



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108136006 A

(43)申请公布日 2018.06.08

(21)申请号 201680049563.7

(22)申请日 2016.08.05

(30)优先权数据

62/202,143 2015.08.06 US

62/280,675 2016.01.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.02.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/045917 2016.08.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/024285 EN 2017.02.09

(71)申请人 佐马美国有限公司

地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 保罗·鲁宾 竹内俊彦

哈森·伊萨弗拉斯

吉兰吉特·考尔·阿卢瓦利亚

约翰·A·科尔宾

伊拉·戈德法因

科克·W·约翰逊 欧·李

丹尼尔·H·贝丁格

(74)专利代理机构 北京德琦知识产权代理有限公司

11018

代理人 潘怀仁 王珍仙

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

权利要求书3页 说明书63页

序列表33页 附图27页

(54)发明名称

针对胰岛素受体的抗体片段和其治疗低血糖的用途

(57)摘要

本公开大体涉及使用负向调节剂抗体片段治疗或预防低血糖的方法,所述抗体片段结合于胰岛素受体并且在所述胰岛素受体处调节胰岛素活动。

1. 一种抗体或其片段,包含三个具有SEQ ID NO:5至7、8至10以及50至112中所罗列的氨基酸序列的重链CDR,和三个具有SEQ ID NO:14至16或SEQ ID NO:20至28中所罗列的氨基酸序列的轻链CDR,其中所述抗体或其片段结合于i)胰岛素受体或(ii)包含胰岛素和胰岛素受体的复合物,或(i)和(ii)两者。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其片段,其中重链可变区氨基酸序列罗列于SEQ ID NO:1、2或29至49中,并且轻链可变区氨基酸序列罗列于SEQ ID NO:4或17至19中。

3. 一种抗体或其片段,包含三个具有SEQ ID NO:8至10中所罗列的氨基酸序列的重链CDR,和三个具有SEQ ID NO:14至16中所罗列的氨基酸序列的轻链CDR,其中所述抗体或其片段结合于i)胰岛素受体或(ii)包含胰岛素和胰岛素受体的复合物,或(i)和(ii)两者。

4. 根据权利要求3所述的抗体或其片段,其中重链可变区氨基酸序列罗列于SEQ ID NO:2中并且轻链可变区氨基酸序列罗列于SEQ ID NO:4中。

5. 一种抗体片段,包含三个具有SEQ ID NO:5至7或8至10中所罗列的氨基酸序列的重链CDR,和三个具有SEQ ID NO:11至13或14至16中所罗列的氨基酸序列的轻链CDR,其中所述抗体片段结合于i)胰岛素受体或(ii)包含胰岛素和胰岛素受体的复合物,或(i)和(ii)两者。

6. 根据权利要求3所述的抗体片段,其中重链可变区氨基酸序列罗列于SEQ ID NO:1或2中并且轻链可变区氨基酸序列罗列于SEQ ID NO:3或4中。

7. 根据权利要求5或6所述的抗体片段,其中所述三个重链CDR具有SEQ ID NO:8至10中所罗列的氨基酸序列,并且所述三个轻链CDR具有SEQ ID NO:14至16中所罗列的氨基酸序列。

8. 根据权利要求5所述的抗体片段,其中重链可变区氨基酸序列罗列于SEQ ID NO:2中并且轻链可变区氨基酸序列罗列于SEQ ID NO:4中。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体片段,其是Fab片段。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体片段,其中所述抗体或抗体片段结合于(i)胰岛素受体或(ii)包含胰岛素和胰岛素受体的复合物,或(i)和(ii)两者,平衡解离常数 $K_D$ 是 $10^{-5}$ M或更小,其能够将胰岛素与胰岛素受体之间的结合亲和力减弱至少约1.5倍,任选地至多1000倍。

11. 根据权利要求10所述的抗体或抗体片段,其中所述结合亲和力是 $K_A$ 、 $K_D$ 、结合速率与解离速率的比率或解离速率与结合速率的比率中的任一个。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体将胰岛素信号传导活性的EC<sub>50</sub>提高约2倍至1000倍,任选地在pAKT分析中。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体是单克隆抗体。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体是人类抗体。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体结合于疏水性部分。

16. 一种制备无菌药物组合物的方法,包含向根据权利要求1至15中任一项所述的抗体中添加无菌的药学上可接受的稀释剂。

17. 一种无菌组合物,包含根据权利要求1至15中任一项所述的抗体和无菌的药学上可接受的稀释剂。

18. 一种治疗低血糖的方法,包含向有需要的个体以可有效改善低血糖的量给药抗体片段,所述抗体片段是结合于胰岛素受体的胰岛素和/或在所述胰岛素受体处的胰岛素活动的负向调节剂。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述低血糖选自以下组成的组:磺酰脲诱发的低血糖、胰岛素诱发的低血糖、夜间低血糖、在肥胖症治疗手术后之后的低血糖以及患有代谢和胰岛素敏感性病症的个体的低血糖。

20. 一种治疗或预防夜间低血糖的方法,包含向有需要的个体以可有效改善夜间低血糖的量给药抗体片段,所述抗体片段是结合于胰岛素受体的胰岛素和/或在所述胰岛素受体处的胰岛素活动的负向调节剂。

21. 根据权利要求18至20中任一项所述的方法,其中所述抗体片段结合于(i)胰岛素受体或(ii)包含胰岛素和胰岛素受体的复合物,或(i)和(ii)两者,平衡解离常数 $K_D$ 是 $10^{-5}M$ 或更小,其能够将胰岛素与胰岛素受体之间的结合亲和力减弱至少约1.5倍,任选地至多1000倍。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述抗体片段将胰岛素信号传导活性的 $EC_{50}$ 提高约2倍至1000倍,任选地在pAKT分析中。

23. 根据权利要求18至22中任一项所述的方法,其中所述抗体片段包含三个SEQ ID NO:5至7、8至10或50至112中所罗列的重链CDR,和三个SEQ ID NO:11至13、14至16或20至28中所罗列的轻链CDR。

24. 根据权利要求18至22中任一项所述的方法,其中所述抗体片段包含三个SEQ ID NO:5至7或8至10中所罗列的重链CDR,和三个SEQ ID NO:11至13或14至16中所罗列的轻链CDR。

25. 根据权利要求18至24中任一项所述的方法,其中所述抗体片段包含选自SEQ ID NO:1或2组成的组的重链可变区和选自SEQ ID NO:3或4组成的组的轻链可变区。

26. 根据权利要求18至24中任一项所述的方法,其中所述抗体片段包含三个SEQ ID NO:8至10中所罗列的重链CDR和三个SEQ ID NO:14至16中所罗列的轻链CDR。

27. 根据权利要求18至26中任一项所述的方法,其中所述抗体片段包含SEQ ID NO:2中所罗列的可变重链氨基酸序列和SEQ ID NO:4中所罗列的可变轻链氨基酸序列。

28. 根据权利要求18至27中任一项所述的方法,其中所述抗体片段来自单克隆抗体。

29. 根据权利要求18至28中任一项所述的方法,其中所述抗体片段来自人类抗体。

30. 根据权利要求18至29中任一项所述的方法,其中所述抗体片段是Fab片段。

31. 根据权利要求18至30中任一项所述的方法,其中所述抗体片段结合于疏水性部分。

32. 根据权利要求18至31中任一项所述的方法,其中所述抗体片段在药物组合物中。

33. 根据权利要求18至32中任一项所述的方法,其中所述抗体片段减少所述个体的高胰岛素血症或过度胰岛素信号传导。

34. 根据权利要求18至33中任一项所述的方法,其中所述个体的血糖含量在给药前少于70mg/dL。

35. 根据权利要求18至34中任一项所述的方法,其中所述抗体片段以0.1至25mg/kg的剂量给药。

36. 根据权利要求18至35中任一项所述的方法,其中所述抗体片段以约0.05至10mg/

kg、约0.3至6.0mg/kg或约0.1至3mg/kg的剂量给药。

37. 根据权利要求18至36中任一项所述的方法,其中所述抗体片段以快速灌注剂(single bolus)形式每12小时一次或每天一次给药,直至消除低血糖。

38. 根据权利要求18至37中任一项所述的方法,其中所述抗体经静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮内、皮下或经口给药。

39. 根据权利要求18至38中任一项所述的方法,其中给药使所述个体的血糖提高1.5至10倍或10%至40%。

40. 根据权利要求18至39中任一项所述的方法,其中给药使所述个体的血糖提高至少10mg/dL。

41. 根据权利要求18至40中任一项所述的方法,其中所述个体还在进行限制膳食疗程。

42. 根据权利要求18至41中任一项所述的方法,进一步包含给药第二药剂,任选地其中所述第二药剂是胰高血糖素和/或胰岛素。

43. 根据权利要求18至42中任一项所述的方法,其中所述给药预防或改善一种或多种选自以下组成的组的低血糖症状:胰腺胰岛细胞增殖症、胰岛细胞增大、胰岛细胞增生、 $\beta$ 细胞出芽、心动过速、发汗、脸红以及认知功能减退。

44. 根据权利要求18至43中任一项所述的方法,其中所述给药在20分钟内,任选地在15分钟内减轻或消除低血糖。

45. 根据权利要求18至44中任一项所述的方法,其中所述抗体片段具有大约4小时的作用持续时间。

46. 根据权利要求18至45中任一项所述的方法,其中所述个体对右旋糖或胰高血糖素疗法不起反应。

## 针对胰岛素受体的抗体片段和其治疗低血糖的用途

[0001] 本申请要求2015年8月6日申请的美国临时专利申请62/202,143和2016年1月19日申请的美国临时专利申请62/280,675的优先权权益,以其全文引用的方式并入本文中。

### 技术领域

[0002] 本公开大体涉及使用对胰岛素受体具有特异性,调节胰岛素与胰岛素受体的结合的负向调节剂抗体片段治疗和预防低血糖,所述低血糖例如因以下所致:内源性或外源性高胰岛素血症、胰岛素过度剂量、药物诱发性低血糖、胰岛素诱发的低血糖、已经历肥胖症治疗或胃旁路手术的患者进食之后发生的低血糖和表征为异常葡萄糖含量的疾病低血糖状态,以及与高胰岛素血症相关的并发症和病症。

### 背景技术

[0003] 本公开涉及表征为异常生成和/或利用胰岛素、胰岛素类似物或胰岛素模拟物的低血糖疾病病况和病症的治疗或预防中的胰岛素-胰岛素受体信号传导复合物的新颖调节剂。

[0004] 胰岛素是用于降低血糖含量的主要激素。胰岛素活动的第一步是所述激素结合于胰岛素受体 (INSR),所述胰岛素受体是完整的膜糖蛋白,也特指为CD220或HHF5。当胰岛素结合于INSR时,受体由酪氨酸自体磷酸化活化,并且INSR酪氨酸激酶使各种效应分子磷酸化,所述效应分子包括胰岛素受体基质-1 (IRS-1),引起激素活动 (Ullrich等人,自然 (Nature) 313:756-761,1985;Goldfine等人,内分泌评论 (Endocrine Reviews) 8:235-255,1987;White和Kahn,生物学化学杂志 (Journal Biol.Chem.) 269:1-4,1994)。IRS-1结合和磷酸化最终导致胰岛素反应性组织 (包括肌肉细胞和脂肪组织) 的外膜上高亲和力和葡萄糖输送体 (Glut4) 分子增多,并且因此增加葡萄糖从血液摄入这些组织中。Glut4从细胞囊泡输送到细胞表面,在细胞表面上其随后能够介导葡萄糖输送至细胞中并且降低血糖含量。

[0005] 胰岛素分泌异常增加能导致严重的低血糖症或低血糖,一种可能导致包括癫痫症和大脑损伤的显著病态的状态。药物诱发性低血糖可以由给药磺酰脲药物或过度剂量的胰岛素引起。多种罕见的医学病状以非药物诱发性、内源性高胰岛素性低血糖为特征,即由身体过度产生胰岛素引起的低血糖。这些病状包括先天性胰岛素过多、胰岛素瘤以及胃旁路手术之后的高胰岛素性低血糖。

[0006] 医源性低血糖描述由给药过度胰岛素或其类似物、或刺激内源性胰岛素分泌的药剂引起的低血糖的病状和效果。基本上但非排他地为用胰岛素促泌素或胰岛素治疗的结果的医源性低血糖是糖尿病血糖管理的主要限制因素。医源性低血糖导致大部分患有T1DM的人和许多患有晚期T2DM的人反复发病,并且有时是严重的。反复发作低血糖损害身体对后续血浆葡萄糖含量下降的防御,并且因此导致复发性低血糖的恶性循环。

[0007] 低血糖引起各种症状,包括:失调、意识模糊、意识丧失、癫痫以及甚至死亡。

[0008] 大部分轻度低血糖的发作可以有效地通过摄取葡萄糖锭剂或其它含有碳水化合物的饮料或点心来自我治疗。更严重的症状性低血糖还可以用经口摄取碳水化合物治疗。

然而,在低血糖患者由于意识模糊、不省人事或其它原因而无法服用经口葡萄糖补充剂时,需要不经肠疗法。作为非医院急救程序,有时采用注射高血糖激素,胰高血糖素,所述注射通过患者自身或已经过鉴别和治疗重度低血糖的训练的患者的同伴经皮下或肌内进行。在医学环境中,静脉内葡萄糖是标准的不经肠疗法。

[0009] 先天性胰岛素过多 (CHI) 包含一组基因病症,其表征为由于胰腺 $\beta$ 细胞不受调控地分泌胰岛素而反复发作高胰岛素性低血糖 (Arnoux J., 等人 *Orphanet 罕见疾病杂志* (*Orphanet Journal of Rare Diseases*) 6:63 (2011); Yorifuji T., 安中化内分泌代谢杂志 (*Ann Pediatr Endocrinol Metab*) 19:57-68 (2014))。CHI 是新生儿、婴儿以及儿童时期的高胰岛素性低血糖的最常见原因,并且通常在生命前两年内诊断。以组织病理学来说,CHI 可以分散或局部形式存在。在分散形式中,所有胰腺 $\beta$ 细胞受影响,而在局部形式中,异常 $\beta$ 细胞的病灶 (通常) 局限于胰腺小部分区域。CHI 的最常见的已知原因是编码 SUR1 和 Kir6.2 的基因发生功能损失突变,所述 SUR1 和 Kir6.2 是 ATP 敏感钾通道 (KATP 通道) 的亚单元,涉及胰腺 $\beta$ 细胞的胰岛素分泌。

[0010] 近来已观察到膳食后低血糖 (PPH) 是胃旁路手术的副作用或并发症 (Singh 等人, *糖尿病谱* (*Diabetes Spectrum*) 25:217-221, 2012; Patti 等人, *糖尿病学* (*Diabetologia*) 48:2236-2240, 2005; Service 等人 *新英格兰医学杂志* (*N Engl J Med*) 353:249-254, 2005), 包括 Roux-en-Y 胃旁路 (RYGB) 的常见程序之后。通常观察到的胃旁路手术的副作用是“倾倒 (dumping)”, 其为摄取单糖并且快速排空食物至小肠中的结果。此通常表征为血管舒缩症状 (例如脸红、心动过速)、腹痛以及腹泻 (Singh 等人, *糖尿病谱* 25:217-221, 2012; Mathews 等人, *手术* (*Surgery*) 48:185-194, 1960)。可以在进食后最多几小时发生较迟倾倒,并且由胰岛素对高血糖症反应引起,所述高血糖症由从邻近的小肠快速吸收单糖引起。相比于在手术后不久注意到并且随时间的推移改善的倾倒,高胰岛素性低血糖在胃旁路手术后存在几个月至数年 (通常约 1 年,至多 3 年)。此综合症与倾倒不同之处在于发病重度餐后神经低血糖症,所述神经低血糖症在倾倒中通常不存在,以及发病胰腺胰岛细胞增生症 (胰岛细胞增大、 $\beta$ 细胞从导管上皮细胞出芽以及胰岛与导管并列)。不同于倾倒,营养修改不会缓解膳食后低血糖 (PPH) 的症状。

## 发明内容

[0011] 本公开涉及使用针对胰岛素受体的负向调节剂抗体片段治疗患有低血糖的患者。此类调节剂可以例如用来治疗由于内源性或外源性高胰岛素血症 (例如由胰岛素过度剂量引起) 而患有低血糖的哺乳动物个体,以及表征为异常葡萄糖含量的疾病低血糖状态。此类调节剂还可以用来预防处于风险中的个体发生低血糖,如患有 1 型 (例如脆弱性) 或 2 型糖尿病,已经历肥胖症治疗手术的患者,或患有遗传性代谢和胰岛素敏感性病症的患者。

[0012] 在各种实施例中,本发明提供一种抗体或其片段,所述抗体或其片段包含三个具有 SEQ ID NO: 5-7、8-10 以及 50-112 中所罗列的氨基酸序列的重链 CDR,和三个具有 SEQ ID NO: 14-16 或 SEQ ID NO: 20-28 中所罗列的氨基酸序列的轻链 CDR,其中所述抗体或其片段结合于 i) 胰岛素受体或 (ii) 包含胰岛素和胰岛素受体的复合物,或 (i) 和 (ii) 两者。举例来说,在一个实施例中,本发明提供抗体或其片段,其中重链可变区氨基酸序列罗列于 SEQ ID NO: 1、2 或 29-49 中,并且轻链可变区氨基酸序列罗列于 SEQ ID NO: 4 或 17-19 中。

[0013] 在各种实施例中,本发明提供抗体或其片段,所述抗体或其片段包含三个具有SEQ ID NO:5-7、8-10、50-52、53-55、56-58、59-61、62-64、65-67、68-70、71-73、74-76、77-79、80-82、83-85、86-88、89-91、92-94、95-97、98-100、101-103、104-106、107-109或110-112中所罗列的氨基酸序列的重链CDR,和三个具有SEQ ID NO:11-13、14-16或SEQ ID NO:20-28中所罗列的氨基酸序列的轻链CDR,其中所述抗体或其片段结合于(i)胰岛素受体或(ii)包含胰岛素和胰岛素受体的复合物,或(i)和(ii)两者。举例来说,在一些实施例中,本发明提供抗体或其片段,其中重链可变区氨基酸序列罗列于SEQ ID NO:1、2或29-49中,并且轻链可变区氨基酸序列罗列于SEQ ID NO:3、4或17-19中。

[0014] 在各种实施例中,本公开提供抗体或其片段,所述抗体或其片段包含三个具有SEQ ID NO:8-10中所罗列的氨基酸序列的重链CDR,和三个具有SEQ ID NO:14-16中所罗列的氨基酸序列的轻链CDR,其中所述抗体或其片段结合于i)胰岛素受体或(ii)包含胰岛素和胰岛素受体的复合物,或(i)和(ii)两者。在各种实施例中,重链可变区氨基酸序列罗列于SEQ ID NO:2中并且轻链可变区氨基酸序列罗列于SEQ ID NO:4中。

[0015] 还提供抗体片段,所述抗体片段包含三个具有SEQ ID NO:5-7或8-10中所罗列的氨基酸序列的重链CDR,和三个具有SEQ ID NO:11-13或14-16中所罗列的氨基酸序列的轻链CDR,其中所述抗体片段结合于i)胰岛素受体或(ii)包含胰岛素和胰岛素受体的复合物,或(i)和(ii)两者。在各种实施例中,重链可变区氨基酸序列罗列于SEQ ID NO:1或2中并且轻链可变区氨基酸序列罗列于SEQ ID NO:3或4中。

[0016] 在各种实施例中,抗体或其片段是Fab片段。

[0017] 在各种实施例中,所述抗体或片段与其它抗体或片段,包括Fab或Fab变体相比更小程度地与肝素结合。

[0018] 在各种实施例中,抗体或其片段结合于(i)胰岛素受体或(ii)包含胰岛素和胰岛素受体的复合物,或(i)和(ii)两者,平衡解离常数 $K_D$ 是 $10^{-5}$ M或更小,其能够将胰岛素与胰岛素受体之间的结合亲和力减弱至少约1.5倍,任选地至多1000倍。在某些实施例中,所述抗体能够将所述胰岛素与胰岛素受体之间的结合亲和力减弱约2倍至500倍。在各种实施例中,抗体将胰岛素信号传导活性的 $EC_{50}$ 提高约2倍至1000倍,任选地在pAKT分析中。任选地,结合亲和力是 $K_A$ 、 $K_D$ 、结合速率与解离速率的比率或解离速率与结合速率的比率中的一个。

[0019] 在各种实施例中,抗体或其片段是单克隆抗体。在各种实施例中,抗体或其片段是人类抗体。

[0020] 在各种实施例中,抗体或其片段结合于疏水性部分。

[0021] 在各种实施例中,抗体或其片段在药物组合物中。

[0022] 在各种实施例中,本公开涵盖制备无菌药物组合物的方法,包含向本文所涵盖的抗体或其片段添加无菌的药学上可接受的稀释剂。任选地,组合物中也包括少量的防腐剂,如杀菌或抑菌剂。也涵盖包含本文所述的抗体或其片段和无菌的药学上可接受的稀释剂的无菌组合物。

[0023] 在各种实施例中,本发明提供治疗或预防低血糖的方法,包含向有需要的个体以可有效改善或预防低血糖的量给药抗体或其片段,所述抗体或其片段是结合于胰岛素受体的胰岛素和/或在所述胰岛素受体处的胰岛素活动的负向调节剂。任选地,低血糖选自以下

组成的组：磺酰脲诱发的低血糖、胰岛素诱发的低血糖、夜间低血糖以及在肥胖症治疗手术后之后的低血糖。

[0024] 在各种实施例中，本发明提供治疗或预防夜间低血糖的方法，包含向有需要的个体以可有效改善或预防夜间低血糖的量给药抗体或其片段，所述抗体或其片段是结合于胰岛素受体的胰岛素和/或在所述胰岛素受体处的胰岛素活动的负向调节剂。

[0025] 在各种实施例中，本发明提供包含给药抗体片段的方法，所述抗体片段结合于(i)胰岛素受体或(ii)包含胰岛素和胰岛素受体的复合物，或(i)和(ii)两者，平衡解离常数 $K_D$ 是 $10^{-5}$ M或更小，其能够将胰岛素与胰岛素受体之间的结合亲和力减弱至少约1.5倍，任选地至多1000倍。任选地，抗体片段将胰岛素信号传导活性的 $EC_{50}$ 提高约2倍至1000倍，任选地在pAKT分析中。

[0026] 在各种实施例中，本发明提供包含给药抗体片段的方法，所述抗体片段包含三个具有SEQ ID NO:5-7、8-10、50-52、53-55、56-58、59-61、62-64、65-67、68-70、71-73、74-76、77-79、80-82、83-85、86-88、89-91、92-94、95-97、98-100、101-103、104-106、107-109或110-112中所罗列的氨基酸序列的重链CDR，和三个具有SEQ ID NO:11-13、14-16或SEQ ID NO:20-28中所罗列的氨基酸序列的轻链CDR，或其中重链可变区氨基酸序列罗列于SEQ ID NO:1、2或29-49中，并且轻链可变区氨基酸序列罗列于SEQ ID NO:3、4或17-19中。举例来说，在一些实施例中，本发明提供给药抗体片段，所述抗体片段包含三个具有SEQ ID NO:5-7或8-10中所罗列的氨基酸序列的重链CDR，和三个具有SEQ ID NO:14-16或SEQ ID NO:20-28中所罗列的氨基酸序列的轻链CDR，或所述抗体片段包含具有SEQ ID NO:2中所罗列的氨基酸序列的可变重链和具有SEQ ID NO:4或17-19中所罗列的氨基酸序列的可变轻链。在一个实施例中，三个重链CDR具有SEQ ID NO:8-10中所罗列的氨基酸序列，并且三个轻链CDR具有SEQ ID NO:14-16中所罗列的氨基酸序列。在一个实施例中，重链可变区氨基酸序列罗列于SEQ ID NO:2中并且轻链可变区氨基酸序列罗列于SEQ ID NO:4中。

[0027] 在各种实施例中，本发明提供包含给药抗体片段的方法，所述抗体片段来自单克隆抗体，例如来自人类抗体。

[0028] 在各种实施例中，本发明提供包含给药抗体片段的方法，所述抗体片段是Fab片段。

[0029] 在各种实施例中，本发明提供包含给药抗体片段的方法，所述抗体片段结合于疏水性部分。

[0030] 在各种实施例中，本发明提供包含给药抗体片段的方法，所述抗体片段在药物组合物中。

[0031] 在各种实施例中，给药抗体片段减少与个体的高胰岛素血症或过度胰岛素信号传导相关的并发症。

[0032] 在各种实施例中，在给药本文所述的抗体之前个体的血糖含量少于70mg/dL。任选地，在给药之前个体的血糖含量少于55mg/dL。

[0033] 在各种实施例中，抗体或其片段以0.1至25mg/kg的剂量给药。在各种实施例中，抗体或其片段以0.3至9mg/kg的剂量给药。所涵盖的额外剂量包括约0.3至15mg/kg、约0.05至10mg/kg、约0.3至6.0mg/kg、约0.1至3mg/kg或约1至6mg/kg。示范性剂量包括0.1mg/kg、0.3mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1.0mg/kg、1.5mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、



6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg、15mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg、20mg/kg、21mg/kg、22mg/kg、23mg/kg、24mg/kg或25mg/kg。其它剂量包括1mg/天、2.5mg/天、5mg/天、10mg/天、20mg/天、25mg/天、50mg/天、75mg/天、100mg/天、150mg/天、200mg/天、250mg/天、500mg/天或1000mg/天。

[0034] 在各种实施例中,抗体或其片段以快速灌注剂(single bolus)形式例如每2-12小时给药。还涵盖每天一次给药,以及连续冲剂,任选地低剂量连续冲剂。用于给药的额外剂量和方法更详细地论述于实施方式中。

[0035] 在各种实施例中,抗体或其片段经静脉内、动脉内、腹膜内、鼻内、肌内、皮内、皮下、经口或通过连续输注给药。在各种实施例中,抗体或其片段通过连续输液泵或储槽给药。

[0036] 在各种实施例中,给药抗体或其片段将个体的血糖提高1.5至10倍或10%至40%。在各种实施例中,给药将个体的血糖提高1.5至10倍或更多,或10%至40%或更大。在各种实施例中,与未治疗的个体相比空腹血糖提高大约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更大。在各种实施例中,给药使个体的血糖提高大约10mg/dL或更多。在各种实施例中,给药使血糖提高返回至正常范围。

[0037] 在各种实施例中,个体正进行限制膳食疗程。

[0038] 在各种实施例中,根据本发明的方法进一步包含给药第二药剂。在各种实施例中,第二药剂是胰岛素、胰高血糖素、阿卡波糖(acarbose)、奥曲肽(octreotide)、维拉帕米(verapamil)或二氮嗪。

[0039] 进一步设想本文所述的前述抗体或其片段中的任一种可以与所属领域中已知的或本文所述的作为辅助疗法的任何抗糖尿病药剂同时给药。还涵盖包含抗体或其片段以及其它抗糖尿病药剂的组合物。

[0040] 所属领域中已知多种抗糖尿病药剂,包括但不限于:1)磺酰脲(例如格列美脲(glimepiride)、格列生脲(glisentide)、磺酰脲、AY31637);2)双胍(例如二甲双胍);3) $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂(例如阿卡波糖、米格列醇(miglitol));4)噻唑烷二酮(例如曲格列酮(troglitazone)、吡格列酮(pioglitazone)、罗格列酮(rosiglitazone)、格列吡嗪(glipizide)、巴拉列酮(balaglitazone)、利格列酮(rivoglitazone)、萘格列酮(netoglitazone)、曲格列酮、恩格列酮(englitazone)、AD 5075、T 174、YM 268、R 102380、NC 2100、NIP 223、NIP 221、MK 0767、环格列酮(ciglitazone)、adaglitazone、CLX 0921、达格列酮(darglitazone)、CP 92768、BM 152054);5)胰高血糖素样肽(GLP)和GLP类似物或GLP-1受体的促效剂(例如肠促胰岛素类似物)或其稳定剂(例如DPP4抑制剂,如西他列汀(sitagliptin));以及6)胰岛素或其类似物或模拟物(例如LANTUS®)。

[0041] 在各种实施例中,给药所述抗体或其片段预防或改善一种或多种选自以下组成的组的低血糖症状:胰腺胰岛细胞增殖症、胰岛细胞增大、胰岛细胞增生、 $\beta$ 细胞出芽、心动过速、发汗、脸红以及认知功能减退。

[0042] 在各种实施例中,给药所述抗体或其片段在20分钟内,任选地15分钟内减轻或消除低血糖。

[0043] 在各种实施例中,抗体或其片段具有大约4至6小时的作用持续时间。

[0044] 在各种实施例中,个体对右旋糖或胰高血糖素疗法不起反应。

[0045] 在各种实施例中,本发明提供结合于胰岛素受体和/或包含胰岛素和胰岛素受体的复合物的抗体或其片段,平衡解离常数 $K_D$ 是 $10^{-5}M$ 或更小,其能够将胰岛素与胰岛素受体(INSR)之间的结合亲和力或结合比参数降低约1.5倍至5倍。在各种实施例中, $K_D$ 是至少 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-11}$ 或 $10^{-12}M$ 。在各种实施例中,抗体片段的 $K_D$ 比四聚抗体的 $K_D$ 更强。

[0046] 在各种实施例中,减弱胰岛素与INSR之间的结合亲和力的抗体或其片段是负向调节剂。在一些实施例中,减弱胰岛素与INSR之间的结合亲和力的抗体或其片段是拮抗剂。

[0047] 在相关方面,本文所述的将胰岛素结合减小1.5倍至5倍的抗体或其片段还是胰岛素介导的信号传导的强力调节剂。

[0048] 在某些实施例中,本发明提供以至少 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-11}$ 或 $10^{-12}M$ 的亲和力结合于胰岛素受体的负向别构调节剂抗体,并且展现将胰岛素介导的信号传导(任选地在pAKT分析中)抑制约5倍至1000倍。

[0049] 在各种实施例中,负向别构调节剂展现小于2倍变化的协同性系数 $\alpha$  ( $\alpha \leq 2$ ),和5至500倍变化之间的协同性系数 $\beta$  ( $5 \leq \beta \leq 500$ )。

[0050] 本公开进一步涵盖本公开的抗体或其片段调节INSR与胰岛素、胰岛素类似物或胰岛素模拟物之间的结合。在各种实施例中,本公开的抗体或其片段还展现所期望的生物特性,包括但不限于减少动物模型中活体外或活体内的葡萄糖摄取,并且优选地由外源性胰岛素诱发的葡萄糖摄取,或由其它药理学治疗,如磺酰脲和其它药物诱发的胰岛素生成。在一些实施例中,所述抗体或其片段能够减少葡萄糖摄取率或总量,或两者。

[0051] 另一方面,本发明提供治疗与高胰岛素血症、异常的胰岛素生成和/或表现为过度胰岛素信号传导的对胰岛素的敏感性相关的病状或病症的方法,所述方法包含以可有效治疗胰岛素过度生成和/或敏感性的量向有需要的个体给药本公开的负向调节抗体或拮抗剂抗体或其片段。

[0052] 在一个实施例中,与胰岛素敏感性相关的病症选自以下组成的组:癌症、卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)、胰岛素瘤、糖尿病性肾病、低血糖、胰岛细胞增殖症(KATP-H1分散性疾病、KATP-H1局部疾病或“PHHI”)、GDH-H1(胰岛素过多/高血氨综合症(HI/HA)、亮氨酸敏感低血糖、或二氮嗪敏感低血糖)、胰岛细胞调节异常综合症、特发性婴儿期低血糖、持续性婴儿期高胰岛素性低血糖(PHHI)以及先天性胰岛素过多、胰岛素过度剂量、因肾衰竭(急性或慢性)、Nissen胃底折叠术所致的低血糖、因自身移植胰岛细胞至肝中所致的低血糖、以及慢性肾病,例如III、IV或V型。

[0053] 在各种实施例中,处于风险中的个体是已知某些膳食会引起低血糖的个体,举例来说,给定膳食并进行混合膳食测试(MMT),且处于风险中的个体将通常激发低血糖。

[0054] 在各种实施例中,处于风险中的个体是先前已发病低血糖的个体,任选地,正用磺酰脲药剂或胰岛素治疗的个体,老年个体,或患有糖尿病或先天性胰岛素过多的个体。

[0055] 在症状之前或症状开始出现时向处于风险中的患者给药能够减少对替代或当前护理标准治疗的需要,减少对胰切除术的需要以及减少医生对所治疗个体问诊的次数。

[0056] 在一个实施例中,抗体是指抗体或其片段,或包含抗体的抗原结合结构域的多肽。示范性抗体或抗体片段包括多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人类化抗体、人类抗体、多特异性抗体、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、结构域抗体(dAb)、互补决定区(CDR)片段、CDR接枝抗

体、单链抗体 (scFv)、单链抗体片段、嵌合抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、微型抗体、线抗体；螯合剂重组抗体、三功能抗体或双功能抗体、细胞内抗体、纳米抗体、小模块免疫药剂 (SMIP)、抗原结合结构域免疫球蛋白融合蛋白质、骆驼化抗体、含有VHH的抗体或其变异体或衍生物、以及含有至少一部分足以使得特异性抗原结合于多肽的免疫球蛋白的多肽，如一、二、三、四、五或六个CDR序列。在一个实施例中，抗体是单克隆抗体。在相关实施例中，抗体是人类抗体。

[0057] 在示范性实施例中，本文的方法涵盖以下的用途：

[0058] 分别带有SEQ ID NO:5-10和SEQ ID NO:50-112和SEQ ID NO:11-16和SEQ ID NO:20-28中任一种的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2或LCDR3中的任何一、二、三、四、五或六个的单克隆抗体或其片段，任选地在此类CDR中包括一种或两种突变，例如保守或非保守取代；

[0059] 分别带有SEQ ID NO:5-10、50-112或SEQ ID NO:1、2或29-49中任一种的所有HCDR1、HCDR2、HCDR3或重链可变区的单克隆抗体或其片段，任选地在此类CDR任一个中包括一种或两种突变，任选地进一步包含任何适合的重链恒定区，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2或IgE或其杂交体；

[0060] 带有SEQ ID NO:11-16或SEQ ID NO:3或4、或SEQ ID NO:20-28或SEQ ID NO:17-19中任一种的所有LCDR1、LCDR2、LCDR3或轻链可变区的单克隆抗体或其片段，任选地在此类CDR任一个中包括一种或两种突变，任选地进一步包含任何适合的轻链恒定区，例如 $\kappa$ 或 $\lambda$ 轻链恒定区；

[0061] 单克隆抗体的经纯化制备物，包含如SEQ ID NO:1、2、29-49和4或17-19中所阐述的重链可变区和轻链可变区；

[0062] 单克隆抗体的经纯化制备物，包含如SEQ ID NO:2和4或17-19中所阐述的重链可变区和轻链可变区；

[0063] 与包含SEQ ID NO:1-4、17-19或29-49中任一种中所罗列的可变区的抗体结合于INSR的相同线性或三维表位的单克隆抗体，如通过X射线晶体学或其它生物物理学或生物化学技术测定，如氘交换质谱、丙氨酸扫描和肽片段ELISA；

[0064] 与包含SEQ ID NO:1-4、17-19或29-49中任一种中所罗列的可变区的抗体竞争的单克隆抗体，任选地如表1中成对，用于结合于人类INSR达大于约75%、大于约80%、或大于约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%或95%。

[0065] 在一些实施例中，所述抗体包含含有SEQ ID NO:1-4、17-19或29-49中所罗列的可变区的抗体的所有三个轻链CDR、所有三个重链CDR或所有六个CDR。在一些示范性实施例中，来自抗体的两个轻链CDR可以和来自不同抗体的第三轻链CDR组合。替代地，来自一种抗体的LCDR1可以和来自不同抗体的LCDR2以及来自又另一种抗体的LCDR3组合，尤其CDR高度同源的抗体。类似地，来自一种抗体的两个重链CDR可以和来自不同抗体的第三重链CDR组合；或来自一种抗体的HCDR1可以和来自不同抗体的HCDR2以及来自又另一种抗体的HCDR3组合，尤其CDR高度同源的抗体。

[0066] 还可以使用共有CDR。此处得到的共有CDR中任一个可以和来自本文所述的抗体中任一种的同一种链（例如重链或轻链）的两个其它CDR组合，例如形成适合的重链或轻链可变区。可以确定示范性共有序列，形成表1和图19中所罗列的序列。可以确定重链和/或轻链

可变区序列,以及HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3氨基酸序列的示范性共有序列。

[0067] 另一方面,本公开提供本文所述的抗体的变异体或衍生物用途。举例来说,在一个实施例中抗体经如本文所述的可检测部分标记。在另一实施例中,抗体与本文所述的疏水性部分结合。

[0068] 抗体的变异体包括在本文所提供的氨基酸序列中具有突变或更改的抗体,包括氨基酸插入、缺失或取代,例如保守或非保守取代。

[0069] 在一些实施例中,所提供抗体包含具有与SEQ ID NO:1、2或29-49中所罗列的重链可变区至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%一致的氨基酸序列的多肽,和/或具有与SEQ ID NO:3或4或17-19中所罗列的轻链可变区至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%一致的氨基酸序列的多肽,所述抗体进一步包含CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2或CDRL3中至少一、二、三、四、五个或所有。在一些实施例中,与所述轻链可变区具有百分比一致性的氨基酸序列可以包含轻链CDR中的一个、两个或三个。在其它实施例中,与所述重链可变区具有百分比一致性的氨基酸序列可以包含重链CDR中的一个、两个或三个。

[0070] 预期本文所用的抗体在抗体的CDR区中可以具有一个、或两个或更多个氨基酸取代,例如保守取代。

[0071] 在各种实施例中,所述方法中使用的抗体包含选自SEQ ID NO:1、2或29-49组成的组的重链可变区和选自SEQ ID NO:3或4或17-19组成的组的轻链可变区。在各种实施例中,可变重链罗列于SEQ ID NO:2并且可变轻链罗列于SEQ ID NO:4或17-19。

[0072] 在各种实施例中,抗体包含三个SEQ ID NO:5-7、8-10或50-112中所罗列的重链CDR,和三个SEQ ID NO:11-13、14-16、20-22、23-25以及26-28中所罗列的轻链CDR。

[0073] 在一个实施例中,可变重链罗列于SEQ ID NO:2并且可变轻链罗列于SEQ ID NO:4。在另一实施例中,抗体包含三个SEQ ID NO:8-10中所罗列的重链CDR,和三个SEQ ID NO:14-16或20-22、23-25以及26-28中所罗列的轻链CDR。

[0074] 在各种实施例中,给药在禁食疗程期间进行。

[0075] 在各种实施例中,给药引发胰岛素抗性。在各种实施例中,胰岛素抗性通过膳食耐受性测试、胰岛素耐受性测试禁食HOMA-IR分析和/或经口葡萄糖耐受性测试测量。

[0076] 还涵盖本文所述的调节胰岛素-INSR信号传导相互作用的前述抗体或多肽中的任一种在制备用于治疗本文所述的病症中任一种的药物中的用途。还涵盖包含前述抗体或多肽中任一种,任选地具有适合的使用说明书的针筒,例如单次使用或预填充针筒;无菌密封容器,例如小瓶、瓶子;容器和/或试剂盒或包装。

[0077] 应理解本文所述的每个特征或实施例或组合是本公开的任一方面的非限制性说明性实例,并且因而意指可以与本文所述的任何其它特征或实施例或组合组合。举例来说,在用如“一个实施例”、“一些实施例”、“其它实施例”、“具体示范性实施例”和/或“另一实施例”的言辞描述特征时,这些类型的实施例中每一个是意图与本文所述的任何其它特征或特征的组合组合的特征的非限制性实例,不必列举每个可能的组合。此类特征或特征的组

合应用于本公开的任一方面。类似地,本公开还涵盖描述使用或鉴定多肽结合剂的方法,所述多肽结合剂如由某些特征表征的抗体,由那些特征表征的多肽结合剂。在公开数值的实例处于范围内时,这些实例中任一个涵盖范围的可能端点,涵盖此类端点之间的任何和所有数值,并且涵盖较高和较低端点的任何和所有组合。

### 附图说明

[0078] 图1描绘采用流式细胞测量术比较XPA.15.247亲本抗体(IgG 247)与其变异体XPA.15.247.2.018(IgG 247.2.018)在表达人类INSR的CHO细胞上的结合的代表性结果。

[0079] 图2描绘采用流式细胞测量术比较XPA.15.247亲本Fab(Fab247)与其变异体XPA.15.247.2.018 Fab(Fab 247.2.018)在表达人类INSR的CHO细胞上的结合的代表性结果。

[0080] 图3A展示pAKT分析结果,其展示由调节XPA.15.247亲本抗体和其变异体XPA.15.247.2.018的抗人INSR实现的胰岛素剂量反应敏感性(EC50)的变化。也展示由XPA.15.247和XPA.15.247.2.018抗体的单体Fab片段产生的结果。图3B展示在胰岛素的EC80浓度下评估的XPA.15.247亲本抗体和其变异体XPA.15.247.2.018抗体和Fab片段在CHO-huINSR细胞中调节pAkt活性的效能。

[0081] 图4A展示XPA.15.247亲本抗体在韦斯鼠(Wistar rat)中对磺酰脲诱发的低血糖的效果,并且图4B展示变异体XPA.15.247.2.018 IgG在韦斯鼠中对磺酰脲诱发的低血糖的效果;并且图4C展示变异体XPA.15.247.2.018 Fab在韦斯鼠中对磺酰脲诱发的低血糖的效果。图4D展示在研究的完整时程期间的葡萄糖读数。

[0082] 图5A展示XPA.15.247亲本抗体在斯普拉-道来鼠(Sprague-Dawley rat)中对胰岛素诱发的低血糖的效果,并且图5B展示变异体XPA.15.247.2.018 Fab在斯普拉-道来鼠中对胰岛素诱发的低血糖的效果。

[0083] 图6展示根据本发明的抗体和其片段的氨基酸序列。

[0084] 图7展示XPA.15.247.2.018不结合肝素,而两种其它Fab变异体非特异性地结合肝素。

[0085] 图8展示XPA.15.247.2.018 Fab对逆转胰岛素诱导的重度低血糖的效果。

[0086] 图9A-9B展示通过静脉内给药的XPA.15.247.2.018 Fab在鼠中的药代动力学。图9A展示至多8小时的早期时间点;图9B展示至多48小时的完整时程。

[0087] 图10A-10C展示XPA.15.247.2.018 Fab在静脉内、肌肉或皮下给药之后在格廷根小型猪(Göttingen minipig)中的药代动力学和药效动力学。图10A展示至多8小时的早期时间点,而图10B展示完整时程。图10C展示XPA.15.247.2.018 Fab在格廷根小型猪中的血糖改变。

[0088] 图11A-11C展示通过单次静脉内、肌肉或皮下给药XPA.15.247.2.018 Fab逆转正常格廷根小型猪的Vetsulin诱导的低血糖。图11A展示以10mg/kg和2mg/kg静脉内给药XPA.15.247.2.018 Fab;图11B展示以5mg/kg肌肉给药XPA.15.247.2.018 Fab;并且图11C展示以9mg/kg皮下给药XPA.15.247.2.018 Fab。

[0089] 图12展示通过以9mg/kg单次皮下给药XPA.15.247.2.018 Fab在正常格廷根小型猪中预防Vetsulin诱导的低血糖。

[0090] 图13A-13B展示在每周一次静脉内给药XPA.15.247.2.018 IgG后斯普拉-道来鼠的空腹和餐后血糖含量。图13A展示8小时禁食之后的血糖含量；图13B展示未禁食的血糖含量。

[0091] 图14A-14D展示在每周一次静脉内给药XPA.15.247.2.018 IgG后斯普拉-道来鼠中禁食和喂食条件期间的C肽和胰岛素含量。图14A展示8小时禁食之后的C肽含量；图14B展示未禁食的C肽含量；图14C展示8小时禁食之后的胰岛素含量；图14D展示未禁食的胰岛素含量。

[0092] 图15A-15C展示在每周一次持续3周重复静脉内给药XPA.15.247.2.018 IgG之后的体重变化以及肝和肾的重量变化。图15A展示研究期间的体重变化；图15B展示研究结束时的肝重量变化；图15C展示研究结束时的肾重量变化。

[0093] 图16A-16B展示在一天一次静脉内给药XPA.15.247.2.018 Fab后斯普拉-道来鼠的空腹和餐后血糖含量。图16A展示第1天的血糖含量；在8小时禁食之后收集t<sub>0</sub>处的血糖；图16B展示第3天的血糖含量；在8小时禁食之后收集t<sub>0</sub>处的血糖。

[0094] 图17A-17D展示在一天一次持续3天静脉内给药XPA.15.247.2.018 Fab之后斯普拉-道来鼠中的C肽和胰岛素含量。图17A-17B分别展示第1天和第3天的C肽含量；在8小时禁食之后收集t<sub>0</sub>处的C肽含量；图17C-17D分别展示第1天和第3天的胰岛素含量；在8小时禁食之后收集t<sub>0</sub>处的胰岛素含量。

