



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106916227 B

(45)授权公告日 2019.12.13

(21)申请号 201611206936.5

A61K 45/00(2006.01)

(22)申请日 2016.12.23

A61K 38/08(2019.01)

A61P 35/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106916227 A

(56)对比文件

(43)申请公布日 2017.07.04

CN 101437850 A,2009.05.20,

CN 103517719 A,2014.01.15,

(66)本国优先权数据

201510990545.6 2015.12.24 CN

CN 101437850 A,2009.05.20,

Puja sapra等.Long-term tumor

(73)专利权人 凯惠科技发展(上海)有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技

园区蔡伦路720弄3号楼302室

regression induced by an antibody-drug conjugate that targets 5T4, an oncofetal antigen expressed on tumor-intiating cells.《Molecular cancer therapeutics》.2013,第12卷(第1期),38-47.

(72)发明人 孙晓岚 张莹 张瑜 胡飞飞

宫世勇 刘礼乐

Mauricio Leal等.Preclinical

(74)专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

代理人 薛琦 朱水平

development of an anti-5T4 antibody-drug conjugate: pharmacokinetics in mice, rats, and NHP and tumor/tissue distribution in mice.《Bioconjugate chem.》.2015,第26卷2223-2232.

(51)Int.Cl.

C07K 16/32(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

A61K 47/68(2017.01)

审查员 高雅

权利要求书3页 说明书41页

序列表36页 附图21页

(54)发明名称

一种TPBG抗体及其制备方法、其偶联物和应用

(57)摘要

本发明公开了一种TPBG抗体及其制备方法、其偶联物和应用。所述TPBG抗体包括TPBG抗体的重链可变区重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3中的一种或多种,和/或,TPBG抗体的轻链可变区轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3中的一种或多种,其氨基酸序列分别如本发明中所述。所述TPBG抗体是人源化抗体,具有高亲和力,与小分子药物毒素MMAF偶联后制得的偶联物能够对TPBG阳性的细胞有细胞毒杀伤作用,因此运用于治疗肿瘤等药物的制备中。

CN 106916227 B

1. 一种分离的TPBG抗体,所述的TPBG抗体包括重链可变区和轻链可变区,其特征在于,所述重链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.41所示,且所述轻链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.45所示。

2. 如权利要求1所述的TPBG抗体,其特征在于,所述的TPBG抗体还包括抗体重链恒定区和/或抗体轻链恒定区。

3. 如权利要求2所述的TPBG抗体,其特征在于,所述的抗体重链恒定区为人源或小鼠源抗体重链恒定区;所述的抗体轻链恒定区为人源或小鼠源抗体轻链恒定区。

4. 如权利要求3所述的TPBG抗体,其特征在于,所述的抗体重链恒定区为人源抗体重链恒定区;所述的抗体轻链恒定区为人源抗体轻链恒定区。

5. 如权利要求1~4任一项所述的TPBG抗体,其特征在于,所述的TPBG抗体是单克隆抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、单链抗体。

6. 一种核酸,其特征在于,其编码如权利要求1~5中任一项所述的TPBG抗体。

7. 如权利要求6所述的核酸,其特征在于,编码所述重链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.91所示,且编码所述轻链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.92所示。

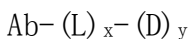
8. 一种包含如权利要求6或7所述的核酸的重组表达载体。

9. 一种包含如权利要求8所述的重组表达载体的重组表达转化体。

10. 一种TPBG抗体的制备方法,其包括如下步骤:培养如权利要求9所述的重组表达转化体,从培养物中获得TPBG抗体。

11. 一种免疫偶联物,其特征在于,其包括共价附着至细胞毒剂的、如权利要求1~5中任一项所述的TPBG抗体。

12. 如权利要求11所述的免疫偶联物,其特征在于,1当量如权利要求1~5中任一项所述的TPBG抗体通过x当量接头与y当量细胞毒剂相连,其具有式1所示结构,



式1

其中,Ab为如权利要求1~5中任一项所述的TPBG抗体;L为接头;D为细胞毒剂;x为自然数;y为自然数。

13. 如权利要求12所述的免疫偶联物,其特征在于,所述的x为1-20的整数;所述的y为0-20的整数。

14. 如权利要求13所述的免疫偶联物,其特征在于,所述的x和所述的y各自独立地为1~2,或2~4,或4~8,或8~20的整数。

15. 如权利要求14所述的免疫偶联物,其特征在于,所述的x和所述的y的比例为1:1。

16. 如权利要求12~15任一项所述的免疫偶联物,其特征在于,所述接头L为活性酯、碳酸盐类、氨基甲酸酯类、亚胺磷酸酯、脲类、脲类、缩醛类、原酸酯类、氨基类、小肽段或核苷酸片段;

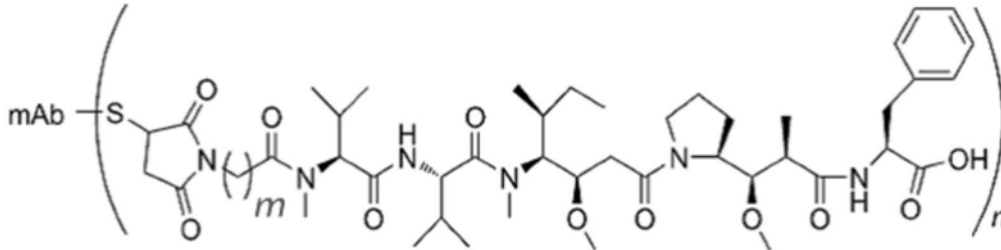
和/或,所述D选自细胞毒素、化学治疗剂、放射性同位素、治疗性核酸、免疫调节剂、抗血管生成剂、抗增殖促凋亡剂或细胞溶解酶。

17. 如权利要求16所述的免疫偶联物,其特征在于,所述接头L为马来酰亚胺基己酰(MC)、马来酰亚胺基己酰-L-缬氨酸-L-瓜氨酸对氨基苄醇(MC-VC-PAB)或4-(N-马来酰亚胺

基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)；

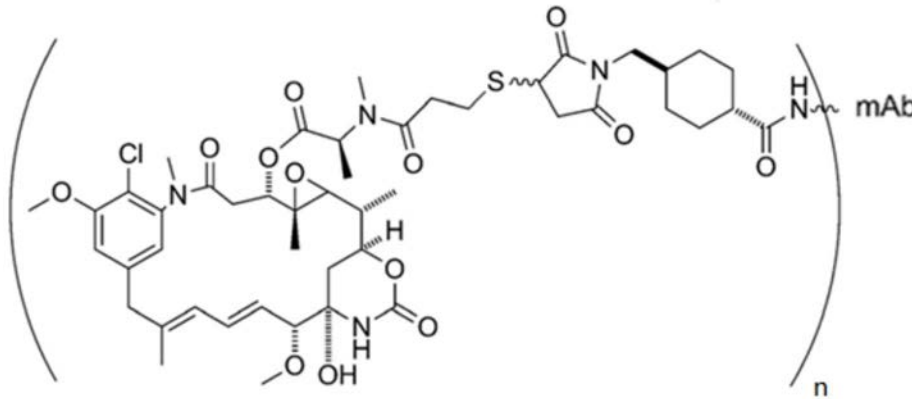
和/或,所述D选自甲基奥瑞他汀E、甲基奥瑞他汀F或N2'-脱乙酰-N2'-3-巯基-1氧代丙基-美登素。

18.如权利要求16所述的免疫偶联物,其特征在于,所述式1中 $x=y=n$,所述免疫偶联物的结构如式3、如式4或者如式5所示,



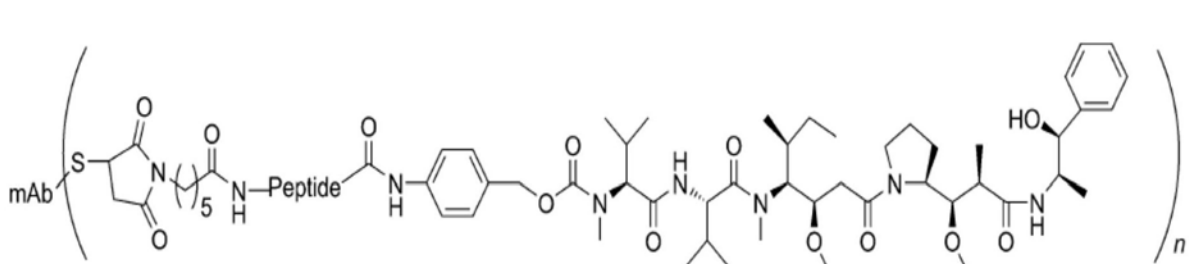
式 3

式3中 m 为5,即所述免疫偶联物中的L为马来酰亚胺基己酰;D为甲基奥瑞他汀F;



式 4

式4中,所述免疫偶联物中的L为4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯;D为N2'-脱乙酰-N2'-3-巯基-1氧代丙基)-美登素(DM1);



式 5

式5中,所述免疫偶联物中的L为马来酰亚胺基己酰-L-缬氨酸-L-瓜氨酸对氨基苄醇,D为甲基奥瑞他汀E(MMAE);

其中, n 为自然数。

19.如权利要求18所述的免疫偶联物,其特征在于,所述的 n 为1~20的整数。

20.如权利要求19所述的免疫偶联物,其特征在于,所述的 n 为1~2,或2~4,或4~8,或

8~20的整数。

21. 一种药物组合物,其特征在于,其包括如权利要求11~20中任一项所述的免疫偶联物和药学可接受的载体。

22. 一种如权利要求1~5中任一项所述的TPBG抗体在制备抗肿瘤药物中的应用。

23. 一种如权利要求11~20中任一项所述的免疫偶联物在制备抗肿瘤药物中的应用。

24. 一种如权利要求21所述的药物组合物在制备抗肿瘤药物中的应用。

25. 一种检测过表达TPBG蛋白的细胞的非诊断目的的方法,其特征在于,包括如下的步骤:如权利要求1~5中任一项所述的TPBG抗体与待检样品在体外接触,检测如权利要求1~5中任一项所述的TPBG抗体与所述待检样品的结合即可。

一种TPBG抗体及其制备方法、其偶联物和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体领域,具体涉及一种TPBG抗体及其制备方法、其偶联物和应用。

背景技术

[0002] 在对胚胎干细胞滋养层和癌细胞进行比较时发现一种细胞表面分子,滋养层特异性糖蛋白(TPBG,又称为5T4),是胚胎滋养层表达的特异性蛋白。人类TPBG蛋白的分子量约为72kDa,包含420个氨基酸,其N端低聚糖结构具有多样性,能够防止蛋白质水解,并且在细胞膜信号传导过程中与其他分子有交互作用。TPBG蛋白共包含7个重复的亮氨酸结构域(LRR),可参与蛋白质与蛋白质的相互作用。

[0003] 滋养层是胎盘和胎儿之间的一层特殊的胚胎干细胞,TPBG广泛表达于胚胎发育期的各种滋养层细胞。对于正常成人组织中,TPBG只在有限的几种上皮细胞中有表达。但是,TPBG在很多癌细胞中表达,如子宫癌、结肠癌、胃癌、卵巢癌、口腔癌、前列腺癌、肺癌或肾癌组织中都检测到TPBG的表达,在结肠癌、胃癌或卵巢癌中有证据表明TPBG的表达量与癌症的低治愈率相关。而在非小细胞肺癌、肾癌或胰腺癌的组织中,TPBG的表达高达95%以上。

