. NO. 12 所列出的编码 CDRL1 的核酸序列;
SEQ. ID. NO. 13 所列出的编码 CDRL2 的核酸序列;
以及

5 SEQ. ID. NO. 14 所列出的编码 CDRL3 的核酸序列组成。

31. 一种编码权利要求 28 的三体的核酸分子。

32. 权利要求 31 的核酸分子, 其由:

SEQ. ID. NO. 15 所列出的编码重链可变片段的核酸序列; 以及
SEQ. ID. NO. 16 所列出的编码轻链可变片段的核酸序列组成。

10 33. 权利要求 27 的三体, 其中所述的三体是单一特异性的。

34. 权利要求 27 的三体, 其中所述的三体是双特异性的并且该
三体与 KDR 上至少一个表位结合。

35. 权利要求 27 的三体, 其中所述的三体是三特异性的并且该
三体与 KDR 上至少一个表位结合。

15 36. 一种中和 KDR 的激活的抗体, 其中该抗体含有至少一个重链
可变片段, 该重链可变片段包含:

CDRH1, 具有 SEQ. ID. NO. 1 所列出的氨基酸序列;

CDRH2, 具有 SEQ. ID. NO. 2 所列出的氨基酸序列; 以及

CDRH3, 具有 SEQ. ID. NO. 3 所列出的氨基酸序列;

20 以及至少一个轻链可变片段, 该轻链可变片段包含:

CDRL1, 具有 SEQ. ID. NO. 4 所列出的氨基酸序列;

CDRL2, 具有 SEQ. ID. NO. 5 所列出的氨基酸序列; 以及

CDRL3, 具有 SEQ. ID. NO. 6 所列出的氨基酸序列。

37. 一种中和 KDR 的激活的抗体, 其中该抗体含有:

25 一个重链可变片段, 它具有 SEQ. ID. NO. 7 所列出的氨基酸序列;
以及

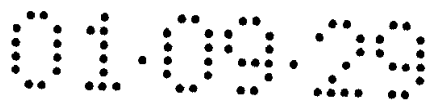
一个轻链可变片段, 它具有 SEQ. ID. NO. 8 所列出的氨基酸序列。

38. 一种编码中和 KDR 的激活的抗体的核酸分子, 该核酸分子含
有:

30 SEQ. ID. NO. 9 所列出的编码 CDRH1 的核酸序列;

SEQ. ID. NO. 10 所列出的编码 CDRH2 的核酸序列;

SEQ. ID. NO. 11 所列出的编码 CDRH3 的核酸序列;



SEQ. ID. NO. 12 所列出的编码 CDRL1 的核酸序列;

SEQ. ID. NO. 13 所列出的编码 CDRL2 的核酸序列;

以及

SEQ. ID. NO. 14 所列出的编码 CDRL3 的核酸序列。

5 39. 一种编码中和 KDR 的激活的抗体的核酸分子, 该核酸分子含有:

SEQ. ID. NO. 15 所列出的编码重链可变片段的核酸序列; 以及

SEQ. ID. NO. 16 所列出的编码轻链可变片段的核酸序列。

40. 一种含有权利要求 36 的抗体的嵌合抗体。

10 41. 一种含有权利要求 36 的抗体的人源化抗体。

42. 一种制备免疫球蛋白的方法, 该免疫球蛋白与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比, 并且中和 KDR 的激活, 该方法包括:

在宿主细胞中插入编码该免疫球蛋白分子的核酸序列, 以及表达该核酸序列。

15 43. 一种中和 KDR 的激活的方法包括:

对哺乳动物施用有效量的免疫球蛋白分子, 该免疫球蛋白分子与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比, 并且中和 KDR 的激活。

44. 一种减缓肿瘤生长的方法包括:

20 对哺乳动物施用有效量的免疫球蛋白分子, 该免疫球蛋白分子与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比, 并且中和 KDR 的激活。

45. 一种抑制血管发生的方法包括:

对哺乳动物施用有效量的免疫球蛋白分子, 该免疫球蛋白分子与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比, 并且中和 KDR 的激活。

25 46. 一种制备单链抗体方法, 该单链抗体与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比并且中和 KDR 的激活, 该方法包括:

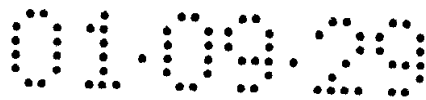
在宿主细胞中插入编码该单链抗体的核酸序列, 以及表达该核酸序列。

47. 一种中和 KDR 的激活的方法包括:

30 对哺乳动物施用有效量的单链抗体, 该单链抗体与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比, 并且中和 KDR 的激活。

48. 一种减缓肿瘤生长的方法包括:

对哺乳动物施用有效量的单链抗体, 该单链抗体与 KDR 结合的亲



和性可与人 VEGF 相比，并且中和 KDR 的激活。

49. 一种抑制血管发生的方法包括：

对哺乳动物施用有效量的单链抗体，该单链抗体与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比，并且中和 KDR 的激活。

5 50. 一种制备双体的方法，该双体与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比，并且中和 KDR 的激活，该方法包括：

在宿主细胞中插入编码该双体的核酸序列，以及表达该核酸序列。

51. 一种中和 KDR 的激活的方法包括：

10 对哺乳动物施用有效量的双体，该双体与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比，并且中和 KDR 的激活。

52. 一种减缓肿瘤生长的方法包括：

对哺乳动物施用有效量的双体，该双体与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比，并且中和 KDR 的激活。

15 53. 一种抑制血管发生的方法包括：

对哺乳动物施用有效量的双体，该双体与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比，并且中和 KDR 的激活。

54. 一种制备三体的方法，该三体与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比，并且中和 KDR 的激活，该方法包括：

20 在宿主细胞中插入编码该三体的核酸序列，以及表达该核酸序列。

55. 一种中和 KDR 的激活的方法包括：

对哺乳动物施用有效量的三体，该三体与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比，并且中和 KDR 的激活。

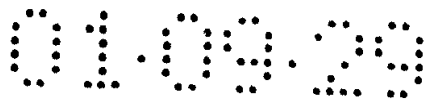
25 56. 一种减缓肿瘤生长的方法包括：

对哺乳动物施用有效量的三体，该三体与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比，并且中和 KDR 的激活。

57. 一种抑制血管发生的方法包括：

30 对哺乳动物施用有效量的三体，该三体与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比，并且中和 KDR 的激活。

58. 一种制备抗体的方法，该抗体与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比，并且中和 KDR 的激活，该方法包括：



在宿主细胞中插入编码该抗体的核酸序列，以及表达该核酸序列。

59. 一种中和 KDR 的激活的方法包括：

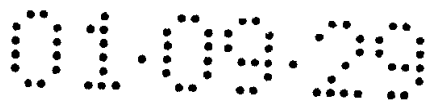
对哺乳动物施用有效量的抗体，该抗体与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比，并且中和 KDR 的激活。

60. 一种减缓肿瘤生长的方法包括：

对哺乳动物施用有效量的抗体，该抗体与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比，并且中和 KDR 的激活。

61. 一种抑制血管发生的方法包括：

10 对哺乳动物施用有效量的抗体，该抗体与 KDR 结合的亲和性可与人 VEGF 相比，并且中和 KDR 的激活。



说明书

对 KDR 特异的抗体及其应用

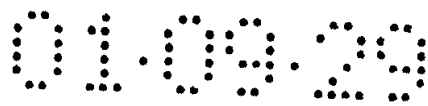
发明背景

5 血管发生是生成新的血管的过程。该过程涉及原先存在的血管的
毛细血管上皮细胞 (capillary endothelial cell) 的增殖、迁移和
组织浸润 (tissue infiltration)。血管发生在正常的生理过程中,
包括胚胎发育、卵泡生长和伤口愈合, 以及在涉及肿瘤的生长和转移
的病理条件下是很重要的 (Folkman, J. and Klagsbrun, M. Science
10 235:442-447(1987))。

在成人中, 血管内皮通常是静息的, 并且它在血管发生中的激活
受到严紧的控制。几个因子被认为可能是体内血管发生的调节者。这
些包括转化生长因子 (TGF β), 酸性和碱性纤维原细胞生长因子 (aFGF
和 bFGF), 血小板生长因子 (PDGF) 和血管内皮生长因子 (VEGF)
15 (Klagsbrun, M. and D'Amore, P. (1991), Annual rev. Physiol.
53: 217-239)。VEGF, 一种内皮细胞特异的分裂原, 显然是这些因
子中的一种, 因为它通过特异性地促进内皮细胞的增殖而作为血管发
生诱导因子发挥作用。

VEGF 是由两个结构上与 PDGF 类似的 23KD 亚基组成的同二聚体
20 糖蛋白。由于 mRNA 的不同剪接 (alternative splicing), 存在四
种不同的 VEGF 单体亚型。这些亚型包括两种膜结合形式亚型 (VEGF₂₀₆
和 VEGF₁₈₉) 和两种可溶形式亚型 (VEGF₁₆₅ 和 VEGF₁₂₁)。在除了胎盘
外的所有人类组织中, VEGF₁₆₅ 是最丰富的亚型。

VEGF 在胚胎组织中 (Breier et al., Development (Camb.)
25 114:521 (1992))、巨噬细胞中、伤口愈合中的增殖的上皮角化细
胞中 (Brown et al., J. Exp. Med., 176:1375(1992)) 表达, 并可
能对与炎症相关的组织水肿负责 (Ferrara et al., Endocr. Rev.
13:18 (1992))。原位杂交表明, 在许多人类肿瘤系中, 包括多形性
成胶质细胞瘤 (glioblastoma multiforme), 成血管细胞瘤, 中枢
30 神经系统瘤和 AIDS 相关的 Kaposi's 肉瘤中, VEGF 大量表达 (Plate,
K. et al. (1992) Nature 359:845-848; Plate, K. et al., (1993)
Cancer Res. 53: 5822-5827; Berkman, R. et al. (1993) J. Clin.



Invest. 91: 153-159; Nakamura, S et al. (1992) AIDS Weekly, 13 (1)). 在组织缺氧诱导的血管发生中也观察到了高水平的 VEGF (Shweiki, D et al. (1992) Nature 359: 843-845).

5 VEGF 的生物学应答是通过高亲和性的 VEGF 受体介导的, 该受体在胚胎发生 (Millauer, B., et al., (1993) Cell 72: 83-846) 和肿瘤形成过程中选择性地在内皮细胞上表达. VEGF 受体通常为 III 类受体类型的酪氨酸激酶, 其特征为在它们的氨基端细胞外受体 - 配基结合区域具有几个, 通常为 5 或 7 个, 类似免疫球蛋白的环 (Kaipainen et al., J. Exp. Med. 178: 2077-2088 (1993)).