[0095] 图18A-18C展示在一天一次持续3天重复静脉内给药XPA.15.247.2.018 Fab之后的体重变化以及肝和肾的重量变化。图18A展示研究期间的体重变化；图18B展示研究结束时的肝重量变化；图18C展示研究结束时的肾重量变化。

[0096] 图19罗列XPA.247.2.018亲和力成熟重链可变区序列的CDR序列，以及不同克隆物对不同物种的亲和力、效能以及结合。

## 具体实施方式

[0097] 本公开提供对胰岛素受体 (INSR) 或胰岛素受体-胰岛素复合物具有特异性的抗体，和其在治疗关于异常葡萄糖含量的病症 (例如低血糖) 中的用途，所述低血糖包括因内源性或外源性高胰岛素血症所致的低血糖、胰岛素过度剂量 (胰岛素诱发的低血糖) 和表征为异常葡萄糖含量的疾病低血糖状态、磺酰脲诱发的低血糖以及膳食后低血糖。此类调节剂还可以用来预防处于风险中的个体，此类1型或2型糖尿病患者中出现低血糖。

[0098] 不受理论束缚，但预期本文中所公开的抗体或抗体片段调节信号传导复合物能够引起对信号输入敏感性的降低并且同时减少信号转导。给药负向调节剂抗体降低细胞路径的敏感性和/或细胞反应的绝对位准。

[0099] 定义

[0100] 术语“化合物”是指任何有机或无机、内源性或外源性化合物，包括但不限于多肽、蛋白质、肽、小分子、核酸 (例如DNA和RNA)、碳水化合物、脂类、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、肽模拟物、聚酮化合物和衍生物、结构性类似物或其组合。“内源性”意指哺乳动物中天然存在，而“外源性”意指哺乳动物中不会天然存在，例如所给予的外来化合物，无论天然存在或人造化合物。

[0101] 术语“多肽结合剂”是指能够特异性结合抗原 (例如标靶或其信号传导搭配物) 或

能够以可测量的结合亲和力结合抗原的多肽。多肽结合剂的实例包括抗体、肽体、多肽和肽,任选地结合于其它肽部分或非肽部分。多肽结合剂可以结合的抗原包括能够诱发抗体反应,或能够以大于非特异性结合的可检测结合亲和力结合于多肽结合剂的任何蛋白质或非蛋白质分子。调节多肽结合剂结合的抗原可以包括标靶、标靶的信号传导搭配物和/或包含标靶和其信号传导搭配物的复合物。

[0102] 术语“抗体”以最广泛意义使用,并且包括充分组装的抗体、四聚抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、能结合抗原的抗体片段(例如Fab'、F'(ab)<sub>2</sub>、Fv、单链抗体、双功能抗体)以及包含前述的重组肽,只要它们展现所期望的生物活性。“免疫球蛋白”或“四聚抗体”是由两个重链和两个轻链构成的四聚糖蛋白,各自包含可变区和恒定区。抗原结合部分可以通过重组DNA技术,或通过完整抗体的酶促或化学裂解来产生。抗体片段或抗原结合部分包括尤其Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、结构域抗体(dAb)、互补决定区(CDR)片段、CDR接枝抗体、单链抗体(scFv)、单链抗体片段、嵌合抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、微型抗体、线抗体;螯合剂重组抗体、三功能抗体或双功能抗体、细胞内抗体、纳米抗体、小模块免疫药剂(SMIP)、抗原结合结构域免疫球蛋白融合蛋白质、骆驼化抗体、含有VHH的抗体或其变体或衍生物、以及含有至少一部分足以使得特异性抗原结合于多肽的免疫球蛋白的多肽,如一、二、三、四、五或六个CDR序列,只要抗体保留所期望的生物活性。

[0103] “单克隆抗体”是指从大体上均质的抗体的群体获得的抗体,即组成群体的个别抗体除了可以微量存在的可能的天然存在的突变以外是相同的。

[0104] 如本文所用的“抗体变体”是指在天然抗体可变区结构域的可变区中含有至少一个氨基酸取代、缺失或插入的抗体多肽序列。变体可以大体上与未改性的抗体同源或与其大体上一致。

[0105] 如本文所用的“嵌合抗体”是指含有来源于两种不同的抗体(参见例如美国专利第4,816,567号)的序列的抗体,所述两种不同的抗体通常源自不同物种。嵌合抗体最通常包含人类和啮齿动物抗体片段,一般是人类恒定区和小鼠可变区。

[0106] “中和抗体”是能够消除或显著减弱抗体所结合的抗原的生物功能的抗体分子。因此,“中和”抗体能够消除或显著减弱生物功能,如酶活性、配体结合或细胞内信号传导。

[0107] “分离”抗体是已经从其天然环境的组分鉴别和分离和回收的抗体。其天然环境的污染组分是会干扰所述抗体的诊断或治疗用途的材料,并且可以包括酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质溶质。在优选实施例中,抗体将被纯化(1)到按抗体的重量计大于95%,如通过劳里法(Lowry method)测定,并且最优选地超过99重量%, (2)到足以通过使用旋转杯式序列分析仪获得至少15个N末端残基或内部氨基酸序列的程度,或(3)到均质,通过使用考马斯(Coomassie)蓝或优选地,银染剂在还原或非还原条件下进行SDS-PAGE。分离的抗体包括在重组细胞内的原位抗体,因为抗体的天然环境的至少一种组分将不存在。然而,通常,经分离抗体将通过至少一个纯化步骤制备。

[0108] 如本文所用的“重链可变区”是指包含所述抗体重链可变结构域的至少一个互补决定区(CDR)的抗体分子的区。重链可变区可以含有所述抗体重链的一个、两个或三个CDR。

[0109] 如本文所用的“轻链可变区”是指抗体分子的区,包含至少一个所述抗体轻链可变结构域的互补决定区(CDR)。轻链可变区可以含有所述抗体轻链的一个、两个或三个CDR,所

述抗体轻链取决于抗体可以是 $\kappa$ 或 $\lambda$ 轻链。

[0110] 如本文所用,“特异性结合”的抗体“抗原特异性”、对抗原标靶“具有特异性”或对抗原具有“免疫反应性”是指本文所用的抗体或多肽结合剂以比其它类似序列的抗原更大的亲和力结合抗原。在一个方面,多肽结合剂或其片段、变异体或衍生物相比于其对其它(即非人类物种)类似抗原的结合亲和力将以更大的亲和力结合于人类抗原,但识别和结合标靶的直系同源物的多肽结合剂在所述方法的范围内。

[0111] 举例来说,作为抗体或其片段的对其同源抗原“具有特异性”的多肽结合剂指示抗体的可变区以可检测的偏好识别和结合所期望抗原(例如在所期望抗原是多肽的情况下,抗体的可变区能够借助结合亲和力的可测量差别将抗原多肽与同一家族的其它已知多肽区分开来,无论家族成员之间可能存在局部序列一致性、同源或类似性)。应理解,特异性抗体还可以通过与抗体可变区外部的序列相互作用,并且尤其在分子的恒定区中与其它蛋白质(例如金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)蛋白A或ELISA技术中的其它抗体)相互作用。测定本文方法中所用的多肽结合剂、例如抗体的结合特异性的筛检分析在所属领域中是熟知的并且通常实施的。关于这类分析法的综合讨论,参见Harlow等人(编),《抗体:实验室手册(Antibodies A Laboratory Manual)》;冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory);纽约州冷泉港(Cold Spring Harbor, N.Y.) (1988),第6章。用于所述方法中的抗体可以使用所属领域中已知的任何方法生成。

[0112] 术语“表位”是指能够在一个或多个抗原结合区被选择性结合剂识别和结合的任何分子的部分。表位通常由分子的化学活性表面基团(如氨基酸或碳水化合物侧链)组成,并且具有特定三维结构特征,以及荷质比特征。如本文所用的表位可以是连续的或不连续的。

[0113] 在与本文的多肽结合剂和多肽结合使用时,术语“衍生物”是指通过如以下技术化学改性的多肽:泛素化、结合到治疗剂或诊断剂、标记(例如经放射性核素或各种酶)、共价聚合物衔接,如聚乙二醇化(通过聚乙二醇衍生化),以及通过化学合成如鸟氨酸的氨基酸插入或取代,所述氨基酸通常不存在于人类蛋白质中。衍生物保留未衍生化的起始物质的分子的结合特性。

[0114] “可检测部分”或“标记”是指可以通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学或化学方式检测的组合物。举例来说,适用的标记包括 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、荧光染料、电子密集型试剂、酶(例如,如ELISA中常用)、生物素-链霉亲和素、地高辛(dioxigenin)、抗血清或单克隆抗体可用的半抗原和蛋白质、或与另一种经标记的核酸分子序列互补的核酸分子。可检测部分通常产生可测量的信号,如放射性、显色或荧光信号,其可用以定量样品中经结合可检测部分的量。

[0115] “肽”或“寡肽”是短氨基酸序列,通常介于3和100个氨基酸残基长度之间,并且涵盖天然存在的氨基酸残基和非天然存在的残基的类似物,所述残基类似物可以单独或与天然存在的氨基酸残基组合使用,以便产生具有特定构形特异性或特定生物活性(如抗蛋白分解)的肽。肽包括肽序列的重复并且可以包括头对尾或头对头布置的氨基酸序列的2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个复本。肽可以结合到非肽部分。肽包括二聚体、三聚体或更高数量级多聚体,例如通过结合于其它聚合或非聚合部分(如PEG)形成。

[0116] “多肽”是较长的氨基酸序列,通常长度是100或更多个氨基酸残基,并且涵盖天然



存在的氨基酸残基和非天然存在的残基的类似物,所述残基类似物可以单独或与天然存在的氨基酸残基组合使用,以便产生具有特定构形特异性或特定生物活性(如抗蛋白分解)的多肽。

[0117] 如本文所用,“肽体”是包含一种或多种融合到免疫球蛋白(Ig)恒定区的全部或部分的肽的融合多肽。参见例如美国专利第6,660,843号。肽可以是任何天然存在的或以重组方式制备或化学合成的结合到抗原的肽。肽可以是重复的并且可以包括头对尾或头对头布置的氨基酸序列的2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个复本。Ig恒定区的部分可以包括至少一个恒定区结构域(例如CH1、CH2、CH3和/或CH4)、多结构域(例如CH2与CH3)、结构域的多个复本(例如CH2-CH2)、保留所期望活性的恒定区的任何片段,例如负责循环中免疫球蛋白延长的半衰期的救助受体表位,或其任何组合。

[0118] “小”分子或有机“小”分子在本文中定义为分子量为约1000道尔顿或更小的非聚合有机化合物。

[0119] 如本文所用,“信号传导复合物”是介导细胞信号转导的蛋白质和/或内源性或外源性化合物的集合。信号传导复合物的实例包括但不限于结合于结合膜的受体的配体、结合于基质的酶或任何与传导涉及信号级联的生化反应相关的细胞分子。信号传导复合物还可以包括共受体、辅因子、支架蛋白、别构调节剂以及大量其它类型的涉及细胞信号转导的蛋白质和分子。信号传导复合物可以暂时形成或可以长期存在。信号传导复合物的分子组分可以随时间变化并且可以取决于每个组分的活化状态和细胞环境。信号传导复合物可以经历能诱发复合物的效应谱的化学改性和调整,包括转导活性细微改变、完全去活化和组成性活化、或正向和负向调节。

[0120] 术语“治疗有效量”在本文中用以指示可有效地改善或减轻与信号传导复合物的异常(例如异常高或异常低)信号传导相关的疾病症状或病征的靶特异性组合物的量。

[0121] 如本文所用,“结合”是两个或多于两个相异的分子实体之间由非共价相互作用的特异性网络产生的物理性缔合,所述非共价相互作用由以下一种或多种组成:不牢固的力,包括氢键、凡得瓦尔力(Van der Waals)、离子偶极子,以及疏水性相互作用和强力离子键。结合的量或程度可以关于亲和力测量。亲和力是两个或多于两个相异的分子实体之间的结合相互作用强度的量度,其可以由稳态结合常数或动力结合比参数定义。适合的常数或参数和其测量单位的实例在所属领域中已知,并且包括但不限于稳态缔合常数( $K_A$ ),例如约 $10^5 M^{-1}$ 或更高、约 $10^6 M^{-1}$ 或更高、约 $10^7 M^{-1}$ 或更高、约 $10^8 M^{-1}$ 或更高、约 $10^9 M^{-1}$ 或更高、约 $10^{10} M^{-1}$ 或更高、约 $10^{11} M^{-1}$ 或更高、或约 $10^{12} M^{-1}$ 或更高;平衡解离常数( $K_D$ ),例如约 $10^{-5} M$ 或更低、或约 $10^{-6} M$ 或更低、或约 $10^{-7} M$ 或更低、或约 $10^{-8} M$ 或更低、或约 $10^{-9} M$ 或更低、或约 $10^{-10} M$ 或更低、或约 $10^{-11} M$ 或更低、或约 $10^{-12} M$ 或更低;结合速率(例如 $sec^{-1}$ 、 $mol^{-1}$ )和解离速率(例如 $sec^{-1}$ )。在 $K_A$ 的情况下,较高值意指“更强的”或“加强的”结合亲和力,而在 $K_D$ 的情况下,较低值意指“更强的”或“加强的”结合亲和力。如本文所用,“加强的”结合比参数意指增加的滞留时间、更强的缔合或更弱的解离。如本文所用,“减弱的”结合比参数意指减少的滞留时间、较弱的缔合或更强的解离。在结合速率的情况下,较高值意指更快或更频繁的缔合,并且因此总体上产生加强的结合亲和力。在解离速率的情况下,较低值一般意指更慢的解离并且因此总体上产生更强的结合亲和力。然而,结合速率与解离速率的比率指示结合亲和力,如稍后进一步详细解释。

[0122] 两种化合物之间,例如抗体与抗原之间,或信号传导复合物的第一与第二组分之间的亲和力可以直接或间接地测量。亲和力的间接测量可以使用指示和/或与亲和力成比例的替代特性进行。此类替代特性包括:信号传导复合物的第一组分与第二组分结合的数量或程度,或预测或和第一组分与第二组分的表观结合亲和力相关的第一组分或第二组分的生物物理学特征。特定实例包括测量在第一或第二组分的亚饱和浓度下第一组分与第二组分结合的数量或程度。其它可以测量的生物物理学特性包括但不限于净分子电荷、循环活性、扩散速率、熔融温度、静电转向、或第一和第二组分中的一种或两种的构形。又其它可以测量的生物物理学特性包括测定结合相互作用对改变温度、pH或离子强度影响的稳定性。

[0123] 所测量的亲和力取决于用于进行测量的精确条件,除多种其它因素以外包括结合组分的浓度、分析装置、结合组分的价态、缓冲剂组合物、pH、离子强度和温度,以及添加到结合反应的额外组分,如别构调节剂和调控剂。可以使用定量和定性方法测量结合相互作用的绝对和相对强度。

[0124] 表观亲和力是在亲和力被条件或结合反应中的组分(如别构调节剂、抑制剂、结合组分价态等)改变的条件下,两个或多于两个相异的分子实体之间的结合相互作用的强度的量度。

[0125] 如本文所用,“亚饱和浓度”是结合反应中一种或多种组分的显著低于结合亲和力 $K_D$ 的浓度,和/或结合反应中一种组分的小于占据另一组分的所有结合位点所需的浓度。在亚饱和条件下,结合反应中结合组分之一相当大的百分比具有可用的结合位点。

[0126] 受体“拮抗剂”是一种类型的受体配体或药物,其在结合到受体时自身不引起生物反应,但阻断或减弱促效剂介导的反应。拮抗剂对于其同源受体可以具有亲和力但不具有效力,并且结合将扰乱相互作用和抑制促效剂或反向促效剂对受体的功能。拮抗剂通过其结合到受体上的活性位点或别构位点介导其效应,或拮抗剂可以在通常不涉及生物调整受体活性的独特结合位点处相互作用。拮抗剂活性取决于拮抗剂-受体复合物的长久性可以是可逆或不可逆的,所述拮抗剂-受体复合物的长久性转而取决于拮抗剂受体结合的性质。大部分拮抗剂通过与受体上的结构确定的结合位点处的内源性配体或基质竞争来达成其效能。

[0127] 拮抗剂不显示活化其所结合受体的功效。然而,一旦结合,拮抗剂可以抑制促效剂、反向促效剂以及局部促效剂的功能。在功能性拮抗剂分析中,剂量反应曲线测量一系列含量的拮抗剂逆转促效剂活性能力的效果。拮抗剂的效能通常由其 $IC_{50}$ 值定义。此可以针对给定拮抗剂通过测定引发半抑制促效剂的最大生物反应所需的拮抗剂浓度来计算。 $IC_{50}$ 越低,拮抗剂效能越大。

[0128] 竞争性或正位拮抗剂与配体或促效剂在同一结合位点(活性位点)可逆地结合于受体,但不活化受体,因此与促效剂竞争受体上的同一结合位点。非竞争性或别构拮抗剂与促效剂结合于单独结合位点,通过其单独结合位点对所述受体起作用。因此,它们不与促效剂竞争结合。无竞争性的拮抗剂与非竞争性的拮抗剂不同之处在于它们需要在其能够结合于单独别构结合位点之前通过促效剂活化受体。

[0129] “胰岛素抗性”描述一种病状,其中胰岛素的生理量不足以从细胞或组织产生正常的胰岛素反应。

[0130] 本公开涵盖胰岛素-INSR信号传导复合物调节剂的用途,其相较于现有疗法提供独特的优势。它们作用于INSR含量,其应该允许诱发整个范围的胰岛素作用,同时使不期望的副作用减到最小。假设抗体能够提供更加精确的葡萄糖和胰岛素含量控制。靶向INSR的胞外区域允许使用生物分子作为胰岛素-INSR信号传导复合物调节剂,其调节内源性胰岛素的效应;这些调节剂可以具有如增加的半衰期、减少的剂量或剂量频率、减少的毒性以及制备的更大简易性的优势。

[0131] 鉴别作为胰岛素信号传导调节剂的抗体的方法公开于共同拥有的美国专利8,926,976和专利申请U.S.S.N.14/555,233和U.S.S.N.12/890,590中,其以引用的方式并入本文中。

[0132] 胰岛素受体 (INSR)

[0133] INSR是在如刺丝虫类和昆虫一样原始的生物中发现的酪氨酸激酶受体。在高等生物中其对于葡萄糖稳态至关重要。小鼠基因敲除研究也已展示INSR在成脂、新血管生成、调节肝葡萄糖合成以及葡萄糖诱发的胰腺胰岛素分泌中至关重要 (Kitamura等人,生理学年鉴 (Ann.Rev.Physiol) 65:313-332,2003)。INSR信号传导在脑中也至关重要,其在脑中涉及调节食物摄入、外周脂肪沉积和生殖内分泌轴,以及涉及学习和记忆 (Wada等人,药理学科学杂志 (J.Pharmacol.Sci) 99:128-143,2005)。已在包括I型和II型糖尿病、痴呆以及癌症的疾病中表明INSR信号传导功能异常。

[0134] 密切相关的胰岛素样生长因子受体 (IGFR-1) 的结构域展现与INSR高的 (47-67%) 氨基酸一致性。尽管在结构上类似,但IGF-1R和INSR提供不同的生理功能。IGF-1R在除肝以外的几乎所有正常成人组织中表达,肝自身是IGF-I生成的主要部位。INSR主要参与代谢功能,而IGF-1R介导生长和分化 (Adams等人,细胞分子生命科学 (Cell.Mol.Life Sci.) 57:1050-1093,2000)。

[0135] INSR以两种剪接变体同工型INSR-A和INSR-B存在,其分别缺乏或含有由外显子11编码的12个氨基酸。较长的变体INSR-B是负责信号传导代谢反应的同工型。相对地,INSR-A信号主要促进细胞分裂反应,是在多种癌症中优先表达的同工型 (Denley等人,内分泌代谢研究 (Horm.Metab.Res.) 35:778-785,2003),并且能够以高亲和力结合胰岛素样生长因子2 (IGF-II) (Denley等人,分子内分泌学 (Mol.Endocrinol.) 18:2502-2512,2004)。

[0136] 成熟人类INSR是包含两个 $\alpha$ 子单元和两个 $\beta$ 子单元 (链) 的同型二聚体。 $\alpha$ 和 $\beta$ 链由单个基因编码并且由位于残基720-723处的弗林蛋白酶裂解位点的1370个氨基酸前体的翻译后裂解生成。 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链的194个残基包含INSR的胞外部分。存在单个跨膜序列和含有酪氨酸激酶的403残基细胞质结构域。各个胞外域单体的N末端半部由两个大约150个氨基酸的同源亮氨酸富集重复结构域 (L1和L2) 组成,由半胱氨酸富集区 (CR) 分隔,所述CR大小也是大约150个氨基酸。各个胞外域单体的C末端半部 (大约460个残基) 由三个III型纤维结合蛋白结构域 (FnIII-1、FnIII-2以及FnIII-3) 组成。FnIII-2结构域含有大约120个残基的插入结构域 (ID),在所述ID内存在弗林蛋白酶裂解位点,所述裂解位点产生成熟受体的 $\alpha$ 和 $\beta$ 链。在细胞内,每个单体含有通过两个调控区 (近膜区和C尾) 侧接的酪氨酸激酶催化结构域,所述调控区含有信号传导分子的磷酸化酪氨酸结合位点 (Ward等人,生理学报 (Acta Physiol.) 192:3-9,2008)。

[0137] 用于胰岛素结合的模型提出,在基本状态下,INSR同型二聚体在每个单体上含有

两对相同的结合位点(称为位点1和位点2)(De Meyts,生物分析(Bioessays) 26:1351-1362,2004)。胰岛素结合于一个 $\alpha$ 子单元上的低亲和力位点(位点1),随后在经结合胰岛素与第二INSR $\alpha$ 子单元的不同区(位点2)之间产生第二结合。两个 $\alpha$ 子单元之间的这一配体介导的桥接产生引起信号转导的高亲和力状态。相反,未系栓在其C末端的可溶INSR胞外域无法生成高亲和力受体-配体复合物。其能够在其两个位点1同时结合两分子胰岛素,但仅具有低亲和力(Adams等人,细胞分子生命科学(Cell.Mol.Life Sci.) 57:1050-1093,2000)。认为位点1由来自L1域的中心 $\beta$ -折叠的元件和 $\alpha$ 链的最后16个残基(称为CT肽)组成。位点2最可能在FnIII-1与FnIII-2交汇处包括环。认为胰岛素结合涉及胰岛素和其受体的结构改变(Ward和Lawrence,生物分析(BioEssays) 31:422-434,2009)。

[0138] 一旦胰岛素分子已对接在受体上并且实现其作用,其可以被释放回到胞外环境中或其可以由细胞降解。降解通常涉及胰岛素-INSR复合物的内吞作用,随后胰岛素降低酶起作用。大部分胰岛素分子由肝细胞降解。据估计典型的胰岛素分子最后在其最初释放至循环中约71分钟后降解(Duckworth等人,内分泌学综述(Endocr.Rev.) 19(5):608-24,1998)。

[0139] 胰岛素信号传导

[0140] 胰岛素诱发分子的信号传导网络,从INSR运载信息到参与代谢和生长的效应蛋白。胰岛素结合于INSR诱发构形改变,其促进固有酪氨酸激酶活性的活化,引起INSR $\beta$ 子单元的自体磷酸化。胰岛素受体基质(IRS)蛋白质通过与磷酸化INSR相互作用募集到质膜,并且这些蛋白质在酪氨酸残基上也变得磷酸化,促进其它信号传导蛋白质募集到复合物,引起通过两条主要路径的信号传导:(1) PI3激酶/PDK1/PKB路径,其主要调节代谢,对生长有部分影响,以及(2) Ras/ERK促有丝分裂路径,其主要调节细胞生长。

[0141] 已报告某些市售的胰岛素类似物在经培养癌细胞中显示IGF-1样促进细胞分裂和抗凋亡活动,在其于人类中的长期安全方面产生问题(Weinstein等人,糖尿病新陈代谢研究评论(Diabetes Metab Res Rev) 25:41-49,2009)。

[0142] 抗体类型和来源

[0143] 本公开涵盖结合于胰岛素受体或胰岛素/胰岛素受体复合物的标靶特异性抗体的用途。在示范性实施例中,本文所述的标靶特异性抗体可以包含人类 $\kappa$ 或人类 $\lambda$ 轻链或来源于其的氨基酸序列,或人类重链或来源于其的序列,或重链和轻链共同在单链、二聚体、四聚体或其它形式中。在一些实施例中,标靶特异性免疫球蛋白的重链和轻链是不同的氨基酸分子。在其它实施例中,同一氨基酸分子含有标靶特异性抗体的重链可变区和轻链可变区。

[0144] 术语“抗体”以最广泛意义使用,并且包括充分组装的抗体、四聚抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人类和人类化抗体、能结合抗原的抗体片段(例如Fab'、F'(ab)2、Fv、单链抗体、双功能抗体)以及包含前述的重组肽,只要它们展现所期望的生物活性。“免疫球蛋白”或“四聚抗体”是由两个重链和两个轻链构成的四聚糖蛋白,各自包含可变区和恒定区。抗原结合部分可以通过重组DNA技术,或通过完整抗体的酶促或化学裂解来产生。抗体片段或抗原结合部分包括尤其Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、结构域抗体(dAb)、互补决定区(CDR)片段、单链抗体(scFv)、单链抗体片段、嵌合抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、微型抗体、线抗体;螯合剂重组抗体、三功能抗体或双功能抗体、细胞内抗体、纳米抗体、小模块免疫药剂(SMIP)、抗原结合结构域免疫球蛋白融合蛋白

质、骆驼化抗体、含有VHH的抗体或其变异体或衍生物、以及含有至少一部分足以使得特异性抗原结合于多肽的免疫球蛋白的多肽,只要抗体保留所期望的生物活性。

[0145] 在天然存在的免疫球蛋白中,每个四聚体由两对相同的多肽链组成,各对具有一个“轻”链(约25kDa)和一个“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基端部分包括具有约100到110个或更多个主要负责抗原识别的氨基酸的可变区。每条链的羧基端部分界定了主要负责效应功能的恒定区。人类轻链分类为 $\kappa$ 和 $\lambda$ 轻链。重链分类为 $\mu$ 、 $\Delta$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$ 以及 $\epsilon$ ,并且分别将抗体的同型定义为IgM、IgD、IgG、IgA以及IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过具有约12个或更多个氨基酸的“J”区接合,并且重链还包括具有约10个更多个氨基酸的“D”区。一般参见基础免疫学(Fundamental Immunology),第7章(Paul,W.,编,第2版纽约雷文出版社(Raven Press,N.Y.)(1989))(出于所有目的以全文引用的方式并入本文中)。每个轻/重链对的可变区形成抗体结合位点,使得完整免疫球蛋白具有两个结合位点。

[0146] 每条重链在一端处具有可变结构域( $V_H$ ),紧接着是多个恒定结构域。每条轻链在一端处具有可变结构域( $V_L$ )且在其另一端具有恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对齐,并且轻链可变结构域与重链可变结构域对齐。认为特定氨基酸残基在轻链和重链可变结构域之间形成介接(Chothia等人,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)196:901-917,1987)。

[0147] 免疫球蛋白可变结构域展现由三个高变区或CDR接合的相对保守框架区(FR)的相同通用结构。从N末端到C末端,轻链和重链均包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3以及FR4。氨基酸到每个结构域的分配是根据Kabat等人,免疫学感兴趣的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),美国国家卫生研究院(National Institutes of Health),马里兰州贝塞斯达(Bethesda,Md.),1987和1991);Chothia和Lesk,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)196:901-917,1987;或Chothia等人,自然(Nature)342:878-883,1989的定义。

[0148] 抗体的高变区是指抗体中负责抗原结合的CDR氨基酸残基。高变区包含来自CDR的氨基酸残基(即,轻链可变结构域中的残基24-34(L1)、50-56(L2)以及89-97(L3),和重链可变结构域中的31-35(H1)、50-65(H2)以及95-102(H3),如由Kabat等人,免疫学感兴趣的蛋白质的序列,第5版.公共卫生服务部(Public Health Service),美国国家卫生研究院,马里兰州贝塞斯达,1991所描述,和/或来自高变环的那些残基(即轻链可变结构域中的残基26-32(L1)、50-52(L2)以及91-96(L3),和重链可变结构域中的26-32(H1)、53-55(H2)以及96-101(H3),如由Chothia等人,分子生物学杂志196:901-917,1987所描述)。然而,所属领域的技术人员理解在鉴定特定抗体的序列时,CDR残基的实际位置可以从上文所述的预计残基变化。

[0149] 框架或FR残基是除高变区残基以外的那些可变结构域残基。

[0150] 取决于免疫球蛋白重链恒定结构域的氨基酸序列,免疫球蛋白可以分成五种主要类别:IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM,其可以进一步分成子类或同型,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1以及IgA2。不同类别的免疫球蛋白的亚单元结构和三维构型是众所周知的。不同的同型具有不同的效应功能;例如IgG1和IgG3同型具有ADCC活性。如果本文所用的抗体包含恒定结构域,那么所述抗体可以是这些子类或同型中任一种。

[0151] 在示范性实施例中,本文所述的并且用于所述方法中的抗体或其片段能包含人类

$\kappa$ 或人类 $\lambda$ 轻链或来源于其的氨基酸序列,或人类重链或来源于其的序列,或重链和轻链共同在单链、二聚体、四聚体或其它形式中。

[0152] 单克隆抗体是指获自一群大体上均质抗体的抗体。单克隆抗体一般是高度特异性的,并且相比于常规(多克隆)抗体制备物可以针对单个抗原位点,所述常规(多克隆)抗体制备物通常包括针对不同决定子(表位)的不同抗体。除了其特异性以外,单克隆抗体有利在于它们通过均质培养基合成,不会被具有不同特异性和特性的其它免疫球蛋白污染。

[0153] 待根据本公开方法使用的单克隆抗体可以通过由科勒(Kohler)等人,自然256:495-7,1975首先描述的杂交瘤方法制成,或可以通过重组DNA方法(参见例如美国专利第4,816,567号)制成。单克隆抗体或其片段还可以使用例如Clackson等人,自然352:624-628,1991和Marks等人,分子生物学杂志222:581-597,1991中所描述的技术分离或衍生自噬菌体抗体库。

[0154] 在杂交瘤方法中,使小鼠或其它适合宿主动物(如仓鼠或猕猴)免疫以诱发淋巴细胞,所述淋巴细胞产生或能够产生将特异性结合于用于免疫作用的蛋白质的抗体(Harlow和Lane:抗体实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual),冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press):纽约冷泉港(Cold Spring Harbor,New York),1988)。

[0155] 抗体的重组生成

[0156] 本公开还涵盖编码适用于本发明方法的抗体的核酸分子。在一些实施例中,不同核酸分子编码抗原特异性抗体的重链可变区和轻链可变区。在其它实施例中,相同核酸分子编码抗原特异性抗体的重链和轻链可变区。

[0157] 编码本文所述的单克隆抗体的DNA可以使用常规程序(例如通过使用寡核苷酸探针,其能够特异性结合于编码单克隆抗体的重链和轻链的基因)从分泌抗体的杂交瘤细胞分离和测序。测序将一般需要分离所关注的基因或cDNA的至少一部分。通常此需要克隆编码单克隆抗体的DNA或优选mRNA(即cDNA)。克隆使用标准技术进行(参见例如Sambrook等人分子克隆实验室指南(Molecular Cloning:A Laboratory Guide),第1-3卷,冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press),1989,其以引用的方式并入本文中)。举例来说,可以通过逆转录polyA+mRNA,优选地膜相关mRNA建构cDNA库,并且使用对人类免疫球蛋白多肽基因序列具有特异性的探针筛查库。核苷酸探针反应和其它核苷酸杂交反应在使得能够鉴定在指定条件下与彼此杂交的聚核苷酸的条件下进行。可以如Sambrook等人(编),分子克隆实验指南,冷泉港实验室出版社:纽约冷泉港(1989),第9.47页到第9.51页所述计算杂交条件。

[0158] 在优选实施例中,使用聚合酶链式反应(PCR)扩增编码所关注的免疫球蛋白基因片段(例如轻链可变片段)的cDNA(或全长cDNA的部分)。所扩增的序列能容易地克隆至任何适合的载体中,例如表达载体、minigene载体或噬菌体展示载体。应了解所用的特定克隆方法并不关键,只要其有可能测定所关注免疫球蛋白多肽的某一部分的序列。如本文所用,“分离的”核酸分子或“分离的”核酸序列是以下核酸分子:(1)从在核酸的天然来源中与其通常相关的至少一种污染物核酸分子鉴别和分离,或(2)经克隆、扩增、标记或以其它方式与背景核酸区分,使得所关注的核酸序列能够测定,被认为是分离的。分离的核酸分子不同于其在自然界中被发现的形式或环境。因此,分离的核酸分子有别于存在于天然细胞中的核酸分子。然而,分离的核酸分子包括通常表达抗体的细胞中所含的核酸分子,例如核酸分

子在不同于天然细胞的染色体位置的染色体位置中。

[0159] 一种用于克隆和测序的RNA的来源是通过从转基因小鼠获得B细胞,并且将B细胞融合至永生细胞生成的杂交瘤。替代地,可以从经免疫动物的B细胞(或整个脾)分离RNA。当使用除杂交瘤以外的来源时,可能需要筛检编码具有特异性结合特性的免疫球蛋白或免疫球蛋白多肽的序列。一种此类筛检方法是使用噬菌体展示技术。噬菌体展示在本文中进一步描述并且也是所属领域中众所周知的。参见例如Dower等人,WO 91/17271、McCafferty等人,WO 92/01047以及Caton和Koprowski,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA),87:6450-54,1990,其各者以引用的方式并入本文中。在一个实施例中,分离来自经免疫转基因小鼠的cDNA(例如总脾cDNA),使用聚合酶链式反应扩增编码免疫球蛋白多肽的一部分(例如CDR区)的cDNA序列,并且将所扩增的序列插入到噬菌体载体中。编码所关注的肽,例如具有所期望的结合特性的可变区肽的cDNA通过如淘选的标准噬菌体展示技术鉴别。

[0160] 随后测定所扩增或克隆的核酸的序列。通常测定编码免疫球蛋白多肽的整个可变区的序列,然而,有时测序可变区的仅一部分,例如编码CDR的部分将是足够的。通常,所测序的部分将有至少30个碱基长度,更通常将测序编码可变区长度的至少约三分之一或至少约二分之一的碱基。

[0161] 测序可以在从cDNA库分离的克隆物上进行,或在使用PCR时,在亚克隆所扩增的序列之后进行,或通过所扩增片段的直接PCR测序进行。测序使用标准技术进行(参见例如Sambrook等人 分子选殖实验室指南,第1-3卷,冷泉港出版社,1989,和Sanger,F.等人 美国国家科学院院刊74:5463-5467,1977,其以引用的方式并入本文中)。通过比较所克隆的核酸的序列与所公开的人类免疫球蛋白基因和cDNA的序列,取决于所测序的区,技术人员将容易地能够测定(i)用于杂交瘤免疫球蛋白多肽的生殖系片段(包括重链的同型)和(ii)重链和轻链可变区的序列,包括由添加N-区和体细胞突变过程产生的序列。免疫球蛋白基因序列的一个信息来源是美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information),国家药品库(National Library of Medicine),美国国家卫生研究院(National Institutes of Health),马里兰州贝塞斯达。

[0162] 一旦分离之后,可以将DNA置于表达载体中,其随后转染至不以其它方式产生免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞中,所述宿主细胞如大肠杆菌(E.coli)细胞、猿猴COS细胞、人类胚胎肾脏293细胞(例如293E细胞)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞,得到单克隆抗体在重组宿主细胞中的合成体。抗体的重组生成在所属领域中众所周知。

[0163] 表达控制序列是指对于在特定宿主生物体中表达可操作地连接的编码序列必要的DNA序列。适合于原核生物的控制序列例如包括启动子(任选地,操纵序列)和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、聚腺苷酸化信号和增强子。

[0164] 在一个替代实施例中,所关注的免疫球蛋白的氨基酸序列可以通过直接蛋白质测序来测定。适合的编码核苷酸序列可以根据通用密码子表设计。

[0165] 可以通过将适当的核苷酸变化引入到编码DNA中,或通过肽合成来制备所期望抗体的氨基酸序列变异体。此类变异体包括例如从抗体氨基酸序列内的残基缺失、和/或插入至残基中,和/或取代残基。进行缺失、插入和取代的任何组合以达成最终构筑体,其限制条件为最终构筑体具有所期望的特性。氨基酸变化还可以更改抗体的翻译后过程,如改变糖

基化位点的数目或位置。

[0166] 编码抗体的氨基酸序列变异体的核酸分子通过所属领域中已知的多种方法制备。这些方法包括但不限于从天然来源(在天然存在的氨基酸序列变异体的情况下)分离,或通过寡核苷酸介导的(或定点)突变诱发、PCR突变诱发以及早期制备的抗体的变异体或非变异体型式的盒式诱变来制备。

[0167] 本公开还提供编码本文所涵盖的抗体的分离的核酸,任选地可操作地连接到由宿主细胞、载体和包含核酸的宿主细胞识别的控制序列,和用于生成所述抗体的重组技术,所述重组技术可以包含培养宿主细胞,使得核酸表达,并且任选地从宿主细胞培养物或培养基回收抗体。Birch和Racher先进药物输送评论(Adv. Drug Deliv. Rev.) 671-685 2006)回顾用于生成抗体的各种系统和方法。

[0168] 为了重组生成抗体或抗体片段,分离编码所述抗体或抗体片段的核酸并且插入到可复制的载体中以便进一步克隆(扩增DNA)或表达。编码单克隆抗体的DNA易于使用常规程序(例如通过使用能够特异性结合编码抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)进行分离和测序。多种载体是可供使用的。载体组分一般包括但不限于以下一种或多种:信号序列、复制起点、一种或多种选择性标记物基因、增强子元件、启动子以及转录终止序列。

[0169] 适用于克隆或表达本文载体中DNA的宿主细胞是原核生物、酵母或更高级真核生物细胞。适用于此目的的原核生物包括真细菌,如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如肠杆菌科(Enterobacteriaceae),如埃希氏菌属(例如大肠杆菌)、肠杆菌属(Enterobacter)、欧文菌属(Erwinia)、克雷伯氏菌属(Klebsiella)、变形菌属(Proteus)、沙门氏菌属(Salmonella)(例如鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium))、沙雷氏菌属(Serratia)(例如粘质沙雷氏菌(Serratia marcescans))和志贺氏菌属(Shigella);以及杆菌(Bacilli),例如枯草杆菌(B. subtilis)和地衣芽孢杆菌(B. licheniformis)(例如1989年4月12日出版的DD 266,710中公开的地衣芽孢杆菌41P);假单胞菌属(如铜绿假单胞菌(P. aeruginosa)),和链霉菌属(Streptomyces)。尽管其它菌株,如大肠杆菌B、大肠杆菌X1776(ATCC 31,537)以及大肠杆菌W3110(ATCC 27,325)是适合的,但一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌294(ATCC 31,446)。这些实例是说明性而非限制性的。

[0170] 在各种实施例中,制造本文的Fab蛋白质包含使用CHO细胞或瓦克化学(Wacker Chemie) ESETEC®技术,例如使用大肠杆菌K12细胞(瓦克化学股份公司,德国慕尼黑(Wacker Chemie AG, Munich, Germany))生成蛋白质。

[0171] 除原核生物外,真核微生物,如丝状真菌或酵母是抗体编码载体的适合的克隆或表达宿主。在低级真核宿主微生物之中最常使用酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)或常见烘焙酵母。然而,多种其它属、种和菌株通常可用并且适用于本文中,如粟酒裂殖酵母(Schizosaccharomyces pombe);克鲁维酵母属(Kluyveromyces)宿主,例如乳酸克鲁维酵母(K. lactis)、脆壁克鲁维酵母(K. fragilis)(ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母(K. bulgaricus)(ATCC 16,045)、威克克鲁维酵母(K. wickerhamii)(ATCC 24,178)、克鲁维雄酵母(K. waltii)(ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(K. drosophilum)(ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母(K. thermotolerans)和马克斯克鲁维酵母(K. marxianus);耶氏酵母属(yarrowia)(EP 402,226);巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)(EP 183,070);假丝酵母属(Candida);瑞氏木霉(Trichoderma reesia)(EP 244,234);粗糙脉孢菌(Neurospora



crassa);许旺酵母属(Schwanniomyces),例如西方许旺酵母(Schwanniomyces occidentalis);和丝状真菌,例如脉孢菌属(Neurospora)、青霉菌属(Penicillium)、弯颈霉属(Tolyocladium)和曲霉属(Aspergillus)宿主,例如构巢曲霉(A.nidulans)和黑曲霉(A.niger)。

[0172] 用于表达糖基化抗体的适合的宿主细胞来源于多细胞生物。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经由如以下的宿主鉴别出众多杆状病毒株和变异体和相应容许的昆虫宿主细胞:草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)(毛虫)、埃及伊蚊(Aedes aegypti)(蚊子)、白纹伊蚊(Aedes albopictus)(蚊子)、黑腹果蝇(Drosophila melanogaster)(果蝇)和家蚕(Bombyx mori)。多种用于转染的病毒株公开可用,例如苜蓿银纹夜蛾(Autographa californica)NPV的L-1变异体和家蚕NPV的Bm-5病毒株,并且所述病毒可以根据本发明用作本文中的病毒,具体来说用于转染草地贪夜蛾细胞。

[0173] 棉、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄、烟草、浮萍以及其它植物细胞的植物细胞培养物也可以用作宿主。

[0174] 适用哺乳动物宿主细胞系的实例是中国仓鼠卵巢细胞,包括CHOK1细胞(ATCC CCL61)、DXB-11、DG-44和中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO,乌尔劳布(Urlaub)等人,美国国家科学院院刊77:4216(1980));经SV40转化的猴肾CV1系(COS-7,ATCC CRL 1651);人胚肾系(经亚克隆用于生长于悬浮培养物中的293或293细胞,格雷安等人,普通病毒学杂志(J.Gen Virol.)36:59,1977);幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);小鼠塞特利氏细胞(TM4,马瑟,繁殖生物学23:243-251,1980);猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562,ATCC CCL51);TRI细胞(马瑟等人,纽约科学学术年报(Annals N.Y Acad.Sci.)383:44-68(1982));MRC 5细胞;FS4细胞;和人肝肿瘤系(Hep G2)。

[0175] 宿主细胞用上述表达或克隆载体转型或转染以便产生抗体,并且在适当时经修改的常规营养培养基中培养用于诱发启动子、选择转型体或扩增编码所期望序列的基因。另外,通过选择性标记物分离的具有转录单元的多个复本的新颖载体和经转染细胞系对于表达结合所期望抗原的抗体而言是尤其适用的和优选的。

[0176] 含有所期望抗体或抗体片段核酸序列的宿主细胞可以在各种培养基中培养。市售培养基,如Ham's F10(西格玛(Sigma))、最小必需培养基(MEM,西格玛)、RPMI-1640(西格玛)以及达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium,DMEM,西格玛)适用于培养宿主细胞。另外,汉姆(Ham)等人,酶学方法(Meth.Enz.)58:44,1979;巴恩斯(Barnes)等人,分析生物化学(Anal.Biochem.)102:255,1980;美国专利第4,767,704号、第4,657,866号、第4,927,762号、第4,560,655号或第5,122,469号;W090103430;W0 87/00195;或美国专利Re.第30,985号中所述的任何培养基可以用作宿主细胞的培养基。这些培养基中的任一种可以视需要补充有激素和/或其它生长因子(如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(如氯化钠、钙盐、镁盐以及磷酸盐)、缓冲剂(如HEPES)、核苷酸(如腺苷和胸苷)、抗生素(如GENTAMYCIN™药物)、微量元素(定义为通常以微摩尔范围内的最终浓度存在的无机化合物)和葡萄糖或等效能量来源。还可以包括所属领域技术人员已知的适当浓度

的任何其它必需补充剂。培养条件(例如温度、pH等)是先前用于经选择用于表达的宿主细胞情况的培养条件,并且对于普通熟练的业内人士将显而易见。

[0177] 当使用重组技术时,可以在细胞内、在周质空间中生成抗体或抗体片段,或直接分泌到培养基中,包括从微生物培养物。如果在细胞内生成抗体,那么作为第一步骤,例如通过离心或超过滤去除微粒碎片,宿主细胞或是裂解的片段。Better等人,科学(Science) 240:1041-43,1988; ICSU简短报告(ICSU Short Reports) 10:105,1990;以及美国国家科学院院刊90:457-461,1993描述用于分离分泌到大肠杆菌的周质空间的抗体的程序(还参见Carter等人,生物技术10:163-167,1992)。