[0004] 很多研究显示,过表达该TPBG能够促进细胞迁移,同时还能够避免免疫监控。在小鼠纤维原细胞中过表达TPBG能够诱导细胞呈现纺锤体形态,降低细胞粘附。在小鼠正常上皮细胞中,同样发现TPBG能够抑制上皮细胞钙粘蛋白(E-cadherin),促进细胞迁移。而TPBG在细胞内的部分有抑制细胞骨架形成的功能。同时,TPBG与上皮细胞间质转移(EMT)相关,TPBG作为胚胎干细胞发育的早期标志物,增加细胞间质蛋白酶的活性,干扰肌动蛋白细胞骨架的排列,下调E-cadherin的表达。还有研究发现,TPBG与CXCR4共定位于细胞膜表明,能够诱导其配体CXCL12趋化因子的结合,促进炎症和肿瘤的扩散。在TPBG阴性细胞中,CXCL12结合另一个受体CXCR7,抑制趋化反应,有利于细胞的生长和存活。Wnt/b-catenin信号通路对发育和细胞再生起到非常重要的作用,TPBG通过抑制LRP6与Wnt受体的内吞,抑制Wnt信号通路,从而抑制细胞粘附和细胞骨架的形成,促进肿瘤的迁移和扩散。还有证据表明TPBG在乳腺癌和胃癌细胞中参与非经典的Wnt通路,同样促进癌细胞的迁移和浸润。

[0005] 抗体药物偶联药物,是由抗体与高效小分子药物通过连接物偶联形成的抗体药物偶联物,能够使高毒性小分子药物特异识别癌细胞上的靶点蛋白,从而特异性杀死癌细胞。近一百年间,基于抗体的免疫疗法与基于化学药物的化学疗法,一直是临床上癌症治疗的两大治疗策略。抗体以肿瘤细胞过度表达的抗原为靶点,多种治疗性单抗已经在临床上取得了巨大成功。在临床实践中,治疗性抗体虽然具有很好的靶向性,但是杀伤作用存在局限性。小分子化学药物虽然具备对癌细胞的高效杀伤作用,但是对非癌细胞也造成同样的伤害。因此临床上抗体药物以及小分子药物各自的局限性,对药物研发提出了新的要求。新一代抗体药物偶联物,利用抗体对靶细胞的特异结合能力,输送高细胞毒的化学药物,实现对癌细胞的靶向高效杀伤。随着新型化学连接技术的出现,抗体药物偶联药在八十年代末开始进入临床研究,目前已经有2个ADC药物经FDA批准上市。

[0006] ADC药物的开发涉及:药物靶点的筛选、重组抗体的制备、连接物技术开发以及高

细胞毒性化合物的筛选优化等几个方面。TPBG作为癌细胞特异表达的蛋白,是ADC药物的候选靶点。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是为了克服目前缺少TPBG抗体的不足,提供一种亲和力高、特异性强的TPBG抗体及其制备方法和应用,所述的TPBG抗体与人源、小鼠源或食蟹猴源的TPBG蛋白具有高度亲和力。本发明还提供一种药物活性成分的偶联物,其包括所述的TPBG抗体和与其偶联的、具有抗肿瘤的功能的小分子化合物,所述的偶联物能够进入细胞,对TPBG阳性的细胞进行细胞毒杀伤作用,能够运用于治疗肿瘤等药物的制备中。

[0008] 本发明以人源TPBG蛋白或者过表达人源TPBG蛋白的重组细胞株作为免疫原,采用传统的杂交瘤制备技术(Kohler and Milstein, Nature, 1975, 256:495),通过一系列的调整和改进,获得TPBG抗体的先导抗体。再通过对先导抗体的初步生产、纯化和检定,获得具备与人源TPBG蛋白等蛋白具有高度亲和力的TPBG抗体。该TPBG抗体与小分子化合物如MMAF偶联得偶联物,所述偶联物能够进入细胞,对TPBG阳性细胞有优异的细胞毒杀伤作用。然后通过分子生物学方法测序获知所得的TPBG抗体的重链可变区和TPBG抗体的轻链可变区的氨基酸序列。

[0009] 本发明提供一种分离的蛋白质,其包括TPBG抗体的重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3中的一种或多种,和/或,TPBG抗体的轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3中的一种或多种,其中,所述重链CDR1的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.2、SEQ ID No.10、SEQ ID No.18、SEQ ID No.26、SEQ ID No.34、SEQ ID No.42、SEQ ID No.50、SEQ ID No.58、SEQ ID No.66或SEQ ID No.74所示;所述重链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.3、SEQ ID No.11、SEQ ID No.19、SEQ ID No.27、SEQ ID No.35、SEQ ID No.43、SEQ ID No.51、SEQ ID No.59、SEQ ID No.67或SEQ ID No.75所示;所述重链CDR3的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.4、SEQ ID No.12、SEQ ID No.20、SEQ ID No.28、SEQ ID No.36、SEQ ID No.44、SEQ ID No.52、SEQ ID No.60、SEQ ID No.68或SEQ ID No.76所示;所述轻链CDR1的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.6、SEQ ID No.14、SEQ ID No.22、SEQ ID No.30、SEQ ID No.38、SEQ ID No.46、SEQ ID No.54、SEQ ID No.62、SEQ ID No.70或SEQ ID No.78所示;所述轻链CDR2的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.7、SEQ ID No.15、SEQ ID No.23、SEQ ID No.31、SEQ ID No.39、SEQ ID No.47、SEQ ID No.55、SEQ ID No.63、SEQ ID No.71或SEQ ID No.79所示;所述轻链CDR3的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.8、SEQ ID No.16、SEQ ID No.24、SEQ ID No.32、SEQ ID No.40、SEQ ID No.48、SEQ ID No.56、SEQ ID No.64、SEQ ID No.72或SEQ ID No.80所示;或者,所述重链CDR1的氨基酸序列与如序列表中SEQ ID No.2、SEQ ID No.10、SEQ ID No.18、SEQ ID No.26、SEQ ID No.34、SEQ ID No.42、SEQ ID No.50、SEQ ID No.58、SEQ ID No.66或SEQ ID No.74所示的氨基酸序列至少有80%的序列同源性的氨基酸序列所示;所述重链CDR2的氨基酸序列与如序列表中SEQ ID No.3、SEQ ID No.11、SEQ ID No.19、SEQ ID No.27、SEQ ID No.35、SEQ ID No.43、SEQ ID No.51、SEQ ID No.59、SEQ ID No.67或SEQ ID No.75所示的氨基酸序列至少有80%的序列同源性的氨基酸序列所示;所述重链CDR3的氨基酸序列与如序列表中SEQ ID No.4、SEQ ID No.12、SEQ ID No.20、SEQ ID No.28、SEQ ID No.36、SEQ ID No.44、SEQ ID No.52、SEQ ID No.60、SEQ

ID No.68或SEQ ID No.76所示的氨基酸序列至少有80%的序列同源性的氨基酸序列所示；所述轻链CDR1的氨基酸序列与如序列表中SEQ ID No.6、SEQ ID No.14、SEQ ID No.22、SEQ ID No.30、SEQ ID No.38、SEQ ID No.46、SEQ ID No.54、SEQ ID No.62、SEQ ID No.70或SEQ ID No.78所示的氨基酸序列至少有80%的序列同源性的氨基酸序列所示；所述轻链CDR2的氨基酸序列与如序列表中SEQ ID No.7、SEQ ID No.15、SEQ ID No.23、SEQ ID No.31、SEQ ID No.39、SEQ ID No.47、SEQ ID No.55、SEQ ID No.63、SEQ ID No.71或SEQ ID No.79所示的氨基酸序列至少有80%的序列同源性的氨基酸序列所示；所述轻链CDR3的氨基酸序列与如序列表中SEQ ID No.8、SEQ ID No.16、SEQ ID No.24、SEQ ID No.32、SEQ ID No.40、SEQ ID No.48、SEQ ID No.56、SEQ ID No.64、SEQ ID No.72或SEQ ID No.80所示的氨基酸序列至少有80%的序列同源性的氨基酸序列所示。

[0010] 较佳地，所述重链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.2所示，所述重链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.3所示，且所述重链CDR3的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.4所示；所述重链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.10所示，所述重链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.11所示，且所述重链CDR3的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.12所示；所述重链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.18所示，所述重链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.19所示，且所述重链CDR3的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.20所示；所述重链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.26所示，所述重链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.27所示，且所述重链CDR3的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.28所示；所述重链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.34所示，所述重链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.35所示，且所述重链CDR3的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.36所示；所述重链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.42所示，所述重链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.43所示，且所述重链CDR3的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.44所示；所述重链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.50所示，所述重链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.51所示，且所述重链CDR3的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.52所示；所述重链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.58所示，所述重链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.59所示，且所述重链CDR3的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.60所示；所述重链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.66所示，所述重链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.67所示，且所述重链CDR3的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.68所示；所述重链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.74所示，所述重链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.75所示，且所述重链CDR3的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.76所示；所述轻链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.6所示，所述轻链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.7所示，且所述轻链CDR3的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.8所示；所述轻链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.14所示，所述轻链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.15所示，且所述轻链CDR3的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.16所示；或，所述轻链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.22所示，所述轻链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.23所示，且所述轻链CDR3的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.24所示；所述轻链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.30所示，所述轻链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.31所示，且所述轻链CDR3的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.32所示；所述轻链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.38所示，所述轻链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.39所示，且所述轻链CDR3

的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.40所示;所述轻链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.46所示,所述轻链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.47所示,且所述轻链CDR3的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.48所示;所述轻链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.54所示,所述轻链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.55所示,且所述轻链CDR3的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.56所示;所述轻链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.62所示,所述轻链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.63所示,且所述轻链CDR3的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.64所示;所述轻链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.70所示,所述轻链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.71所示,且所述轻链CDR3的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.72所示;或,所述轻链CDR1的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.78所示,所述轻链CDR2的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.79所示,且所述轻链CDR3的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.80所示。

[0011] 本发明还提供一种分离的蛋白质,其包括TPBG抗体的重链可变区和/或TPBG抗体的轻链可变区,所述重链可变区的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.1、SEQ ID No.9、SEQ ID No.17、SEQ ID No.25、SEQ ID No.33、SEQ ID No.41、SEQ ID No.49、SEQ ID No.57、SEQ ID No.65或SEQ ID No.73所示;所述轻链可变区的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.5、SEQ ID No.13、SEQ ID No.21、SEQ ID No.29、SEQ ID No.37、SEQ ID No.45、SEQ ID No.53、SEQ ID No.61、SEQ ID No.69或SEQ ID No.77所示。

[0012] 较佳地,所述重链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.1所示,且所述轻链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.5所示;所述重链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.9所示,且所述轻链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.13所示;所述重链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.17所示,且所述轻链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.21所示;所述重链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.25所示,且所述轻链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.29所示;所述重链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.33所示,且所述轻链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.37所示;所述重链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.41所示,且所述轻链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.45所示;所述重链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.49所示,且所述轻链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.53所示;所述重链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.57所示,且所述轻链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.61所示;所述重链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.65所示,且所述轻链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.69所示;或,所述重链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.73所示,且所述轻链可变区的氨基酸序列如序列表SEQ ID No.77所示。

[0013] 综上所述,上述氨基酸序列的编号如表1所示:

[0014] 表1 TPBG抗体蛋白序列编号

| 克隆号 | 重链蛋白 | | | | 轻链蛋白 | | | |
|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 可变区 | CDR1 | CDR2 | CDR3 | 可变区 | CDR1 | CDR2 | CDR3 |
| 12B12C7C3 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 5G4H10G5 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| [0015] 37H9C5G2 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
| 39A11G5F2 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 |
| 52C9E9F6 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 |
| 28D4E6A9 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 |
| 36A10D8B12 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 |
| 99E12C7H1 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 |
| [0016] 103E2E9C2 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 |
| 106D5G3D10 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 |

[0017] 其中,表1中的数字即为序列表中序列号,如12B12C7C3的重链蛋白可变区的氨基酸序列为SEQ ID No.1,而12B12C7C3的重链蛋白可变区中CDR1的氨基酸序列为SEQ ID No.2。

[0018] 较佳地,所述的蛋白质还包括抗体重链恒定区和/或抗体轻链恒定区,所述的抗体重链恒定区为本领域常规,较佳地为小鼠源抗体重链恒定区或人源抗体重链恒定区,更佳地为人源抗体重链恒定区。所述的抗体轻链恒定区为本领域常规,较佳地为小鼠源轻链抗体恒定区或人源抗体轻链恒定区,更佳地为人源抗体轻链恒定区。

[0019] 所述的蛋白质为本领域常规的蛋白质,较佳地为TPBG抗体,更佳地为抗体全长蛋白、抗原抗体结合域蛋白质片段、双特异性抗体、多特异性抗体、单链抗体(single chain antibody fragment, scFv)、单域抗体(single domain antibody, sdAb)和单区抗体(Single-domain antibody)中的一种或多种,以及上述抗体所制得的单克隆抗体或多克隆抗体。所述单克隆抗体可以由多种途径和技术进行研制,包括杂交瘤技术、噬菌体展示技术、单淋巴细胞基因克隆技术等,主流是通过杂交瘤技术从野生型或转基因小鼠制备单克隆抗体。

[0020] 所述的抗体全长蛋白为本领域常规的抗体全长蛋白,其包括重链可变区、轻链可变区、重链恒定区和轻链恒定区。所述的蛋白质的重链可变区和轻链可变区与人源重链恒定区和人源轻链恒定区构成全人源抗体全长蛋白。较佳地,所述的抗体全长蛋白为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0021] 所述的单链抗体为本领域常规的单链抗体,其包括重链可变区、轻链可变区和15~20个氨基酸的短肽。

[0022] 所述的抗原抗体结合域蛋白质片段为本领域常规的抗原抗体结合域蛋白质片段,其包括轻链可变区、轻链恒定区和重链恒定区的Fd段。较佳地,所述的抗原抗体结合域蛋白质片段为Fab和F(ab')₂。

[0023] 所述的单域抗体为本领域常规的单域抗体,其包括重链可变区和重链恒定区。

[0024] 所述的单区抗体为本领域常规的单区抗体,其仅包括重链可变区。

[0025] 其中,所述蛋白质的制备方法为本领域常规的制备方法。所述制备方法较佳地为:从重组表达该蛋白质的表达转化体中分离获得或者通过人工合成蛋白质序列获得。所述的从重组表达该蛋白质的表达转化体中分离获得优选如下方法:将编码所述蛋白质并且带有点突变的核酸分子克隆到重组载体中,将所得重组载体转化到转化体中,得到重组表达转化体,通过培养所得重组表达转化体,即可分离纯化获得所述蛋白质。

[0026] 本发明还提供一种核酸,其编码上述的蛋白质。

[0027] 较佳地,编码所述重链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.81、序列表SEQ ID No.83、序列表SEQ ID No.85、序列表SEQ ID No.87、序列表SEQ ID No.89、序列表SEQ ID No.91、序列表SEQ ID No.93、序列表SEQ ID No.95、序列表SEQ ID No.97或序列表SEQ ID No.99所示;和/或,编码所述轻链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.82、序列表SEQ ID No.84、序列表SEQ ID No.86、序列表SEQ ID No.88、序列表SEQ ID No.90、序列表SEQ ID No.92、序列表SEQ ID No.94、序列表SEQ ID No.96、序列表SEQ ID No.98或序列表SEQ ID No.100所示。

[0028] 更佳地,编码所述重链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.81所示,且编码所述轻链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.82所示;编码所述重链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.83所示,且编码所述轻链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.84所示;编码所述重链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.85所示,且编码所述轻链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.86所示;编码所述重链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.87所示,且编码所述轻链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.88所示;编码所述重链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.89所示,且编码所述轻链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.90所示;编码所述重链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.91所示,且编码所述轻链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.92所示;编码所述重链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.93所示,且编码所述轻链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.94所示;编码所述重链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.95所示,且编码所述轻链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.96所示;编码所述重链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.97所示,且编码所述轻链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.98所示;或,编码所述重链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.99所示,且编码所述轻链可变区的核酸的核苷酸序列如序列表SEQ ID No.100所示。

[0029] 综上所述,上述核苷酸序列的编号如表2所示:

[0030] 表2 TPBG抗体基因序列编号

[0031]

| 克隆号 | 重链蛋白可变区 | 轻链蛋白可变区 |
|-----------|---------|---------|
| 12B12C7C3 | 81 | 82 |
| 5G4H10G5 | 83 | 84 |
| 37H9C5G2 | 85 | 86 |

| | | |
|------------|----|-----|
| 39A11G5F2 | 87 | 88 |
| 52C9E9F6 | 89 | 90 |
| 28D4E6A9 | 91 | 92 |
| 36A10D8B12 | 93 | 94 |
| 99E12C7H1 | 95 | 96 |
| 103E2E9C2 | 97 | 98 |
| 106D5G3D10 | 99 | 100 |

[0032] 其中,表2中的数字即为序列表中序列号,如编码12B12C7C3的重链蛋白可变区的核苷酸序列为SEQ ID No.81。

[0033] 其中,编码12B12C7C3的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.81中的第91位至第105位;

[0034] 编码12B12C7C3的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.81中的第148位至第198位;

[0035] 编码12B12C7C3的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.81中的第295位至第327位;

[0036] 编码12B12C7C3的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.82中的第70位至第114位;

[0037] 编码12B12C7C3的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.82中的第160位至第180位;

[0038] 编码12B12C7C3的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.82中的第277位至第303位;

[0039] 编码5G4H10G5的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.83中的第91位至第105位;

[0040] 编码5G4H10G5的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.83中的第148位至第198位;

[0041] 编码5G4H10G5的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.83中的第295位至第330位;

[0042] 编码5G4H10G5的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.84中的第70位至第102位;

[0043] 编码5G4H10G5的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.84中的第148位至第168位;

[0044] 编码5G4H10G5的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.84中的第265位至第288位;

[0045] 编码37H9C5G2的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.85中的第91位至第105位;

[0046] 编码37H9C5G2的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.85中的第148位至第198位;

[0047] 编码37H9C5G2的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.85中的第295位至第327位;

- [0048] 编码37H9C5G2的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.86中的第70位至第102位；
- [0049] 编码37H9C5G2的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.86中的第148位至第168位；
- [0050] 编码37H9C5G2的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.86中的第265位至第291位。
- [0051] 编码39A11G5F2的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.87中的第91位至第105位；
- [0052] 编码39A11G5F2的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.87中的第148位至第198位；
- [0053] 编码39A11G5F2的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.87中的第295位至第315位；
- [0054] 编码39A11G5F2的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.88中的第70位至第102位；
- [0055] 编码39A11G5F2的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.88中的第148位至第168位；
- [0056] 编码39A11G5F2的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.88中的第265位至第291位。
- [0057] 编码52C9E9F6的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.89中的第91位至第105位；
- [0058] 编码52C9E9F6的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.89中的第148位至第198位；
- [0059] 编码52C9E9F6的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.89中的第295位至第315位；
- [0060] 编码52C9E9F6的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.90中的第70位至第102位；
- [0061] 编码52C9E9F6的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.90中的第148位至第168位；
- [0062] 编码52C9E9F6的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.90中的第265位至第291位。
- [0063] 编码28D4E6A9的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.91中的第91位至第105位；
- [0064] 编码28D4E6A9的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.91中的第148位至第198位；
- [0065] 编码28D4E6A9的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.91中的第295位至第327位；
- [0066] 编码28D4E6A9的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.92中的第70位至第102位；
- [0067] 编码28D4E6A9的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.92中

的第148位至第168位；

[0068] 编码28D4E6A9的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.92中的第265位至第291位。

[0069] 编码36A10D8B12的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.93中的第91位至第108位；

[0070] 编码36A10D8B12的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.93中的第151位至第198位；

[0071] 编码36A10D8B12的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.93中的第295位至第324位；

[0072] 编码36A10D8B12的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.94中的第70位至第102位；

[0073] 编码36A10D8B12的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.94中的第148位至第168位；

[0074] 编码36A10D8B12的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.94中的第265位至第291位。

[0075] 编码99E12C7H1的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.95中的第91位至第105位；

[0076] 编码99E12C7H1的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.95中的第148位至第198位；

[0077] 编码99E12C7H1的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.95中的第295位至第318位；

[0078] 编码99E12C7H1的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.96中的第70位至第102位；

[0079] 编码99E12C7H1的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.96中的第148位至第168位；

[0080] 编码99E12C7H1的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.96中的第265位至第291位。

[0081] 编码103E2E9C2的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.97中的第91位至第105位；

[0082] 编码103E2E9C2的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.97中的第148位至第198位；

[0083] 编码103E2E9C2的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.97中的第295位至第324位；

[0084] 编码103E2E9C2的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.98中的第70位至第105位；

[0085] 编码103E2E9C2的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.98中的第151位至第171位；

[0086] 编码103E2E9C2的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.98中的第268位至第294位。

[0087] 编码106D5G3D10的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.99中的第91位至第105位；

[0088] 编码106D5G3D10的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.99中的第148位至第198位；

[0089] 编码106D5G3D10的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.99中的第295位至第318位；

[0090] 编码106D5G3D10的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.100中的第70位至第99位；

[0091] 编码106D5G3D10的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.100中的第145位至第165位；

[0092] 编码106D5G3D10的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.100中的第262位至第294位。

[0093] 所述核酸的制备方法为本领域常规的制备方法,较佳地,包括以下的步骤:通过基因克隆技术获得编码上述蛋白质的核酸分子,或者通过人工全序列合成的方法得到编码上述蛋白质的核酸分子。

[0094] 本领域技术人员知晓,编码上述蛋白质的氨基酸序列的碱基序列可以适当引入替换、缺失、改变、插入或增加来提供一个多聚核苷酸的同系物。本发明中多聚核苷酸的同系物可以通过对编码该蛋白序列基因的一个或多个碱基在保持抗体活性范围内进行替换、缺失或增加来制得。

[0095] 本发明还提供一种包含所述核酸的重组表达载体。

[0096] 其中所述重组表达载体可通过本领域常规方法获得,即:将本发明所述的核酸分子连接于各种表达载体上构建而成。所述的表达载体为本领域常规的各种载体,只要其能够容载前述核酸分子即可。所述载体较佳地包括:各种质粒、粘粒、噬菌体或病毒载体等。

[0097] 本发明还提供一种包含上述重组表达载体的重组表达转化体。

[0098] 其中,所述重组表达转化体的制备方法为本领域常规的制备方法,较佳地为:将上述重组表达载体转化至宿主细胞中制得。所述的宿主细胞为本领域常规的各种宿主细胞,只要能满足使上述重组表达载体稳定地自行复制,且所携带所述的核酸可被有效表达即可。较佳地,所述宿主细胞为E.coli TG1或BL21细胞(表达单链抗体或Fab抗体),或者CHO-K1细胞(表达全长IgG抗体)。将前述重组表达质粒转化至宿主细胞中,即可得本发明优选的重组表达转化体。其中所述转化方法为本领域常规转化方法,较佳地为化学转化法,热激法或电转法。