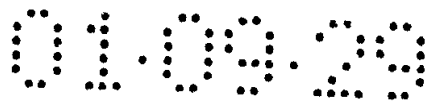
10 另外两个区域包括跨膜区域和羧基端的细胞内催化结构域, 催化结构域被一段不同长度的, 被称为激酶插入结构域的亲水性激酶内序列 (interkinase sequence) 的插入所中断 (Terman et al., Oncogene 6: 1677-1683 (1991)). VEGF 受体包括 FLT-1 (由 Shibuya M. et al. Oncogene 5, 519-524(1990) 所测序); KDR (含激酶插入结构域的受体, kinase insert domain-containing receptor), 在 1992

15 年 2 月 20 日归档的 PCT/US92/01300 中和在 Terman et al., Oncogene 6: 1677-1683 (1991) 中描述; 和 FLK-1, 由 Matthews W. et al. Proc. Acad. Sci. USA, 88:9026-9030 (1991) 测序. KDR 是小鼠 FLK-1 的人类同源物. KDR 和 FLK-1 也被称为 VEGFR2.

20 具有同源氨基酸序列的对等受体, 如上文所定义, 存在于所有的哺乳动物中, 例如, 人类, 小鼠. 与一种 VEGF 受体结合的抗体并不一定意味着和另一种 VEGF 受体结合, 与一种哺乳动物中的一种 VEGF 受体结合并不一定意味着和另一种哺乳动物中的对等受体结合.

有人提出 KDR 通路在人类肿瘤的血管发生中起着重要作用. VEGF 25 受体主要在内皮细胞和造血细胞上表达. 当肿瘤细胞合成和分泌 VEGF 后, VEGF 与 VEGFR2 受体结合并刺激新的血管的生长. 已经发现除非有专门的血液供应, 否则肿瘤的生长不能超过一定的大小.

在 PCT 申请 US95/01678 中描述了通过杂交瘤技术生产抗鼠 VEGF 受体 FLK-1 的单克隆抗体. 这些单克隆抗体被认为通过干扰 30 VEGF 和它的受体的相互作用而抑制受体的激活. 这些抗体被证明能特异性地抑制 VEGF 对转染的 3T3 细胞上表达的 FLI-1 受体的激活. 在体内, 它被表明能够通过抑制与肿瘤相关的血管发生而强烈抑制人



类成胶质细胞瘤异种移植物在裸鼠中的生长。

但是，不是所有与鼠受体 FLK-1 结合的抗体都能够以足够的亲和性与其人类同源物，KDR，反应，以成为可用于人类治疗用的，商业上可行的产品。因此，需要比现有技术中已知的抗体具有更高亲和性的抗 KDR 抗体。

本发明的目标为提供能够中和 VEGF 和其人类受体，KDR，之间的相互作用的高效力抗体，上述抗体的亲和性比现有技术中已知的抗体要高。

10 发明概述

通过提供与 KDR 结合的，亲和性与人类 VEGF 可比的并且能够中和 KDR 的激活的免疫球蛋白，已经达到了这些和其它目标，这对于本领域具有普通技术的人员将是显而易见的。

免疫球蛋白分子包括单价单链抗体，多价单链抗体，双体 (diabody)，三体 (triabody)，抗体，人源化抗体和嵌合抗体。

本发明进而提供了编码这些免疫球蛋白分子的核酸分子。

本发明还提供了制备上述免疫球蛋白的方法。本发明进而提供了用这样的免疫球蛋白分子，中和 KDR 激活的方法，在哺乳动物中抑制血管发生的方法和在哺乳动物中抑制肿瘤生长的方法。

20 缩写

VEGF，血管内皮细胞生长因子；bFGF，碱性成纤维细胞生长因子；KDR，含激酶插入结构域的受体（也称为 VEGF 受体 2）；FLK-1，胎肝激酶 1；scFv，单链 Fv；HUVEC，人脐静脉内皮细胞；PBS，0.01M 磷酸盐缓冲液（pH 7.2）；PBST，含有 0.1%吐温 20 的 PBS；AP，碱性磷酸酶；EGF，上皮细胞生长因子；V_H 和 V_L，分别为免疫球蛋白重链和轻链的可变区。

附图描述

图 1 是显示不同的 scFv 抗体（p1C11，p1F12，p2A6，和 p2A7）与固定的 KDR 直接结合的图。

图 2 是显示不同的 scFv 抗体（p1C11，p1F12，p2A6，和 p2A7）对 KDR 与固定的 VEGF₁₆₅ 的结合的抑制作用的图。

图 3 是显示 scFv 抗体 (p2A6 和 p1C11) 对 VEGF 诱导的 HUVEC 增殖的抑制作用的图。

图 4 是 c-p1C11 的 V_H 和 V_L 链的核苷酸序列和推导的氨基酸序列。

5 图 5 是显示抗体 (c-p1C11, p1C11, p2A6) 与固定的 KDR 直接结合的图。

图 6 是显示 c-p1C11 与表达 KDR 的 HUVEC 细胞结合的 FACS 分析的图。

图 7 是显示不同的 scFv 抗体 (c-p1C11, p1C11, p2A6) 对 KDR 受体与固定的 VEGF₁₆₅ 结合的抑制作用的图。

10 图 8 是显示 c-p1C11 和未标记 VEGF₁₆₅ 对放射性标记的 VEGF₁₆₅ 与固定的 KDR 受体结合的抑制作用的图。

图 9 是显示抗 KDR 抗体 (c-p1C11, p1C11) 对 VEGF 诱导的 HUVEC 增殖的抑制作用的图。

15 发明详述

本发明提供了与 KDR 的细胞外结构域特异结合的免疫球蛋白, 其亲和性可以与 VEGF 相比。这种结合的结果是, 与先前描述的免疫球蛋白分子相比, 该免疫球蛋白可以更有效地中和对受体的激活。VEGF 受体的细胞外结构域在本文定义为在该受体的细胞外区域的配基结合结构域。

20 免疫球蛋白分子是识别并结合特定抗原或物质的蛋白。免疫球蛋白分子包括天然存在的抗体, 单价单链抗体, 多价单链抗体, 双体, 三体, 嵌合抗体, 人源化抗体和其它与抗原特异结合的分子。

本发明的免疫球蛋白分子与 KDR 结合的亲和性可以和天然配基相比。亲和性, 由抗原和免疫球蛋白分子结合的平衡常数 (K) 表示, 25 度量了抗原决定簇和免疫球蛋白分子结合的程度, 而与结合位点的数量无关。抗原决定簇, 也被称为表位, 是在抗原上的特定免疫球蛋白分子结合的位点。通常 K 值为 10^5 到 10^{11} 升 / mol。任何小于 10^4 升 / mol 的 K 值被认为是意味着非特异结合。K 的倒数被指定为 K_d (K_d 也可以被称为解离常数)。30 K_d 越小, 抗原决定簇与抗体结合位点之间的结合力越强。

KDR 的天然配基是人 VEGF。VEGF 以 0.93nM 的亲和性 (K_d) 结合

KDR。为了抑制 VEGF 与 KDR 的结合，抗 KDR 抗体必需以与 VEGF 可比的亲和性与 KDR 结合。也就是说，抗 KDR 抗体必需成功地在与 KDR 的结合上与 VEGF 竞争。K_d 至多为 5nM 的抗体，其与 KDR 结合的亲和性被认为是与天然配基可以相比的。优选地，本发明的抗体结合 KDR 的亲和性至多为约 4nM，更优选地，亲和性至多为约 3nM，最优选地，亲和性为至多约 2nM，最佳亲和性为约 1nM。

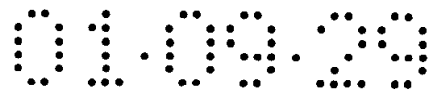
本发明的抗体中和 KDR（参见实施例）。在本说明书中，中和受体的意思是减小和 / 或失活该受体转导信号的内源激酶活性。KDR 中和的一种可靠的检测方法是对受体磷酸化的抑制。

本发明不受任何特定的 KDR 中和机制的限制。在提出本申请时，抗体中和 KDR 的机制尚未被很好地了解，并且一种抗体所遵循的机制不一定与另一种抗体相同。一些可能的机制包括防止 VEGF 配基与 KDR 细胞外结合结构域结合，并且防止受体的二聚体化或寡聚体化。但是，不能排除其它机制。

优选的免疫球蛋白分子是称为单价单链抗体（scFv）的抗体片段。单价单链抗体包括一个抗体重链可变片段（V_H）通过肽接头与一个抗体轻链可变片段（V_L）连接，上述肽接头允许两个片段结合形成功能性的抗原结合位点（参见，例如 U.S. Pat. No. 4,946,778, Ladner et al., (Genex); W088/09344, Creative Biomolecules, Inc/Huston et al.）。W0 92/01047 Cambridge Antibody Technology et al./McCafferty et al., 描述了 scFv 在可溶的重组基因展示包装（soluble recombinant genetic display package），如噬菌体，表面上的展示。带有接头的单链抗体可以被表示为 V_L-L-V_H 或 V_H-L-V_L。

价（Valency）是指一个免疫球蛋白分子上所具有的对特定表位的结合位点数。例如，单价抗体具有一个特定表位的结合位点。抗体亲抗原性（avidity）是对免疫球蛋白分子和其抗原之间结合强度的度量。抗体亲抗原性同时涉及表位与其免疫球蛋白分子上的抗原结合位点之间的亲和性以及免疫球蛋白的价。

单链抗体缺少它们所源自的完整抗体的部分或全部恒定结构域。因此，它们可能克服与完整抗体的使用相关的一些问题。例如，单链抗体倾向于避免重链恒定区和生物分子之间的不合乎需要的相



互作用，或其它不需要的生物学活性。此外，单链抗体要比完整抗体小很多，因此可能具有比完整抗体更大的毛细管渗透性，从而允许单链抗体更有效地定位并更有效地与目的抗原结合位点结合。同时，单链抗体可以在原核细胞中较大量地产生，从而便利于它们的生产。进
5 而，单链抗体相对较小的大小使得它们在接受者 (recipient) 中引起不合乎需要的免疫应答的可能性比完整抗体更小。

用来产生单链抗体的肽接头可以是柔性的肽，柔性肽的选择确保 V_L 和 V_H 连接后形成正确的三维折叠，以便使其保持全长的抗 KDR 抗体的目标分子结合活性。通常， V_L 或 V_H 序列的羧基端被这样的肽接头连
10 接到互补 V_H 或 V_L 序列的氨基端。该接头通常为 10-50 个氨基酸残基。优选地，该接头为 10-30 个氨基酸残基。更优选地，该接头为 12-30 个氨基酸残基。最优选地，该接头为 15-25 个氨基酸残基。这样的接头肽的一个例子为 (Gly-Gly-Gly-Ser)₃。