[0178] 抗体或抗体片段组合物能使用例如羟磷灰石色谱阳离子或阴离子交换色谱以及亲和色谱法纯化,其中亲和色谱法是优选的纯化技术。蛋白A作为亲和配体的适合性取决于物种和存在于抗体中的任何免疫球蛋白Fc结构域的同型。蛋白A可用以纯化基于人类 $\gamma$  1、 $\gamma$  2或 $\gamma$  4重链的抗体(Lindmark等人,免疫学方法杂志62:1-13,1983)。蛋白G推荐给所有小鼠同型和人类 $\gamma$  3(Guss等人,欧洲分子生物学杂志(EMBO J.) 5:15671575,1986)。亲和配体附接的基质最通常是琼脂糖,但其它基质可用。如受控微孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯的机械稳定基质允许比用琼脂糖能实现的更快的流动速率和更短的处理时间。在抗体包含 $C_H$  3结构域的情况下,BakerbondABX树脂(J. T. Baker,新泽西州菲利普斯堡(Phillipsburg,N.J.))适用于纯化。取决于待回收的抗体,其它用于蛋白质纯化的技术,如离子交换柱上分级分离、乙醇沉降、逆相HPLC、二氧化硅上的色谱、肝素SEPHAROSE上的色谱、阴离子或阳离子交换树脂上的色谱(如聚天冬氨酸柱)、色谱焦聚、SDS-PAGE以及硫酸铵沉降也是可用的。

[0179] 示范性抗体的氨基酸序列罗列于图6和图19中。

[0180] 在示范性实施例中,所述方法涵盖以下的用途:

[0181] 分别带有SEQ ID NO:5-10或SEQ ID NO:50-112和SEQ ID NO:11-16或SEQ ID NO:20-28中任一种的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2或LCDR3中的任何一、二、三、四、五或六个的单克隆抗体,任选地在此类CDR任一个中包括一种或两种突变,例如保守或非保守取代;

[0182] 带有SEQ ID NO:1、2或29-49中任一种的HCDR1、HCDR2、HCDR3中的所有或重链可变区的单克隆抗体,任选地在此类CDR任一个中包括一种或两种突变;

[0183] 带有任何一种SEQ ID NO:3或4或17-19的LCDR1、LCDR2、LCDR3中的所有或轻链可变区的单克隆抗体,任选地在此类CDR任一个中包括一种或两种突变,任选地进一步包含任何适合的轻链恒定区,例如 $\kappa$ 或 $\lambda$ 轻链恒定区、其人类序列、或其杂交体或其人类共同体;

[0184] 与包含SEQ ID NO:1-4、17-19和/或29-49中所罗列的可变区的抗体结合到INSR的同一线性或三维表位的单克隆抗体,如通过X射线晶体学或其它生物物理学或生物化学技术测定,所述技术如氘交换质谱、丙氨酸扫描以及肽片段ELISA;

[0185] 与包含SEQ ID NO:1-4、17-19和/或29-49中所罗列的可变区的抗体竞争结合到人类INSR达大于约75%、大于约80%、或大于约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%或95%的单克隆抗体;

[0186] 单克隆抗体的经纯化制备物,包含如SEQ ID NO:1、2、29-49以及4或17-19中任一种所阐述的重链可变区和轻链可变区;

[0187] 单克隆抗体的经纯化制备物,包含如SEQ ID NO:2和4或17-19中任一种所阐述的重链可变区和轻链可变区。

[0188] 在一些实施例中,抗体包含所有三个轻链CDR、所有三个重链CDR或轻链和重链的所有六个CDR,如表1中所阐述成对。在一些示范性实施例中,来自抗体的两个轻链CDR可以和来自不同抗体的第三轻链CDR组合。替代地,来自一种抗体的LCDR1可以和来自不同抗体的LCDR2以及来自又另一种抗体的LCDR3组合,尤其CDR高度同源的抗体。类似地,来自一种抗体的两个重链CDR可以和来自不同抗体的第三重链CDR组合;或来自一种抗体的HCDR1可以和来自不同抗体的HCDR2以及来自又另一种抗体的HCDR3组合,尤其CDR高度同源的抗体。

[0189] 还可以使用共有CDR。此处得到的共有CDR中任一个可以和来自抗体中任一种的同一链(例如重链或轻链)的两个其它CDR组合,例如形成适合的重链或轻链可变区。

[0190] 在一些实施例中,所提供抗体包含具有与SEQ ID NO:1、2或29-49中所罗列的重链可变区至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%一致的氨基酸序列的多肽,和/或具有与SEQ ID NO:3或4或17-19中所罗列的轻链可变区至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%一致的氨基酸序列的多肽,所述抗体进一步包含CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2或CDRL3中至少一、二、三、四、五个或所有。在一些实施例中,与轻链可变区具有百分比一致性的氨基酸序列可以包含SEQ ID NO:11-16或SEQ ID NO:20-28中所罗列的一个、两个或三个轻链CDR。在其它实施例中,与重链可变区具有百分比一致性的氨基酸序列可以包含SEQ ID NO:5-10或SEQ ID NO:50-112中所罗列的一个、两个或三个重链CDR。

[0191] 预期本文所用的抗体可以在抗体的CDR区中具有一个、或两个或更多个氨基酸取代,例如非保守或保守取代。

[0192] 在相关实施例中,框架的残基更改。能更改的重链框架区位于名为H-FR1、H-FR2、H-FR3以及H-FR4的区内,其包围重链CDR残基,并且能更改的轻链框架区的残基位于名为L-FR1、L-FR2、L-FR3以及L-FR4的区内,其包围轻链CDR残基。框架区内的氨基酸可以例如经人类框架或人类共同框架中所鉴别的任何适合的氨基酸取代。

[0193] 进一步预期本公开提供经纯化多肽的用途,所述多肽包含SEQ ID NO:1、2或29-49的氨基酸序列中的任一种,稠合到SEQ ID NO:3、4或17-19的氨基酸序列中的任一种或其片段,所述片段包括SEQ ID NO:1、2或29-49和SEQ ID NO:3、4或17-19中的至少一部分,其中所述多肽结合胰岛素受体或胰岛素/胰岛素受体复合物。

[0194] 另一方面,本公开提供经纯化多肽的用途,所述多肽包含本文所述的轻链可变区的至少一个CDR,其中所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:11-16或SEQ ID NO:20-28中所罗列的LCDR序列至少90%一致的氨基酸序列。在一个实施例中,多肽可以和SEQ ID NO:11-16或SEQ ID NO:20-28中所罗列的LCDR中的任一种90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。另一方面,本公开涵盖经纯化多肽的用途,所述多肽包含本文所述的重链可变区的至少一个CDR,其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO:5-10或SEQ ID NO:50-112中所罗列的HCDR序列至少90%一致的氨基酸序列。在一个实施例中,多肽可以和SEQ ID NO:5-10或SEQ ID NO:50-112中所罗列的HCDR中的任一种90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。

[0195] 进一步预期抗体重链和轻链的CDR包含变异体氨基酸序列,所述变异体氨基酸序列可以改进抗体结合亲和力并且通过例如亲和力成熟得到。在一个方面中,预期本文所用的抗体包含与SEQ ID NO:1、2或29-49中所罗列的亲本抗体序列的HCDR1具有约50%、60%、70%、80%或90%一致性的重链HCDR1序列。在一个方面中,预期本文所用的抗体包含与SEQ ID NO:1、2或29-49中所罗列的亲本抗体序列的HCDR2具有约50%、60%、70%、80%或90%一致性的重链HCDR2序列。在相关方面中,预期本文所用的抗体包含与SEQ ID NO:1、2或29-49中所罗列的亲本抗体序列的HCDR3具有约50%、60%、70%、80%或90%一致性的重链HCDR3序列。

[0196] 在一个方面中,预期本文所用的抗体包含与SEQ ID NO:3、4或7-19中所罗列的亲本抗体序列的LCDR1具有约50%、60%、70%、80%或90%一致性的轻链LCDR1序列。在一个方面中,预期本文所用的抗体包含与SEQ ID NO:3、4或7-19中所罗列的亲本抗体序列的LCDR2具有约50%、60%、70%、80%或90%一致性的重链LCDR2序列。在相关方面中,预期本文所用的抗体包含与SEQ ID NO:3、4或7-19中所罗列的亲本抗体序列的LCDR3具有约50%、60%、70%、80%或90%一致性的重链LCDR3序列。

[0197] 在一个实施例中,本公开涵盖抗原结合化合物的用途,所述化合物包括功能片段,具有SEQ ID NO:1-4、17-19和/或29-49任一种中所阐述的可变区氨基酸序列。在相关实施例中,前述抗原结合化合物选自以下组成的组:充分组装的抗体、四聚抗体、多克隆抗体、单克隆抗体,包括HUMAN ENGINEERED™抗体;人类化抗体;人类抗体;嵌合抗体;多特异性抗体、抗体片段、Fab、F(ab')<sub>2</sub>;Fv;scFv或单链抗体片段;双功能抗体;三功能抗体;四功能抗体;微型抗体;线抗体;螯合剂重组抗体、三功能抗体或双功能抗体、细胞内抗体、纳米抗体、小模块免疫药剂(SMIP)、结合结构域免疫球蛋白融合蛋白质、骆驼化抗体、含有VHH的抗体、或这些抗体中任一种的变异体或衍生物,其包含所述抗体的一种或多种CDR序列并且展现所期望的生物活性。抗原结合化合物优选保留 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-11}$ 、 $10^{-12}$ M或更小的结合亲和力,如通过表面等离子共振所测量。

[0198] 在一个方面中,适用于本发明方法的抗体包含分别如氨基酸序列SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4中所罗列的重链可变区或轻链可变区,任选地如表1中成对。

[0199] 表1

[0200]

抗体	重链可变 SEQ ID NO:	HCDR1、 HCDR2、 HCDR3 SEQ ID NO:	轻链可变 SEQ ID NO:	LCDR1、 LCDR2、 LCDR3 SEQ ID NO:
XPA.15.247	1	5-7	3	11-13
XPA.15.247.2.018	2	8-10	4	14-16
XPA.15.247.014	2		17	20-22
XPA.15.247.011	2		18	23-25
XPA.15.247.019	1		19	26-28
RHF.15.05896.004	29	50-52		
RHF.15.05896.006	30	53-55		
RHF.15.05896.012	31	56-58		
RHF.15.05896.015	32	59-61		
RHF.15.05896.020	33	62-64		
RHF.15.05896.022	34	65-67		
RHF.15.05896.028	35	68-70		
RHF.15.05896.032	36	71-73		
RHF.15.05896.036	37	74-76		
RHF.15.05896.040	38	77-79		
RHF.15.05896.044	39	80-82		

[0201]

抗体	重链可变 SEQ ID NO:	HCDR1、 HCDR2、 HCDR3 SEQ ID NO:	轻链可变 SEQ ID NO:	LCDR1、 LCDR2、 LCDR3 SEQ ID NO:
RHF.15.05896.048	40	83-85		
RHF.15.05896.052	41	86-88		
RHF.15.05896.056	42	89-91		
RHF.15.05896.059	43	92-94		
RHF.15.05896.064	44	95-97		
RHF.15.05896.068	45	98-100		
RHF.15.05896.072	46	101-103		
RHF.15.05896.075	47	104-106		
RHF.15.05896.079	48	107-109		
RHF.15.05896.084	49	110-112		

[0202] 进一步预期抗体可以包含以上氨基酸序列中所罗列的抗体的全部或部分。在一个实施例中，抗体包含SEQ ID NO:1、2或29-49的重链的CDR1、CDR2或CDR3中至少一个，或SEQ ID NO:3或4或17-19的轻链的CDR1、CDR2或CDR3中至少一个，任选地如表1中成对。

[0203] 在一个实施例中，重链包含鉴别为重链CDR3序列的氨基酸序列。所述“重链CDR3序列”（HCDR3）包括鉴别为SEQ ID NO:7、10、52、55、58、61、64、67、70、73、76、79、82、85、88、91、94、97、100、103、106、109以及112中所罗列的重链CDR3序列的氨基酸序列。替代地，HCDR3序列包含与SEQ ID NO:7、10、52、55、58、61、64、67、70、73、76、79、82、85、88、91、94、97、100、103、106、109以及112中所罗列的任何HCDR3氨基酸序列相比含有一种或多种氨基酸变化的

氨基酸序列,所述氨基酸变化即取代、插入或缺失。优选取代包括在此处的另一个HCDR3内的相对应位置处的氨基酸取代。替代地,HCDR3序列可以包含本文所述的HCDR3的共有氨基酸序列。

[0204] 包含上文所述的抗体的HCDR3序列的重链可以进一步包含“重链CDR1序列”,其包括鉴别为SEQ ID NO:5、8、50、53、56、59、62、65、68、71、74、77、80、83、86、89、92、95、98、101、104、107以及110中的重链CDR1的氨基酸序列中任一种;与SEQ ID NO:5、8、50、53、56、59、62、65、68、71、74、77、80、83、86、89、92、95、98、101、104、107以及110中所鉴别的任何重链CDR1相比含有一种或多种氨基酸变化的氨基酸序列,优选地在此处的另一个重链CDR1内的相对应位置处的氨基酸取代;或本文所述的重链CDR1的共有序列。

[0205] 替代地,包含上文所述的抗体的HCDR3序列的重链可以进一步包含“重链CDR2序列”(HCDR2),其包括鉴别为SEQ ID NO:6、9、51、54、57、60、63、66、69、72、75、78、81、84、87、90、93、96、99、102、105、108以及111中的HCDR2的氨基酸序列中任一种;与SEQ ID NO:6、9、51、54、57、60、63、66、69、72、75、78、81、84、87、90、93、96、99、102、105、108以及111中所鉴别的任何HCDR2相比含有一种或多种氨基酸变化的氨基酸序列;或本文所述的重链CDR2的共有序列。

[0206] 包含上文所述的重链CDR3序列的重链还可以包含(a)上文所述的重链CDR1序列和(b)上文所述的重链CDR2序列。

[0207] 本公开的一个方面涵盖结合靶抗原的抗体的用途,所述抗体包含重链,所述重链包含本文所述的重链CDR序列中的任何一种、两种和/或三种。

[0208] 上文所述的重链CDR序列中任一种还可以包括添加到CDR任一端的氨基酸。抗体和抗原结合化合物的变异体和衍生物的制备,包括亲和力成熟或制备含有氨基酸类似物的变异体或衍生物在本文中进一步详细描述。示范性变异体包括在氨基酸序列内含有相对应氨基酸的保守或非保守取代的那些变异体,或氨基酸经人类抗体序列的相对应氨基酸取代的变异体。

[0209] 包含上文所述的重链中任一种的抗体可以进一步包含轻链,优选地结合到靶抗原的轻链,并且最优选地包含下文所述的轻链CDR序列的轻链。

[0210] 本公开的另一方面提供结合靶抗原的抗体的用途,所述抗体包含轻链,所述轻链包含下文所述的轻链CDR序列中的任何一种、两种和/或三种。

[0211] 轻链优选地包含鉴别为轻链CDR3序列的氨基酸序列。所述“轻链CDR3序列”(LCDR3)包括鉴别为SEQ ID NO:13、16、22、25或28中所罗列的轻链CDR3序列的氨基酸序列。替代地,轻链CDR3序列包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:13、16、22、25或28中所罗列的任何轻链CDR3氨基酸序列相比含有一种或多种氨基酸变化,所述氨基酸变化即取代、插入或缺失;或下文所述的轻链CDR3的共有序列。

[0212] 包含上文所述的轻链CDR3序列的轻链可以进一步包含“轻链CDR1序列”,其包括鉴别为SEQ ID NO:11、14、20、23或26中的轻链CDR1的氨基酸序列中任一种;与SEQ ID NO:11、14、20、23或26中所鉴别的任何轻链CDR1相比含有一种或多种氨基酸变化的氨基酸序列,优选地在此处的另一个轻链CDR1内的相对应位置处取代氨基酸;或本文所述的轻链CDR1的共有序列。

[0213] 替代地,包含上文所述的轻链CDR3序列的轻链可以进一步包含“轻链CDR2序列”,

其包括鉴别为SEQ ID NO:12、15、21、24或27中的轻链CDR2的氨基酸序列中任一种;与SEQ ID NO:12、15、21、24或27的任何轻链CDR2相比含有一种或多种氨基酸变化的氨基酸序列,优选地在SEQ ID NO 12、15、21、24或27的另一个轻链CDR2内的相对应位置处取代氨基酸;或轻链CDR2的共有序列。

[0214] 在相关方面,本公开涵盖经纯化多肽的用途,所述经纯化多肽包含SEQ ID NO:1、2或29-49的至少一个HCDR或SEQ ID NO:3、4或17-19的LCDR,其中重链可变区的框架区和轻链可变区的框架区包含来自人类抗体的框架区。在另一实施例中,重链可变区的框架区和轻链可变区的框架区由与人类抗体序列更加同源的氨基酸取代化学改变。举例来说,在每个重链框架区(H-FR1-4)内预期鼠重链可变区的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个固有框架区残基已经通过氨基酸取代改变,并且其中每个轻链框架区(L-FR1-4)内鼠轻链可变区的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个固有框架残基已经通过氨基酸取代改变。

[0215] 包含上文所述的轻链CDR3序列的轻链还可以包含(a)上文所述的轻链CDR1序列和(b)上文所述的轻链CDR2序列。

[0216] 包含上文所述的轻链可变区中任一种的抗体可以进一步包含重链可变区,任选地如表1中成对,优选地结合到靶抗原的重链可变区,并且最优选地包含上文所述的重链CDR序列的重链可变区。

[0217] 在相关实施例中,负向调节剂抗体包括但不限于以下抗体片段:XPA.15.247(SEQ ID NO:1和3),和XPA.15.247.2.018(SEQ ID NO:2和4)。还涵盖具有来自表1的重链和轻链的其它组合的抗体。

[0218] 在另一方面,抗体是与本文所述的抗体中任一种竞争结合到胰岛素受体或胰岛素/胰岛素受体复合物的抗体。在某些实施例中,抗体展现局部竞争。在相关实施例中,局部竞争是约30%至70%、约30%至80%、或约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%的竞争。在一些实施例中,抗体展现完全竞争。在一个实施例中,完全竞争是大于70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的竞争。用于测量抗体竞争的示范性分析包括但不限于所属领域中所描述的受体负载分析和表位分组(epitope binning)分析。

[0219] 结合胰岛素受体的其它示范性抗体包括以下所报告的那些抗体:Soos等人,生物化学杂志235:199-208,1986;Taylor等人,生物化学杂志242:123-129,1987;Prigent等人,生物化学杂志265(17):9970-9977,1990;Brindle等人,生物化学杂志268:615-620,1990;Steele-Perkins和Roth,生物化学杂志265(16):9458-9463,1990;McKern等人,自然443(14):218-221;Boado等人,生物技术和生物工程(Biotech and BioEng.)96(2):381-391;W004/050016;Roth等人,美国国家科学院院刊79:7312-7316,1982;Morgan等人,美国国家科学院院刊83:328-332,1986;Lebrun等人,生物化学杂志268(15):11272-11277,1993;Forsayeth等人,美国国家科学院院刊84:3448-3451,1987;Forsayeth等人,生物化学杂志262(9):4134-4140,Goodman等人,受体研究杂志(J.Receptor Res.)14(6-8),381-398,1994;Ganderton等人,生物化学杂志288:195-205,1992;Spasov等人,实验生物学和医学学报(Bull.of Exp.Biol.and Med.)144(1):46-48,2007;以及EP 2 036 574 A1。

[0220] 抗体片段

[0221] 抗体片段包含完整全长抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合区或可变区。抗

体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fcab以及Fv片段；双功能抗体；线抗体；单链抗体分子(例如scFv)；多特异性抗体片段，如双特异性、三特异性等抗体(例如双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体)；微型抗体；整合剂重组抗体；三功能抗体或双功能抗体；细胞内抗体、纳米抗体、小模块免疫药剂(SMIP)、结合结构域免疫球蛋白融合蛋白质；骆驼化抗体；含有V<sub>H</sub>的抗体；以及由抗体片段形成的其它多肽。参见例如Holliger和Hudson,自然·生物技术(Nat. Biotech.) 23 (9) 1126-36, 2005; Eyer和Hruska (Veterinari Medicina 57:439-513, 2012)。

[0222] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段，称作“Fab”片段，由V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>、C<sub>L</sub>以及C<sub>H</sub>结构域组成的单价片段，各自具有单个抗原结合位点，和残基“Fc”片段，其名称反映其容易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生F(ab')<sub>2</sub>片段，包含两个在铰链区通过二硫桥键连接的Fab片段的二价片段，其具有两个“单链Fv”或“scFv”抗体片段，包含抗体的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域，其中这些结构域存在于单个多肽链中。优选地，Fv多肽进一步在V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域之间包含多肽连接体，其使得Fv能够形成用于抗原结合的所期望结构，产生单链抗体(scFv)，其中V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>区通过合成连接子成对以形成单价分子，其使得所述区能够得到单个蛋白质链(Bird等人, 科学242:423-426, 1988, 和Huston等人, 美国国家科学院院刊85:5879-5883, 1988)。关于scFv的综述，参见Pluckthun, 单克隆抗体的药理学(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies), 第113卷, Rosenburg和Moore编, 施普林格出版社(Springer-Verlag), 纽约(New York), 第269-315页, 1994。Fd片段由V<sub>H</sub>和C<sub>H</sub>1结构域构成。

[0223] 抗体片段，如Fab片段还可以使用所属领域中已知并且描述在本文中的重组技术制备。用于在哺乳动物、细菌或其它细胞系中制备重组抗体片段的示范性方法公开于Frenzel等人, 前沿免疫学(Front Immunol.) 4:217, 2013中，其以引用的方式并入本文中。

[0224] 其它抗体片段包括结构域抗体(dAb)片段(Ward等人, 自然341:544-546, 1989)，其由V<sub>H</sub>结构域构成。双功能抗体是二价抗体，其中V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域在单一多肽链上表达，但使用过短而不允许同一链上的两个结构域之间进行配对的连接子，由此迫使所述结构域与另一链的互补结构域配对，并且产生两个抗原结合位点(参见例如EP404,097; WO 93/11161; Holliger等人, 美国国家科学院院刊90:6444-6448, 1993, 和Poljak等人, 结构(Structure) 2:1121-1123, 1994)。双功能抗体可以是双特异性或单特异性的。

[0225] 不含轻链的功能性重链抗体天然存在于护士鲨(Greenberg等人, 自然374:168-73, 1995)、须鲨(wobbegong shark) (Nuttall等人, 分子免疫学38:313-26, 2001)以及骆驼科(Hamers-Casterman等人, 自然363:446-8, 1993; Nguyen等人, 分子生物学杂志275:413, 1998)中，如骆驼、单峰骆驼、羊驼以及美洲驼。这些动物中的抗原结合位点减少到单个结构域，V<sub>H</sub>H结构域。这些抗体仅使用重链可变区形成抗原结合区，即这些功能性抗体是仅具有结构H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>的重链的同型二聚体(称为“重链抗体”或“HCAbs”)。据报道骆驼科V<sub>H</sub>H与含有铰链、CH<sub>2</sub>以及CH<sub>3</sub>结构域，并且缺乏CH<sub>1</sub>结构域的IgG2和IgG3恒定区重组(Hamers-Casterman等人, 前述)。举例来说，羊驼IgG1是常规的(H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>)抗体同型，其中V<sub>H</sub>与含有铰链、CH<sub>1</sub>、CH<sub>2</sub>以及CH<sub>3</sub>结构域的恒定区重组，而羊驼IgG2和IgG3是缺乏CH<sub>1</sub>结构域并且不含轻链的仅重链同型。已发现骆驼科V<sub>H</sub>H结构域以高亲和力结合于抗原(Desmyter等人, 生物化学杂志276:26285-90, 2001)并且在溶液中具有高稳定性(Ewert等人, 生物化学41:3628-36, 2002)。经典的仅V<sub>H</sub>片段难以呈可溶形式生成，但当框架残基变得更加类似V<sub>H</sub>H时，能获得溶解度和特



异性结合的改进。(参见例如Reichman,等人,免疫学方法杂志(J Immunol Methods) 231: 25-38,1999)用于产生具有骆驼科重链的抗体的方法描述于例如美国专利公开第20050136049号和第20050037421号中。

[0226] 抗体重链的可变结构域,分子量仅为15kDa的完全功能性抗原结合片段,称为纳米抗体(Cortez-Retamozo等人,癌症研究(Cancer Research) 64:2853-57,2004)。纳米抗体库可以由如Conrath等人,(抗微生物剂化学疗法(Antimicrob Agents Chemother) 45:2807-12,2001)中所描述的经免疫单峰骆驼产生,或使用如Reverts等人,生物疗法专家观点(Expert Opin.Biol.Ther.) 5(1):111-24,2005中所描述的重组方法产生。

[0227] 双特异性Fab-scFv(“双功能抗体”)和三特异性Fab-(scFv) (2)(“三功能抗体”)的产生描述于Schoonjans等人(免疫学杂志165:7050-57,2000)和Willems等人(色谱B分析技术生物学生命科学杂志(J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.) 786: 161-76,2003)中。对于双功能抗体或三功能抗体,scFv分子稠合到VL-CL(L)和VH-CH<sub>1</sub>(Fd)链中的一个或两个,产生两个scFv稠合到Fab的C末端的三功能抗体,而在双功能抗体中一个scFv稠合到Fab的C末端。其它基于Fab的双特异性形式描述于Wu等人(mAbs 7:470-482, 2015)中。

[0228] 由通过肽连接子(无铰链)或通过IgG铰链稠合到CH<sub>3</sub>的scFv组成的“微型抗体”已在Olafsen,等人,蛋白质工程、设计与选择(Protein Eng Des Sel.) 17(4):315-23,2004中描述。

[0229] 细胞内抗体是单链抗体,其展示细胞内表达并且能操控细胞内蛋白质功能(Biocca,等人,欧洲分子生物学杂志9:101-108,1990;Colby等人,美国国家科学院院刊101:17616-21,2004)。包含在细胞内区域滞留抗体构筑体的细胞信号序列的细胞内抗体可以如Mhashilkar等人 欧洲分子生物学杂志14:1542-51,1995,和Wheeler等人 美国实验生物学学会联合会杂志(FASEB J.) 17:1733-5.2003中所描述生成。穿膜抗体(transbody)是细胞可渗透的抗体,其中蛋白质转导结构域(PTD)与单链可变片段(scFv)抗体稠合,Heng等人 医学假设(Med Hypotheses.) 64:1105-8,2005。

[0230] 进一步涵盖抗体,所述抗体是对抗原具有特异性的SMIP或结合结构域免疫球蛋白融合蛋白。这些构筑体是包含稠合到执行抗体效应功能所必需的免疫球蛋白结构域的抗原结合结构域的单链多肽。参见例如W003/041600、美国专利公开20030133939以及美国专利公开20030118592。

[0231] 一个或多个CDR可以共价或非共价地并入分子中,使其成为免疫粘附素。免疫粘附素可以并入有CDR作为较大多肽链的一部分,可以将CDR共价链接到另一多肽链,或可以非共价地并入有所述CDR。CDR允许免疫粘附素特异性结合于所关注的特定抗原。

[0232] 在又一实施例中,抗体或抗原结合化合物包含人类抗体序列的恒定区和一个或多个重链和轻链可变框架区。在相关实施例中,抗体包含人类IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的经修改或未经修改的恒定区。

[0233] 替代地,抗体片段可以稠合到蛋白质骨架。蛋白质骨架库包括但不限于纤连蛋白、亲和抗体、抗运载蛋白、达尔潘蛋白(DARPin)、经改造的Kunitz类抑制剂、四连接素、A结构域蛋白质、脂笼蛋白、重复蛋白质(如锚蛋白重复蛋白质)、免疫蛋白质、 $\alpha$ 2p8肽、昆虫防御素A、PDZ结构域、卡律蝎毒素、PHD指蛋白、TEM-1  $\beta$ -内酰胺酶、纤维结合蛋白III型结构域、

CTLA-4、T细胞resptor、打结素、新抑癌蛋白、碳水化合物结合模块4-2、绿色荧光蛋白、硫氧还蛋白(Gebauer和Skerra,化学生物学新见(Curr.Opin.Chem.Biol.)13:245-55,2009;Gill和Damle,生物技术新见(Curr.Opin.Biotech)17:653-58,2006;Hosse等人,蛋白质科学(Protein Sci.)15:14-27,2006;Skerra,生物技术新见18:295-304,2007)。

[0234] 因此,包含抗体的重链可变区或轻链可变区的一个、两个和/或三个CDR的各种组合物可以通过所属领域中已知的技术产生。

[0235] 嵌合和人类化抗体

[0236] 由于嵌合或人类化抗体在人类体内比亲本小鼠单克隆抗体具有较小免疫原性,因此它们可以用于治疗人类,具有远远较低的全身性过敏反应的风险。

[0237] 其中小鼠单克隆抗体的可变Ig结构域稠合到人类恒定Ig结构域的嵌合单克隆抗体可以使用所属领域中已知的标准程序产生(参见Morrison等人,美国国家科学院院刊81,6841-6855,1984;和Boulianne等人 自然312,643-646,1984)。尽管已证明一些嵌合单克隆抗体在人类体内具有较小免疫原性,但小鼠可变Ig结构域仍能够引起显著的人类抗小鼠反应。

[0238] 人类化抗体可以通过各种方法实现,包括例如:(1)将非人类互补决定区(CDR)接枝到人类框架和恒定区上(一种在所属领域中称为通过“CDR接枝”人类化的方法)(2)移植整个非人类可变结构域,但通过取代表面残基用人类样表面“遮盖(cloaking)”所述非人类可变结构域(一种在所属领域中称为“胶合”的方法),或者(3)在经确定不大可能不利地影响抗原结合或蛋白质折叠,但可能减小人类环境中的免疫原性的位置处取代人类氨基酸(一种在所属领域中称为HUMAN ENGINEERING™的方法)。在本公开中,人类化抗体将包括“人类化”、“镶饰(veneered)”以及“HUMAN ENGINEERED™”抗体。这些方法公开于例如Jones等人,自然321:522-525,1986;Morrison等人,美国国家科学院院刊,81:6851-6855,1984;Morrison和Oi,免疫学进展(Adv.Immunol.),44:65-92,1988;Verhoeyer等人,科学239:1534-1536,1988;Padlan,分子免疫学(Molec.Immun.)28:489-498,1991;Padlan,分子免疫学31:169-217,1994;Kettleborough等人,蛋白质工程(Protein Eng.)4:773-783,1991;Studnicka等人美国专利第5,766,886号;Studnicka等人,蛋白质工程7:805-814,1994,其中的每一个以引用的方式并入本文中。CDR接枝技术在所属领域中已知,参见例如Riechmann,等人1988自然332:323-27)。其它抗体人类化方法由Safdan等人,生物技术基因工程评论(Biotech.Gen.Eng.Rev.)29:175-86,2013综述。

[0239] 来自转基因动物的人类抗体

[0240] 针对抗原的人类抗体还可以使用转基因动物生成,所述转基因动物不产生内源性免疫球蛋白并且经改造含有人类免疫球蛋白基因座。举例来说,W0 98/24893公开具有人类Ig基因座的转基因动物,其中所述动物由于去活化内源性重链和轻链基因座而不产生功能性内源性免疫球蛋白。W0 91/00906还公开能够对免疫原产生免疫反应的转基因非灵长类哺乳动物宿主,其中所述抗体具有灵长类恒定和/或可变区,并且其中内源性免疫球蛋白编码基因座经取代或不活化。W0 96/30498和美国专利第6,091,001号公开Cre/Lox系统修改哺乳动物中免疫球蛋白基因座的用途,以便取代恒定或可变区的全部或一部分,形成经修改的抗体分子。W0 94/02602公开具有不活化内源性Ig基因座和功能性人类Ig基因座的非人类哺乳动物宿主。美国专利第5,939,598号公开制备转基因小鼠的方法,其中小鼠缺乏内

源性重链,并且表达包含一个或多个异基因恒定区的外源性免疫球蛋白基因座。还参见美国专利第6,114,598号、第6,657,103号以及第6,833,268号。

[0241] 使用上文所述的转基因动物,可以针对所选择的抗原产生免疫反应,并且可以从动物去除产生抗体的细胞并用来生成分泌人类单克隆抗体的杂交瘤。免疫接种方案、佐剂等等在所属领域中已知,并且用于例如WO 96/33735中所描述的转基因小鼠的免疫接种。此公开公开针对各种抗原的单克隆抗体,所述抗原包括IL-6、IL-8、TNF $\alpha$ 、人类CD4、L选择蛋白、gp39以及破伤风毒素。可以针对单克隆抗体测试抑制或中和相对应蛋白质的生物活性或生理效应的能力。WO 96/33735公开针对IL-8的单克隆抗体,来源于经IL-8免疫的转基因小鼠的免疫细胞,阻断IL-8诱发的嗜中性粒细胞的功能。对抗原具有特异性,用来使转基因动物免疫的人类单克隆抗体还公开于WO 96/34096和美国专利公开第20030194404号;以及美国专利公开第20030031667号中。

[0242] 适用于制备单克隆抗体的其它转基因动物包括Medarex **HuMAb-MOUSE®**, 描述于美国专利第5,770,429号和Fishwild,等人,自然·生物技术(Nat. Biotechnol.) 14: 845-851, 1996中,所述动物含有来自未重排人类抗体基因的基因序列,所述未重排人类抗体基因编码人类抗体的重链和轻链。免疫接种 **HuMAb-MOUSE®** 使得能够生成针对抗原的完全人类单克隆抗体。

[0243] 另外,Ishida等人,克隆干细胞(Cloning Stem Cells.) 4:91-102, 2002描述转染色体小鼠(TCMOUSE™),其包含人类DNA的巨碱基尺寸片段,并且其并入有整个人类免疫球蛋白(hIg)基因座。TCMOUSE™具有完全不同的hIg的抗体库,包括IgG的所有子类(IgG1-G4)。免疫接种具有各种人类抗原的TCMOUSE™产生包含人类抗体的抗体反应。

[0244] 还参见Jakobovits等人,美国国家科学院院刊,90:2551, 1993; Jakobovits等人,自然,362:255-258, 1993; Bruggermann等人,免疫学年报(Year in Immunol.), 7:33, 1993; Green等人,当前药物探索技术(Current Drug Discovery Technologies), 11:74-84, 2014; 和美国专利第5,591,669号、美国专利第5,589,369号、美国专利第5,545,807号;以及美国专利公开第20020199213号。美国专利公开第20030092125号描述偏置动物的免疫反应到所期望的表位的方法。人类抗体还可以通过活体外活化B细胞生成(参见美国专利第5,567,610号和第5,229,275号)。

[0245] 来自展示技术的人类抗体

[0246] 制备重组型人类抗体基因的抗体库和在丝状噬菌体表面上展示经编码抗体片段的技术的发展已提供直接制备人类抗体的方式。通过噬菌体展示技术生成的抗体作为细菌中的抗原结合片段(通常Fv或Fab片段)生成,并且因此缺乏效应功能。效应功能可以通过两种策略中的一种引入:片段可以改造成完全抗体以便在哺乳动物细胞中表达,或改造成具有能够触发效应功能的第二结合位点的双特异性抗体片段。

[0247] 方法可供用于生成抗原特异性抗体或其抗原结合部分,包含以下步骤:在噬菌体上合成人类抗体库,用抗原或其一部分筛选所述库,分离结合抗原的噬菌体,并且从所述噬菌体获得抗体。通过举例,一种制备用于噬菌体展示技术中的抗体库的方法包含以下步骤:用抗原或其抗原部分使包含人类免疫球蛋白基因座的非人动物免疫以产生免疫反应,从经免疫动物提取生成抗体的细胞;从所提取细胞分离RNA,逆转录RNA以生成cDNA,使用引子扩增cDNA,并且将cDNA插入至噬菌体展示载体中,使得抗体在噬菌体上表达。本文适用的重组

抗原特异性抗体可以通过此方式获得。在另一实例中,生成抗体的细胞可以从未经免疫的动物提取,从所提取的细胞分离RNA并且逆转录以生成cDNA,使用引子扩增所述cDNA,并且将其插入至噬菌体展示载体中,使得抗体在噬菌体上表达。噬菌体展示方法通过在丝状噬菌体表面上展示抗体库模拟免疫选择,并且随后通过噬菌体结合到所选抗原选择噬菌体。一种此类技术描述于W0 99/10494中,其描述使用所述方法分离针对MPL和msk受体的高亲和力和功能性促效抗体。抗体可以通过筛检重组的组合抗体库分离,所述抗体库是例如scFv或Fab噬菌体展示库,使用由来源于人类淋巴细胞的mRNA制备的人类V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub> cDNA制备。用于制备和筛检此类库的方法在所属领域中已知。参见例如美国专利第5,969,108号。存在用于生成噬菌体展示库的市售试剂盒(例如法玛西亚重组噬菌体抗体系统(Pharmacia Recombinant Phage Antibody System),目录号27-9400-01;和斯塔津SurfZAP™噬菌体展示试剂盒(Stratagene SurfZAP™ phage display kit),目录号240612)。还存在其它可用于生成和筛检抗体展示库的方法和试剂(参见例如Ladner等人 美国专利第5,223,409号;Kang等人 PCT公开第W0 92/18619号;Dower等人 PCT公开第W0 91/17271号;Winter等人 PCT公开第W0 92/20791号;Markland等人 PCT公开第W0 92/15679号;Breitling等人 PCT公开第W0 93/01288号;McCafferty等人 PCT公开第W0 92/01047号;Garrard等人 PCT公开第W0 92/09690号;Fuchs等人 生物技术9:1370-1372,1991;Hay等人 人类抗体杂交瘤(Hum. Antibod. Hybridomas) 3:81-85,1992;Huse等人 科学246:1275-1281,1989;McCafferty等人,自然348:552-554,1990;Griffiths等人 欧洲分子生物学杂志12:725-734,1993;Hawkins等人 分子生物学杂志226:889-896,1992;Clackson等人 自然352:624-628,1991;Gram等人 美国国家科学院院刊89:3576-3580,1992;Garrard等人 生物技术9:1373-1377,1991;Hoogenboom等人 核酸研究(Nuc Acid Res) 19:4133-4137,1991;Barbas等人 美国国家科学院院刊88:7978-7982,1991以及Omidfar和Daneshpour,药物探索专家观点(Exp.Op.Drug Disc.) 10:651-669,2015。

[0248] 在一个实施例中,为分离对抗原具有特异性,具有所期望的结合特性的人类抗体,筛检人类V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>库以选择具有所期望特异性的抗体片段。用于此方法中的抗体库可以是如本文和所属领域中所述制备和筛检的scFv库(McCafferty等人,PCT公开第W0 92/01047号,McCafferty等人,自然348:552-554,1990;Griffiths等人,欧洲分子生物学杂志12:725-734,1993以及Schwimmer等人,免疫学杂志方法391:60-71,2013)。抗体库优选地使用抗原筛检。

[0249] 替代地,抗体的Fd片段(V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>)和轻链(V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>)分别通过PCR克隆,并且在组合噬菌体展示库中随机重组,其随后能被选择用于结合到特定抗原。Fab片段在噬菌体表面上表达,即以物理方式连接到编码其的基因。因此,通过抗原结合选择Fab辅助选择Fab编码序列,其可以随后扩增。通过数轮的抗原结合和再扩增,称为淘选的程序,富集对抗原具有特异性的Fab并且最终分离。

[0250] 在1994年描述用于使抗体人类化的方法,称作“引导式选择”。引导式选择利用噬菌体展示技术的能力使小鼠单克隆抗体人类化(参见Jespersen, L.S., 等人,生物技术12, 899-903,1994)。对此,小鼠单克隆抗体的Fd片段能结合人类轻链库展示,并且所得杂交Fab库可以随后针对抗原进行选择。由此小鼠Fd片段提供引导选择的模板。随后,所选择人类轻链与人类Fd片段库组合。所得库的选择得到完全人类Fab。

[0251] 针对从噬菌体展示库导出人类抗体已经描述各种程序(参见例如Hoogenboom等人,分子生物学杂志,227:381,1991;Marks等人,分子生物学杂志,222:581-597,1991;美国专利第5,565,332号和第5,573,905号;Clackson,T.,和Wells,J.A.,蒂布技术(TIBTECH)12,173-184,1994)。具体地说,来源于噬菌体展示库的抗体的活体外选择和演变已经变成强有力的工具(参见Burton,D.R.,和Barbas III,C.F.,免疫学进展57,191-280,1994;Winter,G.,等人,免疫学年鉴12,433-455,1994;美国专利公开第20020004215号和W0 92/01047;美国专利公开第20030190317号;以及美国专利第6,054,287and5,877,293号。

[0252] Fv片段通过一条表达为噬菌体蛋白质融合体(例如与M13基因III)的链与表达为可溶片段的互补链的结合展示在噬菌体表面上。预期噬菌体可以是丝状噬菌体,如I类噬菌体:fd、M13、f1、If1、lke、ZJ/Z、Ff中的一种,和II类噬菌体Xf、Pf1以及Pf3中的一种。噬菌体可以是M13,或fd或其衍生物。

[0253] 一旦选择最初的人类V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>片段,“混合和匹配”实验,其中针对抗原结合筛检所选择V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>片段的不同配对,以选择优选的V<sub>L</sub>/V<sub>H</sub>配对组合(参见例如Kang等人(1991)美国国家科学院院刊88:11120-11123)。另外,为进一步改进抗体的品质,优选的V<sub>L</sub>/V<sub>H</sub>配对的V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>片段可以在类似于活体内体细胞突变方法的方法中随机突变,优选地在V<sub>H</sub>和/或V<sub>L</sub>的CDR1、CDR2或CDR3区中任一个内,所述活体内体细胞突变方法负责天然免疫反应期间的抗体亲和力成熟。此活体外亲和力成熟可以通过使用分别与V<sub>H</sub>CDR1、CDR2和CDR3,或V<sub>L</sub>CDR1、CDR2和CDR3互补的PCR引子扩增V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>区来实现,所述引子已经在某些位置处“外加(spiked)”四种核苷酸碱基的随机混合物,使得所得PCR产物将V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>片段编码成随机突变已经引入至V<sub>H</sub>和/或V<sub>L</sub>CDR3区中。这些随机突变的V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>片段可以针对结合到抗原进行筛检。

[0254] 在从重组免疫球蛋白展示库筛检和分离靶特异性抗体之后,可以从展示套装(例如从噬菌体基因组)回收编码所选择抗体的核酸,并且通过标准重组DNA技术亚克隆至其它表达载体中。必要时,可以进一步操纵核酸以产生其它抗体形式,如下所述。为表达通过筛检组合库分离的重组型人类抗体,将编码抗体的DNA克隆至重组表达载体中并且引入至哺乳动物宿主细胞中,如本文所述。

[0255] 预期噬菌体展示方法可以在细菌或宿主细胞的突变基因菌株中进行。突变基因菌株是具有基因缺陷的宿主细胞,所述基因缺陷导致宿主细胞内复制的DNA相对于其父代DNA突变。实例突变基因菌株是NR9046mutD5和NR9046 mut T1。

[0256] 此外,预期噬菌体展示方法可以使用辅助噬菌体进行。这是用来感染含有缺陷型噬菌体基因组的细胞的噬菌体,并且其用以补足缺陷。缺陷型噬菌体基因组可以是去除部分功能编码基因序列的噬菌粒或噬菌体。辅助噬菌体的实例是M13K07、M13K07基因III 3号、超噬菌体(hyperphage);以及展示或编码耦合到衣壳蛋白的结合分子的噬菌体。

[0257] 抗体还可以使用如W0 92/01047中所公开的分级双重组方法通过噬菌体展示筛检方法产生,其中含有H或L链克隆的个别菌落用来感染编码另一链(L或H)的克隆的完整库,并且根据如其中所描述的那些噬菌体展示技术选择所得双链特异性结合成份。这一技术还公开在Marks等人,生物技术,10:779-783,1992中。

[0258] 用于在病毒、酵母、微生物以及哺乳动物细胞表面上展示多肽的方法也已经用来鉴别抗原特异性抗体。参见例如美国专利第5,348,867号;第5,723,287号;第6,699,658号;

Wittrup, 当前生物技术观点 (Curr Op. Biotech.) 12:395-99, 2001; Lee 等人, 生物技术趋势 (Trends in Biotech.) 21 (1) 45-52, 2003; Surgeeva 等人, 先进药物输送评论 (Adv. Drug Deliv. Rev.) 58:1622-54, 2006。抗体库可以附接到酵母蛋白质, 如凝集素, 通过免疫系统中的B细胞有效模拟抗体的细胞表面展示。