[0099] 本发明还提供一种TPBG抗体的制备方法,其包括如下步骤:培养上述的重组表达转化体,从培养物中获得TPBG抗体。

[0100] 本发明提供一种免疫偶联物,其包括共价附着至细胞毒剂的上述的蛋白质。

[0101] 较佳地,所述的免疫偶联物中,上述的1当量的蛋白质通过x当量接头与y当量的细胞毒剂相连,具有如式1所示的结构,

[0102] $Ab-(L)_x-(D)_y$

[0103] 式1

[0104] 其中,Ab为上述的蛋白质;L为接头;D为细胞毒剂;所述x为本领域常规的连接度,x

为自然数,优选1-20的整数;y为0或自然数,优选0-20的整数;x和y各自独立地优选为1~2,或2~4,或4~8,或8~20的整数;x和y的比例优选为1:1。

[0105] 所述L是本领域常规的头(或称交联剂或偶联剂)。所述L包含2个官能团,即与抗体反应的基团,和与药物反应的基团(例如,醛或酮)。

[0106] 药物经由接头分子与上述的蛋白质偶联。所述L进入细胞后释放,其包括但不限于如下的官能团,活性酯、碳酸盐类、氨基甲酸酯类、亚胺磷酸酯、肟类、脞类、缩醛类、原酸酯类、氨基类、小肽段或核苷酸片段。

[0107] 较佳地,所述L主要含有式2所示结构,其为L中离去基团离去后对应的剩余部分;

[0108] $(\text{CO}-\text{Alk}^1-\text{Sp}^1-\text{Ar}-\text{Sp}^2-\text{Alk}^2-\text{C}(\text{Z}^1)=\text{Q}-\text{Sp})$

[0109] 式2

[0110] 其中,Alk¹和Alk²独立地是键或分支的或不分支的(C₁-C₁₀)亚烷基链;Sp¹是-S-、-O-、-CONH-、-NHCO-、-NR'-、-N(CH₂CH₂)₂N-、或-X-Ar'-Y-(CH₂)_n-Z,其中X、Y和Z是独立的键、-NR'-、-S-或-O-,条件是当n=0时,Y和Z中的至少一个必须是键,且Ar'是由(C₁-C₅)烷基、(C₁-C₄)烷氧基、(C₁-C₄)硫代烷氧基、卤素、硝基、-COOR'、-CONHR'、-(CH₂)_nCOOR'、S(CH₂)_nCOOR'、-O(CH₂)_nCONHR'或-S(CH₂)_nCONHR'的1、2或3个基团任选取代的1,2-、1,3-或1,4-亚苯基,n是0-5的整数,条件是当Alk¹是键时,Sp¹是键;R'是由-OH、(C₁-C₄)烷氧基、(C₁-C₄)硫代烷氧基、卤素、硝基、(C₁-C₃)二烷基氨基、或(C₁-C₃)三烷基铵-A的一个或2个基团任选取代的分支的或不分支的(C₁-C₅)链,其中A是完成盐的药学上可接受的阴离子;Ar是由(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₅)烷氧基、(C₁-C₄)硫代烷氧基、卤素、硝基、-COOR'、-CONHR'、-O(CH₂)_nCOOR'、-S(CH₂)_nCOOR'、-O(CH₂)_nCONHR'或-S(CH₂)_nCONHR'的1、2或3个基团任选取代的1,2-、1,3-或1,4-亚苯基,其中n和R'如上述的定义,或Ar是1,2-、1,3-、1,4-、1,5-、1,6-、1,7-、1,8-、2,3-、2,6-或2,7-亚萘基,其中亚萘基或吩噻嗪各任选地由(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₅)烷氧基、(C₁-C₄)硫代烷氧基、卤素、硝基、-COOR'、-CONHR'、-O(CH₂)_nCOOR'、-S(CH₂)_nCOOR'、或-S(CH₂)_nCONHR'的1、2、3或4个基团取代,其中n和R'如上文定义,条件是当Ar是吩噻嗪时,Sp¹是仅与氮连接的键;

[0111] Sp²是键、-S-或-O-,条件是当Alk²是键时,Sp²是键;

[0112] Z¹是H、(C₁-C₅)烷基、或由(C₁-C₅)烷基、(C₁-C₅)烷氧基、(C₁-C₄)硫代烷氧基、卤素、硝基、-COOR'、-CONHR'、-O(CH₂)_nCOOR'、-S(CH₂)_nCOOR'、-O(CH₂)_nCONHR'或-S(CH₂)_nCONHR'的1、2、或3个基团任选取代的苯基,其中n和R'如上文定义;

[0113] Sp是直链或支链二价或三价(C₁-C₁₈)基团,二价或三价芳基或杂芳基基团,二价或三价(C₃-C₁₈)环烷基或杂环烷基基团,二价或三价芳基或杂芳基-芳基(C₁-C₁₈)基团,二价或三价环烷基或杂环烷基-烷基(C₁-C₁₈)基团,或二价或三价(C₂-C₁₈)不饱和的烷基基团,其中杂芳基优选是咪唑基、噻吩基,N-甲基吡咯基、吡啶基、N-甲基咪唑基、噁唑基、嘧啶基。喹啉基、异喹啉基、N-甲基呋唑基、氨基豆素基、或吩噻嗪基、并且其中如果Sp是三价基团,那么Sp还可以由低级(C₁-C₅)二烷基氨基、低级(C₁-C₅)烷氧基、羟基、或低级(C₁-C₅)烷硫基任选取代;且,Q是=NHNCO-、=NHNCS-、=NHNCONH-、=NHNCSNH-或=NHO-。

[0114] 优选地,Alk¹是分支或不分支的(C₁-C₅)亚烷基链,Sp¹是键、-S-、-O-、-CONH-、-NHCO-或-NR',其中R'如上文定义,条件是当Alk¹是键时,Sp¹是键;

[0115] Ar是由(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₅)烷氧基、(C₁-C₄)硫代烷氧基、卤素、硝基、-COOR'、-

CONHR'、 $-O(CH_2)_nCOOR'$ 、 $-S(CH_2)_nCOOR'$ 、 $-O(CH_2)_nCONHR'$ 或 $-S(CH_2)_nCONHR'$ 的1、2或3个基团任选取代的1,2-、1,3-或1,4-亚苯基,其中n和R'如上文定义,或Ar是各自由C₁-C₆烷基、(C₁-C₅)烷氧基、(C₁-C₄)硫代烷氧基、卤素、硝基、 $-COOR'$ 、 $-CONHR'$ 、 $-O(CH_2)_nCOOR'$ 、 $-S(CH_2)_nCOOR'$ 、 $-O(CH_2)_nCONHR'$ 或 $-S(CH_2)_nCONHR'$ 的1、2、3或4个基团任选取代的1,2-、1,3-、1,4-、1,5-、1,6-、1,7-、1,8-、2,3-、2,6-或2,7-亚萘基。

[0116] Z¹是(C₁-C₅)烷基、或由(C₁-C₅)烷基、(C₁-C₄)烷氧基、(C₁-C₄)硫代烷氧基、卤素、硝基、 $-COOR'$ 、 $-CONHR'$ 、 $-O(CH_2)_nCOOR'$ 、 $-S(CH_2)_nCOOR'$ 、 $-O(CH_2)_nCONHR'$ 或 $-S(CH_2)_nCONHR'$ 的1、2、或3个基团任选取代的苯基;Alk²和Sp²均为键;且Sp和Q如仅在上文中所定义的。上述的键的含义为共价键。

[0117] 所述L优选为马来酰亚胺基己酰(maleimidocaproyl,MC)、马来酰亚胺基己酰-L-缬氨酸-L-瓜氨酸对氨基苄醇(MC-VC-PAB)或4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)。

[0118] 所述D为本领域常规的细胞毒剂,较佳地选自细胞毒素、化学治疗剂、放射性同位素、治疗性核酸、免疫调节剂、抗血管生成剂、抗增殖促凋亡剂或细胞溶解酶。

[0119] 其中,所述细胞毒素为本领域常规的细胞毒素,一般指抑制或阻止细胞功能和/或导致细胞破坏的活性剂。较佳地选自抗生素、微管蛋白聚合的抑制剂、烷化剂、蛋白合成抑制剂、蛋白激酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、蛋白激酶、磷酸酶、拓扑异构酶或细胞周期蛋白。更佳地选自多柔比星、柔红霉素、依达比星、阿柔比星、佐柔比星、米托蒽醌、表柔比星、卡柔比星、诺加霉素、美诺立尔、吡柔比星、戊柔比星、阿糖胞苷、吉西他滨、曲氟尿苷、安西他滨、依诺他滨、阿扎胞苷、去氧氟尿苷、喷司他丁、溴尿苷、卡培他滨、克拉屈滨、地西他滨、氟尿苷、氟达拉滨、谷氏菌素、嘌呤霉素、替加氟、噻唑羧胺核苷、阿霉素、顺铂、卡铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、长春碱、长春新碱、博来霉素、氮芥、强的松、甲基苄肼、氨甲喋呤、氟尿嘧啶、依托泊苷、泰素、泰素类似物、铂类(如顺铂和卡铂)、丝裂霉素、噻替派、紫杉烷、道诺红菌素、放线菌素、安曲霉素、氮丝氨酸、它莫西芬、多拉司他汀、奥瑞他汀及其衍生物、哈密特林、埃斯波霉素或美登素类化合物,最佳地选自甲基奥瑞他汀E(MMAE)、甲基奥瑞他汀F(MMAF)或N^{2'}-脱乙酰-N^{2'}-3-巯基-1-氧代丙基-美登素(DM1)。

[0120] 其中,所述化学治疗剂为本领域常规的化学治疗剂,较佳地选自烷化剂、烷基磺酸酯类化学治疗剂、氮丙啶类化学治疗剂、乙烯酰胺类和甲基密胺类化学治疗剂、氮芥、硝基脲类化学治疗剂、抗生素、抗代谢物、叶酸类化学治疗剂、嘌呤类似物、嘧啶类似物、雄激素、抗肾上腺素、叶酸补充剂、美登醇、多糖复合物、紫杉烷、铂类似物或类视黄醇,或者,其在药学上可接受的盐、酸和衍生物。

[0121] 所述的烷化剂为本领域常规的烷化剂,较佳地选自噻替派或环磷酰胺。所述的烷基磺酸酯类化学治疗剂为本领域常规的烷基磺酸酯类化学治疗剂,较佳地选自白消安、英丙舒凡或哌泊舒凡。所述的氮丙啶类化学治疗剂为本领域常规的氮丙啶类化学治疗剂,较佳地选自氮丙啶如、卡巴醌、美妥替哌或乌瑞替派。所述乙烯酰胺类和甲基密胺类化学治疗剂为本领域常规的乙烯酰胺类和甲基密胺类化学治疗剂,较佳地选自六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三亚乙基磷酰胺,三亚乙基硫代磷酰胺或三羟甲蜜胺。所述的氮芥为本领域常规的氮芥,较佳地选自苯丁酸氮芥、萘氮芥、雌氮芥(estramustine)、异环磷酰胺、氮芥、氧氮芥盐酸盐、苯丙氨酸氮芥、新氮芥、苯芥胆甾醇、泼尼氮芥、曲磷胺或尿嘧啶氮芥。所述硝基脲类