单链抗体，每个具有通过一个第一肽接头共价连接的一个 V_H 和一个 V_L ，可以至少被另一个肽接头共价连接以形成多价单链抗体。多价
15 单链使得具有完整抗体的特异性和抗体亲抗原性，但是缺少全长抗体的恒定区的抗体片段的构建成为可能。

多价免疫球蛋白抗体可以是单特异性的或多特异性的。术语特异性指特定免疫球蛋白分子能够结合的不同抗原决定簇的数目。如果免
20 疫球蛋白分子只能结合一种抗原决定簇，该免疫球蛋白分子就是单特异性的。如果免疫球蛋白分子能结合不同的抗原决定簇，那么该免疫球蛋白分子就是多特异性的。

例如双特异性多价抗原允许其识别两个不同的表位。上述表位可以都在 KDR 上。替代地，一个表位可以是在 KDR 上，而另一个表位可
25 以在其它抗原上。

多价单链抗体的每一条链包含一个轻链可变片段和一个重链可变片段，并且通过肽接头和至少一个其它链连接。上述肽接头至少由
15 个氨基酸残基组成。最大氨基酸残基数大约为 100。在一个优选的实施方案中， V_L 和 V_H 结构域的数目是相等的。优选地，肽接头 (L_1)
30 将 V_H 和 V_L 结构域连接在一起形成一条链，肽接头 (L_2) 将两条或多条链连接在一起形成具有基本上相同氨基酸序列的多价 scFv。

例如，两价单链抗体可以如下表示： $V_L-L_1-V_H-L_2-V_L-L_1-V_H$ ，或

$V_L-L_1-V_H-L_2-V_H-L_1-V_L$, 或 $V_H-L_1-V_L-L_2-V_H-L_1-V_L$, 或 $V_H-L_1-V_L-L_2-V_L-L_1-V_H$.

三价或更高价的多价单链抗体具有通过其它肽连接序列连接到两价单链抗体上的肽片段。三价单链抗体的一个例子为:

5 $V_L-L_1-V_H-L_2-V_L-L_1-V_H-L_2-V_L-L_1-V_H$

两个单链抗体可以被组合成二体, 也称为二价二聚体。二体具有两条链, 二体的每条链含有一个与 V_L 结构域连接的 V_H 结构域。连接结构域的接头足够短, 以防止同一条链上的结构域之间配对, 因而促使不同链上的互补结构域配对, 从而再现两个抗原结合位点。上述肽接头包括至少 5 个氨基酸残基和不多于 10 个氨基酸残基, 例如, (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser), (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂。上述二体的结构是刚性而紧密的。抗原结合位点位于该分子相对的两端。二体可以是单特异性的或双特异性的。

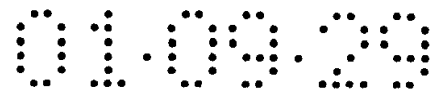
三个单链抗体可以被组合成三体, 也称为三价三聚体。三体是通过 V_L 或 V_H 结构域的氨基端直接与 V_H 或 V_L 结构域的羧基端融合而构建的, 即, 无任何接头序列。三体含有三个 Fv 头部, 其多肽是以环状的, 头尾相接的方式排列的。三体分子的可能构象是平面的, 三个结合位点位于一个平面上, 彼此之间的角度为 120 度。三体可以是单特异性的, 双特异性的或三特异性的。

20 优选地, 本发明的抗体含有完整抗体的所有 6 个互补决定区, 虽然含有少于所有的这些区域, 例如 3 个, 4 个或 5 个 CDR, 的抗体也是具有功能的。

25 为了将鼠源抗体的免疫原性最小化, 本发明还提供了与 KDR 的细胞外结构域特异性结合并中和受体的激活的, 嵌合的和人源化的抗体。嵌合抗体含有源自小鼠抗体的可变区和源自人类抗体的恒定区。嵌合抗体保持了它的结合特异性, 但是更接近天然的人抗体。人源化抗体含有小鼠氨基酸的部份仅仅为那些识别 KDR 所必需的部分, 即, CDR。

30 可以通过结合基本上或完全编码人类恒定区的 DNA 和编码可变区的 DNA 而制备得到编码嵌合抗体的 DNA, 上述可变区基本上或完全源自除了人类以外的哺乳动物的可变区序列。

可以通过结合编码恒定区和除了 CDR 外的可变区的 DNA 和编码



CDR 的 DNA 而制备编码人源化抗体的 DNA，上述恒定区和除了 CDR 外的可变区基本上或完全源自相应的人类抗体，上述 CDR 基本上或完全源自人类以外的哺乳动物。

除了人类以外的适当的哺乳动物包括任何可以从其制备单克隆抗体的哺乳动物。这样的哺乳动物的例子包括兔子、大鼠、小鼠、马、山羊或灵长类。小鼠是优选的。

编码抗体片段的 DNA 分子的适当来源包括任何表达全长抗体的细胞，如杂交瘤和脾细胞。另一来源是本领域中已知的，从噬菌体展示文库产生的单链抗体。

10 本发明的抗体可以是任何类型的免疫球蛋白，如 IgG, IgM, IgA, IgD, 或 IgE, 和它们的亚类的成员，或者由这些成员结合而成。

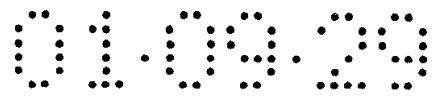
用于制备免疫球蛋白分子的 KDR 通常是与细胞，如内皮细胞，结合的。上述 KDR 也可以是与非内皮细胞，如肿瘤细胞，结合。替代地，KDR 可以是不与细胞结合的，优选地为可溶形式。

15 在以下的实施例中，封闭 VEGF 和 KDR 结合的高亲和性抗 KDR scFv 抗体分离自噬菌体展示文库，上述文库是从用可溶形式的人类 VEGF 受体免疫的小鼠构建得到的。经过两轮筛选后回收的克隆的 90% 以上对 KDR 具有特异性。KDR 与这些 scFv 结合的亲和性是在 nM 的范围内，这与几种通过杂交瘤技术制备的抗 KDR 二价单克隆抗体的亲和性一样高。

20 人类噬菌体文库也可以被用来产生这样的高亲和性抗 KDR scFv 抗体。

上述 scFv 抗体，p1C11 (图 4)，是从分离自噬菌体展示文库的单链抗体 (scFv) 制备得到的。(参见下文的实施例)。p1C11 被显示能够封闭 VEGF-KDR 相互作用，抑制 VEGF 刺激的受体磷酸化和 HUVEC 有丝分裂。该 scFv 同时结合可溶性的 KDR 和在 HUVEC 细胞表面表达的 KDR。p1C11 是本发明的一种优选的 scFv。它和 KDR 以高亲和性结合 ($K_d=2.1\text{nM}$)。

30 本发明抗体的每个结构域都可以是完整的免疫球蛋白重链或轻链可变结构域，或者它可以是天然存在的结构域的功能对等物或突变体或衍生物，或者是利用，例如，诸如 W093/11236 (Medical Research Council et al./ Griffiths et al.) 中描述的技术体外构建的合



成结构域。例如，可以将相应于抗体可变结构域的，缺少至少一个氨基酸的结构域连接在一起。最重要的特征是每个结构域与互补结构域连接形成抗原结合位点的能力。因此，术语“重链/轻链可变片段”不应当被解释为将对本发明发挥作用无实质性影响的变体排除在外。

5 本发明的功能对等物包括氨基酸序列和全长 KDR 抗体的可变区或高变区的氨基酸序列基本上相同的多肽。“基本上相同”的氨基酸序列在本文中被定义为一段氨基酸序列和另一氨基酸序列的同源性至少为 70%，优选地至少为约 80%，更优选地至少为约 90%，上述
10 同源性是通过根据 Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-2448 (1988) 的 FASTA 搜索方法确定的。

本发明的抗体可以与另外的氨基酸残基融合。这样的残基可以是一段肽标记 (peptide tag)，也许是为了便于分离，或者它们可以在合成时从宿主细胞分泌的信号序列。可以适当地使用分泌引导序列，引导序列是与多肽的 N-末端连接的将该多肽导出细胞质的氨基酸序列。

本发明还提供了含有根据本发明的多肽的编码序列的核酸分子，以及这样的核酸的各种库。

可以通过已知的技术，如 PCT 申请 W093/21319, W089/09622, 20 欧洲专利申请 239,400, 338,745 和 332,424 中所描述的技术和/或其它常规的重组 DNA 技术进行上文描述的 DNA 的缺失和重组，如下文所述。

在下文描述的实施例中从 p1c11 产生了嵌合的抗 KDR 抗体，c-p1C11。嵌合-p1C11 与可溶的以及细胞表面表达的 KDR 的细胞外结构域特异性地结合。c-p1C11 的结合亲和性为 0.82nM。它有效地中和了人类内皮细胞的 KDR 和 MAP 激酶 p44/p42 的激活。另外，c-p1C11 有效地中和了 VEGF 诱导的人类内皮细胞有丝分裂。

c-p1C11 与 KDR 的结合比其母体 scFv, p1C11, 更为有效，并且在中和 KDR 相互作用的活性上和抑制 VEGF 刺激的 HUVEC 有丝分裂上更为强有力。c-p1C11 结合 KDR 的亲和性大约为其母体 scFv 的 2.5
30 倍，这主要是由于二价 c-p1C11 的较低的解离速率 (见表 2)。

实施例

下文列出的实施例是用来帮助对本发明的理解，而不是用来，并不应被理解为用来，在任何方面限制本发明的范围。实施例不包括对传统方法的详细描述，如那些用于构建载体和质粒的方法，将编码多肽的基因插入到这样的载体和质粒的方法或将质粒引入宿主细胞的方法。这样的方法对于本领域中具有普通技术的人员是众所周知的，并且在许多出版物中都有所描述，包括 Sambrook, J., fritsch, E. F. and Maniais, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

10

实施例 I. 单链抗体的产生

实施例 I (a) 细胞系和蛋白

原代培养的 HUVEC 细胞在 EBM-2 培养基中，在 37°C，5% CO₂ 的条件下维持。所有分析中使用的细胞都在 2-5 代之间。VEGF₁₆₅ 蛋白在杆状病毒中表达并纯化。编码 KDR 细胞外结构域的 cDNA 是通过 RT-PCR 从人胎肾 mRNA 中分离得到的，并且被亚克隆到 AP-Tag 载体的 Bgl II 和 BspE I 位点之间。在上述质粒中，KDR 的细胞外结构域与人胎盘 AP cDNA 在读码框架内融合。上述质粒与新霉素表达载体 pSV-Neo 一起被通过电穿孔法导入 NIH3T3 细胞，并用 G418 选择稳定的细胞克隆。利用固定的针对 AP 的单克隆抗体通过亲和层析从细胞培养物的上清中纯化融合蛋白 KDR-AP。