[0259] 除了噬菌体展示方法以外, 可以使用活体外展示方法分离抗体, 包括核糖体展示和mRNA展示 (Amstutz 等人, 当前生物技术观点 12:400-05, 2001)。使用核糖体展示选择多肽描述于 Hanes 等人, 美国国家科学院院刊, 94:4937-4942, 1997 和 颁予 Kawasaki 的美国专利第 5,643,768 号以及第 5,658,754 号中。核糖体展示还适用于抗体的快速大规模突变分析。选择性突变诱发方法还提供生成具有改进的活性, 可以使用核糖体展示技术选择的抗体的方法。

[0260] 经改变糖基化

[0261] 还可以生成相对于亲本抗体具有经修改的糖基化型式的抗体变体, 例如删除一个或多个抗体中发现的碳水化合物部分, 和/或添加一个或多个抗体中不存在的糖基化部位。

[0262] 抗体的糖基化通常是N-连接或O-连接的。N-连接是指碳水化合物部分连接到天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸 (其中X是除脯氨酸以外的任何氨基酸) 是用于碳水化合物部分酶连接到天冬酰胺侧链的识别序列。多肽中存在这些三肽序列中任一种产生潜在的糖基化部位。因此, 可以通过改变氨基酸序列, 使得其含有这些三肽序列中的一种或多种来将N-连接糖基化部位添加到抗体。O-连接糖基化是指糖N-乙酰基半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一种连接到羟氨酸, 最常丝氨酸或苏氨酸, 但也可以使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。O-连接糖基化部位可以通过将一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基插入或取代原始抗体的序列来添加到抗体。

[0263] Fc聚糖影响IgG对Fc受体和C1q的结合, 并且因此对IgG效应功能至关重要。可以生成具有经修改的Fc聚糖和经改变的效应功能的抗体变体。举例来说, 具有经修改的末端糖 (如唾液酸、核心海藻糖、等分N-乙酰氨基葡萄糖以及甘露糖残基) 的抗体可以具有改变的对Fc $\gamma$ RIIIa受体的结合和改变的ADCC活性。在另一实例中, 具有经修改的末端半乳糖残基的抗体可以具有改变的对C1q的结合和改变的CDC活性 (Raju, 免疫学当前观点 (Curr. Opin. Immunol.) 20:471-78, 2008)。

[0264] 还涵盖缺乏或具有减少的海藻糖基化的抗体分子, 其展现改进的ADCC活性。所属领域中已知多种得到此抗体分子的方法。举例来说, ADCC效应活性通过抗体分子结合于Fc $\gamma$ RIII受体介导, 已显示其取决于CH2结构域的Asn-297处N-连接糖基化的碳水化合物结构。非海藻糖基化抗体以增加的亲和力结合此受体并且比原始的海藻糖基化抗体更高效地触发Fc $\gamma$ RIII介导的效应功能。举例来说, 在已经敲除 $\alpha$ -1,6-海藻糖基转移酶的CHO细胞中重组生成非海藻糖基化抗体使得抗体的ADCC活性增加100倍 (Yamane-Ohnuki 等人, 生物技术与生物工程 (Biotechnol Bioeng.) 87:614-22, 2004)。通过减少海藻糖基化路径中所述酶或其它酶的活性可以实现类似效果, 例如通过siRNA或反义RNA处理, 改造细胞系以基因敲除所述酶, 或用选择性糖基化抑制剂培养 (Rothman 等人, 分子免疫学 26:1113-23, 1989)。一些宿主细胞菌株, 例如Lec13或鼠杂交瘤YB2/0细胞系天然产生具有较低的海藻糖基化含量的抗体。(Shields 等人, 生物化学杂志 277:26733-40, 2002; Shinkawa 等人, 生物化学杂志

278:3466-73,2003)。也已经确定提高等分碳水化合物含量,例如通过在过度表达GnTIII酶的细胞中以重组方式生成抗体会提高ADCC活性(Umana等人,自然·生物技术17:176-80,1999)。已预测缺乏两种海藻糖残基中的仅一种可能足以提高ADCC活性(Ferrara等人,生物技术与生物工程93:851-61,2006)。抗体的糖基化和方法在Niewa和Sato,药物科学杂志(J.Pharmaceutical Sciences)104:930-41,2015中综述。

[0265] 具有改变的效应功能的变异体

[0266] 预期抗体的其它修改。在一个方面中,可能需要例如关于效应功能修改适用于所述方法的抗体,例如以便增强抗体在治疗癌症和其它病症中的效力(Natsume等人,药物设计发展和疗法(Drug Design Dev't & Ther.)3:7-16,2009)。示范性效应功能包括C1q结合;CDC;Fc受体结合;ADCC;吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体;BCR)下调等。一种用于修改效应功能的方法教导可以在Fc区中引入半胱氨酸残基,由此使得在此区中形成链间二硫键。由此产生的同二聚体抗体可以具有改善的内化能力和/或增加的补体介导的细胞杀灭作用和抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)。参见Caron等人,实验医学杂志(J.Exp Med.)176:1191-1195,1992和Shopes,B.免疫学杂志148:2918-2922,1992。还可以使用如Wolff等人,癌症研究53:2560-2565,1993中所描述的异双官能交联剂制备具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体。或者,抗体可以被工程改造成具有两个Fc区并且由此可以具有增强的补体裂解和ADCC能力。参见Stevenson等人,抗癌药物设计(Anti-Cancer Drug Design)3:219-230,1989。在本公开的某些实施例中,可能需要使用抗体片段而非完整抗体。在此情形下,可能需要修改抗体片段以便增加其血清半衰期,例如向抗体片段添加如PEG或其它水溶性聚合物的分子,包括多醣聚合物,以增加半衰期。此还可以例如通过将救助受体结合表位并入到抗体片段中来实现(例如通过抗体片段中适当区的突变,或通过表位并入到肽标记中,其随后例如通过DNA或肽合成在任一端或中间稠合到抗体片段)(参见例如W096/32478)。

[0267] 因此,本文涵盖的抗体可以包含人类Fc部分、人类共有Fc部分或其变异体,所述变异体保留与Fc救助受体相互作用的能力,包括其中参与二硫键接的半胱氨酸经修改或删除,和/或其中在N末端添加甲硫氨酸,和/或删除N末端20个氨基酸中的一个或多个,和/或删除与补体相互作用的区(如C1q结合部位),和/或删除ADCC位点的变异体(参见例如Sarmay等人,分子免疫学29:633-9,1992)。

[0268] 先前研究主要将人类和鼠IgG上的FcR结合位点映射到由IgG残基233-239组成的较低铰链区。其它研究提出其它宽的片段,如针对人类Fc受体I的Gly316-Lys338,针对人类Fc受体III的Lys274-Arg301和Tyr407-Arg416,或在较低铰链外部发现若干特异性残基,例如用于鼠IgG2b与鼠Fc受体II相互作用的Asn297和Glu318。人类IgG1 Fc片段与人类Fc受体IIIA的**3.2 Å**晶体结构的报告描述IgG1残基Leu234-Ser239、Asp265-Glu269、Asn297-Thr299以及Ala327-Ile332涉及结合到Fc受体IIIA。基于晶体结构,已提出除较低铰链(Leu234-Gly237)外,IgG CH2结构域环FG(残基326-330)和BC(残基265-271)中的残基可能在结合到Fc受体IIA中起一定作用。参见Shields等人,生物化学杂志,276:6591-604,2001),以全文引用的方式并入本文中。Fc受体结合位点内残基的突变能产生改变的效应功能,如改变的ADCC或CDC活性,或改变的半衰期。如上文所述,潜在突变包括插入、缺失或取代一个或多个残基,包括经丙氨酸取代,保守取代、非-保守取代,或在同一位置经来自不同

IgG子类的相应氨基酸残基置换(例如在那一位置处用相对应IgG2残基置换IgG1残基)。

[0269] Shields等人报道涉及结合到所有人类Fc受体的IgG1残基位于接近铰链的CH2结构域,并且如下分成两个类别:1)可以直接和所有FcR相互作用的位置,包括Leu234-Pro238、Ala327以及Pro329(并且可能Asp265);2)影响碳水化合物性质的位置或包括Asp265和Asn297的位置。影响结合到Fc受体II的其它IgG1残基如下:(最大效应)Arg255、Thr256、Glu258、Ser267、Asp270、Glu272、Asp280、Arg292、Ser298以及(较低效应)His268、Asn276、His285、Asn286、Lys290、Gln295、Arg301、Thr307、Leu309、Asn315、Lys322、Lys326、Pro331、Ser337、Ala339、Ala378和Lys414。A327Q、A327S、P329A、D265A以及D270A减少结合。除上文针对所有FcR鉴别的残基以外,减少对Fc受体IIIA的结合达40%或更大的其它IgG1残基如下:Ser239、Ser267(仅Gly)、His268、Glu293、Gln295、Tyr296、Arg301、Val303、Lys338以及Asp376。增加对FcRIIA的结合的变异体包括T256A、K290A、S298A、E333A、K334A以及A339T。Lys414展示对FcRIIA和FcRIIB结合的40%减小,Arg416展示对FcRIIA和FcRIIIA的30%减小,Gln419展示对FcRIIA的30%减小以及对FcRIIB的40%减小,并且Lys360展示对FcRIIIA的23%增加。同样参见以全文引用的方式并入本文中的Presta等人,生物化学学会会刊(Biochem. Soc. Trans.) 30:487-490,2001,其描述发现IgG1的Fc区中的若干位置增加仅对特异性Fc $\gamma$ 受体(R)的结合,或同时增加对一种类型的Fc $\gamma$ R的结合并且减少对另一种类型的结合。所选择的对Fc $\gamma$ RIIIa具有增加的结合的IgG1变异体随后在活体外抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)分析中测试,并且当使用外周血单核细胞或自然杀伤细胞时展示ADCC增强。

[0270] 举例来说,以全文引用的方式并入本文中的美国专利第6,194,551号描述具有改变的效应功能的变异体,其在人类IgG Fc区中氨基酸位置329、331或322(使用卡巴特编号(Kabat numbering))处含有突变,一些所述突变显示减少的C1q结合或CDC活性。

[0271] 共价修改

[0272] 本公开的范围还包括多肽结合剂,例如抗体的共价修改。在适用时,所述共价修改可以通过化学合成或通过酶促或化学裂解多肽结合剂实现。多肽结合剂的其它类型的共价修改是通过使多肽结合剂的目标氨基酸残基与能够和所选择的侧链或N或C末端残基反应的有机衍生试剂反应来引入分子中。

[0273] 其它修改包括脯氨酸和赖氨酸的组氨酰基、赖氨酰基精氨酰基、酪氨酰基、谷氨酰基以及天冬氨酰基羟基化。实现此类修改的方法公开于美国专利8,926,976中,其以引用的方式并入本文中和所属领域中。

[0274] 衍生物

[0275] 衍生物是指通过如以下技术化学改性的多肽结合剂,包括抗体:泛素化、标记(例如用放射性核素或各种酶)、共价聚合物连接,如聚乙二醇化(用聚乙二醇衍生化)、以及通过化学合成插入或取代氨基酸,如鸟氨酸。本文所述的多肽结合剂(如抗体)的衍生物还适用作治疗剂并且可以通过本文所述的方法生成。

[0276] 共轭部分可以共价地、或通过离子性、凡得瓦尔力或氢键并入多肽结合剂中或连接到多肽结合剂,例如并入放射性核苷酸,或由链霉亲和素识别的生物素化核苷酸。

[0277] 聚乙二醇(PEG)可连接到多肽结合剂以提供在活体内更长的半衰期。PEG基团可以具有任何适宜的分子量并且可以是直链或分支链。PEG的平均分子量将优选在约2千道尔顿



（“kD”）至约100kDa、更优选约5kDa至约50kDa、最优选约5kDa至约10kDa的范围内。PEG基团将一般通过PEG部分上的天然或经改造的反应性基团（例如醛、氨基、硫醇或酯基）酰化或还原性烷化到多肽结合剂上的反应性基团（例如醛、氨基或酯基）来连接到多肽结合剂。添加PEG部分至多肽结合剂能使用所属领域中众所周知的技术进行。参见例如国际公开第W096/11953号和美国专利第4,179,337号。

[0278] 多肽结合剂与PEG的连接通常在水相中进行并且能够易于通过逆相分析型HPLC监测。聚乙二醇化物质通过制备型HPLC纯化，并且通过分析型HPLC、氨基酸分析以及激光解吸附质谱表征。

[0279] 抗体结合物

[0280] 多肽结合剂可以呈其“裸的 (naked)”或非结合的形式给药，或可以直接结合到其它治疗剂或诊断剂，或可以间接结合到包含此类其它治疗剂或诊断剂的载体聚合物。在一些实施例中，多肽结合剂结合到细胞毒性剂（如化学治疗剂）、药物、生长抑制剂、毒素（例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素，或其片段）或放射性同位素（即放射性结合物）。适合的化学治疗剂包括：道诺霉素 (daunomycin)、小红莓 (doxorubicin)、甲氨喋呤 (methotrexate) 以及长春地辛 (vindesine) (Rowland等人, 1986, 前述)。适合的毒素包括：细菌毒素，如白喉毒素；植物毒素，如蓖麻毒素；小分子毒素，如格尔德霉素 (geldanamycin) (Mandler等人 美国国立癌症研究所杂志 (J.Natl.Cancer Inst.) 92 (19):1573-81, 2000; Mandler等人, 生物有机化学与医药化学快报 (Bioorg.Med.Chem.Letters) 10:1025-1028, 2000; Mandler等人, 生物结合化学 (Bioconjugate Chem.) 13:786-91, 2002)、美登素 (maytansinoid) (EP 1391213; Liu等人, 美国国家科学院院刊 93:8618-23, 1996)、奥瑞他汀 (auristatins) (Doronina等人, 自然·生物技术 21:778-84, 2003) 以及卡奇霉素 (calicheamicin) (Lode等人, 癌症研究 58:2928, 1998; Hinman等人, 癌症研究 53:3336-3342, 1993, 还参见 Brandon等人, 自然评论临床肿瘤学 (Nature Rev.Clin.Oncol.) 11:637-648, 2014)。

[0281] 多肽结合剂可以通过使用放射性同位素、亲和标记（如生物素、抗生物素蛋白等）、酶标记（如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等）荧光或发光或生物发光标记（如FITC或若丹明 (rhodamine) 等）、顺磁原子等等以可检测方式标记。用于实现此类标记的程序在所属领域中众所周知；例如参见 (Sternberger, L.A. 等人, 组织化学与细胞化学杂志 (J.Histochem.Cytochem.) 18:315, 1970; Bayer, E.A. 等人, 酶学方法 (Meth.Enzym.) 62:308, 1979; Engval, E. 等人, 免疫学 109:129, 1972; Goding, J.W. 免疫学方法杂志 (J.Immunol.Meth.) 13:215, 1976)。

[0282] 多肽结合剂部分的结合描述于美国专利第6,306,393号中。一般技术还描述于 Shih等人, 国际癌症杂志 (Int.J.Cancer) 41:832-839, 1988; Shih等人, 国际癌症杂志 46:1101-1106, 1990; 以及 Shih等人, 美国专利第5,057,313号中。此一般方法涉及使具有氧化碳水化合物部分的多肽结合剂组分与具有至少一种游离胺功能并且负载有多种药物、毒素、螯合剂、硼附加物或其它治疗剂的载体聚合物反应。此反应产生初始希夫碱 (Schiff base) (亚胺) 键联, 其可以通过还原成仲胺稳定, 以形成最终结合物。

[0283] 载体聚合物可以是例如具有至少50个氨基酸残基的氨基葡聚糖或多肽。用于将药物或另一种药剂结合到载体聚合物的各种技术在所属领域中已知。可以使用多肽载体代替

氨基葡聚糖,但多肽载体应在链中具有至少50个氨基酸残基,优选地100-5000个氨基酸残基。氨基酸中的至少一些应该是赖氨酸残基或谷氨酸或天冬氨酸残基。赖氨酸残基的侧接胺以及谷氨酰胺和天冬氨酸的侧接甲酸酯便于连接药物、毒素、免疫调节剂、螯合剂、硼附加物或其它治疗剂。适合的多肽载体的实例包括聚赖氨酸、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、其共聚物,以及这些氨基酸与其它氨基酸(例如丝氨酸)的混合聚合物,以使所得负载载体和结合物具有所期望的溶解特性。

[0284] 替代地,经结合的多肽结合剂可以通过直接使多肽结合剂组分与治疗剂结合来制备。一般程序类似于间接结合方法,但治疗剂直接连接到氧化多肽结合剂组分。举例来说,多肽结合剂的碳水化合物部分能够连接到聚乙二醇以延长半衰期。

[0285] 替代地,治疗剂可以通过二硫键形成,或使用异双官能交联剂,如N-丁二酰基3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)连接在经还原抗体组分的铰链区。Yu等人,国际癌症杂志(Int.J.Cancer)56:244,1994。用于此类结合的一般技术在所属领域中众所周知。参见例如Wong,蛋白质结合和交联的化学方法(Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking),CRC出版社(CRC Press),1991;Upeslakis等人,“通过化学法修改抗体(Modification of Antibodies by Chemical Methods)”,在单克隆抗体:原理和应用(Monoclonal Antibodies:Principles and Applications),Birch等人(编),第187-230页,Wiley-Liss公司(Wiley-Liss,Inc.),1995中;Price,“合成肽衍生的抗体的生成和特征化(Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies)”,在单克隆抗体:生成、工程改造以及临床应用(Monoclonal Antibodies:Production, Engineering and Clinical Application),Ritter等人(编),第60-84页,剑桥大学出版社(Cambridge University Press),1995中。所属领域中已知多种双官能蛋白质偶合剂,如N-丁二酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫杂环戊烷(IT)、亚氨基酯的双官能衍生物(如己二亚胺酸二甲酯HCL)、活性酯(如辛二酸二丁二酰亚氨基酯)、醛(如戊二醛)、双-叠氮基化合物(如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双-重氮衍生物(如双-(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如2,6-二异氰酸亚甲苯酯)以及双-活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

[0286] 抗体融合蛋白

[0287] 制备抗体融合蛋白的方法在所属领域中众所周知。参见例如美国专利第6,306,393号。Boleti等人,肿瘤学记录(Ann.Oncol.)6:945,1995;Nicolet等人,癌症基因疗法(Cancer Gene Ther.)2:161,1995;Becker等人,美国国家科学院院刊93:7826,1996;Hank等人,临床癌症研究(Clin.Cancer Res.)2:1951,1996;以及Hu等人,癌症研究56:4998,1996描述包含白介素-2部分的抗体融合蛋白。另外,Yang等人,人类抗体杂交瘤(Hum.Antibodies Hybridomas)6:129,1995描述包括F(ab')<sub>2</sub>片段和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 部分的融合蛋白质。抗体融合蛋白的其它实例描述于Pastan等人,自然·癌症评论(Nat.Reviews Cancer)6:559-65,2006和Alewine等人 肿瘤学家(The Oncologist),20:176-185,2015。

[0288] 所属领域的技术人员也已知制备其中重组分子包含一种或多种抗体组分和毒素或化学治疗剂的抗体-毒素融合蛋白的方法。举例来说,Chaudhary等人,自然339:394,1989、Brinkmann等人,美国国家科学院院刊88:8616,1991、Batra等人,美国国家科学院院刊89:5867,1992、Friedman等人,免疫学杂志150:3054,1993、Wels等人,国际癌症杂志

(Int. J. Can.) 60:137, 1995、Fominaya等人, 生物化学杂志271:10560, 1996、Kuan等人, 生物化学35:2872, 1996以及Schmidt等人, 国际癌症杂志65:538, 1996已经描述抗体-绿脓杆菌(Pseudomonas)外毒素A融合蛋白。Kreitman等人, 白血病(Leukemia) 7:553, 1993、Nicholls等人, 生物化学杂志268:5302, 1993、Thompson等人, 生物化学杂志270:28037, 1995以及Vallera等人, 血液(Blood) 88:2342, 1996已经描述含有白喉毒素部分的抗体-毒素融合蛋白。Deonarain等人, 肿瘤标靶(Tumor Targeting) 1:177, 1995已经描述具有核糖核酸酶部分的抗体-毒素融合蛋白, 而Linardou等人, 细胞生物物理(Cell Biophys.) 24-25:243, 1994生成包含脱氧核糖核酸酶I组分的抗体-毒素融合蛋白。在Wang等人, 第209届ACS国际会议摘要(Abstracts of the 209th ACS National Meeting), 加利福尼亚州阿纳海姆(Anaheim, Calif.), 1995年4月2-6日, 部分1, BIOT005的抗体-毒素融合蛋白中白树素(Gelonin)用作毒素部分。作为另一实例, Dohlsten等人, 美国国家科学院院刊91:8945, 1994报道包含葡萄球菌(Staphylococcal)肠毒素-A的抗体-毒素融合蛋白。

[0289] 适用于制备此类融合蛋白的说明性毒素是蓖麻毒素、相思豆毒素(abrin)、核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶I、葡萄球菌肠毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白(pokeweed antiviral protein)、白树素、白喉毒素、绿脓杆菌外毒素以及假单胞菌内毒素。参见例如Pastan等人, 细胞(Cell) 47:641, 1986, 和Goldenberg, CA临床医师癌症杂志(A Cancer Journal for Clinicians) 44:43, 1994。所属领域的技术人员已知其它适合的毒素。

[0290] 本文的抗体还可以通过使抗体结合于前药活化酶而用于ADEPT中, 所述前药活化酶将前药(例如肽基化学治疗剂, 参见W081/01145)转化为活性抗癌药物。参见例如W088/07378和美国专利第4,975,278号。

[0291] 适用于ADEPT的免疫结合物的酶组分包括任何能够以一定方式作用于前药的酶, 以便将前药转化成其更具活性、细胞毒性的形式。

[0292] 适用于本公开目的的酶包括但不限于:碱性磷酸酶;芳基硫酸酯酶;胞嘧啶脱氨酶, 5-氟尿嘧啶;蛋白酶, 如沙雷氏菌属(serratia)蛋白酶、嗜热菌蛋白酶(thermolysin)、枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)、羧基肽酶以及组织蛋白酶(如组织蛋白酶B和L);D-丙氨酰基羧基肽酶;碳水化合物裂解酶, 如 $\beta$ -半乳糖苷酶和神经氨酸苷酶(neuraminidase); $\beta$ -内酰胺酶;以及青霉素酰胺酶, 如青霉素V酰胺酶或青霉素G酰胺酶。替代地, 具有酶活性, 在所属领域中也称为抗体酶的抗体, 可以用来将前药转化成自由活性药物(参见例如Massey, 自然328:457-458, 1987)。抗体-抗体酶结合物可以如本文所述制备, 用于递送抗体酶至肿瘤细胞群。

[0293] 上文的酶类可以通过所属领域中众所周知的技术共价结合到抗体, 如使用上文所论述的异双官能交联剂。替代地, 包含本文所述的抗体的至少抗原结合区, 连接到酶的至少功能上有效部分的融合蛋白能使用所属领域中众所周知的重组DNA技术建构(参见例如Neuberger等人, 自然312:604-608, 1984)。

[0294] 氨基酸序列变异体

[0295] 预期产生包含抗体或多肽结合剂的一、二、三、四、五和/或六个CDR的经修改多肽组合物, 其中CDR或非CDR区经修改以提供增加的对抗原的特异性或亲和力, 或提供对标靶与其信号传导搭配物之间的结合亲和力的增加的调控。举例来说, 抗体CDR内的位点通常经连续修改, 例如通过首先用保守选择取代(例如疏水性氨基酸取代不同的疏水性氨基酸),

并且随后用更加相异的选择取代(例如疏水性氨基酸取代带电荷氨基酸),并且随后在目标位点可以进行删除或插入。预期CDR内的保守取代允许可变区保留生物活性。举例来说,使用围绕CDR的保守框架序列,生成与这些共有序列互补的PCR引子,以扩增位于引子区之间的抗原特异性CDR序列。用于克隆并且表达核苷酸和多肽序列的技术在所属领域中是公认的[参见例如Sambrook等人,分子克隆实验指南,第2版,冷泉港,纽约,1989]。将所扩增CDR序列接合到适当质粒中。包含一、二、三、四、五和/或六个所克隆CDR的质粒任选地含有有连接到CDR的其它多肽编码区。

[0296] 对包含经修改CDR的多肽结合剂筛选对原始抗原的结合亲和力。另外,进一步测试抗体或多肽中和其抗原活性的能力。举例来说,本文的抗体可以如实例中所陈述来分析,以测定其干扰靶的生物活性的能力。

[0297] 可通过下文更详细地描述的保守或非保守氨基酸取代进行修改。“插入”或“缺失”优选在约1到20个氨基酸、更优选1到10个氨基酸范围内。可以通过使用重组DNA技术在抗体多肽分子中系统地进行氨基酸取代来引入变化,并且分析所得重组变异体的活性。可以在不同物种在核酸方面不同的位点(可变位置)处或在高度保守区(恒定区)中进行核酸改变。用于改变抗体序列和表达适用于本发明的抗体多肽组合物的方法在下文更详细地描述。

[0298] 氨基酸序列插入包括从一个残基到含有一百个或更多个残基的多肽的长度范围内的氨基和/或羧基端融合,以及序列内部插入单个或多个氨基酸残基。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰基残基的抗体或耦合到表位标记或救助受体表位的抗体(包括抗体片段)。抗体分子的其它插入型变异体包括例如在N末端或C末端耦合至多肽,其增加抗体的血清半衰期。

[0299] 术语“表位经标记(epitope tagged)”是指抗体耦合到表位标记。表位标签多肽具有足以提供抵着抗体的表位(在此处可以实现抵着抗体)的残基,所述残基又足够短,使得其不干扰抗体活性。表位标记优选地足够独特,使得此处抵着的抗体大体上不与其它表位交叉反应。适合的标记多肽一般具有至少6个氨基酸残基并且通常介于约8-50个氨基酸残基之间(优选约9-30个残基之间)。实例包括流感血球凝集素(HA)标记多肽和其抗体12CA5(Field等人,分子与细胞生物学8:2159-2165,1988);c-myc标记和其上的8F9、3C7、6E10、G4、B7以及9E10抗体(Evan等人,分子与细胞生物学5:3610-16,1985);以及单纯疱疹病毒(Herpes Simplex virus)糖蛋白D(gD)标记和其抗体(Paborsky等人,蛋白质工程3:547-53,1990)。其它示范性标记是聚组氨酸序列,一般具有约六个组氨酸残基,其允许使用镍螯合分离如此标记的化合物。本发明涵盖所属领域中众所周知和常规使用的其它标签和标记,如**FLAG®**标记(伊士曼柯达(Eastman Kodak),纽约州罗契斯特(Rochester,NY))。

[0300] 如本文所用,术语“救助受体结合表位”是指引起IgG分子的体内血清半衰期的增加的IgG分子(例如IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>或IgG<sub>4</sub>)的Fc区的表位。

[0301] 另一类型的变异体是氨基酸取代变异体。这些变异体在抗体分子中去除至少一个氨基酸残基并且在其位置插入不同的残基。预期高变区或CDR区或框架区中任一个内的置换诱变。保守取代涉及用氨基酸类别的另一个成员替代所述氨基酸。非保守取代涉及用另一类别的成员替代这些类别中的一种的成员。

[0302] 保守氨基酸取代基于所涉及残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性性质的相似性来进行。举例来说,非极性(疏水性)氨基酸包括丙氨酸(Ala,A)、亮氨酸

(Leu,L)、异亮氨酸(Ile,I)、缬氨酸(Val,V)、脯氨酸(Pro,P)、苯丙氨酸(Phe,F)、色氨酸(Trp,W)和甲硫氨酸(Met,M);极性中性氨基酸包括甘氨酸(Gly,G)、丝氨酸(Ser,S)、苏氨酸(Thr,T)、半胱氨酸(Cys,C)、酪氨酸(Tyr,Y)、天冬酰胺(Asn,N)和谷氨酰胺(Gln,Q);带正电(碱性)氨基酸包括精氨酸(Arg,R)、赖氨酸(Lys,K)和组氨酸(His,H);并且带负电(酸性)氨基酸包括天冬氨酸(Asp,D)和谷氨酸(Glu,E)。

[0303] 未参与维持抗体的适当构形的任何半胱氨酸残基也可以经取代,一般经丝氨酸取代,以改进分子的抗氧化性和预防异常交联。相反,可以将半胱氨酸键结添加至抗体以改进其稳定性(尤其在抗体是如Fv片段的抗体片段的情况下)。

[0304] 药物组合物的调配物

[0305] 为了向人类或所测试哺乳动物给药多肽结合剂,优选地在包含一种或多种无菌的药学上可接受的载剂的无菌组合中调配多肽结合剂。短语“药学上或药理学上可接受”是指在使用所属领域中众所周知的途径给药时不产生过敏或其它不利反应的分子实体和组合物,如下所述。“药学上可接受的载剂”包括任何和所有临床上适用的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等张剂以及吸收延迟剂等。

[0306] 多肽结合剂通过任何适合的方式给药,包括不经肠、皮下、腹膜内、肺内以及鼻内,并且必要时用于局部治疗、病灶内给药。不经肠输注包括静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮内或皮下给药。优选地,给药通过注射、最优选静脉内或皮下注射提供,在某种程度上取决于给药是否为短暂的或慢性的。预期其它给药方法,包括局部、尤其经皮、经粘膜、经直肠、经口或局部给药,例如通过接近所期望的输液泵或储槽位点置放的导管,并且任选地包括使用输送装置(此类泵)、智能装置以及传感器。

[0307] 适用于本发明,含有在本文中描述为活性成分的多肽结合剂的药物组合物取决于给药途径可以含有无菌的药学上可接受的载剂或添加剂。此类载剂或添加剂的实例包括水、药学上可接受的有机溶剂、胶原蛋白、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧基乙烯基聚合物、羧基甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、海藻酸钠、水溶性聚葡萄糖、羧基甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、三仙胶(xanthan gum)、阿拉伯胶、酪蛋白、明胶、琼脂、二甘油、丙三醇、丙二醇、聚乙二醇、凡士林、石蜡、硬脂醇、硬脂酸、人类血清白蛋白(HSA)、甘露糖醇、山梨糖醇、乳糖、药学上可接受的表面活性剂等等。所用的添加剂视需要选自,但不限于以上或其组合,取决于本文所用的剂型。对于溶液或乳液,适合的载剂包括例如水性或醇/水性溶液、乳液或悬浮液,包括生理盐水和缓冲媒剂。不经肠媒剂可以包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖(Ringer's dextrose)、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏溶液或不挥发性油。静脉内媒剂可以包括各种添加剂、防腐剂或流体、营养物或电解质补充剂。各种水性载剂是适合的,例如无菌磷酸盐缓冲盐水溶液、抑菌水、水、缓冲水、0.4%生理盐水、0.3%甘氨酸等等,并且可以包括其它用于增强的稳定性的蛋白质,如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等,经受轻度化学改性等。

[0308] 通过混合具有所期望纯度的多肽结合剂与任选的生理学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂(雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)第16版,Osol,A.编(1980))制备多肽结合剂的治疗性调配物用于储存,呈冻干调配物或水溶液形式。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对接受者无毒性,并且包括缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐、丁二酸盐以及其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如

氯化十八烷基二甲基苯甲基铵、氯化六羟季铵；苯扎氯铵 (benzalkonium chloride)、苜索氯铵 (benzethonium chloride)；酚、丁醇或苯甲醇；对羟基苯甲酸烷酯，如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯；儿茶酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；以及间甲酚)；低分子量(小于约10个残基)多肽；蛋白质，如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖以及其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，如EDTA；糖，如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成盐相对离子，如钠；金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物)；和/或非离子型表面活性剂，如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0309] 还可以将活性成分包覆在微胶囊中，所述微胶囊是例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备，例如羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊，分别在胶状药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微米球、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)中或在粗乳液中。这类技术公开于雷明顿氏药物科学第16版，Osol, A. 编，1980中。

[0310] 用于体内给药的配制物必须是无菌的。这易于通过经无菌过滤膜过滤实现。

[0311] 水性悬浮液可以含有与适用于制造水性悬浮液的赋形剂掺合的活性化合物。此类赋形剂是悬浮剂，例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶以及阿拉伯胶；分散剂或湿润剂可以是天然存在的磷脂，例如卵磷脂，或环氧烷与脂肪酸的缩合产物，例如聚氧乙烯硬脂酸酯，或环氧乙烷与长链脂族醇的缩合产物，例如十七亚乙基氧基十六醇，或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物，如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯，或环氧乙烷与衍生自脂肪酸及己糖醇酐的偏酯的缩合产物，例如聚乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。水性悬浮液还可以含有一种或多种防腐剂，例如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯。

[0312] 在某些实施例中，用于所述方法中的多肽结合剂在包含表面活性剂、抗氧化剂、稳定剂、氨基酸和/或糖中的一种或多种的药物组合物中。

[0313] 在各种实施例中，包含抗体的药物组合物进一步包含例如1-20mM组氨酸、1-20mM甲硫氨酸、150至500mM山梨糖醇，或0.5%至7%山梨糖醇、0.005至0.1%聚山梨醇酯20，在pH 6.8至5.5或7.2至5.5下。在各种实施例中，组合物还包含缓冲液，如丁二酸盐缓冲液、磷酸钠缓冲剂、乙酸盐缓冲液或其它适用于治疗性组合物的缓冲液。

[0314] 本文所述的抗体可以冻干储存并且在使用前在适合的载剂中复原。此项技术已经展示有效用于常规免疫球蛋白。可以采用任何适合的冻干和复原技术。所属领域的技术人员应了解，冻干和复原可以引起不同程度的抗体活性损失并且使用含量可能必须调整以便补偿。

[0315] 适用于通过添加水制备水性悬浮液的可分散剂和颗粒提供与分散或湿润剂、悬浮剂以及一种或多种防腐剂掺合的活性化合物。适合的分散或湿润剂和悬浮剂由以上已提及的那些试剂例示。

[0316] 根据所选择的特定给药模式，这些调配物中的多肽结合剂的浓度可以大幅变化，例如从少于约0.5%、通常处于或至少约1%到多达15或20重量%，并且将主要基于流体体积、粘度等来选择。因此，用于不经肠注射的典型药物组合物可以制成至多含有1ml无菌缓冲水，和50mg多肽结合剂。用于静脉内输注的典型组合物可以制成至多含有250ml无菌林格氏溶液，和150mg多肽结合剂。用于制备可以不经肠给药的组合物的实际方法将是所属领域

的技术人员已知或显而易见的,并且更详细地描述于例如雷明顿氏药物科学,第15版,马克出版公司(Mack Publishing Company),宾夕法尼亚州伊斯顿(Easton,Pa.),1980。多肽结合剂的有效剂量在每次给药每公斤体重0.01mg至25mg范围内。

[0317] 药物组合物可以呈无菌的可注射水性、油性悬浮液、分散液,或用于无菌的可注射溶液或分散液的即用型制备的无菌散剂形式。所述悬浮液可以根据已知技术使用上文已提及的那些适合的分散剂或湿润剂和悬浮剂来调配。无菌可注射制剂也可以是无毒不经肠可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液,例如呈在1,3-丁二醇中的溶液形式。载剂可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇以及液体聚乙二醇等等)、其适合的混合物、蔬菜油、林格氏溶液以及等张氯化钠溶液的溶剂或分散介质。另外,常规地采用无菌不挥发性油作为溶剂或悬浮介质。为此目的,可采用任何温和的不挥发性油,包括合成的单甘油酯或二甘油酯。另外,在可注射剂制备中使用脂肪酸,如油酸。

[0318] 在所有情况下,所述形式必须是无菌的并且流动性必须达到存在流畅注射能力的程度。可以例如通过使用包衣(如卵磷脂)、在分散液情况下通过维持所需粒径和通过使用表面活性剂来维持适当流动性。其在制造和储存条件下必须是稳定的并且必须保护其免遭如细菌和真菌等微生物的污染作用。微生物作用的预防可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如对羟苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等)来实现。在许多情况下,所期望的将包括等张剂,例如糖或氯化钠。可注射组合物的长期吸收可以通过在组合物中使用延迟吸收剂,例如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0319] 适用于给药的组合物可以和摄取或吸收增强剂一起调配以提高其功效。此类增强剂包括例如水杨酸盐、甘氨酸胆酸盐/亚油酸盐、乙醇酸盐、抑肽酶、杆菌肽、SDS、癸酸盐等等。参见例如Fix,药物科学杂志(J.Pharm.Sci.)85:1282-1285,1996)以及Oliyai和Stella,药理学毒理学年度评论(Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.),32:521-544,1993。

[0320] 给药和剂量

[0321] 在一个方面中,本公开提供给药包含如本文所述的负向调节剂抗体的药物组合物的方法。

[0322] 本发明的方法使用任何医疗上认可的用于直接或间接将治疗剂引入哺乳动物个体内的方式进行,包括但不限于注射、输注、口服摄取、鼻内、局部、经皮、不经肠、吸入喷雾、经阴道或经直肠给药。如本文所用的术语不经肠包括皮下、静脉内、肌肉内和脑池内注射,以及导管或输注技术。还涵盖通过皮内、乳房内、腹膜内、鞘内、眼球后、肺内注射和或在特定部位外科手术植入来给药。适合的递送装置可以包括经研发用于递送胰岛素的那些装置(参见例如Owens等人 糖尿病医学(Diabetic Med.)20(11):886-898,2003;US20140128803;以及Peysers et al.,纽约科学学会记录(Annals NY Acad Sci),1311:102-123,2014)。

[0323] 在一个实施例中,在需要通过直接注射进受影响的组织位置或通过能在内部递送调配物的持续递送或持续释放机构治疗的受影响组织位置处进行给药。举例来说,在适用于本公开的调配物中能包括能够持续递送组合物(例如可溶多肽、抗体或小分子)的可生物降解微球或胶囊或其它可生物降解聚合物配置,在所述位置植入。

[0324] 治疗性组合物还可以在多个部位递送给患者。多种给药可以同时提供或可以在一段时间内给药。在某些情况下提供治疗性组合物的连续流动会是有益的。其它疗法可能基

于时间段给药,例如每小时、每天、每周、每2周、每3周或每月。

[0325] 在本发明方法中还涵盖给药多种药剂,如抗体组合物与如本文所述的第二药剂结合。

[0326] 给定剂量中抗体组合物的量将根据待给药疗法的个体的身材以及正治疗的病症的特征而变化。在示范性治疗中,可能必需给药约0.1至约25mg/kg每剂量或每天,或约0.05至10mg/kg、约0.3至6mg/kg、或约0.1至3mg/kg。示范性剂量包括0.1mg/kg、0.3mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、0.75mg/kg、1.0mg/kg、1.5mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg、15mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg、20mg/kg、21mg/kg、22mg/kg、23mg/kg、24mg/kg或25mg/kg。其它剂量包括1mg/天、2.5mg/天、5mg/天、10mg/天、20mg/天、25mg/天、50mg/天、75mg/天、100mg/天、150mg/天、200mg/天、250mg/天、500mg/天或1000mg/天。这些浓度可以作为单个剂型或作为多次剂量或连续给药。首先在动物模型中并且随后在临床测试中进行的的标准剂量反应研究展现对特定疾病病况和患者群体的理想剂量。

[0327] 组合疗法

[0328] 一个实施例,本文所述的抗体与适用于治疗如本文所述的疾病或病症的第二药剂一起给药。包含本文所述的一种或多种抗体的组合物可以向患有或倾向于患有待治疗的与靶多肽相关的病状或病症的人或哺乳动物给药。

[0329] 两种治疗剂的并行给药无需同时或通过相同途径投予药剂,只要药剂发挥其治疗作用的时段存在重叠即可。涵盖同时或依序给药,如在不同的日期或周给药。

[0330] 第二药剂可以是其它治疗剂,如抗糖尿病药剂、细胞介素、生长因子、其它抗炎剂、抗凝剂、会降低或减小血压的药剂、会减少胆固醇、甘油三酯、LDL、VLDL或脂蛋白(a)或增加HDL的药剂、会增加或减少胆固醇调节蛋白质含量的药剂、抗肿瘤药物或分子。对于患有过度增殖性病症,如癌症或肿瘤的患者,还涵盖与第二治疗模式的组合,所述第二治疗模式如放射线疗法、化疗、光动力疗法或手术。

[0331] 示范性药剂包括但不限于胰岛素、胰高血糖素、阿卡波糖、奥曲肽、维拉帕米、二氮嗪以及其它适用于治疗低血糖或与低血糖相关的副作用的药剂。在各种实施例中,本文所述的抗体与胰岛素和/或胰高血糖素一起给药,任选地在递送装置中,例如智能递送装置(参见例如US20140128803)或双传感器/泵(例如仿生学胰腺系统)。

[0332] 本文所述的前述抗体或其片段中任一种可以和第二药剂同时给药,所述第二药剂是所属领域中已知的或本文所述的抗糖尿病药剂,作为辅助疗法。还涵盖包含本发明的前述抗体或多肽中的任一种以及其它抗糖尿病药剂的组合物。

[0333] 所属领域中已知多种抗糖尿病药剂,包括但不限于:1) 磺酰脲(例如格列美脲、格列生脲、磺酰脲、AY31637);2) 双胍(例如二甲双胍);3)  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂(例如阿卡波糖、米格列醇);4) 噻唑烷二酮(例如曲格列酮、吡格列酮、罗格列酮、格列吡嗪、巴拉列酮、利格列酮、萘格列酮、曲格列酮、恩格列酮、AD 5075、T 174、YM 268、R 102380、NC 2100、NIP 223、NIP 221、MK 0767、环格列酮、adaglitazone、CLX 0921、达格列酮、CP 92768、BM 152054);5) 胰高血糖素样肽(GLP)和GLP类似物或GLP-1受体的促效剂(例如肠促胰岛素类似物)或其稳定剂(例如DPP4抑制剂,如西他列汀);6) 胰岛素或其类似物或模拟物(例如LANTUS®);以及7) 胰高血糖素(例如GlucaGen hypoKit)。



[0334] 预期抗体和第二药剂可以同时在同一调配物中提供。进一步预期药剂在单独调配物中给药并且同时给药,其中同时是指在彼此30分钟内给予的药剂。

[0335] 另一方面,第二药剂在给药抗体组合物之前给药。预先给药是指在用抗体治疗之前一周范围内,至多在给药抗体之前30分钟给药第二药剂。进一步预期第二药剂在给药抗体组合物之后给药。之后给药意图描述在抗体治疗之后30分钟到给药抗体之后最多一周给药。

[0336] 适当时,进一步预期其它可以施用的辅助疗法。举例来说,适当时还可以对患者施用针对低血糖患者设计的膳食或进食方案、外科手术疗法或放疗。

[0337] 还将清楚如果传统疗法与本文所述的疗法组合给予,那么可以修改给药。

[0338] 使用方法

[0339] 本文预期结合INSR的负向调节剂抗体适用于治疗和预防与低血糖和高胰岛素血症相关的症状。在各种实施例中,待治疗或预防的病症或病况选自以下组成的组:卡波西肉瘤、胰岛素瘤、脆弱性糖尿病、人造胰腺手术后低血糖、异常葡萄糖代谢、肥胖症治疗手术后低血糖、运动诱发的低血糖、糖尿病性肾病、癌症、低血糖、夜间低血糖、磺酰脲诱发的低血糖、胰岛素诱发的低血糖、胰岛细胞增殖症(KATP-H1分散性疾病、KATP-H1局部疾病或“PHHI”)、GDH-H1(胰岛素过多/高血氨综合症(HI/HA)、亮氨酸敏感低血糖、或二氮嗪敏感低血糖)、胰岛细胞调节异常综合症、特发性婴儿期低血糖、持续性婴儿期高胰岛素性低血糖(PHHI)、先天性胰岛素过多、(有意)胰岛素过度剂量、因肾衰竭(急性或慢性)所致的低血糖、因遗传性代谢疾病(参见例如Douillard等人,Orphanet罕见疾病杂志(Orphanet J Rare Disease),7:26,2012)、Nissen胃底折叠术所致的低血糖、因自身移植胰岛细胞至肝中所致的低血糖、以及慢性肾病,例如III、IV或V型。

[0340] 其它低血糖病症在所属领域中公认并且在下文论述。这些症状中某些在膳食后低血糖中观测到,并且能告知如何用本文所述的抗体治疗和监测治疗膳食后低血糖。

[0341] 磺酰脲诱发的低血糖和胰岛素诱发的低血糖

[0342] 低血糖是表征为异常低血液葡萄糖(血糖)含量的病状,通常小于70mg/dl,并且能危及生命。大约5-15%的所有EMT电话是因为胰岛素诱发的低血糖,并且大约10%的所有ED就诊是因为胰岛素相关的低血糖。