化学治疗剂为本领域常规的确基脲类化学治疗剂,较佳地选自卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀或雷莫司汀。所述抗生素为本领域常规的抗生素,较佳地选自阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素、氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素c、加力车霉素、卡柔比星、洋红霉素、嗜癌素、色霉素、更生霉素、柔红霉素、地托比星、6-重氨基-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星、依达比星、发波霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、紫菜霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链脲菌素、杀结核菌素、乌苯美司、静司他丁或佐柔比星。所述的抗代谢物为本领域常规的抗代谢物,较佳地选自氨甲喋呤或5-氟尿嘧啶(5-FU)。所述的叶酸类化学治疗剂为本领域常规的叶酸类化学治疗剂,较佳地选自二甲叶酸、蝶罗呤或三甲曲沙。所述的嘌呤类似物为本领域常规的嘌呤类似物,较佳地选自氟达拉滨、6-巯嘌呤、硫咪嘌呤或硫鸟嘌呤。所述的嘧啶类似物为本领域常规的嘧啶类似物,较佳地选自安西他滨、阿扎胞苷、6-阿扎尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷或5-EU。所述的雄激素为本领域常规的雄激素,较佳地选自卡普睾酮、丙酸甲雄烷酮、环硫雄醇、美雄烷或睾内酯。所述的抗肾上腺素为本领域常规的抗肾上腺素,较佳地选自安鲁米特、米托坦或曲洛司坦。所述的叶酸补充剂为本领域常规的叶酸补充剂,较佳地选自亚叶酸、醋葡全内酯、醛磷酰胺糖苷、氨基酮戊酸、安吡啶、阿莫司汀、比生群、依达曲沙、地磷酰胺、秋水仙胺、地吡醌、依氟鸟氨酸、依利醋铵、埃坡西龙、依托格鲁、硝酸镓、羟基脲、香菇多糖或氯尼达明。所述的美登醇为本领域常规的美登醇,较佳地选自美登素、安丝菌素、米托胍脲、米托蒽醌、莫派达醇、二胺硝吡啶、喷司他丁、蛋氨酸芥、吡柔比星、洛索蒽醌、鬼臼酸、2-乙基酰肼或丙卡巴肼。所述的多糖复合物为本领域常规的多糖复合物,较佳地选自雷佐生、根霉素、西佐喃、锗螺胺、细交链孢菌酮酸、三亚胺醌2,2',2''-三氯三乙胺、单端孢霉烯族毒素、乌拉坦、长春地辛、达卡巴嗪、甘露莫司汀、二溴甘露醇、二溴卫矛醇、呋泊溴烷、gacytosine、阿糖胞苷、环磷酰胺或噻替派。更佳地选自T-2毒素、疣孢菌素A、杆孢菌素A或anguidine。所述紫杉烷为本领域常规的紫杉烷,较佳地选自紫杉醇、无氢化蓖麻油、紫杉醇的白蛋白工程化纳米颗粒制剂(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)、多西他赛、苯丁酸氮芥、吉西他滨、6-硫代鸟嘌呤、巯嘌呤或甲氨蝶呤。所述的铂类似物为本领域常规的铂类似物,较佳地选自顺铂、卡铂、长春碱、依托泊苷、异环磷酰胺、米托蒽醌、长春新碱、诺安托、替尼泊苷、依达曲沙、道诺霉素、氨基蝶呤、卡培他滨伊班膦酸盐、CPT-11、拓扑异构酶抑制剂RFS 2000或二氟甲基鸟氨酸。所述的类视黄醇为本领域的类视黄醇,较佳地为视黄酸。

[0122] 其中,所述放射性同位素为本领域常规的放射性同位素,较佳地,其与上述蛋白质直接结合,或者通过螯合剂与上述蛋白质结合。更佳地,其与所述蛋白质的半胱氨酸残基直接结合。较佳地,所述放射性同位素选自适于放射治疗的 α -发射体、 β -发射体和俄歇电子以及适于诊断的正电子发射体或 γ -发射体。更佳地,所述放射性同位素选自¹⁸氟、⁶⁴铜、⁶⁵铜、⁶⁷镓、⁶⁸镓、⁷⁷溴、^{80m}溴、⁹⁵钷、⁹⁷钷、¹⁰³钷、¹⁰⁵钷、^{99m}锝、¹⁰⁷汞、²⁰³汞、¹²³碘、¹²⁴碘、¹²⁵碘、¹²⁶碘、¹³¹碘、¹³³碘、¹¹¹铟、¹¹³铟、^{99m}锝、¹⁰⁵锝、¹⁰¹锝、¹⁸⁶镱、¹⁸⁸镱、^{121m}碲、⁹⁹锝、^{122m}碲、^{125m}碲、¹⁶⁵铥、¹⁶⁷铥、¹⁶⁸铥、⁹⁰钪、²¹³铋、²¹³铅或²²⁵锕,或者其衍生的氮化物或氧化物。

[0123] 其中,所述治疗性核酸为本领域常规的核酸,较佳地为编码免疫调节剂、抗血管生成剂、抗增殖剂或促凋亡剂的基因。所述治疗剂包括所述治疗剂、其衍生物和所述治疗剂在药学上可接受的盐、酸及衍生物。

[0124] 其中,所述的免疫调节剂为本领域常规的免疫调节剂,即引发免疫应答,包括体液免疫应答(例如抗原特异性抗体的产生)和细胞介导的免疫应答(例如淋巴细胞增殖)的试剂。更佳地选自细胞因子、生长因子、激素、抗激素药、免疫抑制剂或皮质类固醇。所述细胞因子为本领域常规的细胞因子,更佳地选自黄嘌呤、白介素或干扰素。所述的生长因子为本领域常规的生长因子,更佳地选自TNF、CSF、GM-CSF或G-CSF。所述的激素为本领域常规的激素,更佳地选自雌激素、雄激素或孕激素。更佳地,所述的雌激素为已烯雌酚或雌二醇。更佳地,所述的雄激素为睾酮或氟甲睾酮。更佳地,所述的孕激素为乙酸甲地孕酮或乙酸甲羟孕酮。所述的皮质类固醇为本领域常规的皮质类固醇,更佳地选自强的松、地塞米松或化可的松。所述抗激素药为本领域常规的抗激素药,其能阻断激素对肿瘤的作用,抑制细胞因子生产,下调自身抗原表达、或掩蔽MHC抗原的免疫抑制剂。更佳地选自抗雌激素药、抗雄激素药或抗肾上腺素药。更佳地,所述抗雌激素药选自它莫西芬、雷洛昔芬、芳香酶抑制性4(5)-咪唑类、4-羟基它莫西芬、曲沃昔芬或托瑞米芬。所述抗雄激素药选自氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林或戈舍瑞林。所述免疫抑制剂为本领域常规的免疫抑制剂,更佳地选自2-氨基-6-芳基-5取代的嘧啶类、硫唑嘌呤、环磷酰胺、溴隐亭、达那唑、氨苯砜、戊二醛、针对MHC抗原和MHC片段的抗独特型抗体、环孢菌素A、类固醇例如糖皮质类固醇、链激酶、TGF β 、雷帕霉素、T细胞受体、T细胞受体片段、细胞因子受体拮抗剂或T细胞受体抗体。更佳地,所述细胞因子受体拮抗剂选自抗干扰素抗体、抗IL10抗体、抗TNF α 抗体或抗IL2抗体。

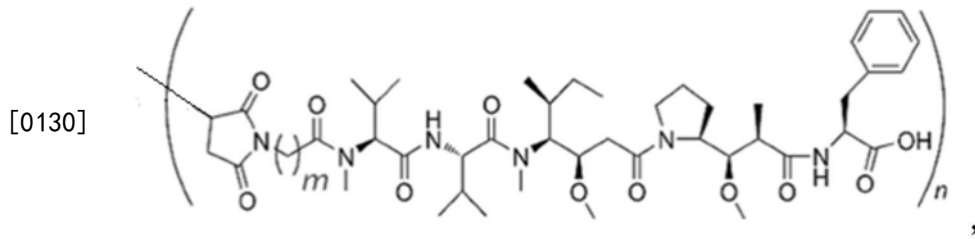
[0125] 其中,所述的抗血管生成剂为本领域常规的抗血管生成剂,更佳地选自法尼基转移酶抑制剂、COX-2抑制剂、VEGF抑制剂、bFGF抑制剂、类固醇硫酸酯酶抑制剂、白介素-24、凝血栓蛋白、metallopondin蛋白质、I类干扰素、白介素12、鱼精蛋白、血管他丁、层粘连蛋白、内皮他丁或催乳激素片段。更佳地为2-甲氧基雌二醇二氨基磺酸酯(2-MeOE2bisMATE)。

[0126] 其中,所述抗增殖促凋亡剂为本领域常规的抗增殖促凋亡剂,更佳地选自PPAR- γ 激活剂、类视黄醇、三萜类化合物、EGF受体抑制剂、端粒末端转移酶抑制剂、铁螯合剂、凋亡蛋白、Bcl-2和Bcl-X(L)的抑制剂、TNF- α /FAS配体/TNF相关的凋亡诱导配体及其信号传导的激活物或PI3K-Akt存活途径信号抑制剂。所述PPAR- γ 激活剂为本领域常规的PPAR- γ 激活剂,更佳地为环戊烯酮前列腺素(cyPGs)。所述三萜类化合物为本领域常规三萜类化合物,更佳地选自环菠萝蜜烷、羽扇豆烷、乌苏烷、齐敦果烷、木栓烷、达玛烷、葫芦素、柠檬苦素类似物或三萜类化合物。所述EGF受体抑制剂为本领域常规的EGF受体抑制剂,更佳地选自HER4、雷帕霉素或1,25-二羟基胆钙化醇(维生素D)。所述的铁螯合物为本领域常规的铁螯合物,更佳地为3-氨基吡啶-2-甲醛硫代缩氨基脲。所述的凋亡蛋白为本领域常规的凋亡蛋白,更佳地为鸡贫血病病毒的病毒蛋白质3-VP3。所述PI3K-Akt存活途径信号抑制剂为本领域常规的PI3K-Akt存活途径信号抑制剂,更佳地为UCN-01或格尔德霉素。

[0127] 其中,所述细胞溶解酶为本领域常规的细胞溶解酶,更佳地为RNA酶。

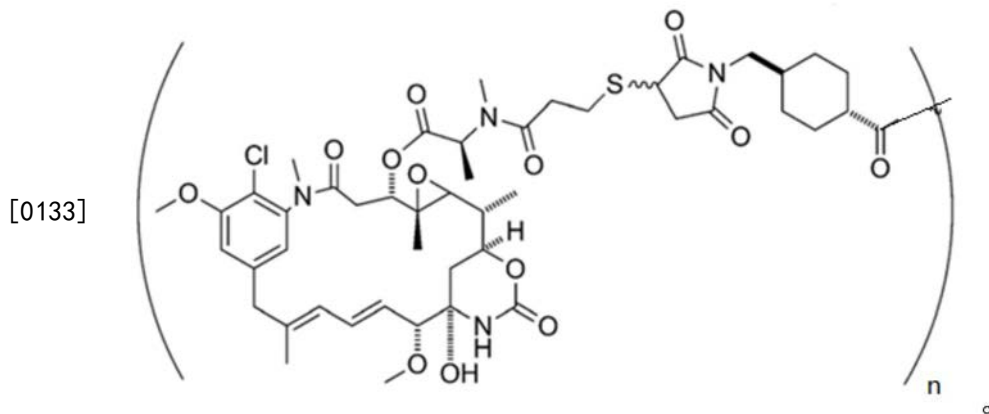
[0128] 本发明优选地,式1中 $x=y=n$;由此

[0129] 在一个优选实施例中, $-(L)_x-(D)_y$ 为:



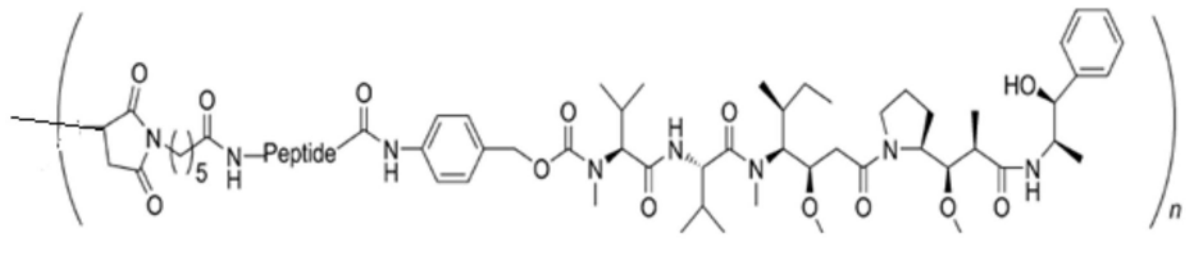
[0131] 其中m为1~10, 优选m为5。

[0132] 在一个优选实施例中, -(L)_x-(D)_y为:

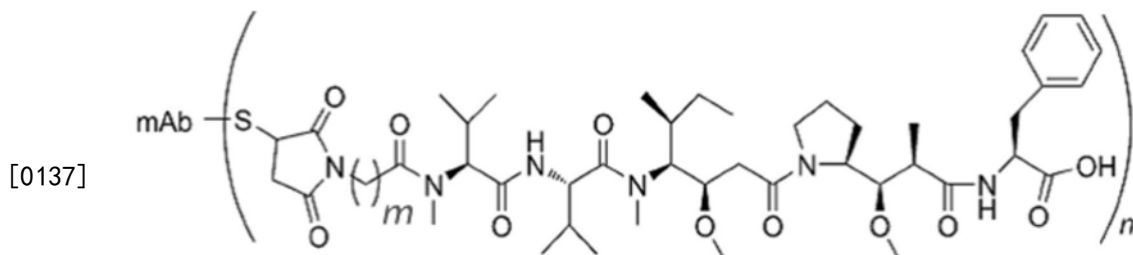


[0134] 在一个优选实施例中, -(L)_x-(D)_y为:

[0135]

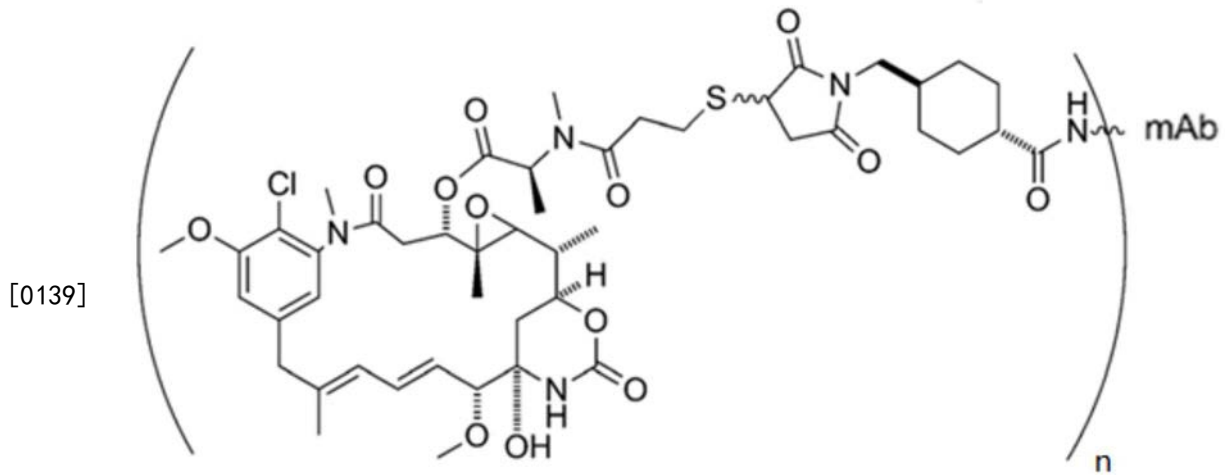


[0136] 最佳地, 所述D为微管蛋白合成酶抑制剂——甲基奥瑞他汀F (MMAF), 且所述接头L为马来酰亚胺基己酰 (maleimidocaproyl, MC), 所述免疫偶联物的结构如式3所示,



式 3

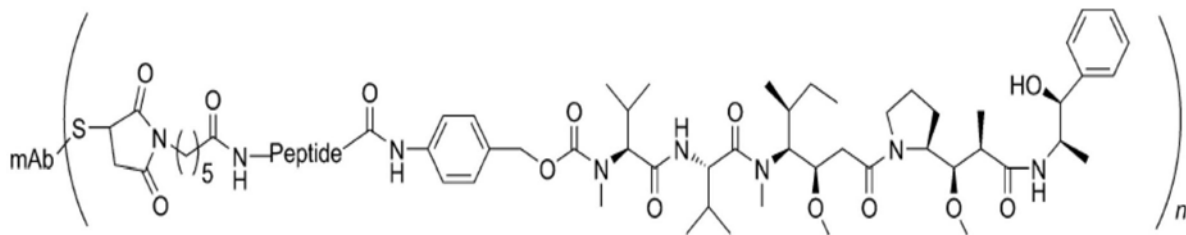
[0138] 或者, 所述L为4-(N-马来酰亚胺基甲基) 环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯; D为N2'-脱乙酰-N2'-3-巯基-1氧代丙基)-美登素 (DM1), 所述免疫偶联物的结构如式4所示,



式 4。

[0140] 或者,L为马来酰亚胺基己酰-L-缬氨酸-L-瓜氨酸对氨基苄醇,D为甲基奥瑞他汀E (MMAE),所述免疫偶联物的结构如式5所示,

[0141]



式 5

[0142] 其中,n为自然数,优选为1~20的整数,更优选为1~2,或2~4,或4~8,或8~20的整数。

[0143] 所述的免疫偶联物的制备方法为本领域常规,较佳地采用Doronina,2006, Bioconjugate Chem.17,114-124所记载的制备方法。较佳地,所述的制备方法产生具有最低限度的低偶联级分(LCF)小于10%的免疫偶联物。

[0144] 更佳地,所述的制备方法包括以下的步骤:将上述蛋白质经过pH6.5~8.5的硼酸钠缓冲液透析后,加入三(2-羧乙基)膦(TCEP),其中TCEP与上述蛋白质的摩尔比比率为2~10,室温下还原1~4小时,得反应液A。将反应液A洗脱去除多余的上述蛋白质得反应液B。向反应液B中加入MC-MMAF,其中MC-MMAF与纯化的TPBG抗体的摩尔比比率为5~20,10~37℃下反应4小时。

[0145] 所述的免疫偶联物能够以本领域所知的任何物理形态而存在,较佳地为澄清溶液。

[0146] 本发明还提供一种药物组合物,其包括上述的免疫偶联物和药学可接受的载体。

[0147] 所述的药学可接受的载体为本领域常规的载体,所述的载体可以为任意合适的生理学或药学上可接受的药物辅料。所述的药物辅料为本领域常规的药物辅料,较佳地包括药学上可接受的赋形剂、填充剂或稀释剂等。更佳地,所述的药物组合物包括0.01~

99.99%的上述蛋白质和0.01~99.99%的药用载体,所述百分比为占所述药物组合物的质量百分比。

[0148] 较佳地,所述的药物组合物是抗肿瘤的药物。更佳地为抗鳞状/腺瘤性肺癌(非小细胞肺癌)、浸润性乳腺癌、结肠癌、直肠癌、胃癌、鳞状宫颈癌、浸润性子官内膜腺癌、浸润性胰腺癌、卵巢癌、鳞状膀胱癌、绒毛膜癌、支气管癌、乳腺癌、子官颈癌、胰腺癌或精囊癌的药物。

[0149] 本发明所述的药物组合物的给药途径较佳地为肠胃外施用、注射给药或口服给药。所述注射给药较佳地包括静脉注射、肌肉注射、腹腔注射、皮内注射或皮下注射等途径。所述的药物组合物为本领域常规的各种剂型,较佳地为固体、半固体或液体的形式,即可以为水溶液、非水溶液或混悬液,更佳的为片剂、胶囊、颗粒剂、注射剂或输注剂等。更佳地为经由血管内、皮下、腹膜内或肌内施用。较佳地,所述药物组合物还可以作为气雾剂或粗喷雾剂施用,即经鼻施用;或者,鞘内、髓内或心室内施用。更佳地,所述的药物组合物还可以透皮、经皮、局部、肠内、阴道内、舌下或经直肠施用。

[0150] 本发明所述的药物组合物的给药剂量水平可以根据达到所需诊断或治疗结果的组合物量而调整。施用方案也可以为单次注射或多次注射,或进行调整。所选择的剂量水平和方案依赖于包括所述药物组合物的活性和稳定性(即,半衰期)、制剂、施用途径、与其他药物或治疗的组合、待检测和/或治疗的疾病或病症、以及待治疗的受试者的健康状况和先前医疗史等各种因素而进行合理地调整。

[0151] 对于本发明的所述药物组合物的治疗有效剂量可以最初在细胞培养实验或动物模型例如啮齿类动物、兔、犬、猪和/或灵长类动物中进行估计。动物模型也可以用于测定合适的施用浓度范围和途径。随后可以用于确定在人中施用的有用剂量和途径。一般地,施用有效量或剂量的确定和调整以及何时和如何进行此类调整的评估为本领域技术人员已知。

[0152] 对于组合疗法,上述蛋白质、上述免疫偶联物和/或另外的治疗或诊断剂可以各自作为单一药剂,在适合于执行预期治疗或诊断的任何时间范围内进行使用。因此,这些单一药剂可以基本上同时(即作为单一制剂或在数分钟或数小时内)或以按顺序连续施用。例如,这些单一药剂可以在一年内,或10、8、6、4或2个月内,或4、3、2、或1周内,或5、4、3、2或1天内施用。

[0153] 关于制剂、剂量、施用方案和可测量的治疗结果的另外指导,参见Berkow等人(2000)The Merck Manual of Medical Information(Merck医学信息手册)和Merck& Co.Inc.,Whitehouse Station,New Jersey;Ebadi(1998)CRC Desk Reference of Clinical Pharmacology(临床药理学手册)等著作。

[0154] 本发明提供一种上述的蛋白质在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0155] 本发明提供一种上述的免疫偶联物在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0156] 本发明提供一种上述的药物组合物在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0157] 本发明提供一种上述的蛋白质在治疗肿瘤中的应用。

[0158] 本发明提供一种上述的免疫偶联物在治疗肿瘤中的应用。

[0159] 本发明提供一种上述的药物组合物在治疗肿瘤中的应用。

[0160] 本发明还提供一种检测过表达TPBG蛋白的细胞的方法,包括如下的步骤:上述的蛋白质与待检样品在体外接触,检测上述的蛋白质与所述待检样品的结合即可。

[0161] 所述的过表达的含义为本领域常规, 较佳地为待检样品中, 细胞经过流式检测, 上述的蛋白质的平均荧光密度 (MFI) 值是亚型 IgG 的 MFI 值的 3 倍及以上。