15

20

实施例 I (b). 小鼠的免疫和单链抗体噬菌体展示文库的构建

在雌性 BALB / C 小鼠的腹膜内 (i. p.) 两次注射 10 μ g 在 200 μ l RIBI 佐剂系统中的 KDR-AP，并且在两个月后进行一次无 RIBI 佐剂的 i. p. 注射。在第一次免疫同时，也在上述小鼠的皮下 (s. c.) 注射 10 μ g 在 200 μ l RIBI 佐剂系统中的 KDR-AP。在进行安乐死的三天之前，对上述小鼠腹膜内进行 20 μ g KDR-AP 的加强注射。取出供体小鼠的脾脏并且分离细胞。提取 RNA，并从脾细胞的总 RNA 中纯化 mRNA。利用上述 mRNA 构建 scFv 噬菌体展示文库，该 mRNA 被展示在丝状噬菌体 M13 的表面。

25

30

在丝状噬菌体表面展示 scFv 时，抗体 V_H 和 V_L 结构域通过 15 个

氨基酸长的接头 (GGGS)³ 被连接在一起并且与噬菌体蛋白 III 的 N 末端融合。在 V_L 的 C 末端和蛋白 III 之间插入一个 15 氨基酸长的 E 标记物, 其后紧接琥珀密码子 (TAG), 以使用于检测和其它分析目的。位于 E 标记物和蛋白 III 之间的琥珀密码子使得当构建体被转入到抑制宿主时 (如 TGI 细胞), 构建体以表面展示的形式制造 scFv, 当构建体被转入到非抑制宿主时 (如 HB2151), 构建体以可溶的形式制造 scFv。

装配的 scFv DNA 被连接到 PCANTAB 5E 载体。转化后的 TG1 细胞被涂布到 2YTAG 平板上并温育。将菌落刮取到 10ml 2YT 培养基中, 与 5ml 50% 的甘油混合并储存在 -70 C 作为文库的储存物。

实施例 I (c) 生物淘选 (Biopanning)

文库的储存物被生长到对数生长期, 用 M13K07 辅助噬菌体援救 (rescue) 并在 2YTAK 培养基含有 (100μg/ml 氨苄青霉素和 50μg/ml 卡那霉素的 2YT 培养基) 中 30 C 扩增过夜。噬菌体制备物用 4% PEG / 0.5M NaCl 沉淀, 重悬浮于含有 500μg/ml AP 蛋白的 3% 脱脂牛奶 / PBS 中, 并在 37 C 温育 1 小时以捕获展示抗 AP scFv 的噬菌体并封闭其它非特异性结合。

将用 KDR - AP (10μg/ml) 包被的 Maxisorp Star 管 (Nunc, Denmark) 首先用 3% 牛奶 / PBS 在 37 C 封闭 1 小时, 然后与噬菌体制备物在室温温育 1 小时。将该管用 PBST 洗 10 次后, 用 PBS 洗 10 次 (含 0.1% 吐温 20 的 PBS)。将结合的噬菌体在室温用新鲜制备的 100mM 三乙胺洗脱 10 分钟。将洗脱的噬菌体与 10ml 对数中期的 TG1 细胞 37 C 静置温育 30 分钟和摇晃温育 30 分钟。将感染的 TG1 细胞涂布到 2YTAG 平板上并 30 C 温育过夜。

经过 3 轮筛选后, 百分之九十九 (185 / 186) 的克隆都被发现是 KDR 的特异性结合者。但是, 这些结合者中只有 15 个 (8%) 能够封闭 KDR 与固定的 VEGF 的结合。这 15 个克隆的 BstN I 指纹图谱表明存在两种不同的消化图谱; 而 21 种随机挑取的 VEGF 非封闭克隆 (non-blocker) 产生 4 种不同的方式。在第二轮淘选后鉴定的克隆中也见到了所有的消化图谱。

从第二轮淘选后的克隆中挑出每种消化图谱的代表克隆并进行

DNA 测序。在 15 个测序的克隆中，鉴定出了 2 个独特的 VEGF 封闭克隆 (blocker) 和 3 个非封闭克隆。一种既不结合 KDR 也不封闭 VEGF 和 KDR 的结合的 scFv, p2A7, 被选出作为所有研究的阴性对照。

5 实施例 I (d) 噬菌体 ELISA

在 96 孔板中 37℃ 生长单个克隆，并如上文所述用 M13K07 辅助噬菌体进行援救。扩增的噬菌体制备物用 1/6 体积的 18% 牛奶 / PBS 室温封闭 1 小时，并加入到用 KDR-AP 或 AP (1μg/ml×100μl) 包被的 Maxi-sorp 96 孔微量滴定板 (Nunc)。室温温育 1 小时后，将
10 滴定板用 PBST 洗 3 次，并与兔抗 M13 噬菌体 - HRP 交联物温育。将滴定板洗 5 次，加入 TMB 过氧化物酶底物，用读板机读取 450nm 的 OD，鉴定 scFv 抗体并测序。

实施例 I (e) 可溶性 scFv 的制备

15 用单个克隆的噬菌体感染非抑制 (non-suppressor) E. coli 宿主 HB2151, 并在 2YTAG-N 平板上筛选被感染的宿主。通过在含有 1mM 异丙基 β-D 硫代半乳糖苷的 2YTA 培养基中 30℃ 培养细胞而诱导 scFv 在 HB2151 细胞中的表达。细胞周质抽提物的制备如下：将细胞沉淀悬浮于含有 20% (w/v) 20% 蔗糖，200mM NaCl, 1mM EDTA 和 0.1mM
20 PMSF 的 25mM Tris (pH7.5) 中，然后在 4℃ 温育并轻柔搅拌 1 小时。15,000rpm 离心 15 分钟后，利用 RPAS Purification Module (Pharmacia Biotech) 通过亲和层析从上清中纯化可溶性的 scFv。

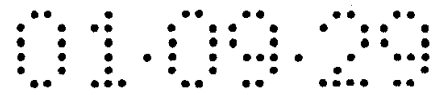
实施例 II 分析检测

25 实施例 II (a) 定量 KDR 结合分析

两种分析方法被用来定量检验纯化的可溶 scFv 与 KDR 的结合。

用非抑制宿主 E. coli HB 2151 细胞在摇床烧瓶中表达 4 个不同的克隆，包括两个 VEGF 封闭克隆，p1C11 和 p1F12, 一个非封闭克隆，显性克隆 p2A6 和一个不结合的克隆，p2A7。通过抗 - E - 标记的亲和
30 层析从 E. coli 的周质抽提物中纯化可溶的 scFv。这些克隆的纯化 scFv 的产量在 100 - 400μg/升培养物之间。

在直接结合分析中，不同量的可溶 scFv 被加入到 KDR 包被的 96



孔 Maxi-sorp 微量滴定板中并在室温温育 1 小时，然后用 PBST 洗板 3 次。然后将滴定板在室温与 100 μ l 小鼠抗 - E - 标记抗体温育 1 小时，接着与 100 μ l 兔抗鼠抗体 - HRP 交联物温育。按照上文噬菌体 ELISA 实验中描述的方法将滴定板洗涤和显色。

5 在另一个分析检测中，即，竞争性 VEGF 封闭检测中，不同量的 scFv 与固定量的 KDR-AP (50ng) 混合并在室温温育 1 个小时。将混合物转移到用 VEGF₁₆₅ (200ng/孔) 包被的 96 孔微量滴定板并在室温继续温育 2 小时，然后将滴定板洗 5 次，加入 AP 的底物以对结合的 KDR - AP 分子定量。然后计算 IC₅₀，即，50% 抑制 KDR 与 VEGF 结合所需
10 要的 scFv 浓度。

图 1 示通过直接结合 ELISA 测定的，scFv 和固定的 KDR 的剂量依赖型结合。如图 2 中所示，克隆 p1C11 和克隆 p1F12 也能封闭 KDR 与固定的 VEGF 的结合，但是克隆 p2A6 不能。图 2 中所示的数据是 3 次重复实验的平均数 \pm SD。阴性对照克隆，p2A7 既不能结合 KDR 也不能封闭 KDR 与 VEGF 的结合 (图 1 和 2)。克隆 p1C11，每次淘选后的
15 显性克隆，表现出最高的 KDR 结合能力和最大的封闭 VEGF 与 KDR 结合 (表 1)。与 KDR 50% 最大结合所需要的和 50% 抑制 KDR 与 VEGF 结合所需要的克隆 p1C11 的抗体浓度分别为 0.3nM 和 3nM (见表 1)。FACS 分析表明 p1C11，p1F12 和 p2A6 也能与 HUVEC 细胞表面表达的受体结合。
20

实施例 II (b) 可溶 scFv 的 BIAcore 分析

用 BIAcore 生物感应器 (Pharmacia Biosensor) 测量了可溶性 scFv 与 KDR 结合的动力学。KDR - AP 融合蛋白被固定到感应器的芯片
25 上，被注射的可溶性 scFv 的浓度在 62.5nM 到 1000nM 之间。在每个浓度得到感应器谱图 (Sensorgram)，并用一个程序，BIA Evaluation 2.0 对其进行评估，以确定速率常数 kon 和 koff。从速率常数 kon/koff 的比率计算得到 Kd。

表 1 示在 BIAcore 仪器上的表面等离子体共振的结果。VEGF - 封闭性的 scFv，p1C11 和 p1F12，分别和固定的 KDR 以 Kd 2.1 和 5.9nM
30 结合。非封闭性的 scFv，p2A6，与 KDR 结合的亲和性比最好的结合克隆 p1C11 大约弱 6 倍 (Kd, 11.2nM)，主要是由于其解离速率要

快很多。如所预期的那样，p2A7 不与固定在 BIAcore 上的 KDR 结合。

实施例 II (c) 磷酸化分析

磷酸化分析是利用 HUVEC 的早期传代细胞按照先前描述的方法
5 进行的。简言之，将 HUVEC 与补充了 0.5% 牛血清白蛋白的，无血清
的 EBM-2 基础培养基在有或无 5 μ g/ml scFv 抗体的情况下室温温育
10 分钟，然后用 20ng/ml 的 VEGF₁₆₅ 在室温继续刺激 15 分钟。裂解细
胞，用偶联了兔抗 KDR 多克隆抗体 (ImClone Systems Incorporated)
的蛋白 A Sepharose 小珠从细胞裂解液中免疫沉淀 KDR 受体。洗涤
10 小珠，与 SDS 上样缓冲液混合，将上清进行 Western 印迹分析。为了
检测 KDR 的磷酸化，印迹用抗磷酸化酪氨酸的 Mab, 4G10 检测。对于
MAP 激酶活性分析，将细胞裂解液用 SDS-PAGE 进行解析后利用磷特
异的 MAP 激酶抗体进行 Western 印迹分析。所有的信号都用 FCL 探
测。