[0343] 低血糖能够由给药某些药物诱发,包括磺酰脲诱发的低血糖和胰岛素自身。胰岛素和磺酰脲诱发的低血糖是两种最常见的药物诱发的低血糖类型。

[0344] 磺酰脲诱发的低血糖由磺酰脲(SU)药物导致,所述药物用来通过提高血清胰岛素含量治疗2型糖尿病。磺酰脲通过刺激从胰腺中的 $\beta$ 细胞释放胰岛素起作用。目前使用的磺酰脲包括乙酰苯磺酰环己脲、氯磺丙脲、甲磺吡庚脲、甲苯磺丁脲、格列本脲(glibenclamide)、格列齐特(gliclazide)、格列吡嗪(glipizide)以及格列美脲(glimepiride)。格列本脲和氯磺丙脲与较高的低血糖风险相关。

[0345] 第一代SU(乙酰苯磺酰环己脲、氯磺丙脲、甲磺吡庚脲、甲苯磺丁脲)较多地受增加低血糖风险的药物-药物相互作用影响。第二代SU(格列本脲、格列齐特、格列吡嗪、格列美脲)具有减小的诱发低血糖的药物-药物相互作用的可能性。

[0346] 胰岛素诱发的低血糖(医源性低血糖)由给药外源性胰岛素引发,例如由过度剂量的胰岛素引发,其能够引起血浆葡萄糖的有害的减少。摄取胰岛素的患者比摄取磺酰脲化

合物的患者远远更加频繁地发生重度低血糖。不同类型的胰岛素能导致发生过度剂量：速效胰岛素在注射后约15分钟起作用，而常规作用胰岛素：在注射后约30分钟起作用。长效胰岛素在注射后数小时开始起作用，并且效果均匀地持续超过24小时时间段。如果患者意外注射错误剂量或错误类型的胰岛素，或在已注射另外正确剂量之后错过用餐/点心，那么会发生胰岛素过度剂量。摄取错误的胰岛素产品最常报道于患者混合长效和速效产品。误算膳食碳水化合物含量也能造成胰岛素过度剂量。膳食相关的错误包括在给药胰岛素不久后忽略进食，或在减少热量摄取的情况下未调整胰岛素方案。也能发生有意的胰岛素过度剂量。近期研究发现据估计每年美国有100,000人由于低血糖去往急诊室，并且这些人的大约三分之一(30,000)最终住院。在这一研究中，在超过一半的病例中鉴别50mg/dL或更少的血糖含量，并且在几乎三分之二病例中存在严重的神经系统表现(Geller AI, 美国医学会杂志:内科学(JAMA Intern Med.) 175(5):678-686, 2014)。

[0347] 用于SU和胰岛素诱发的低血糖的典型治疗由摄取15-20克的葡萄糖或简单碳水化合物组成。对于更严重低血糖，给药胰高血糖素和/或右旋糖50% (D50)。胰高血糖素不稳定，不容易制备并且在10分钟内起作用，但通常作用时间过短(20-60分钟)。胰高血糖素具有多种副作用(脸红、呕吐、恶心)并且在大剂量的胰岛素急救或持续低血糖中低效，并且在胰岛素瘤个体中禁用。胰高血糖素需要肝糖储存，所述肝糖储存会被消耗并且能相对容易地被胰岛素超过。

[0348] 右旋糖经静脉内给药，因此其无法在家中(或学校)给药。其是粘稠的，具有有限的‘效力’(例如对于高胰岛素过度剂量)并且是短暂的，例如由EMT治疗的20%的成年低血糖患者将在24小时内具有后续情况。右旋糖还具有副作用，如静脉炎和注射部位的血栓、高渗透压摩尔浓度综合症风险、液体过剩(fluid overload)以及反跳性低血糖(rebound hypoglycemia)。对于胰岛素过度剂量-胰高血糖素和D50都不能克服所引起的低血糖。

[0349] 夜间低血糖。

[0350] 夜间低血糖在用胰岛素治疗的糖尿病患者中常见。幼童尤其对夜间低血糖的重度和长期发作敏感(Matyka等人, 激素研究(Horm Res.) 57(增刊1):85-90, 2002)。由于并不通常在睡眠期间监测血糖，通常未检测到夜间低血糖，这使得其比日间低血糖甚至更加危险。夜间低血糖通常在儿童中导致生动的梦或恶梦、较差睡眠质量或睡眠期间不安定、早晨头痛、慢性疲劳、情绪变化、肌紧张增加、盗汗、抽搐以及遗尿(Stephen A Brunton, 医景:一般内科(MedGenMed.) 9(2):38, 2007)。频繁的未检测到的夜间低血糖还促使未察觉到低血糖并且导致长期的神经认知不足。已经表明夜间低血糖的重度发作是引起猝死(老年患者“床上死亡综合症(dead-in-bed syndrome)”)的心律失常的诱发因素(Allen KV, Frier BM. 内分泌实践(Endoc Pract.) 9(6):530-43, 2003)。因担心发作重度夜间低血糖，患者通常在睡觉前减小其胰岛素剂量，这导致葡萄糖控制不足并且改变早晨胰岛素方案。另外，劳神过度和身体活动以及难以调节食物摄入能加剧儿童低血糖。用于夜间低血糖的当前治疗是床边点心，以便唤醒个体，以及胰高血糖素，用于不能唤醒的患者。本文的抗体可以应用为防治处于高风险的重度发作的患者。重要的是，有效的防治会允许较好(较坚固)的葡萄糖控制(因为低血糖风险降低)。

[0351] 持续性婴儿期高胰岛素性低血糖(PHHI)和新生儿低血糖。

[0352] 低血糖是新生儿中常见的代谢问题，尤其在生命的最初2天，并且导致进入NICU。

重要的是,具有长期低血糖含量的婴儿处于较高的后续儿童期发育问题的风险。

[0353] 在筛查、判断和管理新生儿低血糖的最佳方法方面仍然存在一些争论,并且鉴别低葡萄糖浓度含量可能潜在地具有损坏性。处于低血糖风险并且频繁筛查低血糖的新生儿包括晚期早产儿、大于胎龄儿 (large for gestational age)、小于胎龄儿 (small for gestational age)、生长受限新生儿以及糖尿病母亲的婴儿。大部分低血糖是轻度的、短暂的并且平安地解决。典型的治疗包括补充调配物,或在一些情况下静脉内给药葡萄糖。最近研发的选择方案是颊内递送右旋糖凝胶。

[0354] 本文所述的抗体可能适用于对葡萄糖不充分反应的患者,和/或其中未解决低血糖的患者(例如在最初48至72小时内)。

[0355] 由于肾脏功能改变、多重用药以及对警示征兆减少的敏感度,老年群体中存在较高的低血糖发生率。举例来说,80岁以上的患者风险有两倍高。

[0356] 可以在对当前治疗选择具有较差反应的患者中,或在其中指示当前治疗是相反的那些个体中使用治疗,例如静脉接受右旋糖溶液。举例来说,在由于酒精滥用或酒精中毒而患有肝糖耗乏的个体中当前疗法可能并不有效,或肝中肝糖耗乏的患者对胰高血糖素不具有预期效果。

[0357] 所属领域中涵盖的用于低血糖的替代疗法包括使用仿生学胰腺,其组合胰岛素泵、持续葡萄糖监测 (CGM), 并且自动给药所需剂量的胰岛素,例如Medtronic MiniMed 670G混合式闭合回路系统。预期仿生学胰腺可以补充有如本文所述的抗体或Fab。

[0358] 先天性高胰岛素血症

[0359] 先天性胰岛素过多是导致个体具有异常高的胰岛素含量,引起频繁的低血糖(低血糖症)情形的病状。反复发生低血糖增加严重事件的风险,如呼吸困难、癫痫、智力功能障碍、失明、脑损伤以及昏迷。已发现若干基因的突变引起先天性胰岛素过多,并且这些突变通常引起胰岛素从 $\beta$ 细胞过度分泌,并消耗来自血流的葡萄糖。

[0360] 当前仅存在少数用于持续性先天性高胰岛素血症 (CHI) 的治疗方法 [Arnoux J., 等人Orphanet罕见疾病杂志 (Orphanet Journal of Rare Diseases) 6:63 (2011); Yorifuji T., 安中华内分泌代谢杂志 (Ann Pediatr Endocrinol Metab.) 19:57-68 (2014)]。二氮嗪是KATP通道活化剂,其抑制胰腺 $\beta$ 细胞中的胰岛素分泌。最常见的不良影响是毛发过多(多毛症)。其它副作用包括钠和体液潴留 (fluid retention), 其可能诱发充血性心脏衰竭。对于由于KATP通道突变而患有CHI的那些患者,二氮嗪一般低效,所述突变是CHI的最常见原因之一。奥曲肽是抑制胰岛素释放的生长抑素类似物。尽管未经批准用于CHI,但奥曲肽用于对二氮嗪无反应的CHI。由于奥曲肽短的半衰期(1到2小时),其作为多次每天注射或连续地用泵皮下 (SC) 给药,或经静脉内 (IV) 给药。常见的不良事件包括胃肠症状和胆囊并发症。局部胰腺切除术是用于病灶性病变的选择方案,并且在大部分情况下可以治愈。然而,在由手术前成像指定的部位处,病变并不是始终可见的或可触知的。患有分散形式的患者主要通过持续葡萄糖馈送或药品核准标示外 (off-label) 的药剂治疗。已认为接近全部胰腺切除术是一种治疗,但其特征在于高风险的糖尿病。

[0361] 胰岛素瘤

[0362] 胰岛素瘤是胰腺肿瘤,通常起始于 $\beta$ 细胞,引起胰岛素分泌增加。用于患有胰岛素瘤的患者的治疗选择包括用二氮嗪或生长抑素类似物药物治疗以控制低血糖症状,但仅外

科手术去除/局部胰腺切除术可以治愈。胰岛素瘤诱发的低血糖能在成功的外科手术去除之后数年复发(在患有散发性胰岛素瘤的患者中复发率5-7%)。

[0363] 大约5-10%的胰岛素瘤(对应于每年约125个新患者)是恶性的和转移性的。恶性胰岛素瘤一般对传统化学治疗剂方案反应不良;因此,在此群体中存在远未满足的葡萄糖控制的需要。另外,可以和化疗同时施用以控制低血糖的靶向胰岛素的治疗会是所关注的。

[0364] 膳食后低血糖

[0365] 最近已经观察到膳食后高胰岛素性低血糖是胃旁路手术的副作用或并发症(Singh等人,糖尿病谱(Diabetes Spectrum) 25:217-221,2012;Patti等人,糖尿病学(Diabetologia) 48:2236-2240,2005;Service等人 新英格兰医学杂志(N Engl J Med) 353:249-254,2005)。用于胃旁路手术的常见方法包括Roux-en-Y胃旁路方法(RYGB)、袖状胃切除术(Li等人,外科手术腹腔镜检查、内窥镜检查以及经皮技术(Surgical Laparoscopy, Endoscopy & Percutaneous Techniques) 24:1-11,2014)、胃囊带术或胃成形术。通常观察到的胃旁路手术的副作用是“倾倒”,其为摄取单糖并且快速排空食物至小肠中的结果。此通常表征为血管舒缩症状(脸红、心动过速)、腹痛以及腹泻。在进食之后至多数小时能发生迟倾倒或反应性低血糖的形式,并且由胰岛素对由从邻近小肠快速吸收单糖产生的高血糖症起反应引起。相比于在手术后不久注意到并且随时间的推移改善的倾倒,高胰岛素性低血糖在胃旁路手术后存在几个月至数年(通常约1年,至多3年)。此综合症与倾倒不同之处在于发病重度膳食后神经低血糖症,所述神经低血糖症在倾倒中通常不存在,以及发病胰腺胰岛细胞增生症(胰岛细胞增大、 $\beta$ 细胞从导管上皮细胞出芽以及胰岛与导管并列)。不同于倾倒,营养修改不会缓解膳食后低血糖(PPH)的症状。

[0366] 肥胖症治疗手术后的高胰岛素性低血糖的诊断和确认通常基于观测升高的胰岛素( $>3\mu\text{U}/\text{ml}$ )和C肽( $>0.6\text{ng}/\text{ml}$ )以及负向经口低血糖药剂筛查(Service F.J.,北美内分泌学与代谢临床(Endocrinol Metab Clin North Am) 28:501-517,1999)。

[0367] 一般来说,低血糖可以是轻度的并且引起如焦虑和饥饿的症状,但患者也处于重度低血糖的风险,所述重度低血糖能导致癫痫、昏迷以及甚至死亡。患者抱怨的与低血糖相关的典型症状包括疲劳、虚弱、颤抖以及饥饿。许多患者必须频繁进食以预防来自低血糖的症状。一些患者由于低血糖可能罹患精神症状。

[0368] 预期给药作为胰岛素信号传导的负向调节剂的抗体将有益于治疗肥胖症治疗手术后的PPH。预期所述方法在所属领域中已知的并且描述在本文中的胃手术中任一种之后有用,所述胃手术包括但不限于Roux-en-Y胃旁路方法(RYGB)、袖状胃切除术、胃囊带术或胃成形术。在一个方面中,低血糖/高胰岛素血症使用针对人类胰岛素受体(INSR)的单克隆抗体治疗,所述单克隆抗体负向调节胰岛素作用。在一个方面中,具有选自以下组成的组的以下一种或多种特性的抗体:结合到两种形式的INSR(A和B)、抑制INSR自体磷酸化、抑制通过Akt的INSR信号传导,是特异性的,能抑制胰岛素结合,并且不结合于IGF-1R或影响IGF-1R信号传导。

[0369] 假设本文预期所用的抗体将通过负向调节INSR赋予细胞对胰岛素的抗性,由此使高胰岛素性患者体内的血糖含量提高和正常化。在各种实施例中,抗体减轻高胰岛素血症或过度胰岛素信号传导。在各种实施例中,给药将个体的膳食后血糖提高1.5至10倍,或10%至40%。在各种实施例中,给药使个体的膳食后血糖提高大约10mg/dL。在各种实施例

中,给药使血糖提高返回至正常范围。

[0370] 进一步预期给药使血糖含量在给药本文的抗体之后稳定约1、2、3、4、5、6、7、8并且至多12小时。还提供的是本文所述的给药在不予接受治疗的个体中引起高血糖症的情况下逆转所述个体中的低血糖。

[0371] 另外,本文所述的抗体能改善膳食之后的低血糖的动力学。举例来说,在用餐后1-4小时可能发生大约 $<70\text{mg/dL}$ 或 $<60\text{mg/dL}$ 的膳食后低血糖。预期用如本文所述的抗体治疗将此类膳食后含量减小至正常的非症状性范围。此类减小能达约 $10\text{--}30\text{mg/dL}$ ,例如减小可以是约 $10$ 、 $15$ 、 $20$ 、 $25$ 或 $30\text{mg/dL}$ 或更多,或这些数值之间的任何量。向个体给药负向调节剂抗体的效果在活体内和活体外测量。在一个实施例中,预期负向调节胰岛素/胰岛素受体活性的抗体降低胰岛素敏感性和HbA1c以及葡萄糖的活体内含量。这些因素使用所属领域的技术人员常用的技术测量。

[0372] 接受负向调节剂抗体的个体还可能展示改善的:胰岛素分泌、葡萄糖控制(如通过葡萄糖耐受性测试(GTT)或混合膳食测试(MMT)所测量)、胰岛素敏感性(如通过胰岛素耐受性测试(ITT)所测量)、 $\beta$ 细胞功能(如通过例如细胞块、胰岛素分泌、C肽含量所测量)、 $\beta$ 细胞休眠和/或血脂异常。

[0373] 举例来说,ADA建议成人HbA1c目标含量小于7%。对于儿童,ADA建议较高A1c目标含量。在小于6岁的儿童中,所推荐含量是7.5%至8.5%。在6到12岁大的儿童中,所推荐含量小于8%。对于13到19岁大的青少年所推荐含量小于7.5%。A1c是在先前2至3个月内血糖含量在目标范围内保持得有多好的量度。(美国糖尿病协会(American Diabetes Association),糖尿病护理(Diabetes Care),28(1):186-212,2005)预期给药抗体以治疗PPH使得A1c含量趋向非低血糖个体中所观测到的含量,例如将患者体内的A1c含量提高至少0.5%、0.7%、1.0%或1.5%或更大的绝对HbA1c百分比测量值。胰岛(pancreatic islets of Langerhans)中的 $\beta$ 细胞制备和释放胰岛素,所述胰岛素是控制血液中葡萄糖含量的激素。胰腺保持的胰岛素存在基线含量,但胰腺能够通过释放储存的胰岛素对血糖剧增快速反应,并且同时生成更多胰岛素。反应时间相当迅速。举例来说,在1型糖尿病中, $\beta$ 细胞的逐渐和大规模损失引起所分泌的胰岛素含量减少,最终导致高血糖症(血液中异常高的葡萄糖含量)。在2型糖尿病中, $\beta$ 细胞首先通过增加胰岛素产出补偿个体中的胰岛素抗性,但随时间推移,细胞变得不能够生成足够的胰岛素以维持正常的葡萄糖含量。认为目标组织对胰岛素作用的抗性和胰岛素分泌减少在某种程度上是因为发生 $\beta$ 细胞失效。

[0374] 实例

[0375] 通过以下说明性、非限制性实例进一步描述本发明。

[0376] 实例1

[0377] 构筑XPA.15.247.2.018变异体

[0378] 为构筑XPA.15.247.2.018抗体和Fab变异体,使用斯塔津试剂盒使用标准定点突变诱发方案扩增和突变XPA.15.247的重链和轻链(参见W02011/038302,以引用的方式并入本文中)。VH中突变的残基是CDR2中的天冬氨酸54变成丝氨酸,因为其能造成与邻近残基甘氨酸的异构化。在CDR3中,甲硫氨酸105突变成苯丙氨酸,因为其是潜在氧化位点。突变的第三个残基是缬氨酸107变成Tyr。所有这些三个残基变成生殖系(D54S、M105F、V107Y),其意图改进可制造性,但与亲本抗体相比出人意料地改进对INSR的亲合力和变异体的效能。

XPA.15.247变异体重链称为XPA.15.247.2 (SEQ ID NO:2)。XPA.15.247 (SEQ ID NO:1和3)和XPA.15.247.2.018 (SEQ ID NO:2和4)的重链和轻链序列展示于下文表2中,其中CDR带下划线,并且氨基酸修改呈粗体斜体。

[0379] 表2

[0380]

	<b>序列</b>
<b>XPA.15.247 VH</b>	<b>EVQLVETGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWV RQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHEWGFMDVWGQG TTVTVSS (SEQ ID NO: 1)</b>
<b>XPA.15.247.2 VH</b>	<b>EVQLVETGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWV RQAPGKGLEWVAVISYSGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHEWGF<del>FD</del>YWGQGT TVTSS (SEQ ID NO: 2)</b>
<b>XPA.15.247 VL</b>	<b>DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCRSSLSLVYGDENTYLN WFQQRPGQSPRRLLYKVS<del>DR</del>DSGVPDRFSGSGSGTDF LKISRVEADDVGVYYCMQGT<del>H</del>WPYTFGQGTKLEIKRT VAAPS (SEQ ID NO: 3)</b>
<b>XPA.15.247.2.018 VL</b>	<b>DVVMTQSPLSLPVTGQPASISCRSS<del>Q</del>SLVYGDGNTYLN WFQQRPGQSPRRL/YKVS<del>NR</del>DSGVPDRFSGSGSGTEFT LKISRVEAEDVGVYFCMQGT<del>Y</del>WPGTFGGGTKLEIKRTV AAPS (SEQ ID NO: 4)</b>

[0381] 实例2

[0382] 结合分析

[0383] 为测定经修改Fab结合胰岛素受体的能力,进行结合分析。

[0384] 将过度表达INSR人类、鼠以及猕猴直系同源物的CHOK1细胞以25,000个细胞/孔接种于96孔圆底盘(Costar,目录号3799)中。为分析亲本抗体结合,在分析前一天用PBS洗涤细胞,以 $1 \times 10^6$ 个细胞/毫升再悬浮于含有RPMI 1640(Invitrogen)、2mM L-谷氨酰胺以及0.5%BSA的“饥饿培养基”中,并且在37°C、5%CO<sub>2</sub>培育箱中培育16-20小时,并且随后在4°C下以0.001至100μg/ml范围内的抗体浓度在50μl FACS缓冲液(PBS+0.5%BSA+0.1mM叠氮化钠)中培育40分钟。对于Fab染色,用第二抗体,小鼠抗c-myc IgG(罗氏(Roche),瑞士巴塞尔(Basel,Switzerland))对细胞进行染色。在用FACS缓冲液洗涤两次之后,随后用山羊抗人IgG别藻蓝蛋白(杰克逊免疫研究(Jackson Immuno Research),宾夕法尼亚州西格罗夫(West Grove,PA))(用于IgG分析)或用山羊抗小鼠IgG别藻蓝蛋白(杰克逊免疫研究,宾夕法尼亚州西格罗夫)(用于Fab分析)以1:100稀释在4°C下对细胞染色20分钟。用FACS缓冲液洗涤细胞两次,并且在FACSCanto II™流式细胞仪(百克顿迪金森公司(Becton Dickinson))上分析细胞。使用FlowJo™(Tristar,加利福尼亚州帕索罗布尔斯(Paso Robles,CA))和GraphPad Prism 5(GraphPad软件(GraphPad Software),加利福尼亚州拉

荷亚 (La Jolla, CA) 分析数据。

[0385] XPA.15.247抗体具有32.35的EC50,与XPA.15.247.2.018抗体的0.7514形成对比(图1),表明XPA.15.247.2.018 IgG对INSR的亲合力比亲本分子高约43倍。对于Fab片段, XPA.15.247Fab具有2.530的EC50,与XPA.15.247.2.018的0.1864形成对比(图2),表明XPA.15.247.2.018 Fab对INSR的亲合力比亲本Fab高大于13倍。

[0386] 通过在ProteOn XPR36仪器(拜耳雷德(Bio-Rad))上在25°C下使用一次性动力学方法进行的表面等离子共振(SPR)测定抗人INSR调节抗体的动力学和结合亲合力。SPR在无标记环境下测量实时的生物分子相互作用。将CHO-hINSR-B细胞溶解于由150mM NaCl、20mM Tris pH 7.5、1mM EDTA、1mM EGTA以及1% Triton™ X-100组成,以蛋白酶抑制剂混合物(罗氏,编号05892791001)补充的Tris裂解缓冲液(TLB)中。简单地说,将1ml TBL添加至约 $2 \times 10^6$ 个细胞,并且在4°C下在摇臂上搅拌细胞悬浮液。2小时后,在4°C下使用桌面离心机以14 000rpm将此溶液离心20分钟。过滤含有溶解的INSR的上清液并且在-80°C下保持冷冻,直至恰好在分析前将其解冻。为制备用于INSR捕获的SPR检测表面,使用标准胺偶合化学方法将识别INSR的羧基端部分的CT-3 mAb(费舍尔(Fisher),编号MS-636-PABX)共价固定于传感器芯片(拜耳雷德GLM,编号176-5012)上。简单的说,通过以每分钟100 $\mu$ L的流动速率连续注射10mM SDS、50mM NaOH、100mM Tris pH 9.5以及由10mM HEPES、150mM氯化钠、3mM EDTA、0.05%聚山梨醇酯20(天惠华(Teknova),编号H8022)组成的操作缓冲液来预调节GLM传感器芯片。随后通过以每分钟25 $\mu$ L的流动速率五分钟注射新制备的0.1M N-羟基丁二酰亚胺(NHS)和0.4M 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺的1:1溶液活化芯片表面。活化后,以每分钟30 $\mu$ L的流动速率注射pH 4.5乙酸盐缓冲液中的10 $\mu$ g/mL CT-3抗体,直至约10,000RU的捕获抗体固定于传感器表面上。为阻断表面,持续五分钟注射1M乙醇胺盐酸盐-NaOH pH 8.5。在涂布有CT-3抗体的竖直流道上以1000-1200RU的密度捕获1:1稀释于补充有1mg/ml BSA,含或不含1 $\mu$ g/ml人类胰岛素(西格玛(Sigma),编号A30590)的操作缓冲液中的溶解INSR。在转换至水平定向并且基线稳定10分钟后,以每分钟30 $\mu$ L的流动速率以133、44、14.7、4.9以及1.64nM的浓度在所捕获的溶解INSR上方注射抗人INSR调节抗体。监测结合持续5分钟,并且监测解离持续10分钟。在注射抗人INSR调节抗体之后用100mM HCl再生表面。使用ProteOn™软件用简单1:1结合模型对双参考数据进行曲线拟合,以产生用于结合速率( $k_a$ )和解离速率( $k_d$ )的动力参数。由动力学参数比率( $k_d/k_a$ )计算稳态结合常数( $K_D$ )值。表3展示在存在和不存在胰岛素的情况下,抗人INSR调节XPA.15.247亲本抗体和其变异体XPA.15.247.2.018对人类INSR的结合动力和亲合力参数。

[0387] 表3

[0388]

抗体	结合速率 $k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	解离速率 $k_d$ (1/s)	亲合力 $K_D$ (nM)
XPA.15.247	3.85E+04	4.71E-04	10 ± 2
XPA.15.247 + 胰岛素	4.25E+04	1.31E-03	29 ± 2
XPA.15.247.2.018	1.85E+05	1.22E-03	6.6 ± 0.6
XPA.15.247.2.018 + 胰岛素	1.96E+05	1.68E-03	8.5 ± 0.16

[0389] XPA.15.247在胰岛素不存在的情况下以约10nM的亲合力结合hINSR。结合速率是

$3.8 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$  并且解离速率是  $4.7 \times 10^{-4} \text{秒}^{-1}$ 。在胰岛素存在下, XPA.15.247 的亲合力低约 3 倍 ( $KD=29\text{nM}$ )。在胰岛素的情况下, XPA.15.247 结合到 hINSR 的结合速率是  $4.25 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$  并且解离速率是  $1.3 \times 10^{-3} \text{秒}^{-1}$ 。作为对比, 在胰岛素不存在的情况下 XPA.15.247.2.018 以约 6nM 的亲合力结合 hINSR。结合速率是  $1.85 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$  并且解离速率是  $1.22 \times 10^{-34} \text{秒}^{-1}$ 。在胰岛素存在下, XPA.15.247.2.018 的亲合力低小于 2 倍 ( $KD=8.5\text{nM}$ )。在胰岛素的情况下, XPA.15.247.2.018 结合到 hINSR 的结合速率是  $1.96 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$  并且解离速率是  $1.68 \times 10^{-3} \text{秒}^{-1}$ 。由于结合速率参数升高, 与 XPA.15.247 亲本抗体相比变异体展现更高的亲合力。此外, 相比于亲本抗体, 存在胰岛素并未显著减小变异体的结合速率或解离速率。

#### [0390] 实例3

##### [0391] 抗INSR调节抗体对INSR诱发的AKT磷酸化的效果

[0392] INSR是在胰岛素结合后进行自体磷酸化, 并且随后催化细胞内蛋白质磷酸化的酪氨酸激酶, 所述细胞内蛋白质如胰岛素受体基质 (IRS) 家族成员 Shc 和 Gab1。这些蛋白质中每一种充当对接位点, 用于募集下游信号传导分子, 引起各种信号传导路径的活化, 所述信号传导路径包括 PI (3) K/AKT 和 MAP 激酶 (MAPK) 路径。这些路径最终协调以调节细胞生长和分化、基因表达、肝糖、蛋白质和脂质合成以及葡萄糖代谢。

[0393] 测试抗体对通过 INS/INSR 复合物信号传导的效果能通过评估抗体加强胰岛素诱发的特定细胞内蛋白质的丝氨酸或酪氨酸磷酸化的能力来测量, 所述细胞内蛋白质如 AKT 和 MAPK (ERK1/2), 其对 INSR 信号传导路径具有特异性。这些蛋白质的磷酸化能通过电化学发光、西方墨点法 (Western blotting)、ELISA 以及所属领域中已知的其它技术测量和定量。

[0394] 经改造成表达 B 型人类 INSR 的 CHO K1 细胞用于信号传导分析。将这些细胞保持在含有用于 CHO 细胞的 EX-CELL 302 无血清培养基 (西格玛-阿尔德里奇 (Sigma-Aldrich), 密苏里州圣路易斯 (St. Louis, MO))、4mM L-谷氨酰胺以及 0.4mg/mL GENETICIN® (英杰公司 (Invitrogen), 加利福尼亚州卡尔斯巴德 (Carlsbad, CA)) 的生长介质中。将亲本 CHO K1 细胞用作对照并且保持在不含 GENETICIN® 的生长介质中。

[0395] 在分析前一天, 用 PBS 洗涤细胞, 以  $1 \times 10^6$  个细胞/毫升再悬浮于含有 RPMI 1640 (英杰公司)、2mM L-谷氨酰胺、0.4mg/mL GENETICIN® 以及 0.5% BSA 的“饥饿培养基”中, 并且在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培育箱中培育 16-20 小时。亲本 CHO K1 细胞培育在不含 GENETICIN® 的“饥饿培养基”中。次日, 将细胞再悬浮于具有 0.5% BSA 的 PBS 中, 并且将  $1 \times 10^5$  个细胞添加至 96 孔盘的孔。在添加胰岛素之前 15 分钟以 500nM 的饱和浓度添加测试抗体。随后在 0.0008 与 200nM 之间的范围的 7 个浓度下添加重组型人类胰岛素 (rhInsulin, 西格玛, 密苏里州圣路易斯)。在胰岛素存在下在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培育箱中培育另外 10 分钟之后, 将经处理细胞离心, 倾析培养基, 并且使细胞在含有 20mM Tris-HCl (pH 7.5)、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、1% Triton X-100、10mM NaF、磷酸酶抑制剂混合物 1 和 2 (西格玛-阿尔德里奇) 以及完整微型蛋白酶抑制剂 (罗氏诊断学公司 (Roche Diagnostics Corporation), 印第安纳州印第安纳波利斯 (Indianapolis, IN)) 的缓冲液中以  $4^\circ\text{C}$  振荡下裂解 1 小时。通过以  $485 \times g$  离心 3 分钟澄清裂解物。使用 MesoScale Discovery 多点分析系统 (MesoScale Discovery, 马里兰州盖瑟斯堡 (Gaithersburg, MD)) 的电化学发光 ELISA 用来定量裂解物内存在的磷酸化 AKT 的量。使用 GraphPad Prism® (GraphPad 软件公司, 加利福尼亚州拉荷亚) 软件分析数据,



由4参数对数等式计算EC50值。

[0396] 图3展示作为IgG抗体或Fab片段的XPA.15.247和XPA.15.247.2.018抗体的pAKT分析结果。XPA.15.247.2.018 IgG抗体和Fab均展示显著增强的对胰岛素介导的AKT磷酸化的抑制。在胰岛素的EC80和EC65浓度下比较XPA.15.247抗体和XPA.15.247.2.018抗体或Fab的效能。在胰岛素的EC80浓度下，XPA.15.247抗体的EC50是34.7nM，与XPA.15.247.2.018抗体的2.0和XPA.15.247.2.018 Fab的7.7形成对比，表明与亲本抗体相比，XPA.15.247.2.018抗体的效能高大于17倍，并且XPA.15.247.2.018 Fab的效能高大于4倍（图3B）。当在猕猴和鼠INSR直系同源物中测试时，XPA.15.247.2.018抗体和XPA.15.247.2.018 Fab还展现相较于亲本抗体改进的功能活性。

[0397] 实例4

[0398] 抗INSR调节抗体对磺酰脲诱发的低血糖的效果

[0399] 评估XPA.15.247.2.018 IgG和XPA.15.247.2.018 Fab对格列本脲诱发的低血糖的效果。使7周大的韦斯雄性鼠禁食2.5小时，并且随后给药媒介1 (PO) 或10mg/kg格列本脲 (PO)。60分钟后，向动物给药媒介2 (IV)、30mg/kg XPA.15.247抗体 (IV)、3mg/kg或10mg/kg XPA.15.247.2.018 IgG、或3mg/kg或10mg/kg XPA.15.247.2.018 Fab。读取首次给药之前、以及给药之后30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、180分钟、240分钟、6小时、8小时、24小时和48小时的血糖。

[0400] 格列本脲诱发缓慢和稳定的血糖减少，其通过30mg/kg XPA.15.247抗体(图4A)逆转，这似乎是有效的临界剂量。相比而言，XPA.15.247.2.018 IgG和XPA.15.247.2.018 Fab在3mg/kg和10mg/kg剂量下均以显著的剂量依赖性方式有效逆转低血糖(图4B和C)。与XPA.15.247和XPA.15.247.2.018 IgG相比，XPA.15.247.2.018 Fab具有较快的起始作用时间(约30分钟)和较短的持续时间(图4D)。

[0401] 实例5

[0402] 抗INSR调节抗体对胰岛素诱发的低血糖的效果

[0403] 还评估XPA.15.247.2.018 Fab对胰岛素诱发的低血糖的效果。使7周大的雄性斯普拉-道来鼠禁食，并且随后以1U/kg给药皮下胰岛素(Humulin R, 礼来公司(Eli Lilly)，印第安纳州印第安纳波利斯)。20分钟后，向动物给药30mg/kg XPA.15.247抗体(IV)或3mg/kg或10mg/kg XPA.15.247.2.018 Fab(IV)。在给药胰岛素后前90分钟每10分钟测量血糖，随后每30分钟直到4小时。

[0404] 胰岛素诱发血糖快速减少。XPA.15.247抗体在30mg/kg下有效逆转胰岛素诱发的低血糖(图5A)。相比而言，XPA.15.247.2.018 Fab在3mg/kg和10mg/kg剂量下均有效逆转低血糖(图5B)，在10mg/kg剂量后具有10分钟内的快速起始，并且在3mg/kg剂量后在20分钟起始。在经XPA.15.247.2.018 Fab处理的组中在3mg/kg与10mg/kg之间观测到显著的剂量依赖性功效。总体上，XPA.15.247.2.018 Fab在两个鼠品系中具有类似动力学。与XPA.15.247亲本抗体相比，XPA.15.247.2.018 IgG具有较高的效能并且XPA.15.247.2.018 Fab具有较快的起始作用时间和较短的持续时间。

[0405] 实例6

[0406] 另外结合分析

[0407] 为了测定XPA.15.247.2.018结合小型猪胰岛素受体的能力，进行另外结合分析。

还使用各种胰岛素受体直系同源物在结合分析中测试XPA.15.247的两种另外变体15.247.2.011和15.247.2.014。结合分析如实例2中所描述进行,但使用山羊抗人κ异硫氰酸荧光素第二抗体(生命技术(Life Technologies),纽约州格兰德岛(Grand Island,NY))检测Fab。用于实验检验此表中的IgG的第二抗体是来自实例2/图1的相同抗人IgG抗体(山羊抗人IgG别藻蓝蛋白(杰克逊免疫研究,宾夕法尼亚州西格罗夫))。

[0408] 表4展示XPA.15.247、XPA.15.247.2.018以及两种另外变体抗体结合到胰岛素受体直系同源物的以nM为单位的EC50值。

[0409] 表4

[0410]

Fab	人类	鼠	猕猴	小型猪
XPA.15.247	34.8	11.8	93.0	39.8
XPA.15.247.2.018	1.6	1.9	21.9	2.0
XPA.15.247.2.011	2.7	1.9	17.2	5.8
XPA.15.247.2.014	1.8	1.7	10.2	2.9
IgG				
XPA.15.247	8.8	9.7	13.6	12.0
XPA.15.247.2.018	0.3	0.4	1.4	0.5
XPA.15.247.2.011	1.0	1.3	3.3	1.5
XPA.15.247.2.014	0.7	0.7	1.1	0.9

[0411] 实例7

[0412] 抗INSR调节抗体对INSR直系同源物诱发的AKT磷酸化的效果

[0413] 在实例3中所描述的pAKT信号传导分析中使用经改造成表达各种INSR直系同源物,例如鼠、猴以及小型猪INSR的CHOK1细胞测试XPA.15.247和三种变体抗体。结果展示于表5中。

[0414] 表5

EC50 (nM)				
Fab	人类	鼠	猕猴	小型猪
<b>XPA.15.247</b>	<b>44.0</b>	<b>46.6</b>	<b>82.4</b>	<b>20.7</b>
<b>XPA.15.247.2.018</b>	<b>3.3</b>	<b>4.2</b>	<b>2.8</b>	<b>2.5</b>
<b>XPA.15.247.2.011</b>	<b>5.0</b>	<b>7.8</b>	<b>6.2</b>	<b>4.4</b>
<b>XPA.15.247.2.014</b>	<b>9.6</b>	<b>~15.63</b>	<b>~15.09</b>	<b>8.4</b>
IgG				
<b>XPA.15.247</b>	<b>34.5</b>	<b>46.2</b>	<b>30.7</b>	<b>20.7</b>
<b>XPA.15.247.2.018</b>	<b>0.3</b>	<b>0.4</b>	<b>0.2</b>	<b>0.3</b>
<b>XPA.15.247.2.011</b>	<b>1.5</b>	<b>3.1</b>	<b>1.3</b>	<b>1.7</b>
<b>XPA.15.247.2.014</b>	<b>2.1</b>	<b>4.2</b>	<b>1.7</b>	<b>2.3</b>

[0415] 实例8

[0417] XPA.15.247变体Fab在存在和不存在胰岛素的情况下结合人类INSR的动力学分析

[0418] 抗体结合的动力学分析使用表面等离子共振,使用Protein™ XPR36(拜耳雷德,加

利福尼亚州埃库莱斯 (Hercules, CA) 进行。在传感器表面上通过固定的单克隆抗INSR $\beta$ 亚基抗体 (克隆CT-3, 费舍尔, 编号MS-636-PABX) 捕获使用Tris裂解缓冲液 (150mM NaCl、20mM Tris pH 7.5、1mM EDTA、1mM EGTA以及1% Triton<sup>TM</sup> X-100, 补充有蛋白酶抑制剂混合物 (罗氏, 编号05892791001)) 从表达胰岛素受体的B同工型的CHO细胞溶解的人类INSR。将3.7-300nM范围内的递增浓度的Fab注射在所捕获受体上方以获得结合和解离动力学。结果展示于表6中。

[0419] 表6

[0420]

- 胰岛素			
Fab	结合速率 (1/Ms)	解离速率 (1/s)	亲和力 (nM)
XPA.15.247	3.74E+04	2.11E-03	56 ± 3.5
XPA.15.247.2.018	9.48E+04	6.55E-04	6.9 ± 0.4
XPA.15.247.2.011	7.04E+04	7.05E-04	10 ± 0.3
XPA.15.247.2.014	1.37E+05	7.05E-04	3.7 ± 0.2
+ 胰岛素			
XPA.15.247	2.61E+04	2.41E-03	92 ± 13
XPA.15.247.2.018	6.84E+04	1.18E-03	17 ± 1.0
XPA.15.247.2.011	6.62E+04	1.08E-03	16 ± 0.2
XPA.15.247.2.014	1.09E+05	9.98E-04	9.2 ± 0.2

[0421] 实例9

[0422] XPA.15.247变异体Fab的pI测量

[0423] 使用Pharmalyte® 3-10载体两性电解质 (通用电气医疗集团 (GE Healthcare)) 根据制造商的说明书制备Fab样品。使用cIEF Pharmalyte碱性分离来分离样品, 并且与合成肽pI标记物 (9.77、9.5以及6.61) 或贝克曼库尔特公司 (Beckman Coulter) pI标记物 (10.0、7.0或6.7) 进行比较。使用32Karat软件中的定性分析计算样品的实验pI值。XPA.15.247变异体Fab的理论 (未处理) 和实验 (CE IEF) pI值展示于表7中。

[0424] 表7

[0425]

Fab (或IgG?)	未处理pI值	实验pI值
XPA.15.247	8.41	7.71
XPA.15.247.2.018	8.63	9.45
XPA.15.247.2.011	8.63	9.47
XPA.15.247.2.014	8.74	9.62

[0426] 实例10

[0427] XPA.15.247变异体Fab结合于肝素

[0428] 具有较低pI的蛋白质一般展现较低的非特异性蛋白质结合, 并且因此经历较少的从身体非特异性清除。这一减少的非特异性结合能具有对活体内分子的半衰期的正向效果。参见例如Datta-Mannan等人 (mAbs, 7:483-493, 2015), 其描述具有较低pI的蛋白质具有较少的对肝素的结合以及较少的活体内非特异性清除, 但注意改变抗体的电荷和pI以减少非特异性结合能影响抗体的其它特性, 如减少的对靶的结合。

[0429] 本文所述的变异体Fab的相对高pI值增加所述变异体Fab会具有对如肝素的蛋白质的较高度度的非特异性结合的可能性。因此,研发用于肝素结合的ELISA分析。聚-D-赖氨酸板涂布有25 $\mu$ g/ml肝素(西格玛)并且用酪蛋白阻断剂(赛默飞世尔(Thermo Fisher))阻断。在37 $^{\circ}$ C下进行测试蛋白结合2小时。用在分析缓冲液中1:2000稀释的山羊抗人类Fab(Caltag),随后用HRP结合的驴抗山羊抗体(圣克鲁兹生物技术(Santa Cruz Biotechnology))检测Fab。将重组IL-8(安迪生物公司(R&D Systems))用作阳性对照,因为已知其结合肝素。用生物素标记的抗IL-8抗体(安迪生物公司),随后用在分析缓冲液中1:5000稀释的抗生物素链菌素HRP(南方生物技术(Southern Biotech))检测IL-8。用100 $\mu$ L TMB(卡尔生物化学公司(Calbiochem))建立ELISA并且用50 $\mu$ L 2M硫酸停止。在SpectraMax<sup>®</sup>Plus微板读数仪(分子仪器公司(Molecular Devices))上在450nm下对板对数,并且扣除来自对照聚-D-赖氨酸板的背景读数。结果展示于表8和图7中。

[0430] 出人意料地,尽管相比于15.247.2.011和15.247.2.014,XPA.15.247.2.018具有相对高的pI,但其并不结合于肝素。

[0431] 表8

[0432]

IL-8 $\mu$ g/ml	平均 A450 IL-8	Fab $\mu$ g/ml	平均 A450 .018	平均 A450 .011	平均 A450 .014	平均 A450 低 pI Fab
1.00	1.03	100	0.09	0.88	1.26	0.03
0.50	0.61	50	0.02	0.32	0.41	-0.01
0.25	0.23	25	0.01	0.21	0.24	0.00
0.125	0.09	12.5	0.01	0.10	0.16	0.00
0.063	-0.01	6.25	0.00	0.05	0.07	0.00
0.03125	0.01	3.125	0.00	0.02	0.03	-0.01
0.015625	-0.05	1.56	0.00	0.01	0.02	0.00
0.000	0.05	0	0.00	0.00	0.00	-0.01

[0433] 实例11

[0434] 抗INSR调节抗体对重度胰岛素诱发的低血糖的效果

[0435] 为分析XPA.15.247.2.018 Fab对重度胰岛素诱发的低血糖的效果,在斯普拉-道来鼠中如实例5中所描述评估XPA.15.247.2.018 Fab,但Fab在给药胰岛素45分钟后添加,而非在给药胰岛素20分钟后添加。结果展示于图8中。XPA.15.247.2.018 Fab在10mg/kg下有效逆转胰岛素诱发的重度低血糖(在少于20分钟内)。效果的持续时间持续数小时。这指示XPA.15.247.2.018 Fab不仅能在及早给药时逆转胰岛素诱发的低血糖,而且以及时方式成功地急救重度低血糖,即使在血糖已经低于50mg/dL时。

[0436] 实例12

[0437] XPA.15.247.2.018 Fab在鼠中的药代动力学

[0438] 使7周大的雄性斯普拉-道来鼠禁食2.5小时,并且随后经静脉内给药调配于丁二酸盐缓冲液(5mM丁二酸钠、150mM NaCl,pH 6.0)中的XPA.15.247.2.018 Fab。在给药前(剂量前)以及剂量后5分钟、15分钟、30分钟、1小时、2小时、4小时、8小时、24小时和48小时采集用于PK分析的样品。结果展示于表9和图9A和9B中。在静脉内给药XPA.15.247.2.018 Fab之后,一般来说,在第一取样时间,剂量后5分钟时观测到最大浓度(对于3mg/kg组是143 $\mu$ g/

mL,并且对于10mg/kg组是360 $\mu$ g/mL) (表9)。其后血清浓度下降,对于10mg/kg组具有4.9小时的平均半衰期,并且对于3mg/kg组具有1.4小时的平均半衰期。

[0439] 表9

[0440]

组	N	C 最大 ( $\mu$ g/mL)	AUC 最后 ( $\mu$ g*小时/mL)	T 最大 (小时)	T1/2 (小时)	CL ( mL/kg/ 小时)	Vss ( mL/kg)
3mg/kg	3	143 (24)	63 (10)	约 0.1	1.4 (0.3)	48 (7)	26 (5)
10 mg/kg	3	360 (127)	175 (43)	约 0.1	4.9 (0.5)	59 (15)	82 (67)