[0162] 所述结合的检测方式是本领域常规的检测方式, 较佳地为 FACS 检测。

[0163] 本发明所述的“TPBG 阳性”的细胞即为过表达 TPBG 蛋白的细胞, 如 NCI-H1568 细胞株; 反之, 则称为“TPBG 阴性”的细胞, 如肿瘤细胞系 NCI-H1770。

[0164] 在符合本领域常识的基础上, 上述各优选条件, 可任意组合, 即得本发明各较佳实例。

[0165] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0166] 本发明的积极进步效果在于: 本发明所述的 TPBG 抗体是一嵌合抗体, 其与 TPBG 蛋白具有高度亲和力, 能够在蛋白水平和细胞水平结合 TPBG 蛋白受体的胞外区。所述的 TPBG 抗体与如 MC-MMAF 的小分子化合物偶联后得到一偶联物, 所述偶联物能够有效地对 TPBG 阳性细胞进行细胞毒杀伤作用。此外, TPBG 抗体能把小分子化合物, 如 MMAF, 通过内吞作用带入细胞, 并在细胞内降解释放小分子化合物, 从而起到细胞毒杀伤作用。因此所述的 TPBG 抗体制备的抗体交联药, 能够有效杀伤肿瘤细胞, 治疗肿瘤。

附图说明

[0167] 图1为人TPBG蛋白转染的HEK293细胞FACS筛选检测结果。

[0168] 图2为人TPBG蛋白转染的CHO-k1细胞FACS筛选检测结果。

[0169] 图3为食蟹猴TPBG蛋白转染的CHO-k1细胞FACS筛选检测结果。

[0170] 图4为小鼠TPBG蛋白转染的CHO-k1细胞FACS筛选检测结果。

[0171] 图5为ELISA检测TPBG免疫后小鼠血清抗体效价情况。

[0172] 图6A和图6B为ELISA检测TPBG抗体与人TPBG-hFc蛋白的结合反应。

[0173] 图7A和图7B为FACS检测TPBG抗体与CHOk1-hTPBG的结合反应。

[0174] 图8A和图8B为FACS检测TPBG抗体与CHOk1-cTPBG的结合反应。

[0175] 图9A和图9B为FACS检测TPBG抗体与CHOk1-mTPBG的结合反应。

[0176] 图10A和图10B为FACS检测TPBG抗体与CHO-k1的结合反应。

[0177] 图11A和图11B为TPBG抗体-MMAF抗体交联药对TPBG表达阳性非小肺癌细胞株NCI-H1568的细胞杀伤作用。

[0178] 图11C为TPBG抗体对TPBG表达阳性非小肺癌细胞株NCI-H1568的细胞杀伤作用。

[0179] 图12A和图12B为TPBG抗体-MMAF抗体交联药对TPBG表达阴性非小肺癌细胞株NCI-H1770的细胞杀伤作用。

[0180] 图13为TPBG嵌合抗体药物偶联物对TPBG阳性的肿瘤细胞系NCI-H1299的细胞杀伤作用。

[0181] 图14A为TPBG嵌合抗体12B12的抗体药物偶联物及其裸抗的治疗后的肿瘤体积变化图。

[0182] 图14B为TPBG嵌合抗体5G4的抗体药物偶联物及其裸抗的治疗后的肿瘤体积变化图。

[0183] 图14C为TPBG嵌合抗体39A11的抗体药物偶联物及其裸抗的治疗后的肿瘤体积变化图。

- [0184] 图14D为TPBG嵌合抗体28D4的抗体药物偶联物及其裸抗的治疗后的肿瘤体积变化图。
- [0185] 图14E为TPBG嵌合抗体36A10的抗体药物偶联物及其裸抗的治疗后的肿瘤体积变化图。
- [0186] 图15A为TPBG嵌合抗体12B12的抗体药物偶联物及其裸抗的治疗后的小鼠体重变化图。
- [0187] 图15B为TPBG嵌合抗体5G4的抗体药物偶联物及其裸抗的治疗后的小鼠体重变化图。
- [0188] 图15C为TPBG嵌合抗体39A11的抗体药物偶联物及其裸抗的治疗后的小鼠体重变化图。
- [0189] 图15D为TPBG嵌合抗体28D4的抗体药物偶联物及其裸抗的治疗后的小鼠体重变化图。
- [0190] 图15E为TPBG嵌合抗体36A10的抗体药物偶联物及其裸抗的治疗后的小鼠体重变化图。
- [0191] 图16A和16B分别为TPBG嵌合抗体12B12及其偶联了不同的小分子药的抗体药物偶联物对TPBG阳性的肿瘤细胞系NCI-H1299的细胞杀伤作用。
- [0192] 图16C和16D分别为TPBG嵌合抗体12B12及其偶联了不同的小分子药的抗体药物偶联物对TPBG阳性的肿瘤细胞系NCI-H1568的细胞杀伤作用。
- [0193] 图17A和17B为TPBG嵌合抗体药物偶联物对TPBG阳性的表达TPBG的293-hTPBG稳转细胞株的细胞杀伤作用。
- [0194] 图17C和17D为TPBG嵌合抗体药物偶联物对不表达TPBG的293细胞株的,细胞杀伤作用。

具体实施方式

[0195] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。

[0196] 实施例中所述的室温为本领域常规的室温,一般为10~30℃。

[0197] 若无特别说明,实施例中所述的PBS为PBS磷酸缓冲液,pH7.2。

[0198] 实施例1 TPBG抗体的制备

[0199] (一)免疫原A的制备

[0200] 将含有编码人源TPBG蛋白胞外区氨基酸序列32-355 (Ser32-Ser355) (其中,编码人源TPBG蛋白的核苷酸序列在Genebank的编号为Genebank ID:AAH37161.1)的核苷酸序列克隆到带有人IgG Fc片段(hFc)的pCpC载体(购自Invitrogen,V044-50)并按已建立的标准分子生物学方法制备质粒。具体方法参见Sambrook,J.,Fritsch,E.F.,and Maniatis,T.(1989).Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Second Edition(Plainview,New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press)。对HEK293细胞(购自Invitrogen)进行瞬时转染(聚醚酰亚胺PEI,购自Polysciences)并使用FreeStyle™ 293(购自Invitrogen)在37℃下进行扩大培养。4天后收集细胞培养液,离心去除细胞成分,得含TPBG蛋白胞外区

的培养上清液。将培养上清液上样到蛋白A亲和层析柱(Mabselect Sure,购自GE Healthcare),同时用紫外(UV)检测仪监测紫外吸收值(A280nm)的变化。上样后用PBS磷酸盐缓冲液(pH7.2)清洗蛋白A亲和层析柱直到紫外吸收值回到基线,然后用0.1M甘氨酸盐酸(pH2.5)洗脱,收集从蛋白A亲和层析柱上洗脱下来的带hFc标签的TPBG蛋白(即人源TPBG-hFc)。用PBS磷酸盐缓冲液(pH7.2)在4℃冰箱透析过夜。透析后的蛋白经0.22微米无菌过滤后分装于-80℃保存,即获得纯化的免疫原A。

[0201] 免疫原A在使用前需要进行一系列质控检测,如检测其蛋白浓度、纯度、分子量、生物活性等,结果发现免疫原A各项指标良好,能够作为抗原进行后续制备TPBG抗体的试验。

[0202] (二)、免疫原B的制备

[0203] 编码人源TPBG全长氨基酸序列的核苷酸序列(其中,编码人源TPBG蛋白的核苷酸序列在Genebank的编号为Genebank ID:AAH37161.1)被克隆到pIRES载体(购自Clontech)并制备质粒。对HEK293细胞系(-购自Invitrogen)进行质粒转染(PEI,购自Polysciences)后,在含0.5μg/ml的含10%(w/w)胎牛血清的DMEM培养基中选择性培养2周,用有限稀释法在96孔培养板中进行亚克隆,并置于37℃、5%(v/v)CO₂培养,大约2周后选择部分单克隆孔扩增到6孔板中。对扩增后的克隆用已知的TPBG抗体(购自Sigma,货号#SAB1404485)经流式细胞分析法进行筛选。选择长势较好、荧光强度较高、单克隆的细胞系继续扩大培养并液氮冻存,即获得免疫原B。具体选择结果如表3和图1所示,IgG亚型对照为小鼠IgG对照。表3说明,已经制得一系列TPBG阳性表达的HEK293细胞系。图1中,横坐标为细胞荧光强度,纵坐标为细胞数。图1的结果说明,5E5E9为TPBG高水平表达细胞株,其中抗TPBG抗体标记的细胞平均细胞荧光密度为216,迁移率为98.5%。

[0204] 表3人源TPBG蛋白转染的HEK293细胞FACS筛选检测结果

| 序号 | 转染细胞克隆号 | 细胞平均荧光密度 | |
|----|----------------|----------|---------|
| | | IgG 亚型对照 | TPBG 抗体 |
| 1 | 293F-hTPBG 4E1 | 5.2 | 145.0 |
| 2 | 293F-hTPBG 4A8 | 3.1 | 33.4 |
| 3 | 293F-hTPBG 4A9 | 6.3 | 203.9 |
| 5 | 293F-hTPBG 4B9 | 6.3 | 126.1 |
| 6 | 293F-hTPBG 4C3 | 3.2 | 27.2 |

[0205]

| | | | | |
|--------|----------------|-----------------|------|-------|
| [0206] | 7 | 293F-hTPBG 4C5 | 5.6 | 171.5 |
| | 8 | 293F-hTPBG 4E1 | 4.8 | 91.8 |
| | 9 | 293F-hTPBG 4F9 | 3.9 | 47.7 |
| | 10 | 293F-hTPBG 4G1 | 4.0 | 131.2 |
| | 11 | 293F-hTPBG 4G6 | 3.1 | 31.8 |
| | 12 | 293F-hTPBG 4H12 | 4.0 | 9.5 |
| | 13 | 293F-hTPBG 5E6 | 2.6 | 13.2 |
| | 15 | 293F-hTPBG 5A11 | 4.6 | 166.5 |
| | 16 | 293F-hTPBG 5A9 | 5.0 | 53.2 |
| | 17 | 293F-hTPBG 5C12 | 3.7 | 75.4 |
| | 18 | 293F-hTPBG 5D4 | 3.0 | 70.6 |
| | 19 | 293F-hTPBG 5E5 | 5.6 | 280.5 |
| | 20 | 293F-hTPBG 5G11 | 4.1 | 11.3 |
| | 21 | 293F-hTPBG 5G8 | 6.0 | 167.8 |
| 22 | 293F-hTPBG 5H6 | 3.0 | 36.4 | |

[0207] (三)、杂交瘤细胞的制备和抗体筛选

[0208] A、免疫原A免疫

[0209] 采用6~8周龄BALB/cAnNCr1小鼠或SJL/Jor11coCr1小鼠(均购自上海斯莱克公司),小鼠在SPF条件下饲养。初次免疫时,免疫原A用弗氏完全佐剂乳化后腹腔注射0.25mL,即每只小鼠注射50 μ g免疫原A蛋白。加强免疫时,免疫原A用弗氏不完全佐剂乳化后腹腔注射0.25mL,即每只小鼠注射50微克免疫原A。初次免疫与第一次加强免疫之间间隔2周,以后每次加强免疫之间间隔3周。每次加强免疫1周后采血,用ELISA和FACS检测血清中免疫原A的抗体效价和特异性,结果如图5和表4所示。表4说明,经免疫原A免疫的小鼠的免疫后血清对免疫原A均有不同程度的结合,呈现抗原抗体反应,其中最高稀释度在一百万左右。其中空白对照为1% (w/w) BSA,其中批次指第二次加强免疫后第七天的小鼠血清,表中的数据为OD_{450nm}值。