15 结果表明 VEGF-封闭性的 scFv p1C11 能够抑制 VEGF 刺激的 KDR
受体的磷酸化，而非封闭性的 scFv p2A6 不能。进而，p1C11 也有效
地抑制了 VEGF 刺激对 MAP 激酶 p44/p42 的激活。相反，p1C11 和 p2A6
都不能抑制 FGF 刺激对 MAP 激酶 p44/p42 的激活。

20 实施例 II (d) 抗有丝分裂原分析

将 HUVEC (5 \times 10³ 细胞 / 孔) 加入到 96 孔组织培养板
(Wallach, Inc., Gaithersburg, MD) 的 200 μ l 无 VEGF, bFGF 或 EGF
的 EBM-2 培养基中并在 37C 温育 72 小时。往一式两份的平行孔
(duplicate wells) 中加入不同量的抗体并在 37 C 预温育 1 小时，
25 然后加入终浓度 16ng/ml 的 VEGF₁₆₅。温育 18 小时后往每个孔中加入
0.25 μ Ci 的 [3H] - TdR (Amersham) 并继续温育 4 小时。将细胞置
于冰上，用无血清的培养基洗两次，然后与 10% TCA 在 4C 温育 10
分钟。然后将细胞用水洗一次，并用 25 μ l 2% 的 SDS 溶解。加入闪烁
液 (150 μ l/孔) 并在液闪计数器 (Wallach, Model 1450 Microbeta
30 Scintillation Counter) 上测定掺入 DNA 的放射性活性。

scFv 抗体封闭 HUVEC 上 VEGF 刺激的有丝分裂原活性的结果在图
3 显示。VEGF-封闭性的 scFv p1C11 强有力地抑制了 HUVEC 中 VEGF

诱导的 DNA 合成, 其 EC_{50} , 即对 VEGF 刺激的 HUVEC 有丝分裂 50% 抑制所需要的抗体浓度, 为大约 5nM. 非封闭性的 scFv p2A6 对 VEGF 的有丝分裂原活性表现为无抑制效应. p1C11 和 p2A6 都不能抑制 HUVEC 中 bFGF 诱导的 DNA 合成 (数据未示出). 图 3 中显示的数据为至少 3 次单独实验的代表. () 只有 VEGF; () 无 VEGF.

实施例 IV. 嵌合抗体的产生

实施例 IV (a) 细胞系和蛋白

原代培养的人脐静脉细胞 (HUVEC) 在 EBM-2 培养基中, 在 37°C, 5% CO₂ 的条件下维持. 所有分析中使用的细胞都在 2-5 代之间. VEGF₁₆₅ 和 KDR-碱性磷酸酶融合蛋白 (KDR-AP) 分别在杆状病毒中和 NIH 3T3 细胞中表达, 并按照上文描述的方法纯化. 抗 KDR 的 scFv p1C11 和 scFv p2A6, 一种与 KDR 结合但是不封闭 KDR-VEGF 相互作用的抗体, 是从噬菌体展示文库分离得到的, 上述噬菌体展示文库是从用 KDR 免疫的小鼠构建得到的, 如上文所述. C225 是针对上皮生长因子 (EGF) 受体的一种嵌合 IgG1 抗体.

实施例 (b) scFv p1C11 可变结构域的克隆

p1C11 的轻链 (V_L) 和重链 (V_H) 可变结构域是分别利用引物 1 和 2, 以及引物 3 和 4, 通过 PCR 从 scFv 表达载体克隆得到的. 分别利用引物 5 和 2, 以及引物 5 和 4, 通过 PCR, 将用于在哺乳动物细胞中负责蛋白分泌的引导肽序列加入到 V_L 和 V_H 的 5' 端.

引物 1: 5' CTA GTA GCA ACT GCA ACT GGA GTA CAT TCA GAC ATC
GAG CTC3'

引物 2: 5' TCG ATC TAG AAG GAT CCA CTC ACG TTT TAT TTC CAG3'
*Bam*HI

引物 3: 5' CTA GTA GCA ACT GCA ACT GGA GTA CAT TCA CAG GTC
AAG CTG3'

引物 4: 5' TCG AAG GAT CCA CTC ACC TGA GGA GAC GGT3'

*Bam*HI

引物 5: 5' GGT CAA AAG CTT ATG GGA TGG TCA TGT ATC ATC CTT TTT

Hind III

CTA GTA GCA ACT3'

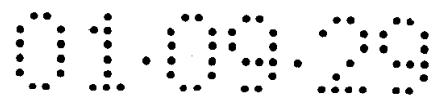
实施例 IV (e) 嵌合 p1C11 IgG 表达载体的构建

分别构建了用于表达嵌合 IgG 轻链和重链的载体。克隆的 V_L 基因
5 用 *Hind* III 和 *Bam*HI 水解，并与含有人 κ 轻链恒定区 (C_L) 的载体
pKN100 连接以产生表达嵌合 p1C11 轻链，c-p1C11-L，的载体。克隆
的 V_H 基因用 *Hind*III 和 *Bam*H I 水解，并与含有人 IgG1 (γ) 重链恒
定区 (C_H) 的载体 pG1D105 连接以产生表达嵌合 p1C11 重链，c-
10 p1C11-H，的表达载体。通过限制性内切酶水解检测上述两种构建体，
并通过脱氧核酸测序确认。

如图 4 中所见， V_H 和 V_L 结构域都在其 5' 端精确地和编码导肽序
列的基因片段融合，如所标明的那样。 V_H 和 V_L 结构域通过 *Hind*III
和 *Bam*H I 水解位点分别被连接到载体 pG1D105 和 pKN100 上，上述
15 质粒 pG1D105 含有 cDNA 形式的人 $\gamma 1$ 恒定区基因，质粒 pKN100 含有
cDNA 形式的人 κ 链恒定区基因。在每种情况下，表达都是在 HCMVi 启
动子的控制之下，并且由人工终止序列终止。根据 Kabat et al. 等
人的关于高变序列的描述定义的轻链和重链互补决定区 (CDR) 用下
划线表示并且分别标明 CDR-H1 到 H3 和 CDR-L1 到 L3。

20 实施例 IV (d) IgG 的表达和纯化

用等量的 c-p1C11-L 和 c-p1C11-H 质粒共转染 COS 细胞以进行
IgG 的瞬时表达。在含有 DMEM / 10% FCS 的 150mm 培养皿中生长的分
25 会合 (subconfluent) COS 细胞用 20ml 含有 40mM Tris (pH7.4) 的 DMEM
洗涤一次，然后与 4ml 的 DMEM / DEAE - Dextran / DNA 混合物 (含有
40mM Tris, 0.4mg/ml 的 DEAE -Dextran (Sigma), 以及 c-p1C11-L
和 c-p1C11-H 质粒各 20 μ g 的 DEME) 在 37C 一起温育 4.5 小时。上述
细胞与 4ml 含有 100nM 氯喹 (Sigma) 的 DMEM / 2% FCS 在 37 $^{\circ}$ C 温育 1
小时，然后与 1.5ml 20% 的甘油 / PBS 在室温温育 1min。上述细胞



用 DMEM / 5% FCS 洗涤两次并在 20ml 同样的培养基中 37℃ 温育过夜。用普通的 DMEM 洗涤两次后，将上述细胞转入无血清的 DMEM / HEPES 培养基中。在转染后 48 小时和 120 小时收集细胞培养物的上清。按照厂商 (Pharmacia Biotech) 所描述的方法利用 Protein G 柱通过亲和层析从收集的上清中纯化嵌合的 IgG。收集含有 IgG 的级分，将缓冲液换成 PBS，并用 Centricon 10 浓缩器浓缩 (Amicon Corp., Beverly, MA)。IgG 的纯度用 SDS - PAGE 进行分析。用羊抗人 γ 链特异的抗体作为捕捉剂，用 HRP 交联的羊抗人 k 链抗体作为检测试剂，通过 ELISA 确定纯化的抗体的浓度。利用临床级别的抗体，C225，校准标准曲线。

Protein G 亲和纯化后，在 SDS - PAGE 中看到一条 ~ 150KD 的单一蛋白条带。用 HRP 交联的抗人 IgG1 Fc 特异的抗体进行的 Western 印迹分析确认了纯化的蛋白中存在人 IgG Fc 部分 (未显示)。

ELISA 结果表明 c-p1C11 与固定的 KDR 的结合比母体 scFv 更有效 (图 5)。

实施例 V. 检测和分析

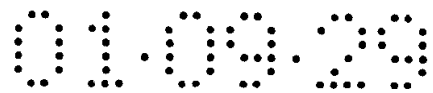
实施例 V (a). FACS 分析

将早期传代 (early passage) 的 HUVEC 细胞在无生长因子的 EBM - 2 培养基生长过夜，以诱导 KDR 的表达。收集上述细胞并用 PBS 洗涤三次，与 c-p1C11 IgG (5 μ g/ml) 在 4℃ 温育 1 小时，然后与 FITC 标记的兔抗人 Fc 抗体 (Capper, Organon Teknika Corp., West Chester, PA) 继续温育 60min。洗涤上述细胞并用流式细胞仪 (Model EPICS®, Coulter Corp., Edison, NJ) 分析。

图 6 是显示 c-p1C11 与表达 KDR 的 HUVEC 结合的 FACS 分析图。与先前在母体 scFv 中所见到的那样，c-p1C11 与在早期传代 HUVEC 上表达的 KDR 特异结合。

实施例 V (b). 定量 KDR 结合分析

将不同量的抗体加入到 KDR 包被的 96 孔 Maxi - sorp 微滴定量板 (Nunc, Denmark) 并在室温温育 1 小时，然后用含有 0.1% 吐温-20 的 PBS 将上述滴定板洗涤三次。然后，对于 scFv，将上述滴定板与



100 μ l 的小鼠抗 - E 标记的抗体 - HRP 交联物 (Pharmacia Biotech) 室温温育 1 小时, 或对于嵌合 IgG, 将滴定板与 100 μ l 兔抗人 IgG 特异的抗体 - HRP 交联物 (Cappel, Organon Teknika Corp.) 室温温育 1 小时。将滴定板洗涤 5 次, 加入 TMB 过氧化物酶底物 (KPL, Gaithersburg, MD), 用读板机 (Molecular Device, Sunnyvale, CA) 读取 450nm 的 OD 值。

图 5 是显示抗体与固定的 KDR 直接结合的图。显示的结果表明 c-p1C11 与固定的 KDR 受体的结合比其母体 scFv 更有效

10 实施例 V (c) BIAcore 分析

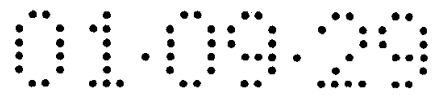
用 BIAcore 生物感应器 (Pharmacia Biosensor) 测量了抗体与 KDR 结合的动力学。KDR - AP 融合蛋白被固定到感应器芯片上, 浓度在 25nM 到 200nM 之间的抗体或 VEGF 被注射入。在每个浓度得到感应器谱图 (Sensorgram), 并用一个程序, BIA Evaluation 2.0 对其进行评估, 以确定速率常数 k_{on} 和 k_{off} 。从速率常数 k_{on}/k_{off} 的比率计算得到 K_d 。