[0441] 实例13

[0442] XPA.15.247.2.018 Fab在小型猪中的药代动力学

[0443] 为了研究XMet Fab变异体在活体内的效果,使用胰岛素诱发的低血糖小型猪模型。使四只雄性格廷根小型猪(大约10kg)禁食2.5小时(6:00am喂食,拿走食物)。在t0时以10mg/kg经静脉内、肌内或皮下给药XPA.15.247.2.018 Fab。将XPA.15.247.2.018 Fab调配于磷酸钠缓冲液中。在以下时间点收集样品用于药代动力学:剂量前,剂量后5、10、30、60、120、240分钟、8小时(恢复食物)以及24小时。

[0444] 图10A-10C展示所有三种途径的血清药物浓度的药代动力学。在静脉内给药的情况下,XPA.15.247.2.018 Fab在第一取样时间,剂量后5分钟时达到最大浓度,具有3.3小时的平均半衰期。在肌内给药后,XPA.15.247.2.018 Fab的吸收较慢,并且在剂量后2.0小时观测到最大浓度(平均24.1 $\mu$ g/mL)。在达到C<sub>最大</sub>后,其后血清浓度下降,具有5.6h的平均半衰期和66.9%的生物可用性。在皮下给药XPA.15.247.2.018 Fab后,平均最大浓度是15.9 $\mu$ g/mL,这在三种途径中最低,并且是在剂量后1.7小时观测到,具有10.5小时的平均半衰期和65.5%的生物可用性。总之,与IV给药XPA.15.247.2.018 Fab相比,IM和SC给药XPA.15.247.2.018 Fab产生较迟T<sub>最大</sub>、较低C<sub>最大</sub>。

[0445] 通过改变血糖测量XPA.15.247.2.018 Fab在正常小型猪中的效果(图10C)。使四只雄性格廷根小型猪(大约10kg)禁食2.5小时。在t0时以10mg/kg经静脉内、肌内或皮下给药XPA.15.247.2.018 Fab。针对静脉内和肌内途径在以下时间点测量血糖:剂量前,剂量后5、10、30、60、120、240分钟、8小时以及24小时;并且针对皮下途径在以下时间点测量血糖:剂量前,剂量后15分钟、30分钟、1小时、1.5小时、2小时、2.5小时、3小时、3.5小时、4小时、4.5小时、5小时、5.5小时、6小时以及7小时。如图10C中所示,静脉内给药XPA.15.247.2.018 Fab将血糖升高最多,高达350mg/dL,皮下给药将血糖升高最少,仅150mg/dL,并且肌内给药在中间,为250mg/dL。XPA.15.247.2.018 Fab的效果在小型猪中持续约8小时。这与PK结果紧密相关,因为IV途径具有最高C<sub>最大</sub>并且SC途径具有最低C<sub>最大</sub>。

[0446] 实例14

[0447] XPA.15.247.2.018 Fab在小型猪中对优泌林(Humulin)R诱发的低血糖的功效

[0448] 进行小型猪实验以评估在给药长效胰岛素(优泌林R,礼来公司,印第安纳州印第

安纳波利斯)之后Fab变异体的效果。使四只雄性格廷根小型猪(大约10kg)禁食2.5小时(6:00am喂食,拿走食物)。对猪7083、7084、7086以0.15U/kg皮下给药胰岛素(优泌林R),并且对猪7085以0.1U/kg给药。在给药胰岛素后20分钟时肌肉给药XPA.15.247.2.018 Fab。在以下时间点测量血糖含量:剂量前,剂量后10、20、30、40、50、60、75、90、105、120、150、180、210、240、270分钟、6小时(恢复食物)以及24小时。如果血糖含量等于或低于40mg/dL,那么进行小型猪的急救。通过对猪喂食棉花软糖(marshmallow)进行急救。如果需要多于一个棉花软糖来升高血糖,那么认为其是独立的急救事件。结果展示于表10中。(\*血糖读数等于或小于40mg/dL。)

[0449] 表10

[0450]

小型猪	优泌林 R (S.C.) t=0 分钟	XPA.15.247.2.018Fab (I.M.) t=20 分钟	所需急救*(用棉花软糖)
7083	0.15 IU/kg	不适用	无
		10mg/kg	无
7084	0.15 IU/kg	不适用	无
		10mg/kg	无
7085	0.1 IU/kg	不适用	30 分钟, 40 分钟
		10mg/kg	无
7086	0.15 IU/kg	不适用	30 分钟
		10mg/kg	无

[0451] 这些结果表明XPA.15.247.2.018 Fab迅速减弱由优泌林R所导致的血糖降低,并且预防血糖含量降至低于40mg/dL。

[0452] 实例15

[0453] XPA.15.247.2.018 Fab通过不同给药途径在小型猪中急救Vetsulin诱发的低血糖的功效

[0454] 使四只雄性格廷根小型猪(大约10kg)禁食2.5小时(6:00am喂食,拿走食物)。在t0时皮下(s.c.)给药0.5IU/kg的Vetsulin(经纯化猪胰岛素)或媒介对照。在各种时间点下测量血糖含量(对于Vetsulin组,前2小时每30分钟,并且随后从2小时至5小时每20分钟,随后在5.5、6、6.5、7以及8小时处测量;对于媒介对照组,前5小时每20分钟,随后在5.5、6、6.5、7以及8小时处测量)。

[0455] Vetsulin迅速降低血糖并且血糖在t45分钟时达到50mg/dL,并且保持在所述含量下约6至7小时。在t45分钟时经静脉内以10mg/kg或2mg/kg剂量给药XPA.15.247.2.018 Fab。在给药XPA.15.247.2.018 Fab后前2个时间点每15分钟测量血糖,并且每30分钟直到t6小时,和在7小时处测量。XPA.15.247.2.018 Fab在两种剂量下均在15分钟内有效逆转Vetsulin诱发的低血糖,并且展示显著的剂量依赖性效果(图11A)。XPA.15.247.2.018 Fab在2mg/kg下不仅有效,并且将小型猪中的血糖稳定在血糖正常,其持续大于6小时。这指示在适当剂量下,静脉内给药XPA.15.247.2.018 Fab能稳定血糖,不引起显著波动。

[0456] 在Vetsulin后t35分钟时通过肌肉内注射以5mg/kg给药XPA.15.247.2.018 Fab。在给药XPA.15.247.2.018 Fab后前2个时间点每15分钟测量血糖,并且每30分钟直到t6小

时,和在7小时处测量。XPA.15.247.2.018 Fab在5mg/kg下在15分钟内有效减慢血糖降低,并且在给药后约30分钟内开始逆转低血糖(图11B)。效果持续数小时。尽管在4小时后存在血糖略微升高,但其不超过150mg/dL。这指示XPA.15.247.2.018 Fab通过肌肉内给药具有足够的减慢由胰岛素所导致的血糖降低和在不导致高血糖症的情况下逆转重度低血糖的生物可用性。XPA.15.247.2.018 Fab通过肌肉内注射的成功提供可以易于医学专业人员和非医务人员使用的途径。

[0457] 还通过在此模型中皮下注射测试XPA.15.247.2.018 Fab的效果。在Vetsulin后t30分钟时以9mg/kg皮下给药XPA.15.247.2.018 Fab。在给药XPA.15.247.2.018 Fab后前2个时间点每15分钟测量血糖,并且每30分钟直到t6小时,和在7小时处测量。如图11C中所示,XPA.15.247.2.018 Fab通过皮下给药减弱由胰岛素所导致的血糖降低,但相较于仅Vetsulin对照组,仅在给药后30-60分钟内升高血糖。

[0458] 实例16

[0459] XPA.15.247.2.018 Fab通过皮下给药途径在小型猪中预防Vetsulin诱发的低血糖的功效

[0460] 小型猪中Vetsulin诱发的低血糖的持续时间和强度代表用于人类夜间低血糖的良好模型。因此,其还用于评估XPA.15.247.2.018 Fab预防夜间低血糖的效果。使四只雄性格廷根小型猪(大约10kg)禁食2.5小时(6:00am喂食,拿走食物)。在t-90分钟时以9mg/kg皮下给药XPA.15.247.2.018 Fab。在t0时以0.5IU/kg皮下(s.c.)给药Vetsulin。在给药XPA.15.247.2.018 Fab后前2个时间点每15分钟测量血糖,并且每30分钟直到t6小时,和在7小时处测量。如图12中所示,XPA.15.247.2.018 Fab通过皮下给药成功预防胰岛素诱发的低血糖。在给药XPA.15.247.2.018 Fab之后,在研究期间的任何时间点处不存在显著的血糖升高。这指示皮下给药XPA.15.247.2.018 Fab能在没有导致高血糖症风险的情况下有效预防夜间低血糖。

[0461] 实例17

[0462] XPA.15.247.2.018 IgG在正常鼠中重复给药的功效

[0463] 为测试重复给药XPA.15.247.2.018 IgG的效果,每周一次持续三周向正常斯普拉-道来鼠以1mg/kg、3mg/kg以及10mg/kg经静脉内给药XPA.15.247.2.018 IgG。在8小时禁食条件下或在喂食条件下在各种时间点收集血清样品并且测量血糖含量。在剂量前,剂量后第4天、第8天、第11天、第15天以及第18天收集空腹血清样品和葡萄糖读数(来自第8天和第15天的样品是第二剂量前和第三剂量前)。在4小时、8小时、第2天、第4天+4小时和第4天+10小时、第5天、第8天+6小时、第9天、第11天+6小时、第12天、第15天+4小时、第15天+10小时、第16天、第17天、第18天+4小时、第18天+10小时以及第19天收集餐后血清样品和葡萄糖读数。10mg/kg的XPA.15.247.2.018 IgG在禁食条件下在大多数时间点引起显著的高血糖症(图13A)。在给药多剂量XPA.15.247.2.018 IgG时还观测到改进的葡萄糖升高功效。XPA.15.247.2.018 IgG在10mg/kg下在喂食条件下引起甚至更加严重的高血糖症(图13B)。然而,1mg/kg和3mg/kg组中的血糖含量在禁食条件下未显著升高,并且在3mg/kg组中在喂食条件下具有不协调的微小升高(图13A和B)。

[0464] 在所有时间点分析血清样品的c肽和胰岛素含量。XPA.15.247.2.018 IgG在禁食条件下以剂量依赖性方式升高c肽含量(图14A),并且尤其在葡萄糖升高的剂量下,符合正

常生理反应。然而,在喂食条件下未观测到类似趋势。针对两个剂量组,C肽在第一剂量后t10小时处展示初始剧增,随后保持在稳定含量(约 $5\sim 6\times 10^3$ pM)(图14B)。

[0465] 对于胰岛素含量,XPA.15.247.2.018 IgG在禁食条件下还以剂量依赖性方式升高内源性胰岛素含量(图14C)。在10mg/kg剂量下,胰岛素含量的峰浓度与c肽的峰一致(图14A和C)。然而,在喂食条件下,在第2周和第3周,10mg/kg和3mg/kg组之间的胰岛素含量几乎重叠(图14D)。在10mg/kg组中观测到胰岛素含量显著升高,其与c肽含量相关(图14B)。

[0466] 尽管在3mg/kg下血糖改变极少,但XPA.15.247.2.018 IgG显著升高c肽和内源性胰岛素含量,表明临界葡萄糖升高,并且具有敏感的反调控的胰岛素分泌。

[0467] 在研究期间记录体重改变,并且在研究结束时收集器官(肝和肾脏)。XPA.15.247.2.018 IgG在10mg/kg组中在第一周引起部分重量损失(图15A)。随后,动物在第二周保持体重,并且在第三周期间开始以类似于其余组的速率增重(图15A)。XPA.15.247.2.018 IgG在3mg/kg下展示与1mg/kg组和媒介对照组相比的较少体重增长的趋势。基于XPA.15.247.2.018 IgG的作用机理,认为肝是标靶器官,因为其具有丰富的胰岛素受体表达。在所有组当中未观测到肝重量的显著变化(图15B)。然而,在研究结束时,在10mg/kg组中存在肾重量的略微增加(图15C)。因此,在以10mg/kg 3次重复给药XPA.15.247.2.018 IgG的情况下,观测到初始重量损失,其在研究继续进行时倾向于恢复。XPA.15.247.2.018 IgG在此研究中并未显著影响肝重量,并且仅引起肾重量略微增加。

[0468] 实例18

[0469] XPA.15.247.2.018 Fab在正常鼠中重复给药的功效

[0470] 为测试重复给药XPA.15.247.2.018 Fab的效果,每天一次持续三天向正常斯普拉-道来鼠以3mg/kg和10mg/kg经静脉内给药所述药剂。在8小时禁食条件下或在喂食条件下在各种时间点收集血清样品并且测量血糖含量。在剂量前、第3天(第三剂量前)收集空腹血清样品和葡萄糖读数。在15分钟、1小时、3小时和7小时、和第2天(第二剂量前)、第3天+15分钟、第3天+1小时、第3天+3小时、第3天+7小时以及第4天收集餐后血清样品和葡萄糖读数。XPA.15.247.2.018 Fab在10mg/kg和3mg/kg两种剂量下升高血糖含量,并且其效果持续数小时(图16A和B)。XPA.15.247.2.018 Fab在剂量后24小时未引起任何血糖含量变化(图16A和B),其也未升高c肽和胰岛素含量(图17A、B、C以及D)。然而,在血糖升高期间观测到c肽和胰岛素含量以剂量依赖性方式显著升高(图17A、B、C以及D)。

[0471] 在整个研究期间未观测到动物体重显著改变,在研究结束时也未观测到肝和肾重量的任何变化(图18A、B以及C)。因此,XPA.15.247.2.018 Fab对动物体重和肝和肾脏重量具有极少影响,即使在10mg/kg剂量下。

[0472] 实例19

[0473] XPA.15.247.2.018 IgG的药代动力学

[0474] 在XPA.15.247.2.018 IgG重复给药研究期间收集的血清样品还用来分析血清药物浓度以理解XPA.15.247.2.018 IgG的药代动力学。结果展示于表11中。在静脉内给药XPA.15.247.2.018 IgG后,在第一取样时间点,剂量后5分钟处观测到最大浓度(对于10mg/kg组是336.7 $\mu$ g/ml,并且对于3mg/kg组是126 $\mu$ g/ml)。其后血清浓度下降,对于10mg/kg组具有3.8天并且对于3mg/kg组具有1.2天的平均半衰期。

[0475] 表11



[0476]

	n	C <sub>最大</sub> (ug/ml)	AUC (ug*小时/ml)	T <sub>最大</sub> (小时)	t1/2 (小时)	t1/2 (天)
--	---	-------------------------	----------------	----------------------	-----------	----------

[0477]

<b>10 mg/kg</b>	<b>3</b>	<b>336.7</b>	<b>13457.2</b>	<b>10</b>	<b>91</b>	<b>3.8</b>
<b>3 mg/kg</b>	<b>3</b>	<b>126</b>	<b>2862.2</b>	<b>10</b>	<b>29</b>	<b>1.2</b>

[0478] 实例20

[0479] 克隆XPA247.2.018重链可变区的亲和力成熟

[0480] 对XPA15.247.2.018重链可变区进行亲和力成熟以提高其对hINSR的亲和力和效能。使用生物素标记的h-INSR淘选由重链的定向亲和力增强(targeted affinity enhancement;TAE)产生的序列变异体库。VH CDR1、CDR2以及CDR3中的所有残基突变。每个残基经NHT、VAA以及BGG替换。这些简并引子产生除半胱氨酸和甲硫氨酸以外的18种突变(参见美国专利第9,102,711号)。

[0481] 所期望突变区保持在引子中间,并且两侧的校正序列的约20个碱基侧接突变。进行所有四个片段的重叠PCR以便产生H1+H2+H3CDR组合库。用AscI/NotI限制酶消化全长片段并且接合到pXHMV31噬菌粒载体中,并转移到含有伴随蛋白cytFKPA的TG1细胞中。

[0482] 使用HC TAE库进行三轮可溶淘选。对于第一轮噬菌体淘选,在室温下在1ml的5%脱脂奶粉(Marvel,普雷米尔食品(Premier Foods),英国)于PBS缓冲液中在轻微旋转下阻断 $1.3 \times 10^{10}$ cfu的噬菌体粒子1小时。抵着经抗生蛋白链菌素涂布的磁性DYNABEADS® M-280(英杰戴诺有限公司(Invitrogen Dynal AS),挪威奥斯陆(Oslo,Norway)),用5%牛奶于PBS中阻断来对所阻断噬菌体进行两次取消选择持续45分钟。在取消选择的戴诺珠粒上捕获生物素标记的受体,以去除非生物素标记的受体。减少每一后续淘选回合的生物素标记的h-INSR的量,以便增加严格度。

[0483] 通过在用于洗涤珠粒和洗脱噬菌体的KINGFISHER96®系统(赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific),马萨诸塞州沃尔瑟姆(Waltham,MA))中在室温下以20RPM轻微旋转将取消选择的噬菌体与由生物素标记的h-INSR结合的珠粒一起培育一小时来进行选择。用PBS-0.05%Tween,随后PBS洗涤结合受体的噬菌体。增加每一后续淘选回合中洗涤的持续时间,以便增加选择的严格度。另外,增加用100×低温受体隔夜洗涤。

[0484] 结合h-INSR的噬菌体通过在室温下用100mM三乙胺(TEA)培育30分钟,并且随后用1M Tris-HCl(pH 7.4)中和来洗脱。当OD<sub>600</sub>等于0.5时,将从每一淘选回合洗脱的噬菌体用来感染表达cyt-FkpA伴随蛋白变异体的TG1细菌细胞(Levy等人2013免疫医学杂志(J.Immun.Meth.)394(1-2):10-21)。TG1细胞在补充有34μg/ml氯霉素(chloramphenicol)的2YT培养基中生长。在37℃下进行感染1小时。将细胞离心,并且将细胞团再悬浮于补充有100μg/ml卡本西林(carbenicillin)和2%(w/v)葡萄糖的2YT生长培养基中。将再悬浮的细胞接种于含有100μg/ml卡本西林、34μg/ml氯霉素以及2%葡萄糖的2YT琼脂板上,并且在30℃下培育隔夜。

[0485] 用M13K07辅助噬菌体(新英格兰生物实验室(New England Biolabs))以20的感染复数(multiplicity of infection;MOI)修复噬菌体。第一和第二轮选择输出克隆物生长成OD<sub>600</sub>约0.5。在37℃下用辅助噬菌体感染细胞1小时,同时以100RPM振荡。在感染后,将细

胞离心并且将细胞团再悬浮于补充有100 $\mu$ g/ml卡本西林、50 $\mu$ g/ml卡那霉素(kanamycin)以及0.2%阿拉伯糖的2YT培养基中,以便允许表达伴随蛋白cytFkpA和允许在25 $^{\circ}$ C下生长隔夜。使细菌培养物在25 $^{\circ}$ C下隔夜生长后,在4 $^{\circ}$ C下离心后捕获噬菌体,并且随后经PEG沉淀,以用作用于下一淘选回合的输入物。

[0486] 为了估计由噬菌体选择产生的增浓,滴定输入和输出噬菌体的量并且接种于补充有适当抗生素的2YT琼脂板上。

[0487] 周质提取物(Periplasmic Extract;PPE)制备:从第3轮输出物挑选克隆物并且在补充有34 $\mu$ g/ml氯霉素、100 $\mu$ g/ml卡本西林以及0.1% (w/v) 葡萄糖的2YT生长培养基中生长。允许克隆物生长2-3小时约OD600-0.5,并且随后添加0.2%阿拉伯糖,并且培养物在30 $^{\circ}$ C下生长。30分钟后,添加异丙基 $\beta$ -D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG)达1mM的最终浓度,并且在25 $^{\circ}$ C下培育隔夜。集结细胞并且以1:4稀释再悬浮于75 $\mu$ l冰冷PPB蔗糖缓冲液(天惠华)和一片无EDTA的蛋白酶抑制剂混合物(罗氏)中。在4 $^{\circ}$ C下培育1小时后,将样品离心30分钟并且收集含有周质提取物的上清液。随后使用PPE通过SPR和FACS筛检h-INSR粘合剂。

[0488] Fab周质提取物的亲和力排名:为了鉴别对胰岛素受体具有增强的结合亲和力的Fab片段变异体,使用直接结合表面等离子共振(SPR)方法。

[0489] 在25 $^{\circ}$ C下在Biacore 4000(通用电气医疗集团)上进行SPR分析。SPR在无标记环境下测量实时的生物分子相互作用。将重组型人类胰岛素受体(B型)ECD(安迪生物公司,明尼苏达州明尼阿波利斯)用于SPR分析。为制备SPR检测表面,使用标准胺偶合化学方法(所用试剂来自胺偶合试剂盒(Amine Coupling kit)-通用电气医疗集团)通过经修改的方案将INSR-ECD共价固定于系列S CM5传感器芯片(通用电气医疗集团)上,所述经修改方案包括在下文详述的再活化步骤。通过以10 $\mu$ L/分钟的流动速率10分钟注射新制备的0.1M N-羟基丁二酰亚胺(NHS)和0.4M 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)的1:1溶液活化芯片表面。在活化后,以每分钟10 $\mu$ L的流动速率持续7分钟注射pH 4.5的10mM乙酸钠中的10 $\mu$ g/mL的INSR-ECD,并且达成约4,000RU的经固定蛋白质。随后通过进一步5分钟注射新混合的EDC/NHS再活化传感器表面。此用于进一步使经固定的蛋白质复合物稳定。随后用pH 8.5的1M乙醇胺盐酸盐-NaOH对表面阻断7分钟。用于固定的操作缓冲液是由10mM HEPES、150mM氯化钠、3mM EDTA、0.05%聚山梨醇酯20(天惠华,加利福尼亚州霍利斯特(Hollister CA))组成的1 $\times$ HBS-EP+操作缓冲液。

[0490] 含有所关注的Fab的周质提取物用含有5mg/mL BSA的HBS-EP+1:1稀释,通过0.2 $\mu$ M Millex GV过滤板(密理博(Millipore))过滤并且以30 $\mu$ L/分钟注射240秒,并且300秒解离。在每次PPE注射后使用两次50秒注射3M MgCl<sub>2</sub>进行再生。所用操作缓冲液是具有2.5mg/mL BSA(西格玛阿尔德里奇,密苏里州圣路易斯)的HBS-EP+。使用BIACORE 4000软件中的稳定性早期报告点评估PPE结合量并且计算解离速率常数(k<sub>d</sub>)。

[0491] 鉴别并且选择具有改进的解离速率或暗示改进的结合速率的高结合反应的克隆物用于进一步分析。用于选择的k<sub>d</sub>截止值在5 $\times 10^{-4}$ 至2.3 $\times 10^{-4}$ (1/s)范围内,取决于每个分析中改进的克隆物的分布。

[0492] 经纯化Fab片段的亲和力测量:为测量各种经纯化Fab片段的结合速率(k<sub>a</sub>)和解离速率(k<sub>d</sub>)常数,进行SPR方法。

[0493] 在25 $^{\circ}$ C下在Biacore 2000(通用电气医疗集团)上进行SPR分析。为制备SPR检测表

面,将INSR-ECD共价固定于CM5传感器芯片上,并且如上文所述活化芯片。在活化后,以每分钟10 $\mu$ L的流动速率持续2分钟注射pH 4.5的10mM乙酸钠中的10 $\mu$ g/mL的INSR-ECD,并且达成约1,400RU的经固定蛋白质。随后如上文所述再活化和阻断传感器表面。用于固定的操作缓冲液是1 $\times$ HBS-EP+,通过以40 $\mu$ L/分钟持续240秒注射Fab,随后300秒解离来进行动力学分析。以200nM和40nM的至少两种浓度注射Fab。在每次PPE注射后使用一次60秒注射3M MgCl<sub>2</sub>,随后一次7.5秒注射10mM甘氨酸pH 2.0来进行再生。缓冲液空白注射用来双重参照这些数据(扣除对照点和空白注射)。随后使用SCRUBBER 2(生物软件(BioLogic Software),澳大利亚坎贝尔(Campbell Australia))评估软件用1:1结合模型对这些数据进行曲线拟合,产生用于结合速率( $k_a$ )和解离速率( $k_d$ )的动力学参数。由动力学参数比率( $k_d/k_a$ )计算稳态结合常数( $K_D$ )值。

[0494] 基于解离速率分析选择十六种克隆物。与来自PPE筛检的XPA.247.2.018亲本相比,在某些克隆物中观测到2-4倍改进。基于Ru结合选择五种另外克隆物。将二十一种克隆物重新格式化成未标记Fab。使亲和力成熟重链与LC 18配对用于转染至Expi 293细胞中。

[0495] 亲和力成熟重链克隆物的序列罗列于图19中。图19还展示不同亲和力成熟克隆物的亲和力和效能。所鉴别的亲和力突变体相较于亲本XPA.15.247.2.018 Fab在结合速率和解离速率两方面均有改进。

[0496] 突变热点的检测:由另外筛检显现重链CDR1和CDR3中的突变热点中的趋势。HCDR1中的氨基酸残基苏氨酸28大多通常突变成K和R残基,并且在大约77%的所选择克隆物中突变。这些突变和频率表明其对改进的 $k_{解离}$ 具有正面影响。

[0497] 制备较小库以并入仅这两个残基,并且包括T作为亲本残基(T、K以及R)。对于HCDR3,在所选择克隆物中,苯丙氨酸103、苯丙氨酸105以及酪氨酸107氨基酸残基分别突变10%、28%以及52%。这三个FFY残基能够突变成所有20种氨基酸,即NNS。酪氨酸107突变成R/E表明R/E对改进的 $k_{解离}$ 具有正面影响。图20中展示的突变频率表明Q和K也可以促成改进。苯丙氨酸105突变成酪氨酸与改进的 $k_{结合}$ 具有较强关联,这是基于图19和20中5种具有改进的 $k_{结合}$ 的克隆物中4种具有此突变(068、072、075、079),并且缺乏此突变的克隆物(084)具有弱的 $k_{结合}$ 改进。在此位置还观测到色氨酸,表明此残基还改进亲和力。位置103未大量突变,但基于所观测的突变频率,107、105以及103很可能是与靶靶相互作用的位置。

[0498] 由于突变优选在这些热点处,设计新的库以合并所有这些突变。这些突变中两种或更多种的组合将可能展示协同效应。

[0499] 重要地,保留HCDR2作为TAE库,其中每个CDR2最多1个突变。突变频率表展示整个CDR2中的显著突变,但对结合所起的作用不明确。然而,图19中的突变频率展示在所选择的较高亲和力抗体库内的特定位置内哪种氨基酸耐受。

[0500] 所属领域的技术人员预期会出现如阐述于上文说明性实例中的本发明中的大量修改和变化。因此仅如所附权利要求书中出现的此类限制应属于本发明。

## 序列表

<110> 佐马美国有限公司 (XOMA (US) LLC)  
Rubin等人

<120> 针对胰岛素受体的抗体片段和其治疗低血糖的用途

<130> 27129/49925

<150> US 62/202,143

<151> 2015-08-06

<150> US 62/280,675

<151> 2016-01-19

<160> 112

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> 智人(Homo Sapiens)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.15.247 VH

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

[0001] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> 智人(Homo Sapiens)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.15.247. 2.018 VH

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

```

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

```

```

<210> 3
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人(Homo Sapiens)

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> XPA.15.247 VL

```

```

<400> 3

```

[0002]

```

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

```

```

<210> 4
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人(Homo Sapiens)

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> XPA.15.247.2.018 VL

```

<400> 4  
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Gly  
 20 25 30  
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Met Gln Gly  
 85 90 95  
 Thr Tyr Trp Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser  
 115

<210> 5  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

[0003]

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> XPA.15.247 VH CDR1

<400> 5

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
 1 5

<210> 6  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> XPA.15.247 VH CDR2

<400> 6

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys  
 1 5

<210> 7  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> XPA.15.247 VH CDR3

<400> 7

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Met Asp Val

1	5	10
<210> 8		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> XPA.15.247. 2.018 VH CDR1		
<400> 8		
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala		
1	5	
<210> 9		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> XPA.15.247. 2.018 VH CDR2		
<400> 9		
Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Lys		
1	5	
<210> 10		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
[0004]		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> XPA.15.247. 2.018 VH CDR3		
<400> 10		
Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Tyr		
1	5	10
<210> 11		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> XPA.15.247 VL CDR1		
<400> 11		
Leu Ser Leu Val Tyr Gly Asp Glu Asn Thr Tyr		
1	5	10
<210> 12		
<211> 3		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> XPA.15.247 VL CDR2		
<400> 12		
Lys Val Ser		

```

1

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人(Homo Sapiens)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> XPA.15.247.VL.CDR3

<400> 13
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1          5          10

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人(Homo Sapiens)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> XPA.15.247.2.018.VL.CDR1

<400> 14
Gln Ser Leu Val Tyr Gly Asp Glu Asn Thr Tyr
1          5          10

<210> 15
<211> 3
<212> PRT
<213> 智人(Homo Sapiens)

[0005]
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> XPA.15.247.2.018.VL.CDR2

<400> 15
Lys Val Ser
1

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人(Homo Sapiens)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> XPA.15.247.2.018.VL.CDR3

<400> 16
Met Gln Gly Thr Tyr Trp Pro
1          5

<210> 17
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人(Homo Sapiens)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> XPA.15.247.014.VL

<400> 17
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

```



1	5	10	15
Gln Pro Ala	Ser Ile Ser Cys Arg	Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Gly	
	20	25	30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser			
	35	40	45
Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Lys Arg Asp Ser Gly Val Pro			
	50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly			
	85	90	95
Thr Tyr Trp Pro Met Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	110
Arg			
<210> 18			
<211> 113			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo Sapiens)			
<220>			
<221> MISC_FEATURE			
<223> XPA.15.247.011 VL			
<400> 18			
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly			
1	5	10	15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser His Ser Leu Val Tyr Gly			
	20	25	30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Ser			
	35	40	45
Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro			
	50	55	60
Asp Arg Phe Ala Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Phe Gly Val Phe Tyr Cys Met Gln Gly			
	85	90	95
Thr His Trp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	110
Arg			
<210> 19			
<211> 113			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo Sapiens)			

[0006]

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> XPA.15.247.014 VL CDR1  
  
 <400> 19  
  
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15  
  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Glu Ser Leu Val Tyr Gly  
 20 25 30  
  
 Asp Glu Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
  
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
  
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
 85 90 95  
  
 Thr His Trp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

Arg

[0007]

<210> 20  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> XPA.15.247.014 VL CDR1

&lt;400&gt; 20

Gln Ser Leu Val Tyr Gly Asp Gly Asn Thr Tyr  
 1 5 10

<210> 21  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> XPA.15.247.014 VL CDR2

&lt;400&gt; 21

Lys Val Ser  
 1

<210> 22  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> XPA.15.247.014 VL CDR3

<400> 22  
 Met Gln Gly Thr Tyr Trp Pro Met Thr  
 1 5

<210> 23  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> XPA.15.247.011 VL CDR1

<400> 23  
 His Ser Leu Val Tyr Gly Asp Gly Asn Thr Tyr  
 1 5 10

<210> 24  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> XPA.15.247.011 VL CDR2

<400> 24  
 Lys Val Ser  
 1

[0008] <210> 25  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> XPA.15.247.011 VL CDR3

<400> 25  
 Met Gln Gly Thr His Trp Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 26  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> XPA.15.247.019 VL CDR1

<400> 26  
 Glu Ser Leu Val Tyr Gly Asp Glu Asn Thr Tyr  
 1 5 10

<210> 27  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> XPA.15.247.019 VL CDR2

<400> 27

Lys Val Ser  
1

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo Sapiens)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.15.247.019 VL CDR3

<400> 28

Met Gln Gly Thr His Trp Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 29

<211> 118

<212> PRT

<213> 智人(Homo Sapiens)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> RHF.15.05896.004 VH

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

[0009]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 30

<211> 118

<212> PRT

<213> 智人(Homo Sapiens)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> RHF.15.05896.006 VH

<400> 30

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1	5	10	15
Ser Leu Arg	Leu Ser Cys Ala Ala	Ser Gly Phe Lys Phe	Ser Ser Tyr
	20	25	30
Ala Met His	Trp Val Arg Gln Ala	Pro Gly Lys Gly	Leu Glu Trp Val
	35	40	45
Ala Val Ile	Ser Tyr Ser Gly Asp Asn Lys Tyr	Tyr Ala Asp Ser Val	
	50	55	60
Lys Gly Arg	Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn	Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
	65	70	80
Leu Gln Met	Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85	90	95
Ala Arg His	Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Arg Trp	Gly Gln Gly Thr	
	100	105	110
Thr Val Thr	Val Ser Ser		
	115		
<210>	31		
<211>	118		
<212>	PRT		
<213>	智人(Homo Sapiens)		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<223>	RHF. 15. 05896. 012 VH		
<400>	31		
Glu Val Gln	Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val	Gln Pro Gly Arg	
	1	5	10
15			
Ser Leu Arg	Leu Ser Cys Ala Ala	Ser Gly Phe Thr Phe	Ser Ser Trp
	20	25	30
Ala Met His	Trp Val Arg Gln Ala	Pro Gly Lys Gly	Leu Glu Trp Val
	35	40	45
Ala Val Ile	Ser Tyr Ser Gly Glu Asn Lys Tyr	Tyr Ala Asp Ser Val	
	50	55	60
Lys Gly Arg	Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn	Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
	65	70	80
Leu Gln Met	Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85	90	95
Ala Arg His	Glu Trp Gly Phe Pro Phe Asp Tyr Trp	Gly Gln Gly Thr	
	100	105	110
Thr Val Thr	Val Ser Ser		
	115		
<210>	32		
<211>	118		
<212>	PRT		
<213>	智人(Homo Sapiens)		

[0010]

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF.15.05896.015 VH  
 <400> 32  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Val Ile Ser Tyr Ser Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

[0011]

<210> 33  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF.15.05896.020 VH  
 <400> 33  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Val Ile Ser Trp Ser Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 34  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 022 VH

&lt;400&gt; 34

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Trp  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

[0012]

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 35  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 028 VH

&lt;400&gt; 35

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

	85	90	95
Ala Arg His	Glu Trp Gly Leu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
	100	105	110
Thr Val Thr Val Ser Ser			
	115		
<210>	36		
<211>	118		
<212>	PRT		
<213>	智人(Homo Sapiens)		
<220>			
<221>	MISC FEATURE		
<223>	RHF. I5. 05896. 032 VH		
<400>	36		
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr			
	20	25	30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ala Val Ile Ser Tyr Ser Gly Glu Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
	50	55	60
[0013] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
Thr Val Thr Val Ser Ser			
	115		
<210>	37		
<211>	118		
<212>	PRT		
<213>	智人(Homo Sapiens)		
<220>			
<221>	MISC FEATURE		
<223>	RHF. I5. 05896. 036 VH		
<400>	37		
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr			
	20	25	30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ala Val Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			



```

        50              55              60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
100             105             110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 38
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人(Homo Sapiens)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> RHF. 15. 05896. 040 VH

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1              5              10              15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr
20             25             30

[0014] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35              40              45

Ala Val Ile Ser Asn Ser Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50              55              60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Trp Trp Gly Gln Gly Thr
100             105             110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 39
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人(Homo Sapiens)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> RHF. 15. 05896. 044 VH

<400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1              5              10              15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr

```

	20	25	30
	Ala Met His Trp Val Arg Gln	Ala Pro Gly Lys Gly	Leu Glu Trp Val
	35	40	45
	Ala Val Ile Ser Asn Ser Gly	Ser Asn Lys Tyr Tyr	Ala Asp Ser Val
	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser	Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr	Leu Tyr
	65	70	80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg	Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr	Tyr Cys
	85	90	95
	Ala Arg His Glu Trp Gly Phe	Gly Phe Asp Lys Trp Gly	Gln Gly Thr
	100	105	110
	Thr Val Thr Val Ser Ser		
	115		
	<210> 40		
	<211> 118		
	<212> PRT		
	<213> 智人(Homo Sapiens)		
	<220>		
	<221> MISC_FEATURE		
	<223> RHF. 15. 05896. 048 VH		
	<400> 40		
[0015]	Glu Val Gln Leu Val Glu Thr	Gly Gly Gly Val Val Gln Pro	Gly Arg
	1	5	10
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala	Ala Ser Gly Phe Thr Phe	Arg Ser Tyr
	20	25	30
	Ala Met His Trp Val Arg Gln	Ala Pro Gly Lys Gly	Leu Glu Trp Val
	35	40	45
	Ala Val Ile Ser Tyr Ser Gly	Ser Val Lys Tyr Tyr	Ala Asp Ser Val
	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser	Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr	Leu Tyr
	65	70	80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg	Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr	Tyr Cys
	85	90	95
	Ala Arg His Glu Trp Gly Phe	Gly Phe Asp Glu Trp Gly	Gln Gly Thr
	100	105	110
	Thr Val Thr Val Ser Ser		
	115		
	<210> 41		
	<211> 118		
	<212> PRT		
	<213> 智人(Homo Sapiens)		
	<220>		
	<221> MISC_FEATURE		
	<223> RHF. 15. 05896. 052 VH		

<400> 41  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Val Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 42  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

[0016]

<220>  
 <221> MISC FEATURE  
 <223> RHF. 15.05896.056 VH

<400> 42  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Val Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 43

<211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 059 VH

<400> 43

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Val Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Arg Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

[0017] Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 44  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 064 VH

<400> 44

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Ser Gly Ser His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

	100	105	110
	Thr Val Thr Val Ser Ser		
	115		
	<210> 45		
	<211> 118		
	<212> PRT		
	<213> 智人(Homo Sapiens)		
	<220>		
	<221> MISC_FEATURE		
	<223> RHF.15.05896.068 VH		
	<400> 45		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg		
	1 5 10 15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr		
	20 25 30		
	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35 40 45		
	Ala Val Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
	50 55 60		
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
	65 70 75 80		
[0018]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85 90 95		
	Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
	100 105 110		
	Thr Val Thr Val Ser Ser		
	115		
	<210> 46		
	<211> 118		
	<212> PRT		
	<213> 智人(Homo Sapiens)		
	<220>		
	<221> MISC_FEATURE		
	<223> RHF.15.05896.072 VH		
	<400> 46		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg		
	1 5 10 15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Phe Ser Ser Tyr		
	20 25 30		
	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35 40 45		
	Ala Val Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
	50 55 60		
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85	90	95
Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Tyr	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
	100	105	110
Thr Val Thr Val Ser Ser			
	115		
<210> 47			
<211> 118			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo Sapiens)			
<220>			
<221> MISC_FEATURE			
<223> RHF. 15. 05896. 075 VH			
<400> 47			
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr			
	20	25	30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
[0019] Ala Val Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
Thr Val Thr Val Ser Ser			
	115		
<210> 48			
<211> 118			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo Sapiens)			
<220>			
<221> MISC_FEATURE			
<223> RHF. 15. 05896. 079 VH			
<400> 48			
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr			
	20	25	30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			

```

                35          40          45
Ala Val Ile Ser Trp Ser Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
    65          70          75          80

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

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
    100          105          110

Thr Val Thr Val Ser Ser
    115

<210> 49
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人(Homo Sapiens)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> RHF. 15. 05896. 084 VH

<400> 49
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15

[0020] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
    35          40          45

Ala Val Ile Ser Trp Ser Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
    65          70          75          80

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

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Lys Trp Gly Gln Gly Thr
    100          105          110

Thr Val Thr Val Ser Ser
    115

<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人(Homo Sapiens)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> RHF. 15. 05896. 004 H-CDR1

<400> 50
Gly Phe Arg Phe Ser Ser Tyr Ala

```

1 5

<210> 51  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF.15.05896.004 H-CDR2

<400> 51

Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Lys  
 1 5

<210> 52  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF.15.05896.004 H-CDR3

<400> 52

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Glu  
 1 5 10

<210> 53  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF.15.05896.006 H-CDR1

<400> 53

Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr Ala  
 1 5

<210> 54  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF.15.05896.006 H-CDR2

<400> 54

Ile Ser Tyr Ser Gly Asp Asn Lys  
 1 5

<210> 55  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF.15.05896.006 H-CDR3

<400> 55

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Arg

[0021]



1	5	10
<210> 56		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF. 15. 05896. 012 H-CDR1		
<400> 56		
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Trp Ala		
1	5	
<210> 57		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF. 15. 05896. 012 H-CDR2		
<400> 57		
Ile Ser Tyr Ser Gly Glu Asn Lys		
1	5	
<210> 58		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
[0022]		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF. 15. 05896. 012 H-CDR3		
<400> 58		
Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Pro Phe Asp Tyr		
1	5	10
<210> 59		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF. 15. 05896. 015 H-CDR1		
<400> 59		
Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr Ala		
1	5	
<210> 60		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF. 15. 05896. 015 H-CDR2		
<400> 60		
Ile Ser Tyr Ser Gly Arg Asn Lys		

1 5

<210> 61  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 015 H-CDR3

<400> 61

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Gln Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 62  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 020 H-CDR1

<400> 62

Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr Ala  
 1 5

<210> 63  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

[0023]

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 020 H-CDR2

<400> 63

Ile Ser Trp Ser Gly Ser Asn Lys  
 1 5

<210> 64  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 020 H-CDR3

<400> 64

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Glu  
 1 5 10

<210> 65  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 022 H-CDR1

<400> 65

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Trp Ala

1 5

<210> 66  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 022 H-CDR2

<400> 66

Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Thr  
 1 5

<210> 67  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 022 H-CDR3

<400> 67

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Pro Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 68  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

[0024]

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 028 H-CDR1

<400> 68

Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr Ala  
 1 5

<210> 69  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 028 H-CDR2

<400> 69

Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asn Lys  
 1 5

<210> 70  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 028 H-CDR3

<400> 70

Ala Arg His Glu Trp Gly Leu Gly Phe Asp Tyr

1	5	10
<210> 71		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF. 15. 05896. 032 H-CDR1		
<400> 71		
Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr Ala		
1	5	
<210> 72		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF. 15. 05896. 032 H-CDR2		
<400> 72		
Ile Ser Tyr Ser Gly Glu Asn Lys		
1	5	
<210> 73		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF. 15. 05896. 032 H-CDR3		
<400> 73		
Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Glu		
1	5	10
<210> 74		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF. 15. 05896. 036 H-CDR1		
<400> 74		
Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr Ala		
1	5	
<210> 75		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF. 15. 05896. 036 H-CDR2		
<400> 75		
Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Asn Lys		

[0025]

1 5

<210> 76  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF.15.05896.036 H-CDR3

<400> 76

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Leu  
 1 5 10

<210> 77  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF.15.05896.040 H-CDR1

<400> 77

Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr Ala  
 1 5

<210> 78  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

[0026]

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF.15.05896.040 H-CDR2

<400> 78

Ile Ser Asn Ser Gly Ser Asn Lys  
 1 5

<210> 79  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF.15.05896.040 H-CDR3

<400> 79

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Trp  
 1 5 10

<210> 80  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF.15.05896.044 H-CDR1

<400> 80

Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr Ala

```

1           5

<210> 81
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人(Homo Sapiens)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> RHF.15.05896.044 H-CDR2

<400> 81
Ile Ser Asn Ser Gly Ser Asn Lys
1           5

<210> 82
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人(Homo Sapiens)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> RHF.15.05896.044 H-CDR3

<400> 82
Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Lys
1           5           10

<210> 83
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人(Homo Sapiens)

[0027]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> RHF.15.05896.048 H-CDR1

<400> 83
Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Ala
1           5

<210> 84
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人(Homo Sapiens)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> RHF.15.05896.048 H-CDR2

<400> 84
Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Val Lys
1           5

<210> 85
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人(Homo Sapiens)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> RHF.15.05896.048 H-CDR3

<400> 85
Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Glu

```

1	5	10
<210> 86		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF. 15. 05896. 052 H-CDR1		
<400> 86		
Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr Ala		
1	5	
<210> 87		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF. 15. 05896. 052 H-CDR2		
<400> 87		
Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Asn Lys		
1	5	
<210> 88		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
[0028]		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF. 15. 05896. 052 H-CDR3		
<400> 88		
Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Glu		
1	5	10
<210> 89		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF. 15. 05896. 056 H-CDR1		
<400> 89		
Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr Ala		
1	5	
<210> 90		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF. 15. 05896. 056 H-CDR2		
<400> 90		
Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Lys		

1 5

<210> 91  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 056 H-CDR3

<400> 91

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Glu  
 1 5 10

<210> 92  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 059 H-CDR1

<400> 92

Gly Phe Arg Phe Ser Ser Tyr Ala  
 1 5

<210> 93  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

[0029]

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 059 H-CDR2

<400> 93

Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Val Lys  
 1 5

<210> 94  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 059 H-CDR3

<400> 94

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Arg  
 1 5 10

<210> 95  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 064 H-CDR1

<400> 95

Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr Ala



1 5

<210> 96  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 064 H-CDR2

<400> 96

Ile Ser Tyr Ser Gly Ser His Lys  
 1 5

<210> 97  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 064 H-CDR3

<400> 97

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Gln Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 98  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

[0030]

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 068 H-CDR1

<400> 98

Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr Ala  
 1 5

<210> 99  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 068 H-CDR2

<400> 99

Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Asn Lys  
 1 5

<210> 100  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 068 H-CDR3

<400> 100

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Tyr Asp Tyr

1	5	10
<210> 101		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF.15.05896.072 H-CDR1		
<400> 101		
Gly Phe Arg Phe Ser Ser Tyr Ala		
1	5	
<210> 102		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF.15.05896.072 H-CDR2		
<400> 102		
Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Asn Lys		
1	5	
<210> 103		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
[0031]		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF.15.05896.072 H-CDR3		
<400> 103		
Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Tyr Asp Tyr		
1	5	10
<210> 104		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF.15.05896.075 H-CDR1		
<400> 104		
Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr Ala		
1	5	
<210> 105		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo Sapiens)		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> RHF.15.05896.075 H-CDR2		
<400> 105		
Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Lys		

1 5

<210> 106  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 075 H-CDR3

<400> 106

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Tyr Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 107  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 079 H-CDR1

<400> 107

Gly Phe Lys Phe Ser Ser Tyr Ala  
 1 5

<210> 108  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

[0032]

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 079 H-CDR2

<400> 108

Ile Ser Trp Ser Gly Ser Asn Lys  
 1 5

<210> 109  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 079 H-CDR3

<400> 109

Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Tyr Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 110  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo Sapiens)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> RHF. 15. 05896. 084 H-CDR1

<400> 110

Gly Phe Arg Phe Ser Ser Tyr Ala

	1		5
	<210>	111	
	<211>	8	
	<212>	PRT	
	<213>	智人(Homo Sapiens)	
	<220>		
	<221>	MISC_FEATURE	
	<223>	RHF. 15. 05896. 084 H-CDR2	
	<400>	111	
[0033]	Ile Ser Trp Ser Gly Ser Asn Lys		
	1		5
	<210>	112	
	<211>	11	
	<212>	PRT	
	<213>	智人(Homo Sapiens)	
	<220>		
	<221>	MISC_FEATURE	
	<223>	RHF. 15. 05896. 084 H-CDR3	
	<400>	112	
	Ala Arg His Glu Trp Gly Phe Gly Phe Asp Lys		
	1		5 10

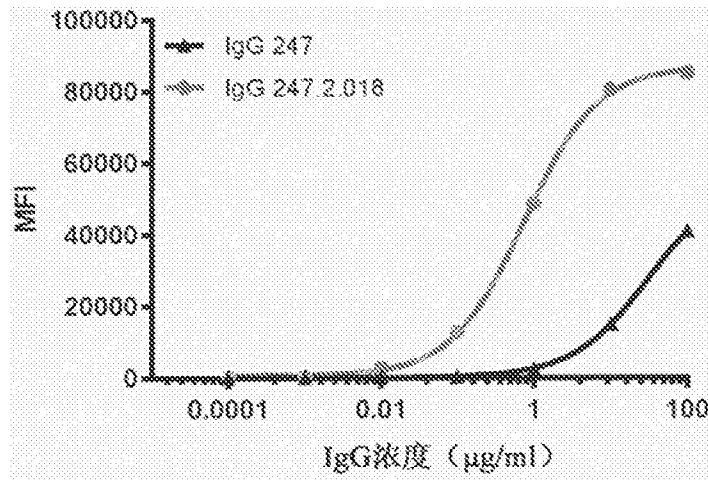


图1

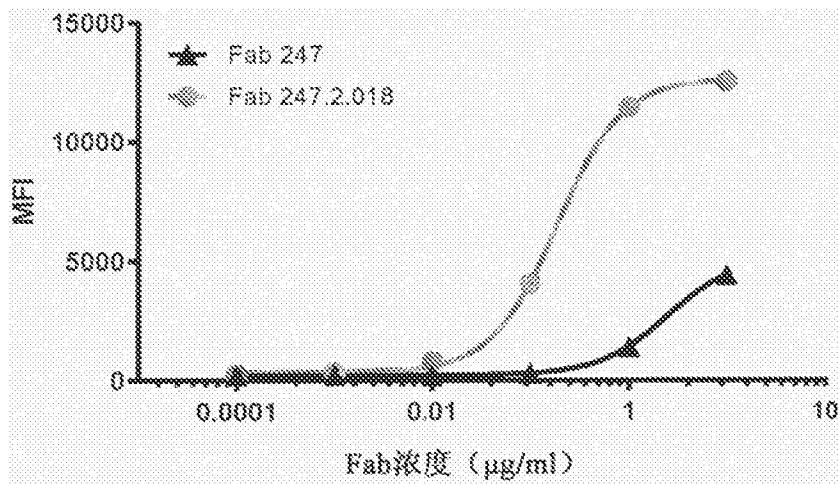


图2

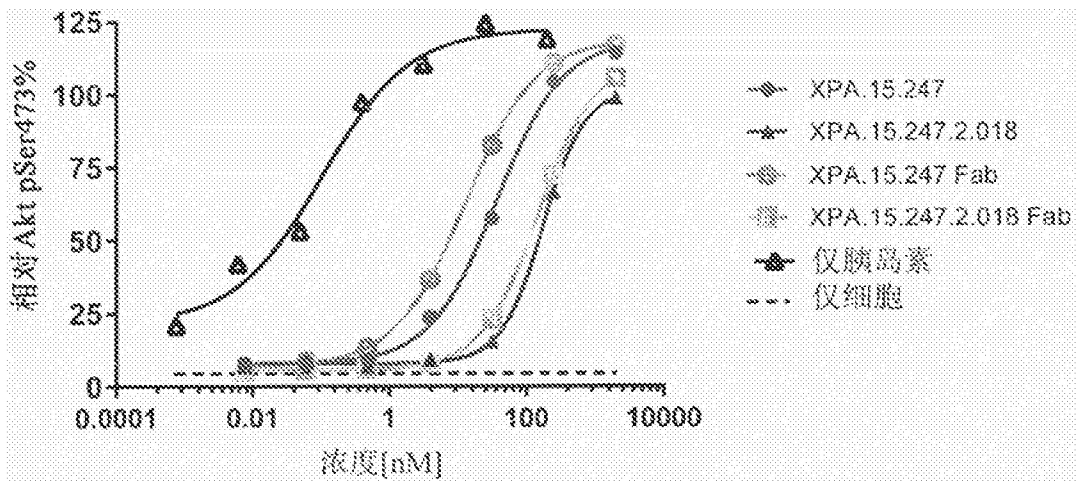


图3A

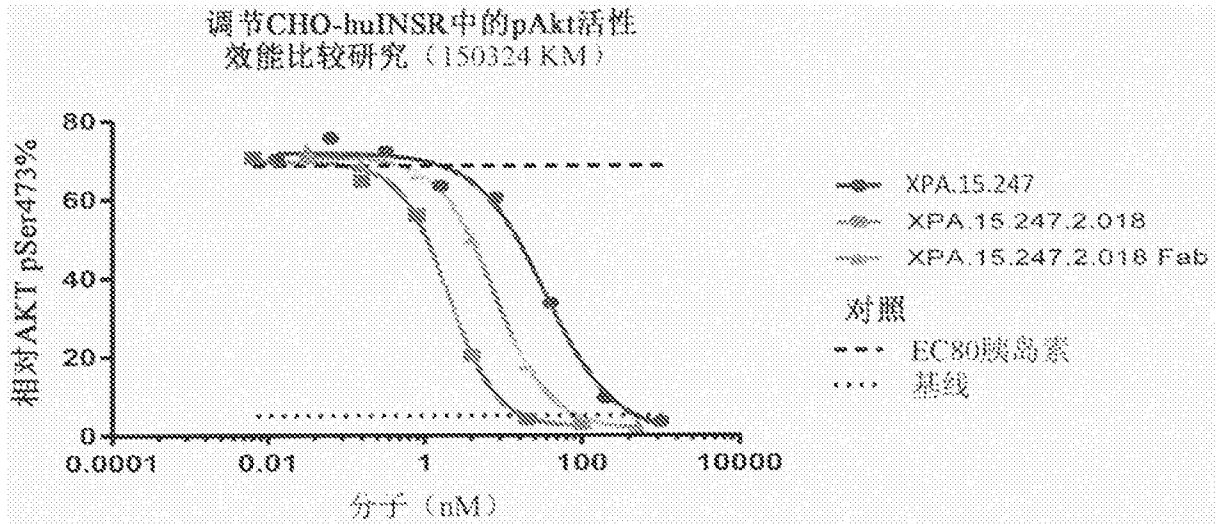


图3B

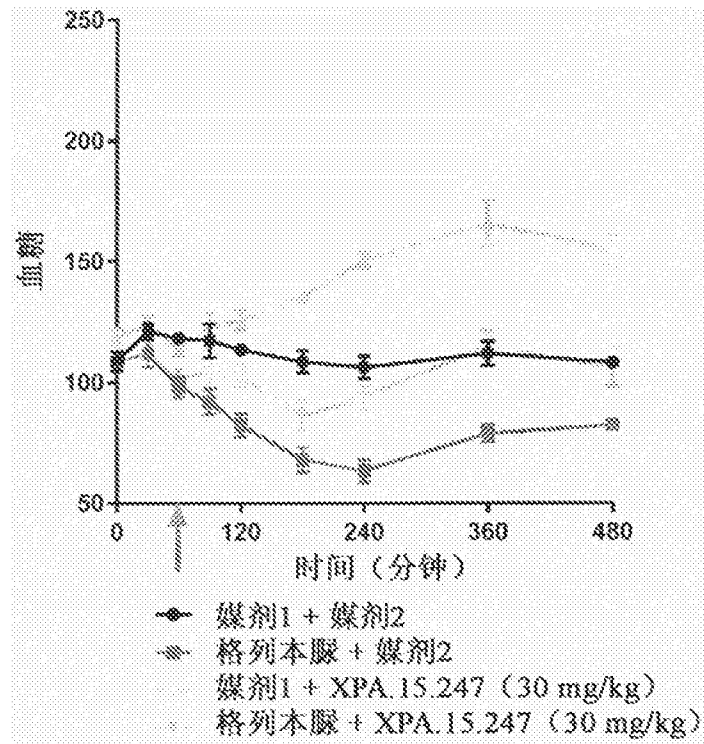


图4A

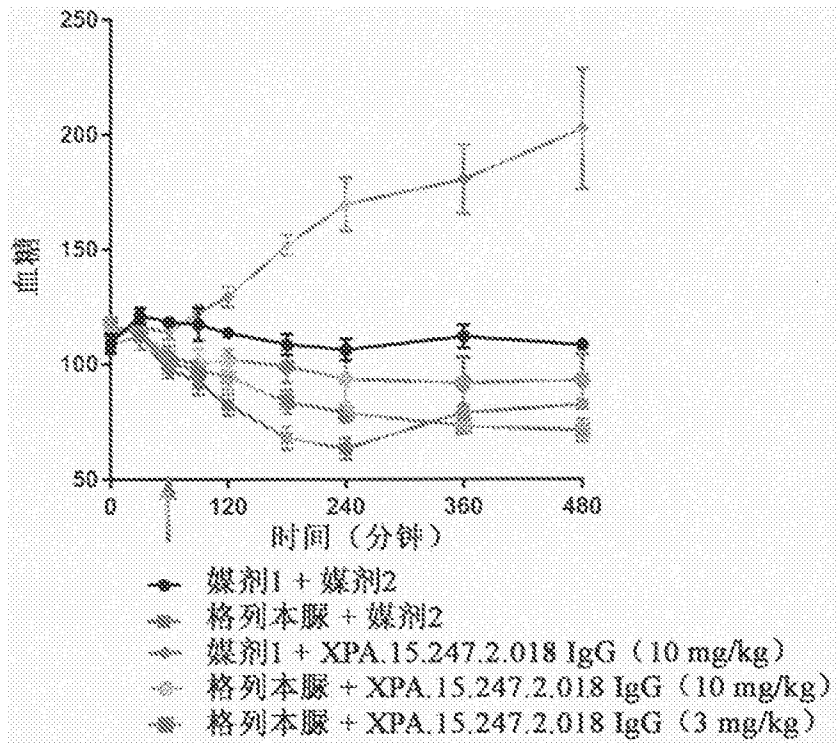


图4B

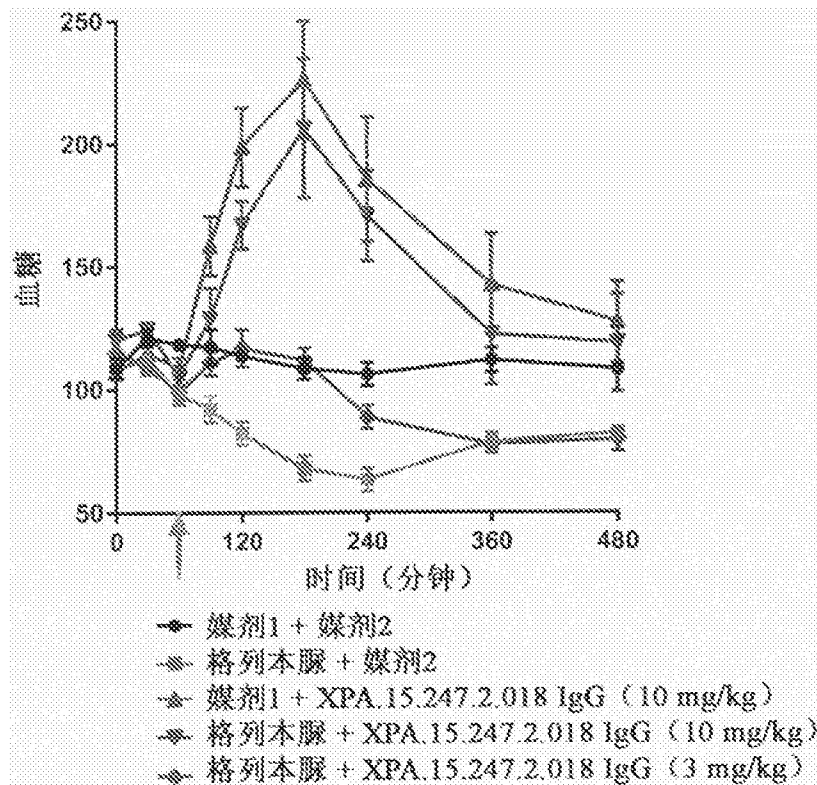


图4C

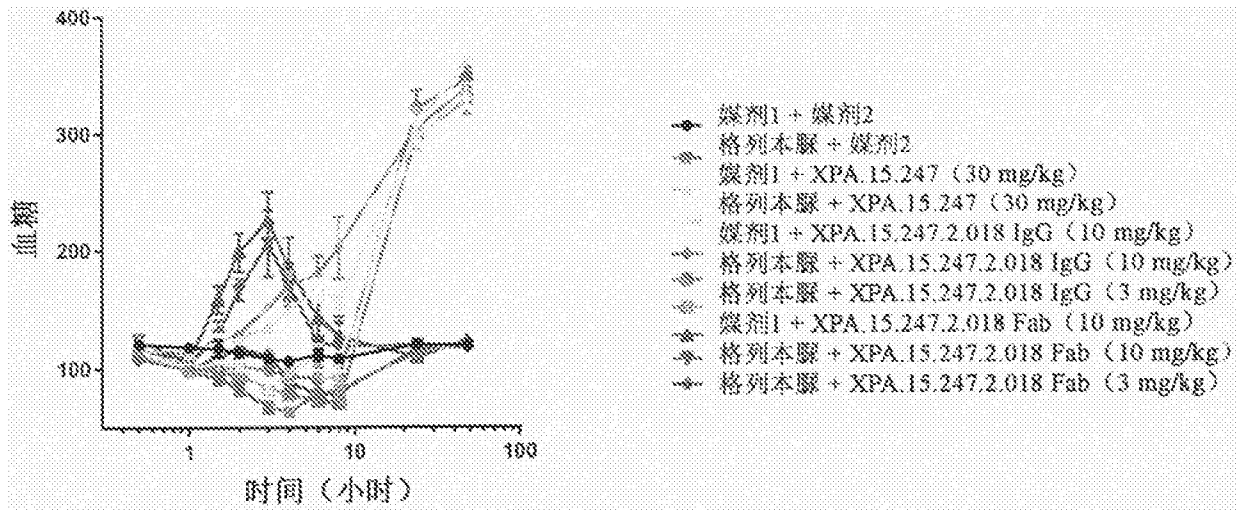


图4D

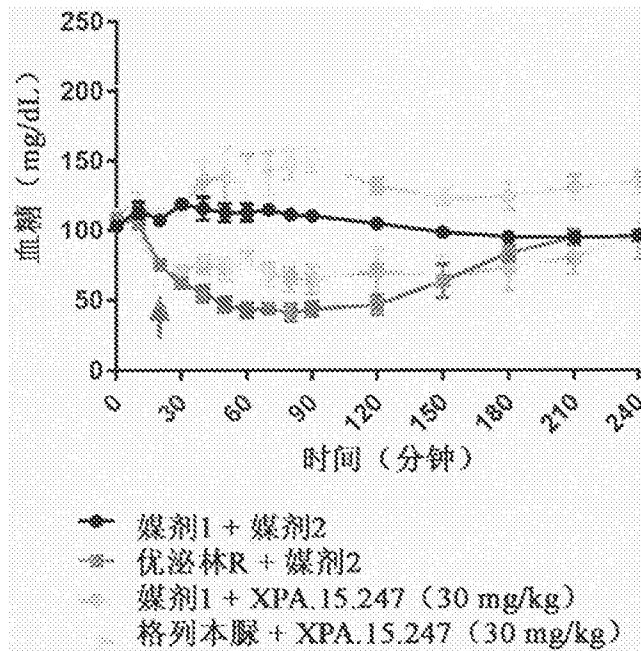


图5A



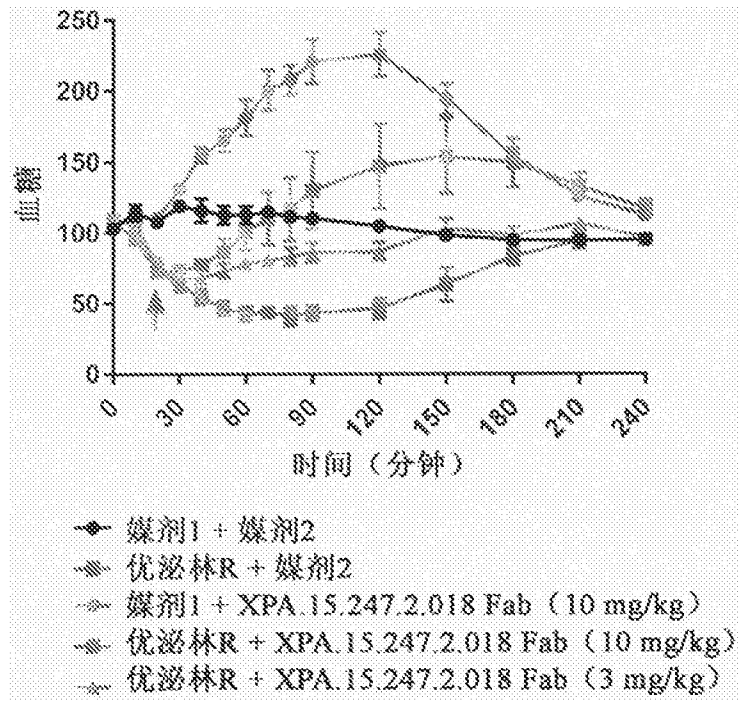


图5B

	序列	SEQ ID
XPA.15.247.VH	EVQLVETGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAP GKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHEWGFGMDVWGQGTTVTVSS	1
XPA.15.247.2.018.VH	EVQLVETGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAP GKGLEWVAVISYSGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHEWGFGFDYWGQGTTVTVSS	2
XPA.15.247.VL	DVVMTQSPSLSLPVTLGQPASISCRSSLSLVYGDENTYLNWFQ QRPGQSPRRLLYKVS DRDSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVE ADDVGVYYCMQGT HWPYTFGQGTKLEIKRTVAAPS	3
XPA.15.247.2.018.VL	DVVMTQSPSLSLPVTLGQPASISCRSSLSLVYGDGNTYLNWFQ QRPGQSPRRLLYKVS NRDSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYFCMQGT YWPGTFGGGGTKLEIKRTVAAPS	4
XPA.15.247.VH.CDR1	GFTFSSYA	5
XPA.15.247.VH.CDR2	ISYDGSNK	6
XPA.15.247.VH.CDR3	ARHEWGFGMDV	7
XPA.15.247.2.018.VH.CDR1	GFTFSSYA	8
XPA.15.247.2.018.VH.CDR2	ISYSGSNK	9
XPA.15.247.2.018.VH.CDR3	ARHEWGFGFDY	10
XPA.15.247.VL.CDR1	LSLVYGDENTY	11
XPA.15.247.VL.CDR2	KVS	12
XPA.15.247.VL.CDR3	YTFGQGTKLEIK	13
XPA.15.247.2.018.VL.CDR1	QSLVYGDENTY	14
XPA.15.247.2.018.VL.CDR2	KVS	15
XPA.15.247.2.018.VL.CDR3	MQGT YWP	16
XPA.15.247.014.VL	DVVMTQSPSLSLPVTLGQPASISCRSSLSLVYGDGNTYLNWFQ QRPGQSPRRLLYKYSKRDSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCMQGT YWPMTFGGGGTKLEIKR	17
XPA.15.247.011.VL	DVVMTQSPSLSLPVTLGQPASISCRSSHSLVYGDGNTYLNWFH QRPGQSPRRLLYKYSNRDSGV PDRFAGSGSGTDFTLKISRVEA DDFGVYFCMQGT HWPYTFGQGTKLEIKR	18
XPA.15.247.019.VL	DVVMTQSPSLSLPVTLGQPASISCRSSLSLVYGDENTYLNWFQ QRPGQSPRRLLYKYSNRDSGV PSRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCMQGT HWPYTFGQGTKLEIKR	19
XPA.15.247.014.VL.CDR1	QSLVYGDGNTY	20
XPA.15.247.014.VL.CDR2	KVS	21
XPA.15.247.014.VL.CDR3	MQGT YWPMT	22
XPA.15.247.011.VL	HSLVYGDGNTY	23

图6

CDR1		
XPA.15.247.011 VL	KVS	24
CDR2		
XPA.15.247.011 VL	MQGTHWPYT	25
CDR3		
XPA.15.247.019 VL	ESLVYGDENTY	26
CDR1		
XPA.15.247.019 VL	KVS	27
CDR2		
XPA.15.247.019 VL	MQGTHWPYT	28
CDR3		

图6(续)

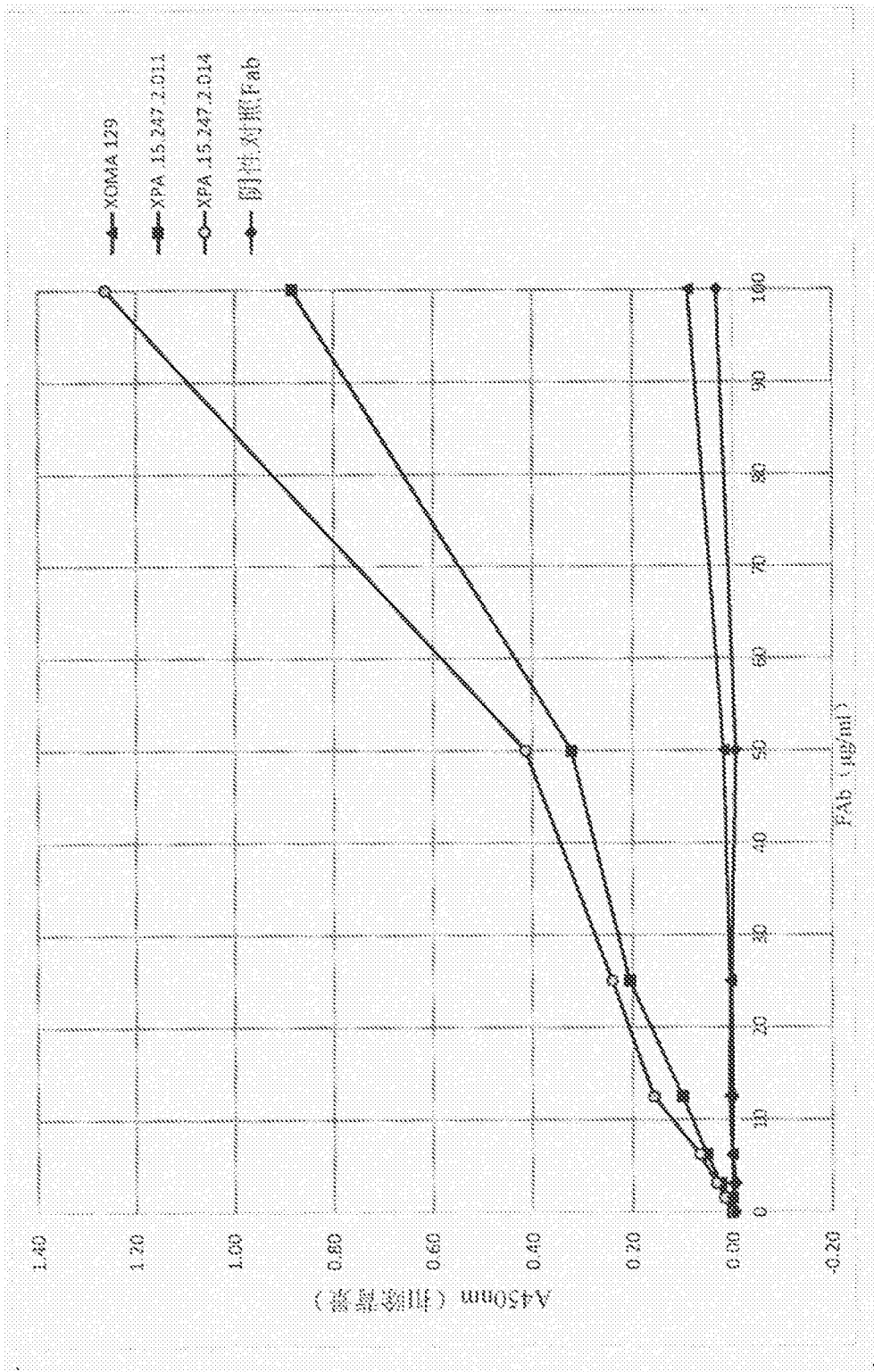


图7

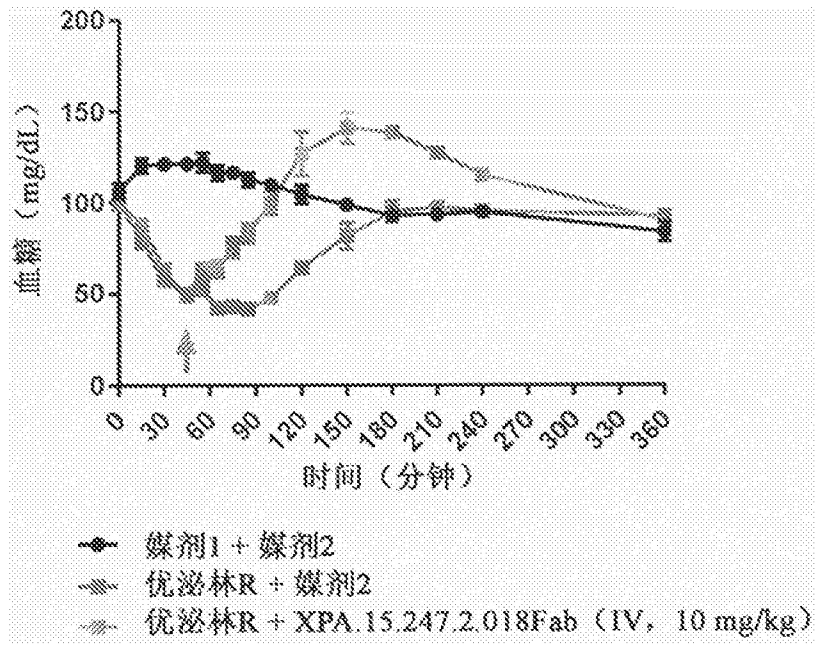


图8

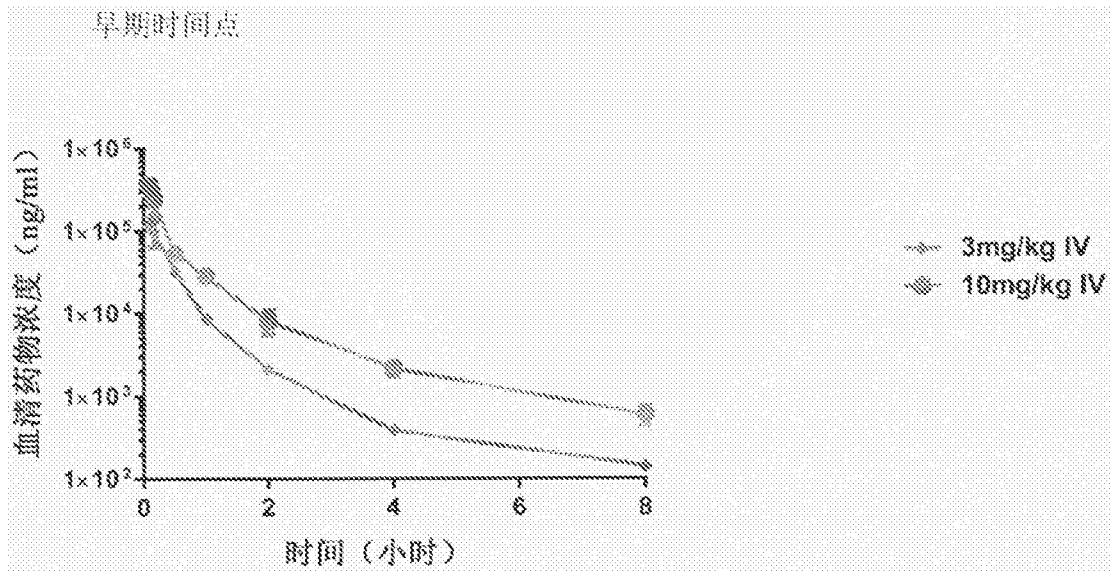


图9A

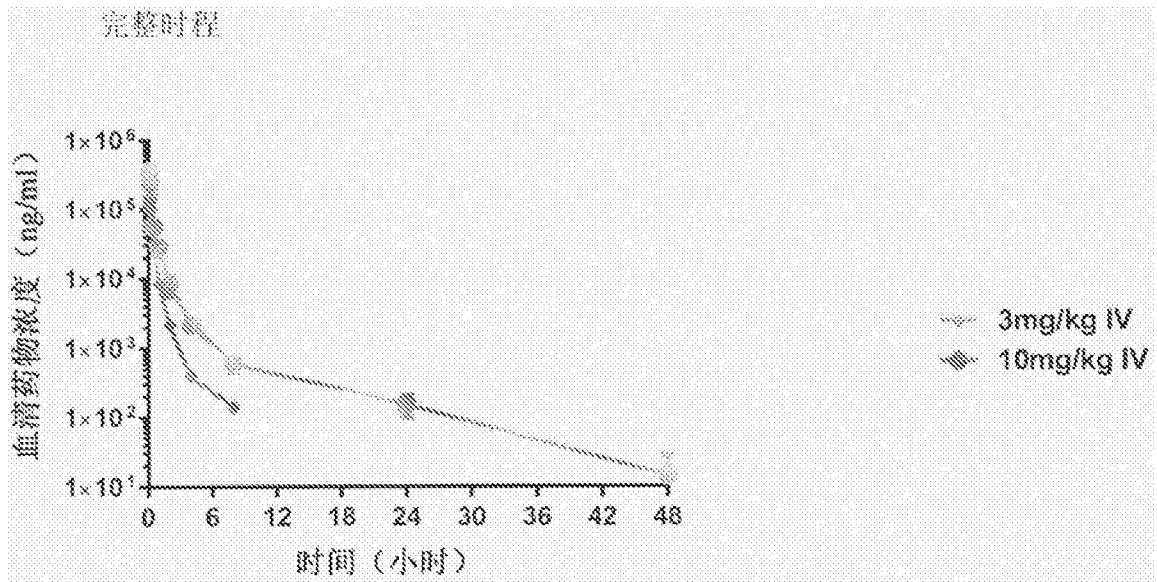


图9B

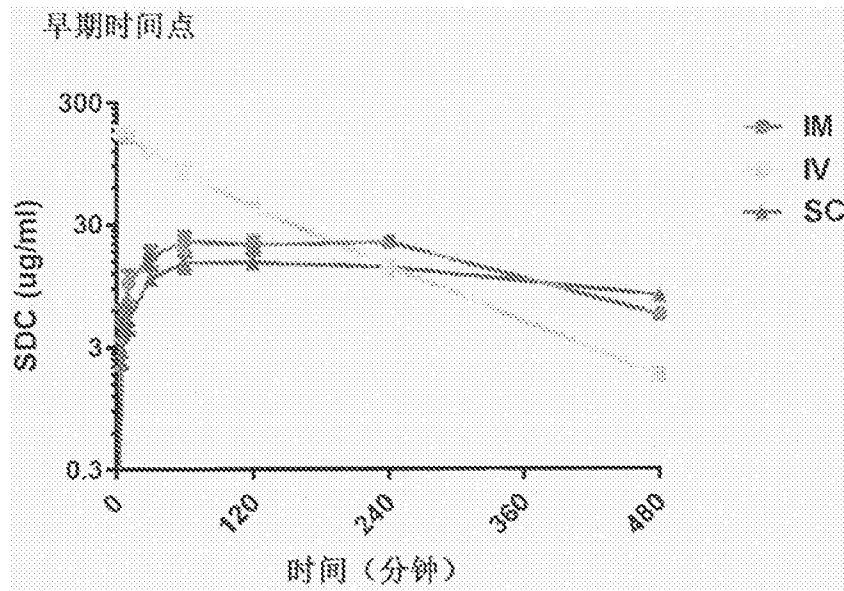


图10A

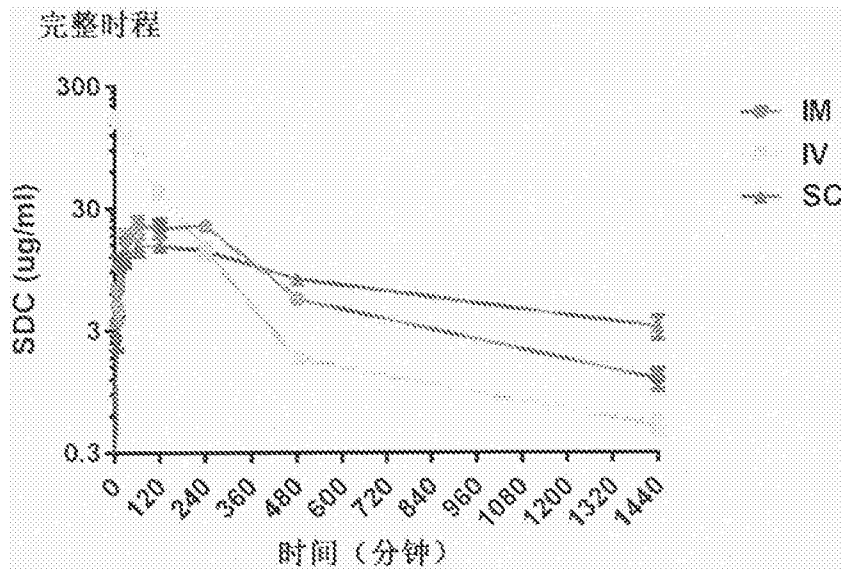
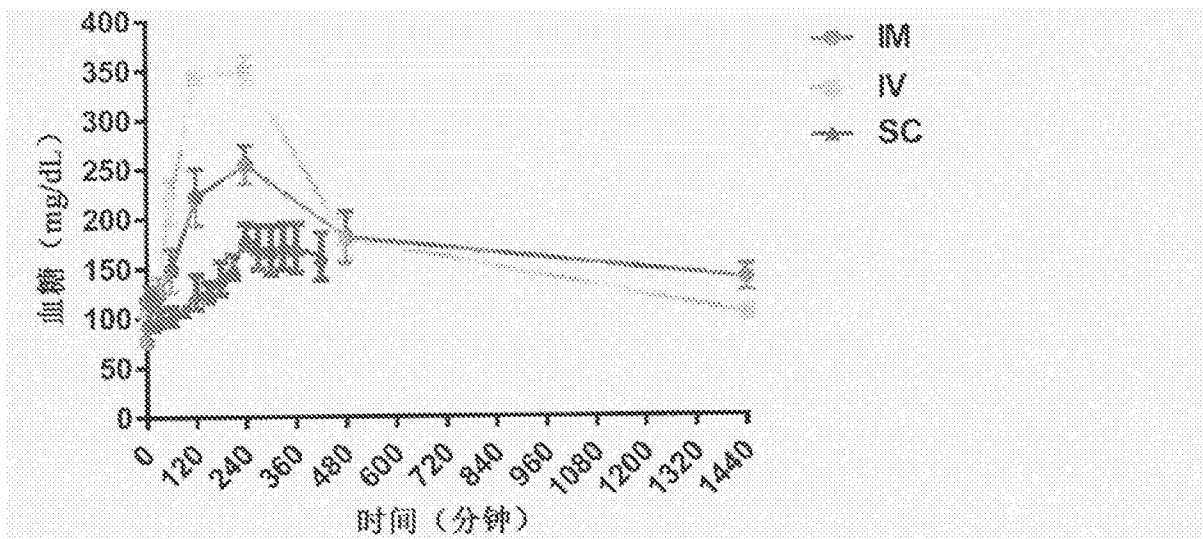


图10B



	n	$C_{max}$ (ug/ml)	$T_{max}$ (小时)	AUC (ug*h/ml)	$t_{1/2}$ (小时)	F%
IV	4	172.8	0.1	280.3	3.3	不适用
IM	4	24.1	2	185.3	5.5	66.9
SC	3	15.9	1.7	183.3	10.5	65.5