BIAcore 分析结果表明 c-p1C11 与 KDR 的结合比其母体 scFv 的亲合性更高 (表 2)。c-p1C11 的 K_d 是 0.82nM, 而 scFv 的是 2.1nM。c-p1C11 亲合性的升高主要是由于二价的嵌合 IgG 的解离速率 (k_{off}) 较低。值得注意的是 c-p1C11 和 KDR 结合的亲合性 (K_d) 与天然配基 VEGF 结合 KDR 的亲合性, 根据 BIAcore 分析的测定为 0.93nM (表 2), 相似。

实施例 V (d) 竞争性 VEGF 结合实验

25 在第一个分析实验中, 将不同量的抗体与固定量的 KDR-AP (50ng) 混合并在室温温育 1 小时。然后将混合物转移到 VEGF₁₆₅ (200ng/孔) 包被的 96 孔微量滴定板并在室温继续温育 2 小时, 之后将滴定板洗 5 次, 加入 AP 的底物 (p-硝基酚磷酸 (p-nitrophenyl phosphate), Sigma) 以对结合的 KDR - AP 分子进行定量。然后计算 EC_{50} , 即 50% 抑制 KDR 与 VEGF 结合所需要的抗体浓度。

30 图 7 显示 c-p1C11 以剂量依赖的方式封闭了 KDR 受体与固定的 VEGF 的结合。在封闭 VEGF-KDR 相互作用上嵌合抗体更为强有力, 其



IC₅₀ 为 0.8nM, 而 scFv 的为 2.0nM. 作为对照的 scFv p2A6 也与 KDR 结合, 但是不能封闭 VEGF-KDR 相互作用 (图 7).

5 在第二个分析实验中, 将不同量的 c-p1C11 抗体或无同位素标记的 VEGF₁₆₅ 蛋白与固定量的 ¹²⁵I 标记的 VEGF₁₆₅ 混合并加入到 KDR 受体包被的 96 孔微量滴定板. 滴定板在室温温育 2 小时, 洗涤 5 次后计数与固定的 KDR 受体结合的放射性标记的 VEGF₁₆₅. 确定 50% 封闭放射性 VEGF 与固定的 KDR 受体结合所需要的 c-p1C11 和未标记 VEGF₁₆₅ 的浓度.

10 对放射性标记的 VEGF₁₆₅ 结合的抑制的结果在图 8 显示. 显示的数据是三次重复测量的平均值. 显示结果表明 c-p1C11 能以剂量依赖的方式有效地与 ¹²⁵I 标记的 VEGF 竞争结合固定的 KDR 受体. 如所预期的那样, C225, 针对 EGF 受体的嵌合抗体不与 KDR 受体结合或封闭 VEGF-KDR 相互作用 (结果未显示).

15 实施例 V (e) 磷酸化分析

实验前将接近汇合 (subconfluent) 的 HUVEC 细胞在无生长因子的 EBM-2 培养基中生长 24 到 48 小时. 用 50nM 正钒酸钠预处理 30 分钟后, 细胞在有或无抗体的条件下温育 15 分钟, 然后用 20ng/ml 的 VEGF₁₆₅ 或 10ng/ml 的 EGF 继续刺激 15 分钟. 然后在裂解缓冲液
20 (50nM Tris, 150mM NaCl, 1% NP-40, 2mM EDTA, 0.25% 脱氧胆酸钠, 1mM PMSF, 1μg/ml 亮肽素 (Leupeptin), 1μg/ml 抑肽素 (pepstatin), 10μg/ml 抑肽酶 (aprotinin), pH7.5) 中裂解细胞, 将细胞裂解液用于 KDR 和 MAP 激酶磷酸化分析. 用偶联了抗 KDR 抗体, Mab 4.13 (ImClone Systems) 的蛋白 A Sepharose 小珠 (Santa
25 Crutz Biotechnology, Inc. CA) 从细胞裂解液中免疫沉淀 KDR 受体. 用 SDS-PAGE 解析蛋白并进行 Western 印迹分析. 为了检测 KDR 磷酸化, 用抗磷酸酪氨酸 Mab, PY20 (ICN Biomedicals, Inc. Aurora, OH) 对印迹进行探测. 对于 MAP 激酶活性分析, 细胞裂解液用 SDS-PAGE 解析, 然后用磷酸特异的 MAP 激酶抗体 (New England Biolabs,
30 Beverly, MA) 进行 Western 印迹分析. 用 ECL (Amersham, Arlington Heights, IL) 检测所有的信号. 在两种分析实验中, 用多克隆抗 KDR 抗体 (ImClone Systems) 重新检测印迹以保证在每个 SDS-PAGE 凝

胶道中上样了等量蛋白。

C-p1C11 有效地抑制了 VEGF 刺激的 KDR 受体的磷酸化以及 p44/p42 MAP 激酶的激活。相反, C225 未显示出任何对 VEGF 刺激的 KDR 受体和 MAP 激酶的激活的抑制。单独的 c-p1C11 和单独的 C225 对 KDR 受体和 p44/p42 MAP 激酶的活性都无任何的作用。与先前在 scFv p1C11 中所见到的那样, c-p1C11 不抑制 FGF 刺激的 p44/p42 MAP 激酶的激活(未显示)。此外, scFv p2A6 和 p2A6 的嵌合 IgG 形式(c-p2A6)都不抑制 VEGF 刺激的 KDR 受体和 MAP 激酶的激活(未显示)。

10

实施例 V (f). 抗有丝分裂分析

通过 [³H] - TdR DNA 掺入分析, 用 HUVEC 确定了抗 KDR 抗体对 VEGF 刺激的人内皮细胞有丝分裂的作用。将 HUVEC (5×10³ 细胞/孔) 加入到 96 孔组织培养板的 200μl 无 VEGF, bFGF 或 EGF 的 EBM-2 培养基中, 并在 37C 温育 72 小时。将不同量的抗体加入微孔, 一式两份并在 37C 预温育 1 小时, 然后加入最终浓度为 16ng/ml 的 VEGF₁₆₅。温育 18 小时后, 在每孔中加入 0.25μCi 的 [³H] - TdR 并继续温育 4 小时。用闪烁计数器确定掺入的 DNA 的放射性。图 9 中所示的数据是至少三个单独实验的代表。

20

c-p1C11 和 scFv p1C11 都有效地抑制了 VEGF 刺激的 HUVEC 有丝分裂(图 9)。C-p1C11 对 VEGF 诱导的 HUVEC 有丝分裂的抑制比母体 scFv 更强。对于 c-p1C11 和 scFv, 50% 抑制 VEGF 诱导的 HUVEC 有丝分裂所需要的抗体浓度分别是 0.8nM 和 6nM。如所预期的那样, scFv p2A26 未显示出任何对 VEGF 刺激的内皮细胞增殖的抑制作用。

说明书附图

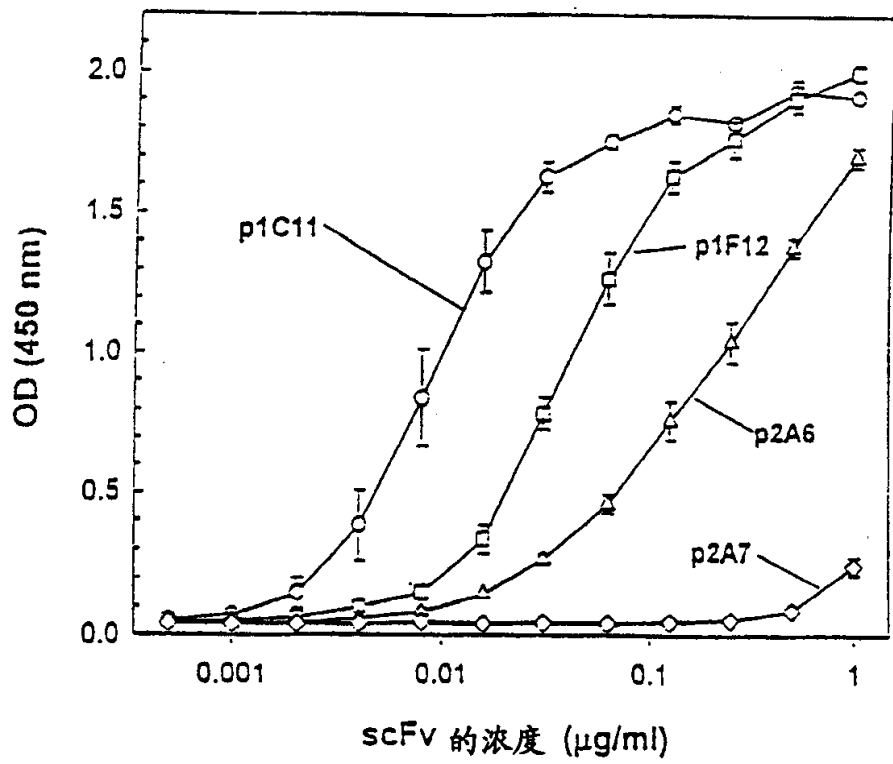


图 1

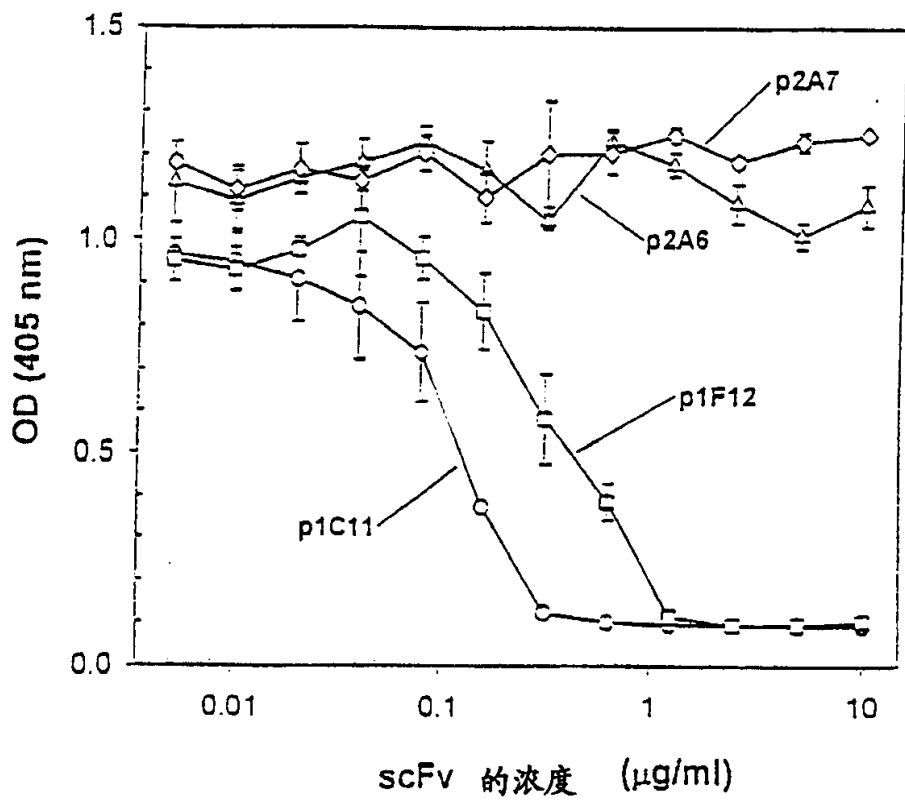


图 2

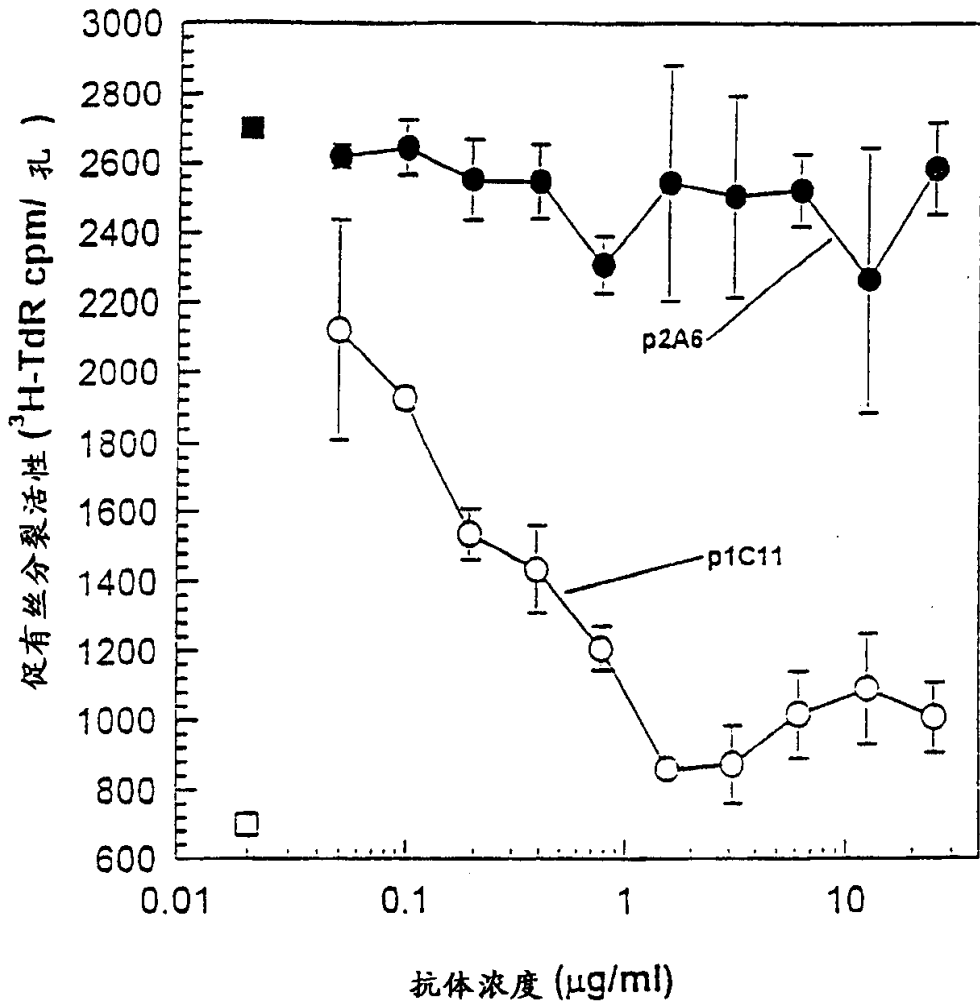


图 3

HindIII
GAACTTATGGGATCSTCATGTCTCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACAT
 M G W S C L I L F L V A T A T G V H
 → leader

TCACAGGTCAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGGGGTCAGGGGCCTCAGTCAA
 S Q V K L Q Q S G A E L V G S G A S V K
 VL

TTGTCCCTGCACAACTTCTGGCTTCACATTPAAGACTTCTATATGCACTGGGTGAAGCAG
 L S C T T S G F N I K D F Y M H W V K Q
 CDR-H1

AGGCCTGARCAGGGCCTGGAGTGGATTGGATTGGATTGATCCTGAGAATGGTGATTCTGAT
 R P E Q G L E W I G W I D P E N G D S D
 CDR-H2

TATGCCCGGAGTTCCAGGGCAAGGCCACCATGACTGCAGACTCATCCTCCAACACAGCC
 Y A P K F Q G K A T M T A D S S S N T A

TACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACACTCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTAATGCATAC
 Y L Q L S S L T S E D T A V Y Y C N A Y

TATGGTGACTACGPAAGGCTACTGGGGCCAGGGACCCGGTCAAGCCTCTCCTCAGGTGAG
 Y G D Y E G Y W G Q G T T V T V S
 CDR-H3

BanHI
TGGATCC

HindIII
AAGCTTATGGGATGGTCAATGATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACAT
 M G W S C I I L F L V A T A T G V H
 → leader

TCAGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTC
 S D I E L T Q S P A I M S A S P G E K V
 VL

ACCAATACCTGCAGTGGCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGCACTGGTTCAGCAGAAGCCA
 T E T C S A S S S V S Y M H W F Q Q K P
 CDR-L1

GGCACTTCTCCCAACTCTGGATTATAGCACATCCCACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCT
 G T S P K L W I Y S T S N L A S G V P A
 CDR-L2

CGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGATGGAGGCT
 R F S G S G S G T S Y S L T I S R M E A

GAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAGTAGTTACCCATTACGCTTCGGCTCG
 E D A A T Y Y C Q Q R S S Y P F T F G S
 CDR-L3