图10C

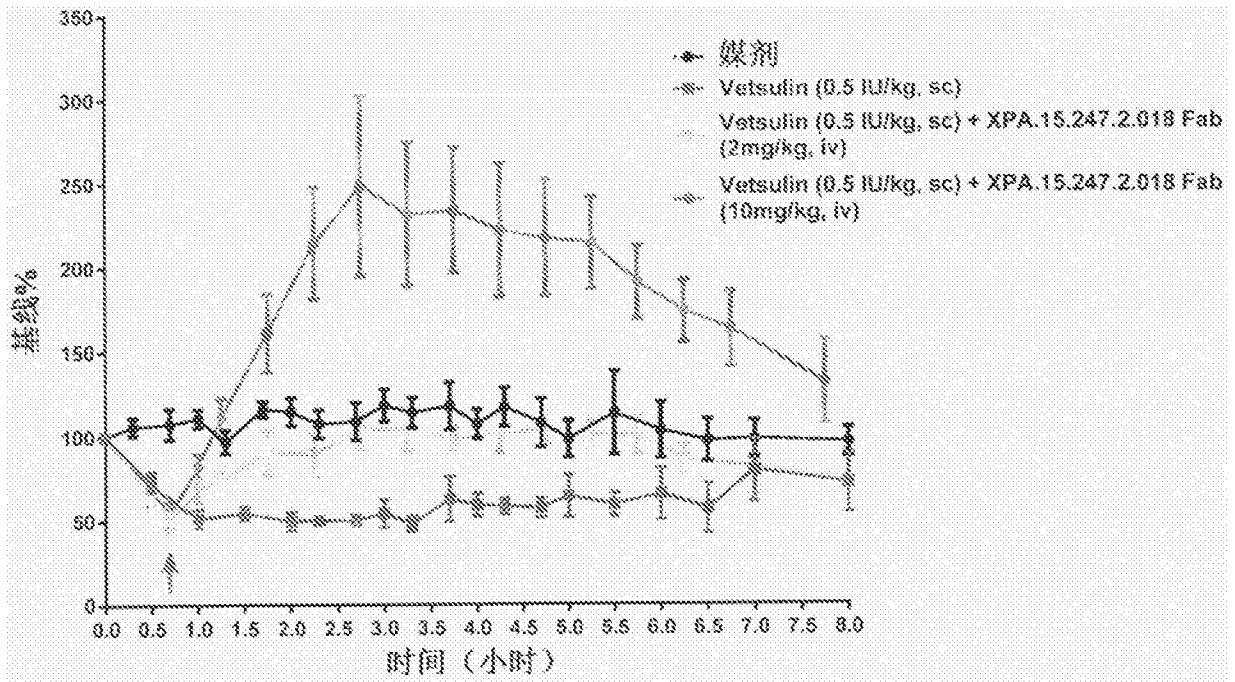


图11A

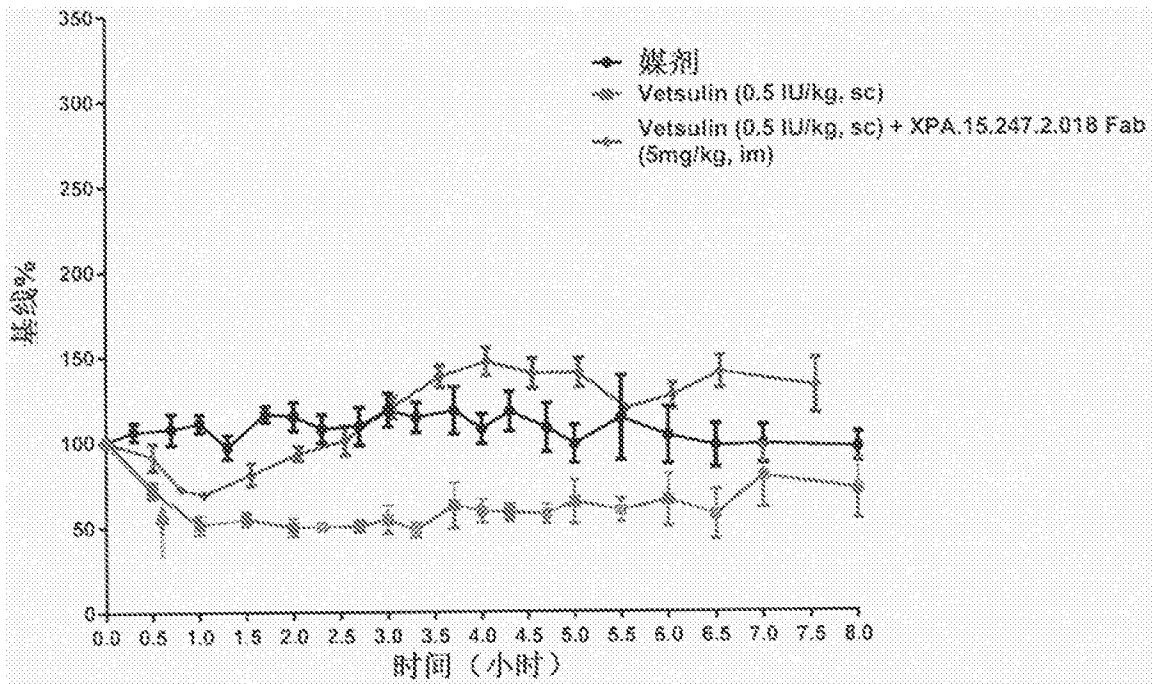


图11B



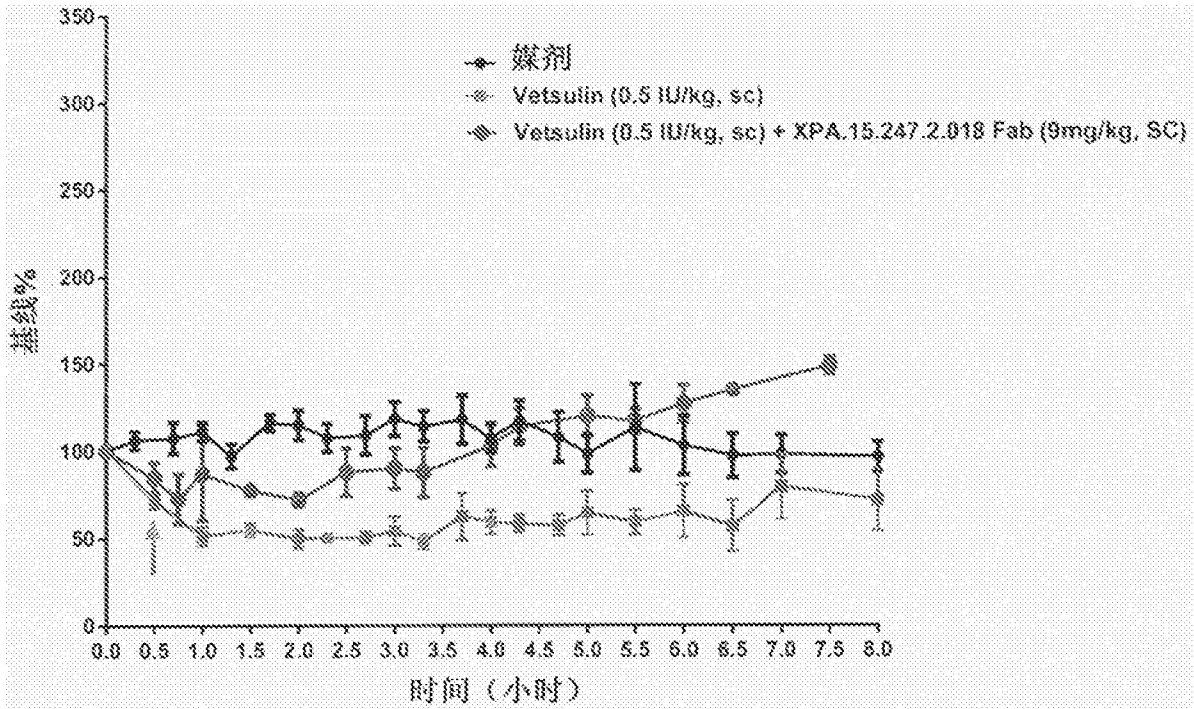


图11C

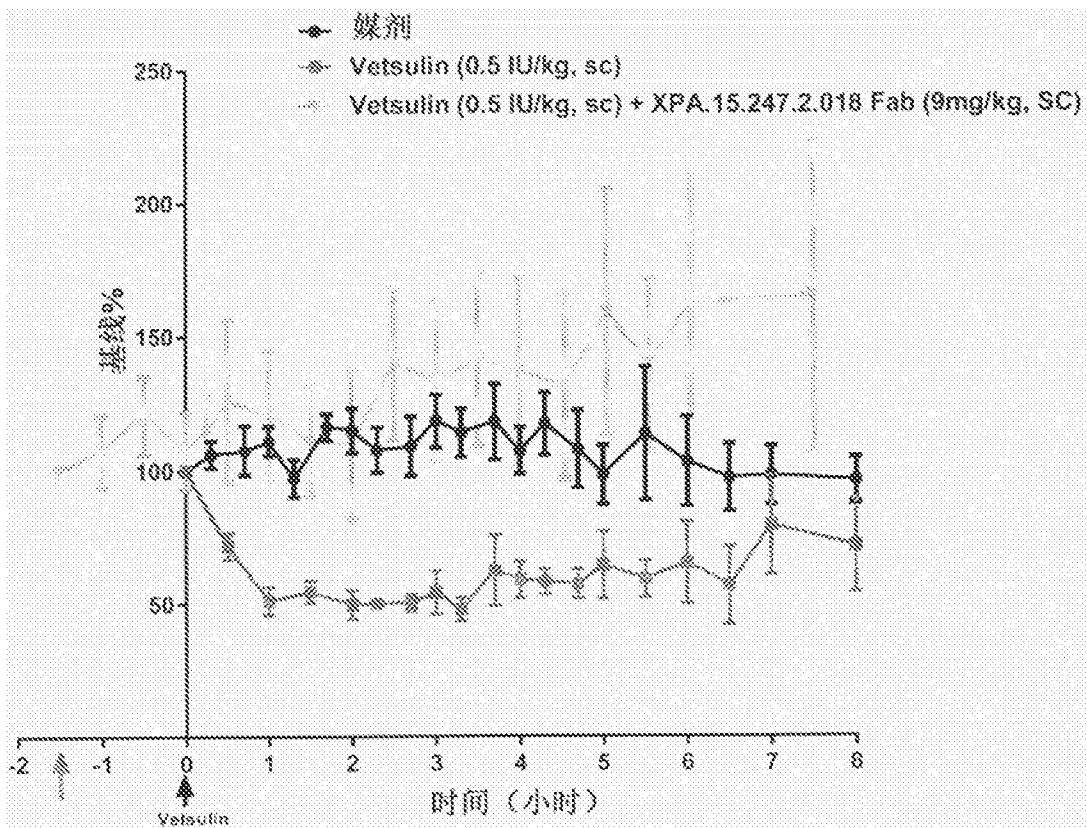


图12

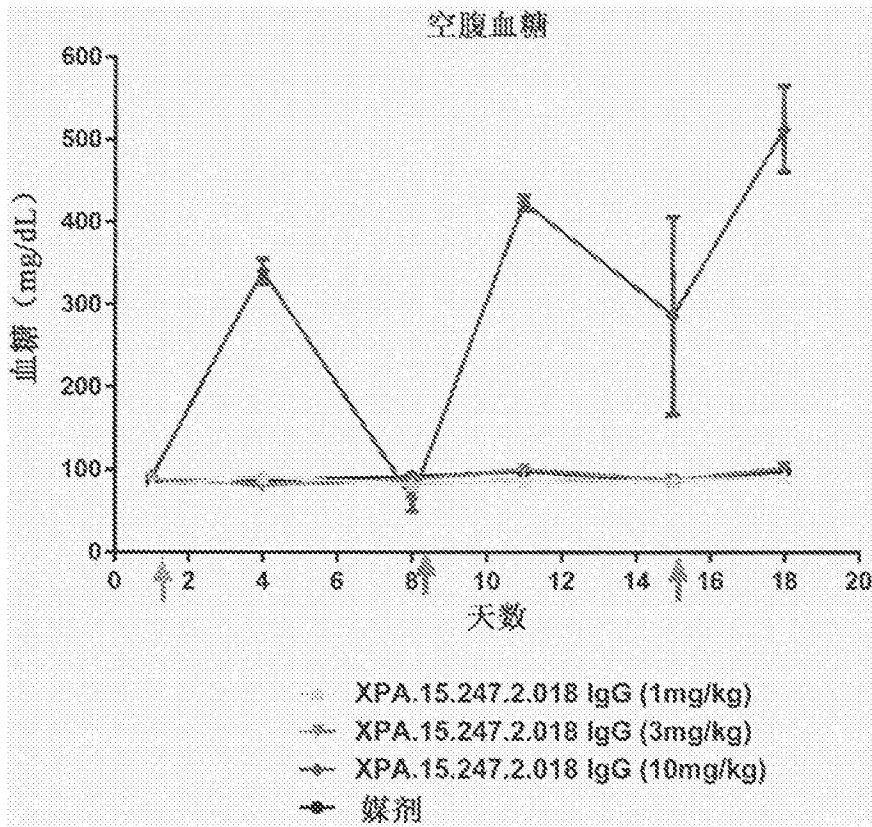


图13A

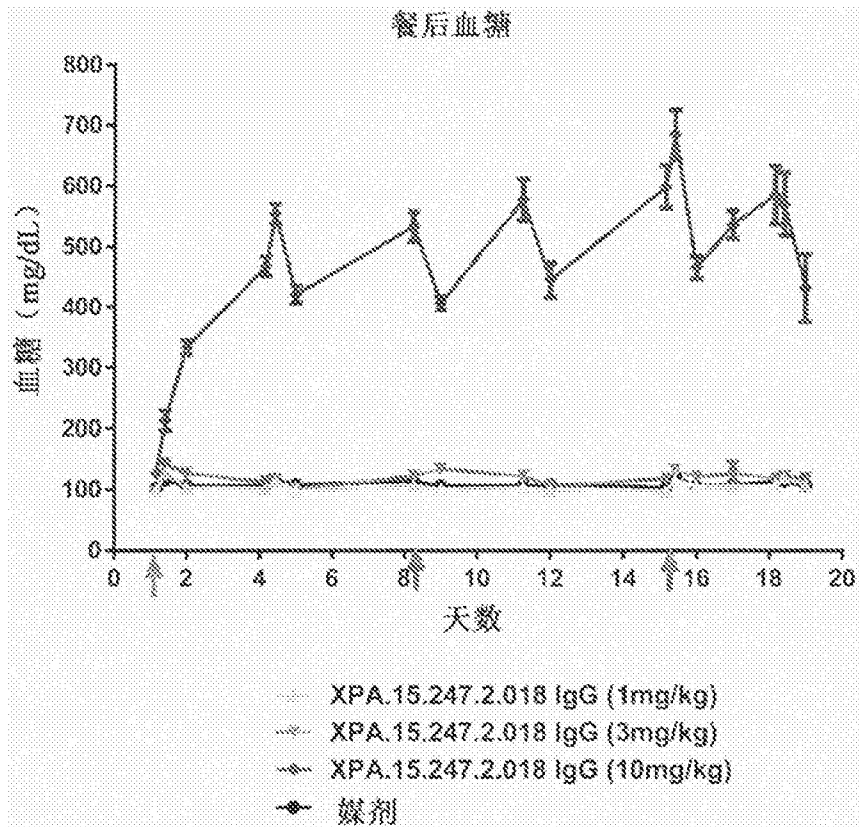


图13B

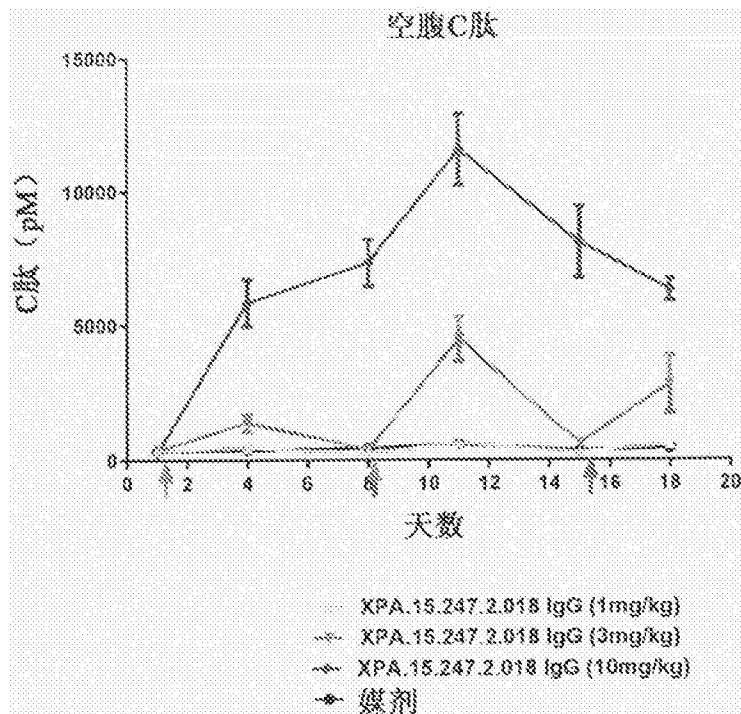


图14A

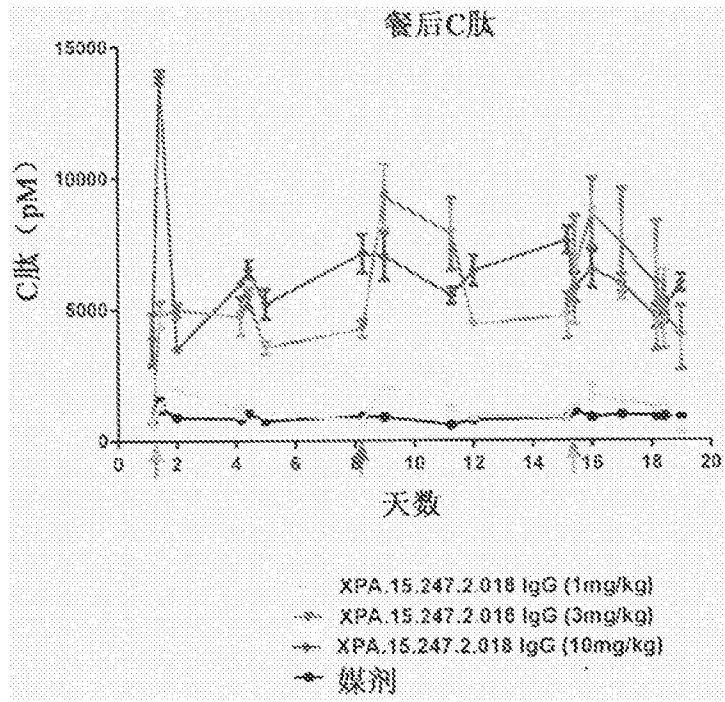


图14B

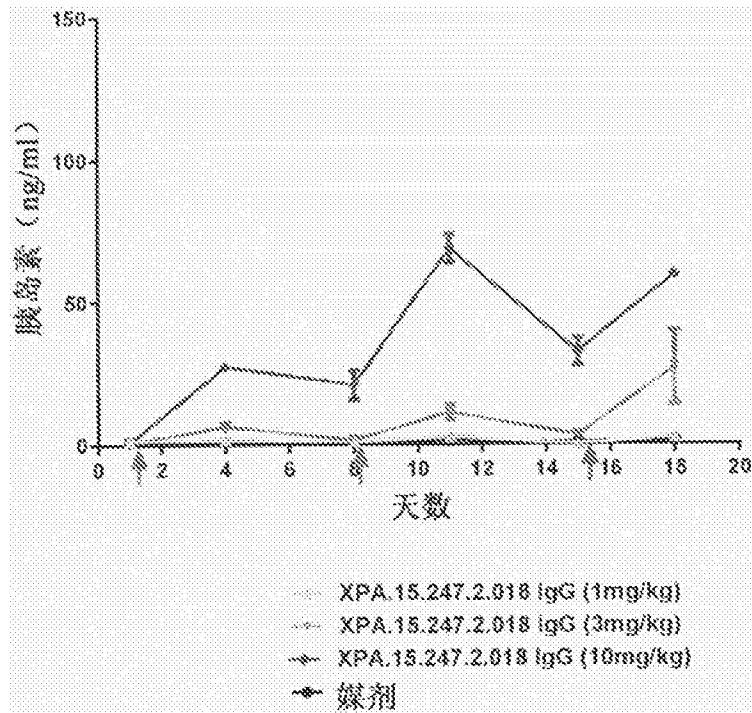


图14C

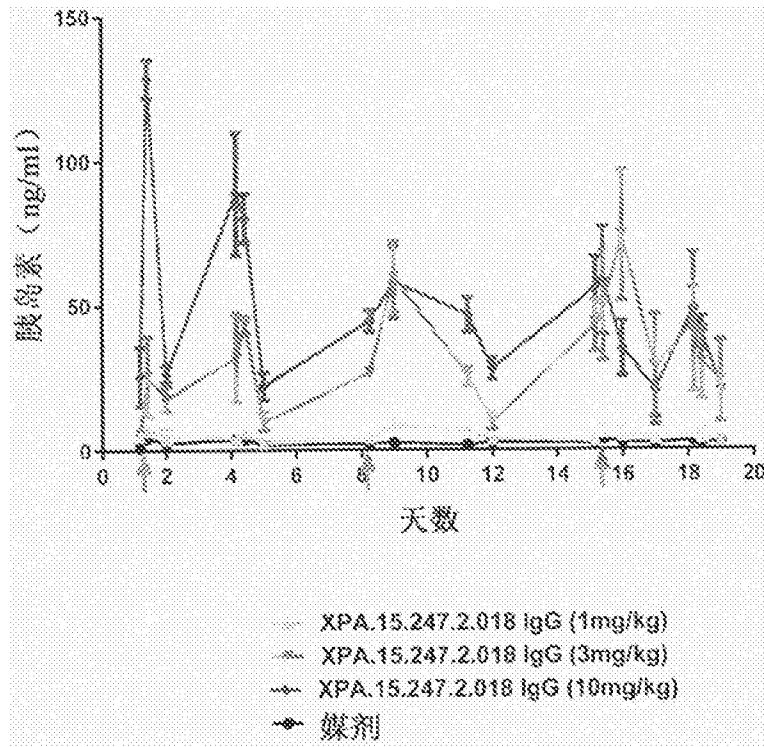


图14D

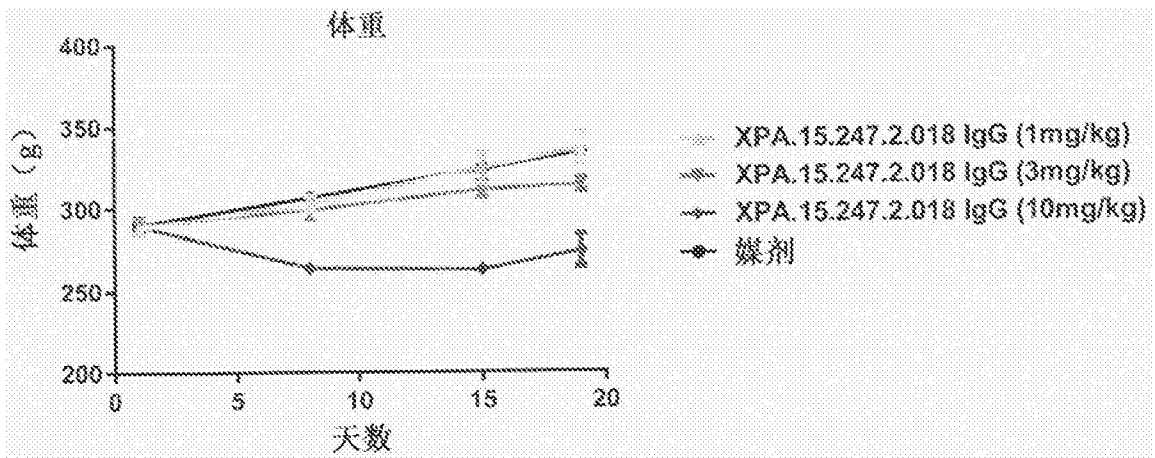


图15A

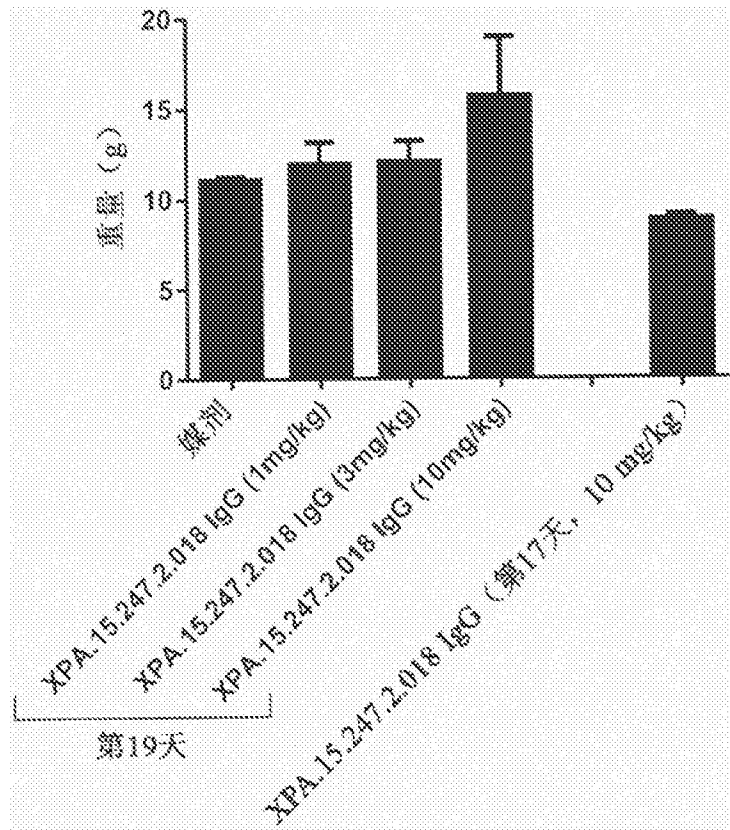


图15B

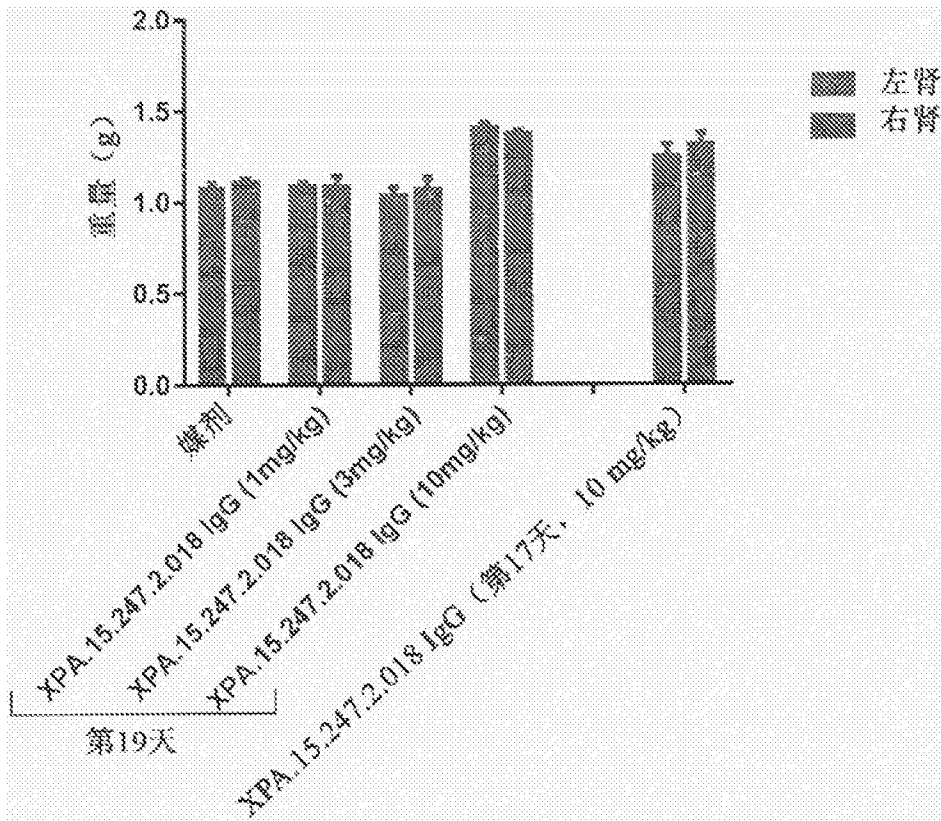


图15C

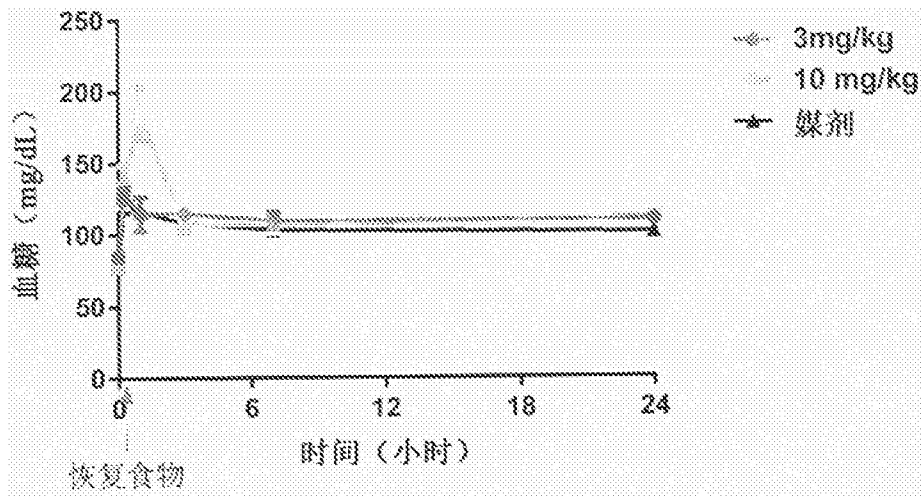


图16A

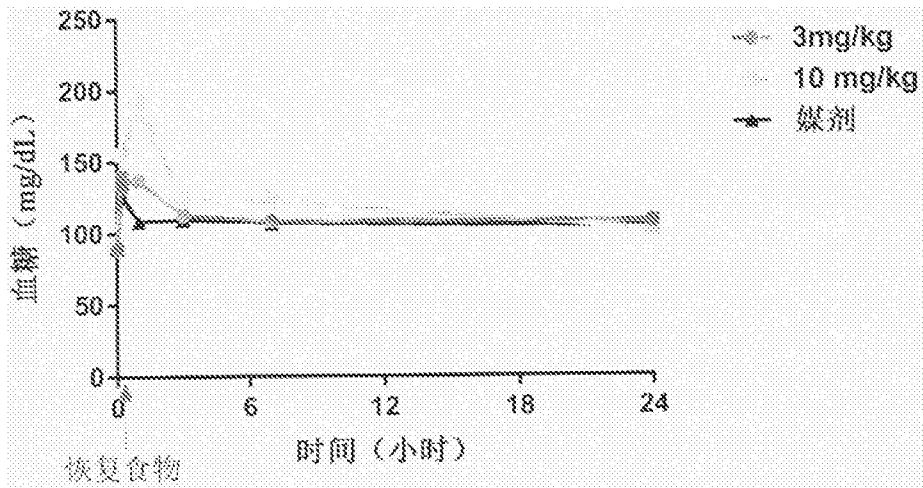


图16B

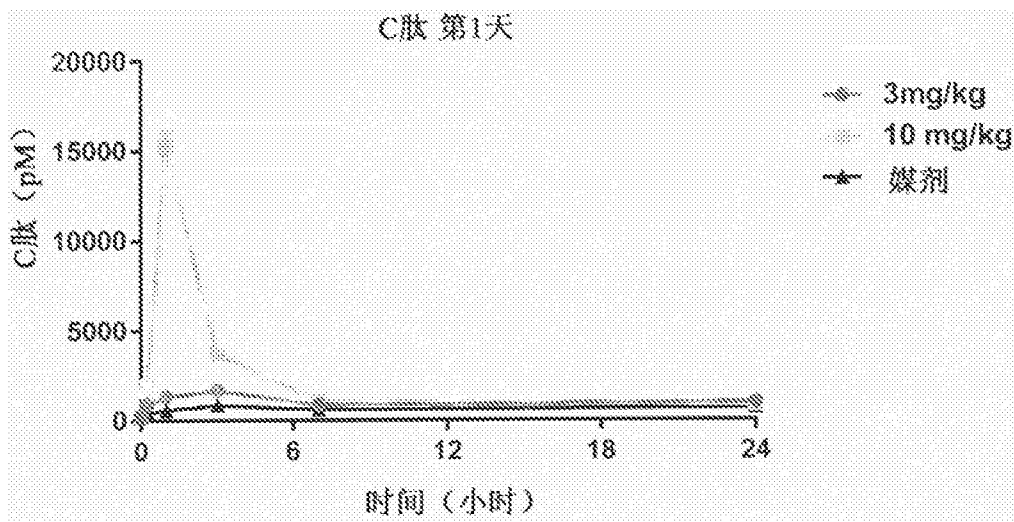


图17A



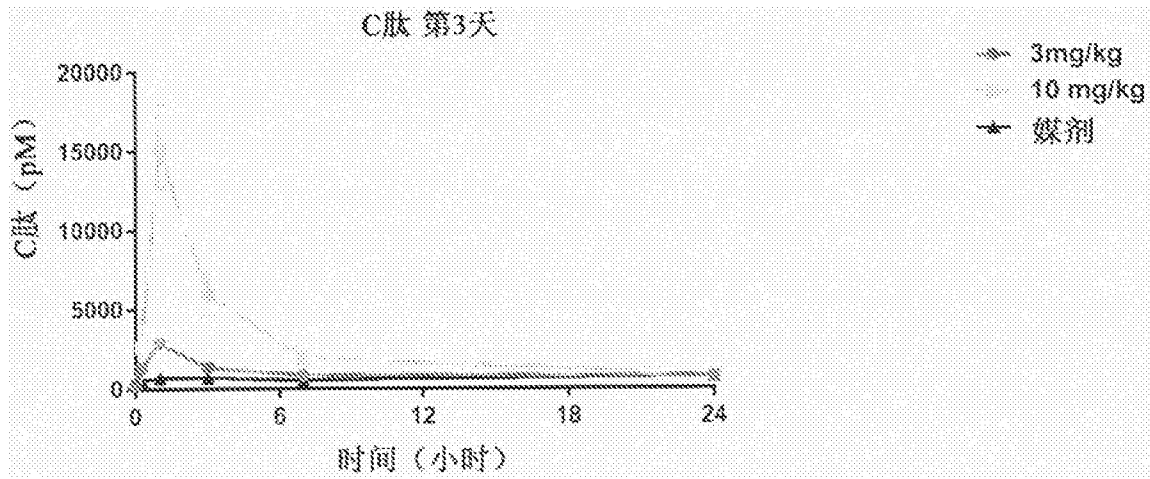


图17B

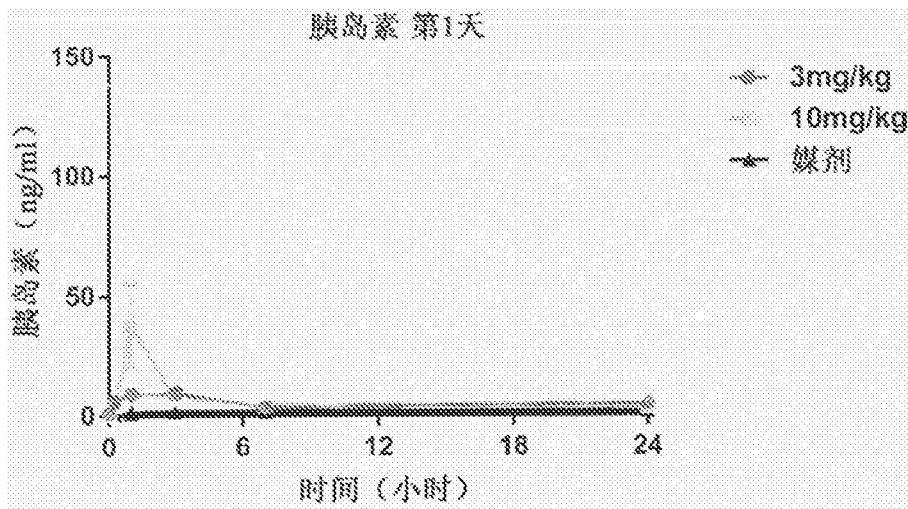


图17C

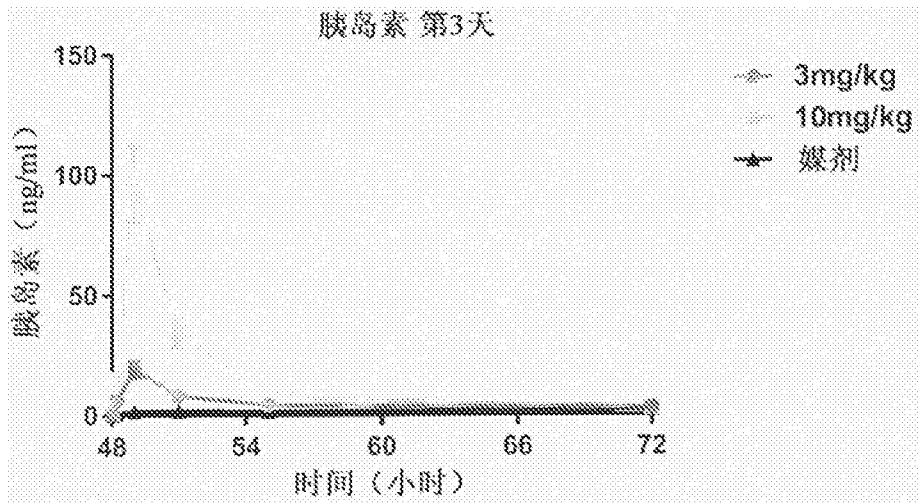


图17D

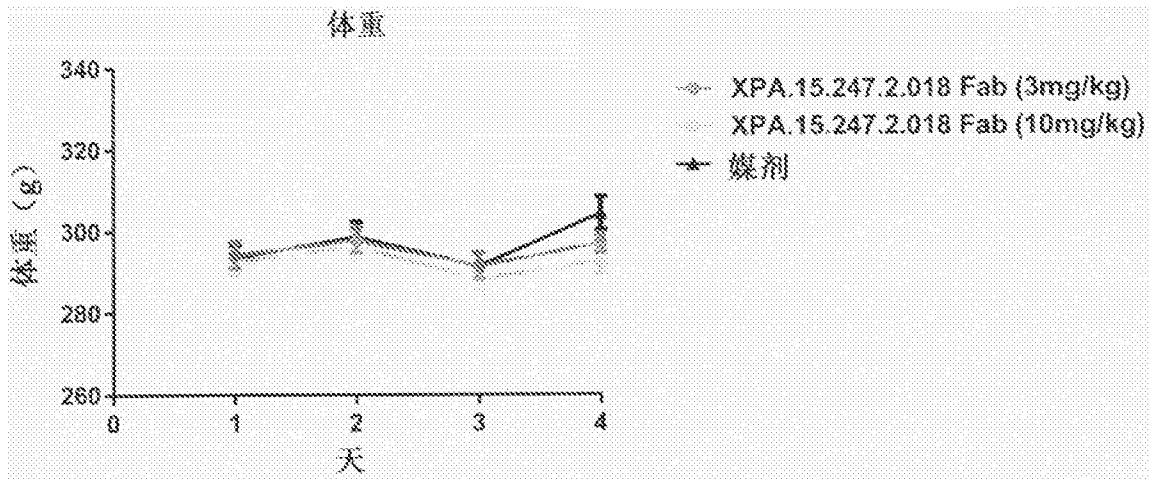


图18A

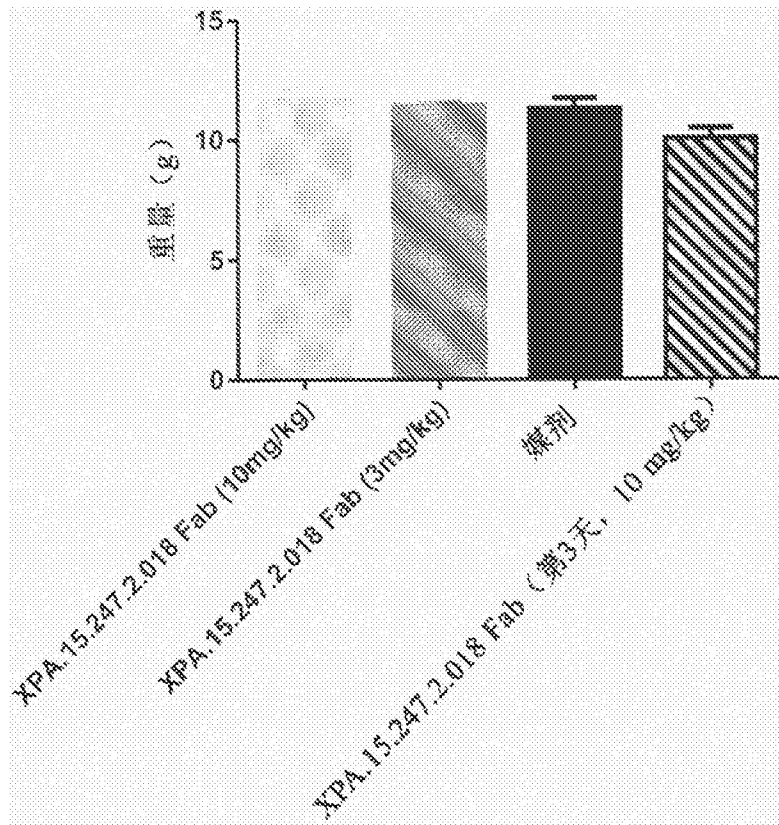


图18B

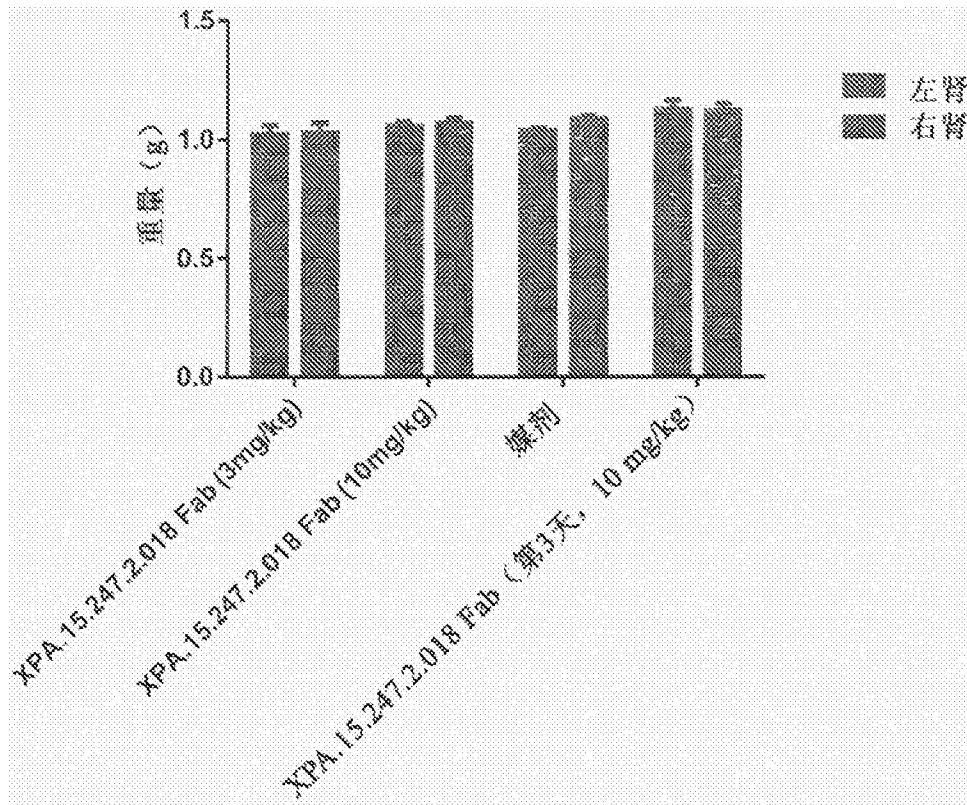


图18C

名称	SEQ ID NO	H-cdr1	SEQ ID NO	H-cdr2	SEQ ID NO	H-cdr3	SEQ ID NO	亲和力: $K_D$ (nM)	$K_D$ 提高倍数
247.2.018 Fab	2	GTFSSYA	5	ISYSGSNK	6	ARHEWGFDFY	7	9.7 nM	1.0
RHF.15.05896.004	29	GFRFSSYA	50	ISYSGSNK	51	ARHEWGFDFE	52	1.6 nM	6.1
RHF.15.05896.006	30	GKFFSSYA	53	ISYSGDNK	54	ARHEWGFDFR	55	1.9 nM	5.2
RHF.15.05896.012	31	GTFSSWA	58	ISYSGENK	57	ARHEWGFDFY	58	460 pM	21.0
RHF.15.05896.015	32	GKFFSSYA	59	ISYSGRNK	60	ARHEWGFQDDY	61	3.0 nM	3.3
RHF.15.05896.020	33	GKFFSSYA	62	ISWSGSNK	63	ARHEWGFDFE	64	1.5 nM	6.4
RHF.15.05896.022	34	GTFSSWA	65	ISYSGSNT	66	ARHEWGFDFY	67	680 pM	14.2
RHF.15.05896.028	35	GKFFSSYA	68	ISCSGSNK	69	ARHEWGLDFY	70	1.4 nM	7.0
RHF.15.05896.032	36	GKFFSSYA	71	ISYSGENK	72	ARHEWGFDFE	73	1.1 nM	8.6
RHF.15.05896.036	37	GKFFSSYA	74	ISYSGGNK	75	ARHEWGFDFL	76	1.8 nM	5.4
RHF.15.05896.040	38	GKFFSSYA	77	ISNSGSNK	78	ARHEWGFDFW	79	1.8 nM	5.5
RHF.15.05896.044	39	GKFFSSYA	80	ISNSGSNK	81	ARHEWGFDFK	82	1.3 nM	7.4
RHF.15.05896.048	40	GTFRSSYA	83	ISYSGSVK	84	ARHEWGFDFE	85	1.3 nM	7.5
RHF.15.05896.052	41	GKFFSSYA	86	ISYSGGNK	87	ARHEWGFDFE	88	1.1 nM	9.0
RHF.15.05896.056	42	GKFFSSYA	89	ISYSGSNK	90	ARHEWGFDFE	91	1.4 nM	6.9
RHF.15.05896.059	43	GFRFSSYA	92	ISYSGSVK	93	ARHEWGFDFR	94	1.3 nM	7.4
RHF.15.05896.064	44	GKFFSSYA	95	ISYSGSHK	96	ARHEWGFQDDY	97	2.6 nM	3.7
RHF.15.05896.068	45	GKFFSSYA	98	ISYSGGNK	99	ARHEWGFDFY	100	1.2 nM	8.3
RHF.15.05896.072	46	GFRFSSYA	101	ISYSGGNK	102	ARHEWGFDFY	103	1.4 nM	6.8
RHF.15.05896.075	47	GKFFSSYA	104	ISYSGSNK	105	ARHEWGFDFY	106	1.4 nM	7.0
RHF.15.05896.079	48	GKFFSSYA	107	ISWSGSNK	108	ARHEWGFDFY	109	1.2 nM	8.1
RHF.15.05896.084	49	GFRFSSYA	110	ISWSGSNK	111	ARHEWGFDFK	112	2.2 nM	4.4

图19

名称	$k_s$ (1/MS)	$k_d$ (1/s)	效能EC50值 [mM]	CHO 人类 INSR	CHO 人类 INSR	CHO猕猴 INSR	CHO大鼠 INSR	CHO猕猴 INSR	CHO大鼠 INSR
247.2.018.Fab	1.1E+05	1.1E-03	1.309	2.204	1.634	2.615	1.279	2.615	1.279
RHF.15.05896.004	1.3E+05	2.1E-04		2.426					
RHF.15.05896.006	1.3E+05	2.4E-04		2.946					
RHF.15.05896.007	7.2E+04	3.3E-05	2.200	4.525					
RHF.15.05896.015	8.4E+04	2.5E-04		4.350					
RHF.15.05896.020	1.1E+05	1.7E-04		1.955	0.838	0.9108	0.661	0.9108	0.6605
RHF.15.05896.022	7.3E+04	6.0E-05		3.724					
RHF.15.05896.028	1.1E+05	1.5E-04		2.014					
RHF.15.05896.032	9.1E+04	1.0E-04		3.098					
RHF.15.05896.036	1.2E+05	2.2E-04		3.036					
RHF.15.05896.040	9.2E+04	1.6E-04		2.923					
RHF.15.05896.044	1.3E+05	1.7E-04		2.518					
RHF.15.05896.048	1.6E+05	2.1E-04		2.075					
RHF.15.05896.052	1.3E+05	1.3E-04		1.853					
RHF.15.05896.056	1.2E+05	1.7E-04		2.264					
RHF.15.05896.059	1.9E+05	2.5E-04		2.509					
RHF.15.05896.064	6.0E+04	1.6E-04		6.298					
RHF.15.05896.068	3.2E+05	3.8E-04		1.249	0.762	0.8538	0.533	0.8538	0.5328
RHF.15.05896.072	3.8E+05	5.4E-04	1.084	1.052	0.609	0.7718	1.039	0.7718	1.039
RHF.15.05896.075	3.2E+05	4.5E-04	1.160	1.065	0.791	0.7282	0.621	0.7282	0.6212
RHF.15.05896.079	2.9E+05	3.5E-04		1.264					
RHF.15.05896.084	1.7E+05	3.8E-04	1.138	1.665	0.692	0.7284	0.799	0.7284	0.7986

图19(续)

H-CDR1																							
位置	氨基酸	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	X	Y	突变%
26	G	0	0	0	0	271	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00%
27	F	0	0	0	0	768	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3	1.11%
28	I	2	0	0	3	1	9	1	0	327	1	0	2	4	8	29	1	51	0	0	0	0	77.68%
29	F	0	0	0	0	270	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.37%
30	S	0	0	1	1	0	5	1	0	2	0	0	2	3	3	5	252	0	0	0	0	0	7.01%
31	S	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	284	0	0	0	0	0	2.58%
32	Y	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	255	5.90%
33	A	271	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00%

H-CDR2																							
位置	氨基酸	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	X	Y	突变%
51	I	0	0	0	0	0	0	0	269	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0.74%
52	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	271	0	0	0	0	0	0.90%
53	Y	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	3	1	10	0	237	13.57%
54	S	0	0	14	17	0	6	1	0	2	0	0	0	0	0	0	272	0	0	0	0	0	19.06%
55	G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00%
56	S	1	0	0	24	1	20	1	1	3	1	0	0	0	0	0	202	1	0	0	0	0	15.86%
57	N	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	211	1	1	0	1	1	0	0	0	0	4.95%
58	K	0	0	0	0	0	0	2	0	214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21.00%

H-CDR3																							
位置	氨基酸	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	X	Y	突变%
97	A	269	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0.74%
98	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	271	0	0	0	0	0	0	0.00%
99	H	0	0	0	0	0	0	271	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00%
100	E	0	0	0	271	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00%
101	W	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	271	0	0	0.00%
102	G	0	0	0	0	0	271	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00%
103	F	0	0	0	0	244	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.56%
104	G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.85%
105	F	0	0	0	0	194	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28.41%
106	D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00%
107	V	0	0	0	66	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00%

基于PPV噬菌体筛选速率改进的克隆物-非单一序列  
248/271 单一序列

图20