BanHI
 GGGACCAAGCTGGAAATAAAACGTGAGTTGGATCC
 G T K L E I K

图 4

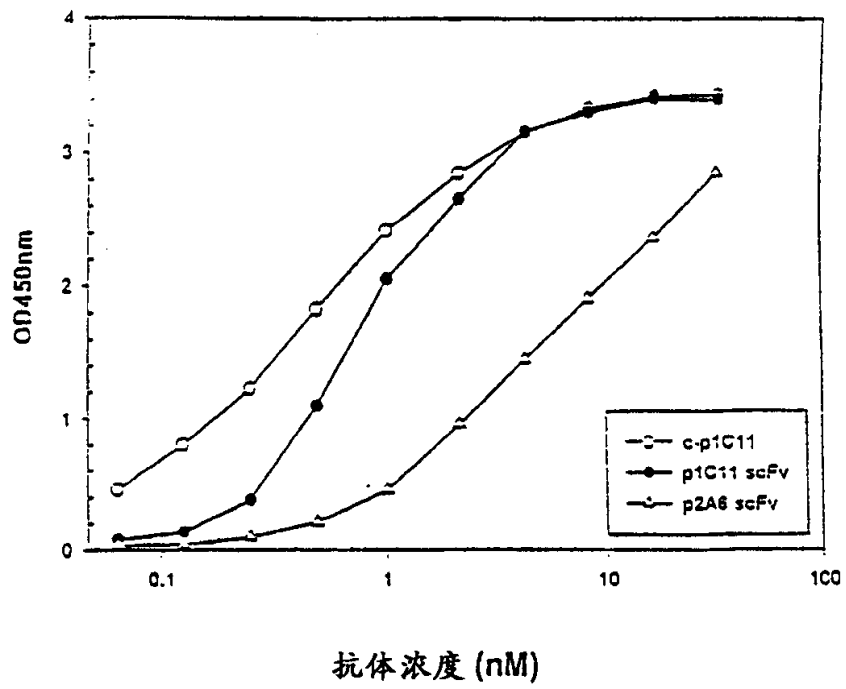


图 5

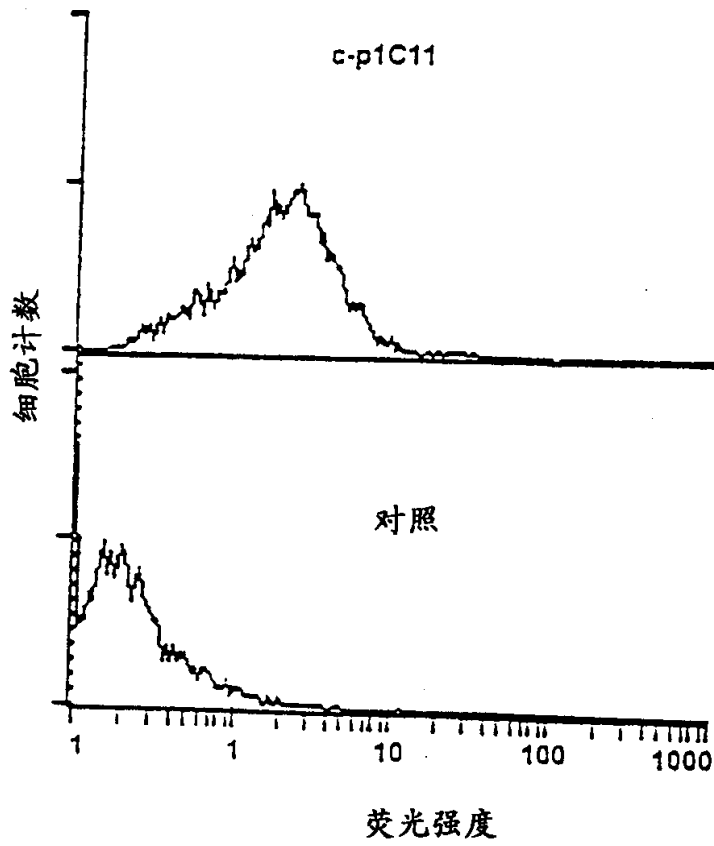


图 6

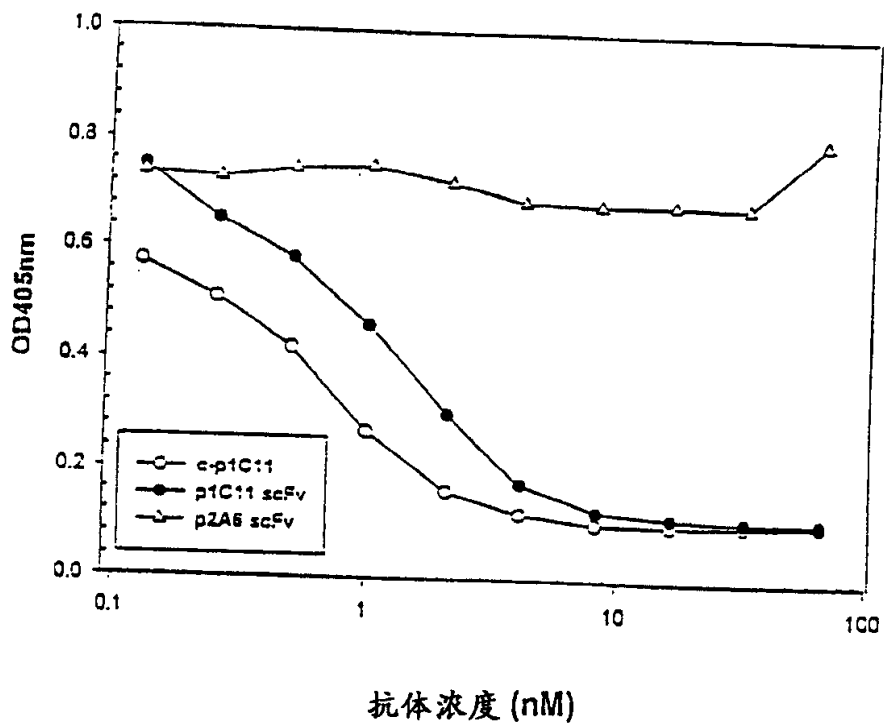


图 7

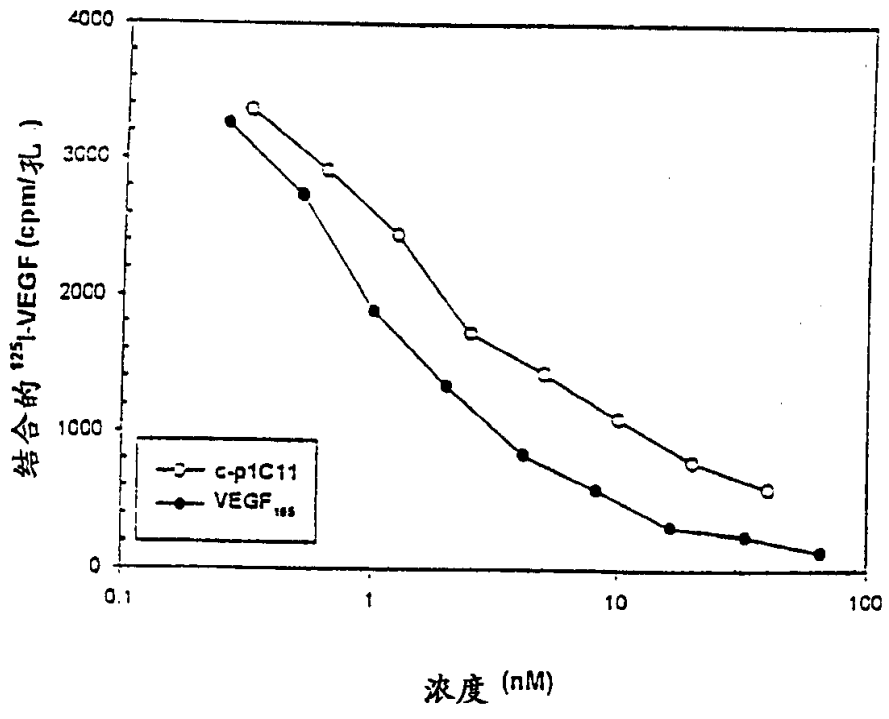


图 8

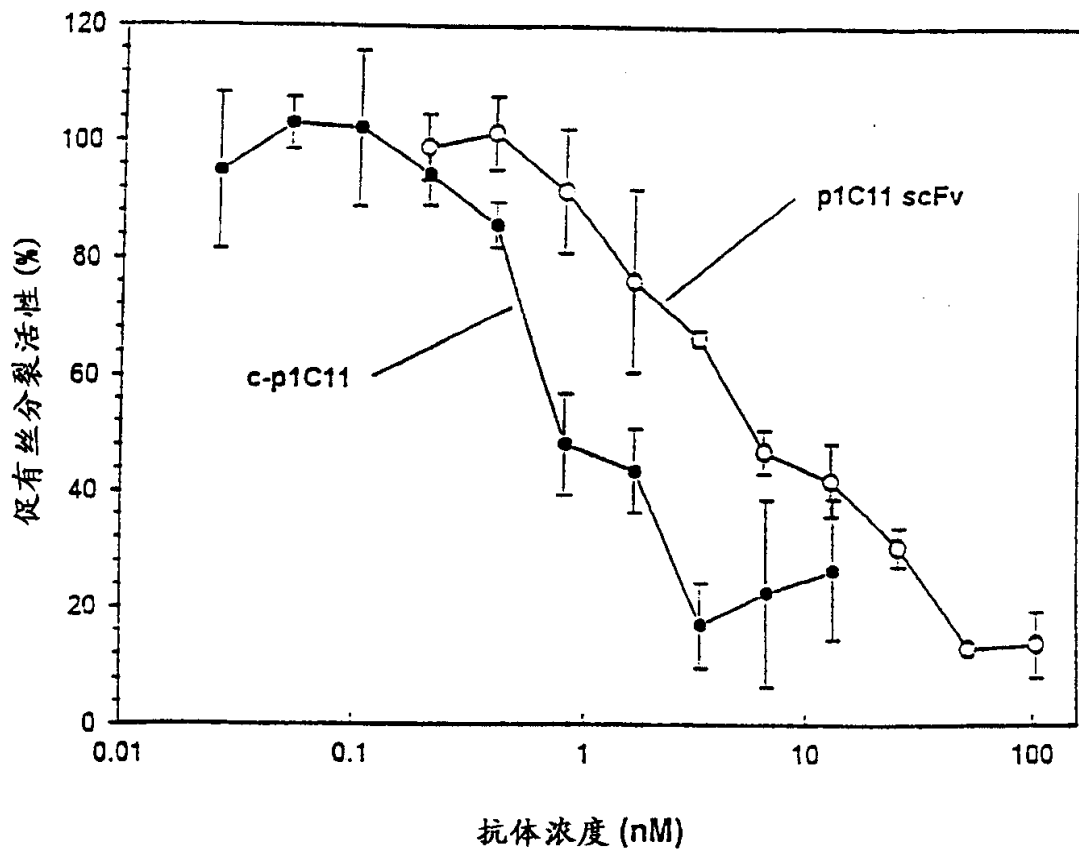


图 9

表1 抗-KDR scfv抗体的KDR结合分析

scFv 克隆	KDR 结合 ¹ (ED ₅₀ , nM)	VEGF 封闭 ² (IC ₅₀ , nM)	k_{on} ($10^5 M^{-1} s^{-1}$)	结合动力学 ³ k_{off} ($10^{-4} s^{-1}$)	K_d ($10^{-9} M$)
p1C11	是 (0.3)	是 (3.0)	1.1	2.3	2.1
p1F12	是 (1.0)	是 (15)	0.24	1.4	5.9
p2A6	是 (5.0)	否 (> 300)	4.1	46.1	11.2
p2A7	否 (NA)	否 (> 300)	NA	NA	NA

1. 通过直接结合的ELISA测定, 括号内的数字代表达到50%最大结合(参见图1)时的scFV浓度. 2. 通过竞争性VEGF封闭ELISA测定, 括号内的数字代表50%抑制KDR与固定的VEGF结合(参见图2)所需要的scFV浓度. 3. 通过BIAcore分析测定.

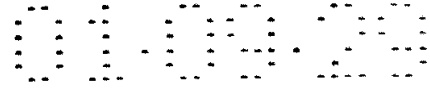


表2 p1C11和c-p1C11与KDR受体结合的动力学

抗体	k_{on} ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_{off} (10^{-4} s^{-1})	K_d (10^{-9} M)
p1C11 scFv	1.11	2.27	2.1
c-p1C11	0.63	0.52	0.82
VEGF	1.87	1.81	0.93

*所有的速率都是利用BIAcore系统通过表面等离子共振测定的至少三次测定的平均值。

ScFv P1C11 的序列

SEQ# 1

G F N I K D F Y M H

SEQ# 2

W I D P E N G D S G Y A P K F Q G

SEQ# 3

Y Y G D Y E G Y

SEQ# 4

S A S S S V S Y M H

SEQ# 5

S T S N L A S

SEQ# 6

Q Q R S S Y P F T

SEQ# 7

Q V K L Q Q S G A E L V G S G

A S V K L S C T T S G F N I K

D F Y M H W V K Q R P E Q G L
E W I G W I D P E N G D S G Y
A P K F Q G K A T M T A D S S
S N T A Y L Q L S S L T S E D
T A V Y Y C N A Y Y G D Y E G
Y W G Q G T T V T V S S

SEQ #8

D I E L T Q S P A I M S A S P G E K
V T I T C S A S S S V S Y M H
W F Q Q K P G T S P K L W I Y
S T S N L A S G V P A R F S G
S G S G T S Y S L T I S R M E
A E D A A T Y Y C Q Q R S S Y
P F T F G S G T K L E I K R A

SEQ# 9

GGC TTC AAC ATT AAA GAC TTC TAT ATG CAC

SEQ# 10

TGG ATT GAT CCT GAG AAT GGT GAT TCT GGT TAT GCC CCG AAG TTC CAG GGC

SEQ# 11

TAC TAT GGT GAC TAC GAA GGC TAC

SEQ# 12

AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG CAC

SEQ# 13

AGC ACA TCC AAC CTG GCT TCT

SEQ# 14

CAG CAA AGG AGT AGT TAC CCA TTC ACG

SEQ# 15

CAG GTC AAG CTG CAG CAG TCT GGG GCA GAG CTT GTG GGG TCA GGG
GCC TCA GTC AAA TTG TCC TGC ACA ACT TCT GGC TTC AAC ATT AAA
GAC TTC TAT ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GAA CAG GGC CTG
GAG TGG ATT GGA TGG ATT GAT CCT GAG AAT GGT GAT TCT GGT TAT
GCC CCG AAG TTC CAG GGC AAG GCC ACC ATG ACT GCA GAC TCA TCC
TCC AAC ACA GCC TAC CTG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC
ACT GCC GTC TAT TAC TGT AAT GCA TAC TAT GGT GAC TAC GAA GGC
TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

SEQ# 16

GAC ATC GAG
CTC ACT CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG
GTC ACC ATA ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG CAC
TGG TTC CAG CAG AAG CCA GGC ACT TCT CCC AAA CTC TGG ATT TAT
AGC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC
AGT GGA TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC CGA ATG GAG
GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAA AGG AGT AGT TAC
CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCG

SEQ# 17

G G G G S G G G G S G G G G S

SEQ# 18

GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG

SEQ# 19

GGGS GGGG

SEQ# 20

GGT GCA GGC GGT TCA