[0210] 表4 ELISA检测TPBG蛋白免疫后Balb/c小鼠血清抗体效价

[0211]

| OD _{450nm} | 血清稀释度 | | | | | | | |
|---------------------|--------|--------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| | 批次 | 1:100 | 1:10 ³ | 1:10 ⁴ | 1:10 ⁵ | 1:10 ⁶ | 1:10 ⁷ | 空白对照 |
| 731 (TB2) | 2.8722 | 2.8084 | 2.8186 | 1.5772 | 0.3892 | 0.1201 | 0.0935 | |
| 732 (TB2) | 2.8715 | 2.8171 | 2.857 | 1.2767 | 0.2601 | 0.1353 | 0.0985 | |
| 733 (TB2) | 2.8411 | 2.8841 | 2.9258 | 1.7943 | 0.3336 | 0.1178 | 0.1418 | |
| 734 (TB2) | 2.8735 | 2.8503 | 2.861 | 1.3150 | 0.3052 | 0.1129 | 0.1365 | |
| 735 (TB2) | 2.9460 | 2.9859 | 2.9761 | 1.9749 | 0.4203 | 0.1463 | 0.1531 | |

[0212] B、免疫原B免疫

[0213] 采用6~8周龄BALB/cAnNCr1小鼠或SJL/Jor11coCr1小鼠(均购自上海斯莱克公司),小鼠在SPF条件下饲养。含有编码人源TPBG全长氨基酸序列的核苷酸序列的pIRES质粒[参见实施例1步骤(二)]转染HEK293细胞系,得含有人源TPBG的HEK293稳定细胞系(转染使用X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent,购自Roche公司,货号Cat#06 366 236 001,并按说明书操作)。在T-75细胞培养瓶中扩大培养至90%汇合度,吸尽培养基,用DMEM基础培养基(购自Invitrogen)洗涤2次,然后用无酶细胞解离液(购自Invitrogen)37℃处理直至细胞从培养皿壁上可脱落,收集细胞。用DMEM基础培养基洗涤2次,进行细胞计数后将细胞用磷酸盐缓冲液稀释至 2×10^7 细胞/mL。每只小鼠每次免疫时腹腔注射0.5mL细胞悬液。第一次与第二次免疫之间间隔2周,以后每次免疫间隔3周。除第一次免疫以外,每次免疫1周后采血,用FACS检测血清中抗体效价和特异性。在第二次加强免疫后,FACS检测血清抗体效价达到1:1000以上。

[0214] A~B步骤完成前,将所选择的每只小鼠最后一次免疫腹腔注射100微克纯化的免疫原A(针对免疫原A进行免疫反应的小鼠)或含有人源TPBG的HEK293稳定细胞系(针对免疫原B进行免疫反应的小鼠),5天后处死小鼠,收集脾细胞。加入NH₄OH至终浓度1%(w/w),裂解脾细胞中参杂的红细胞,获得脾细胞悬液。用DMEM基础培养基1000转每分钟离心清洗细胞3次,然后按照活细胞数目5:1比率与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0(购自ATCC)混合,采用高效电融合方法(参见METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 220)进行细胞融合。融合后的细胞稀释到含20%(w/w)胎牛血清、 $1 \times$ HAT的DMEM培养基中。然后按 $1 \times 10^5/200$ 微升每孔加入到96孔细胞培养板中,放入5%(v/v) CO₂、37℃培养箱中培养。14天后用ELISA和Acumen(微孔板细胞检测法)筛选细胞融合板上清,将ELISA中OD_{450nm}>1.0和Acumen中MFI值>100的阳性克隆扩增到24孔板,在含10%(w/w)HT胎牛血清的DMEM(invitrogen)中,于37℃、5%(v/v) CO₂条件下扩大培养。培养3天后取24孔板中扩大培养的培养液进行离心,收集上清液,对上清液进行抗体亚型分析,用ELISA、FACS确定对TPBG蛋白和TPBG阳性细胞的结合活性(结合活性的检测方法分别参见实施例3A和实施例3B中的相关内容),以及小鼠源TPBG抗体-MMAF间接细胞毒杀伤实验(间接细胞毒杀伤活性检测方法参见实施例4中的相关内容)。

[0215] 根据24孔板筛选结果,挑选ELISA实验中OD_{450nm}>1.0、FACS实验中MFI值>50和间接细胞毒杀伤实验中杂交瘤细胞培养上清对TPBG阳性细胞杀伤率达到50%的杂交瘤细胞为符合条件的阳性克隆,选择符合条件的杂交瘤细胞用有限稀释法在96孔板进行亚克隆,在

含10% (w/w) FBS的DMEM培养基中(购自invitrogen) 37℃、5% (v/v) CO₂条件下培养。亚克隆后10天用ELISA和Acumen进行初步筛选,挑选单个阳性单克隆扩增到24孔板继续培养。3天后用FACS确定抗原结合阳性并用小鼠源TPBG抗体-MMAF间接细胞毒杀伤实验评估生物活性,评估标准为ELISA实验中OD_{450nm}>1.0、FACS实验中MFI值>50和间接细胞毒杀伤实验中杂交瘤细胞培养上清对TPBG阳性细胞杀伤率达到50%及以上。

[0216] 根据24孔板样品检测结果,挑选出最优的克隆,并于含10% (w/w) FBS的DMEM培养基中(购自invitrogen) 在37℃、5% (v/v) CO₂条件下将该最优的克隆进行扩大培养,液氮冻存即得本发明杂交瘤细胞,并可用于后续的获得先导抗体、生产和纯化抗体。

[0217] 实施例2先导抗体的生产和纯化

[0218] 杂交瘤细胞产生的抗体浓度较低,大约仅1-10μg/mL,浓度变化较大。且培养基中细胞培养所产生的多种蛋白和培养基所含胎牛血清成分对很多生物活性分析方法都有不同程度的干扰,因此需要进行小规模(1-5mg)抗体生产纯化。

[0219] 将实施例1所得的杂交瘤细胞接种到T-75细胞培养瓶并用生产培养基(Hybridoma serum free medium,购自Invitrogen公司)驯化传代3代。待其生长状态良好,接种细胞培养转瓶。每个2升的培养转瓶中加入200mL生产培养基,接种细胞密度为 1.0×10^5 /mL。盖紧瓶盖,将转瓶置于37℃培养箱中的转瓶机上,转速3转/分钟。连续旋转培养14天后,收集细胞培养液,过滤去除细胞,并用0.45μm的滤膜过滤至培养上清液澄清,得澄清的杂交瘤细胞的培养上清液。澄清的杂交瘤细胞的培养上清液可立即进行纯化或于-30℃冻存。

[0220] 将获得的培养上清液(200mL)中的TPBG抗体用2mL蛋白A柱(购自GE Healthcare)纯化。蛋白G柱先用平衡缓冲液(PBS磷酸缓冲液,pH7.4)平衡,然后将培养上清液上样到蛋白A柱,控制流速在3mL/分钟。上样完毕后用平衡缓冲液清洗蛋白G柱,平衡缓冲液的体积为蛋白A柱柱床体积的4倍。用洗脱液(0.1M柠檬酸钠缓冲液,pH3.5)洗脱结合在蛋白A柱上的TPBG抗体,用紫外检测器监测洗脱情况(A_{280nm}紫外吸收峰)。收集洗脱的抗体,加入10% (v/v) 1.0M Tris-HCl缓冲液中和pH,然后立即用PBS磷酸缓冲液透析过夜,第二天换液1次并继续透析3小时。收集透析后的TPBG抗体,用0.22μm的滤器进行无菌过滤,无菌保存,即得纯化的TPBG抗体。

[0221] 将纯化的TPBG抗体进行蛋白浓度(A_{280nm}/1.4)、纯度、内毒(Lonza试剂盒)等检测分析,结果如表5所示,表5说明,抗体最终产品内毒素浓度在1.0EU/mg以内。

[0222] 表5纯化的TPBG抗体检测分析

| [0223] | 克隆号 | 抗体纯度 | 蛋白浓度 (mg/mL) | 内毒素 (EU/mg) |
|--------|-----|------|-----------------|----------------|
| | | | | |

| | | | | |
|--------|------------|-------|------|-------|
| [0224] | 12B12C7C3 | > 90% | 0.82 | <0.12 |
| | 5G4H10G5 | > 90% | 0.68 | <0.12 |
| | 37H9C5G2 | > 90% | 0.65 | <0.12 |
| | 39A11G5F2 | > 90% | 0.85 | <0.12 |
| | 52C9E9F6 | > 90% | 1.2 | <0.12 |
| | 28D4E6A9 | > 90% | 1.02 | <0.12 |
| | 36A10D8B12 | > 90% | 0.28 | <0.12 |
| | 99E12C7H1 | > 90% | 1.12 | <0.12 |
| | 103E2E9C2 | > 90% | 0.73 | <0.12 |
| | 106D5G3D10 | > 90% | 0.54 | <0.12 |

[0225] 实施例3先导抗体的检定

[0226] A、酶联免疫吸附实验(ELISA)检测TPBG抗体与TPBG蛋白的结合

[0227] 对实施例2所得的纯化的TPBG抗体进行与人源TPBG-hFc蛋白(免疫原A)进行反应。

[0228] 将实施例1获得的纯化的免疫原A(其制备方法参见实施例1步骤(一))用PBS稀释到终浓度1.0 μ g/mL,然后以100 μ L每孔加到96孔ELISA板。用塑料膜封好4 $^{\circ}$ C孵育过夜,第二天用洗板液[含0.01% (v/v) Tween20的PBS]洗板2次,加入封闭液[含0.01% (v/v) Tween20和1% (w/w) BSA的PBS]室温封闭2小时。倒掉封闭液,加入实施例2所得的纯化的TPBG抗体100 μ L每孔。37 $^{\circ}$ C孵育2小时后,用洗板液[含0.01% (v/v) Tween20的PBS]洗板3次。加入HRP(辣根过氧化物酶)标记的二抗(购自Sigma),37 $^{\circ}$ C孵育2小时后,用洗板液[含0.01% (v/v) Tween20的PBS]洗板3次。加入TMB底物100 μ L每孔,室温孵育30分钟后,加入终止液(1.0N HCl)100 μ L每孔。用ELISA读板机(SpectraMax 384plus,购自Molecular Device)读取A_{450nm}数值,结果如图6和表6所示,表6说明,纯化的TPBG抗体与TPBG重组蛋白在ELISA水平结合。表6中IgG对照为对照小鼠IgG,表中的数据为OD_{450nm}值,Blank的含义为板中只有PBS缓冲液时的OD_{450nm}值。

[0229] 表6 ELISA检测TPBG抗体与人TPBG-hFc蛋白的结合反应

| OD _{450nm} | 抗体浓度 (nM) | | | | | | | | |
|---------------------|------------|------|------|------|------|------|-------|--------|-------|
| | 克隆号 | 200 | 20 | 2 | 0.2 | 0.02 | 0.002 | 0.0002 | Blank |
| [0230] | 12B12C7C3 | 2.82 | 2.83 | 2.84 | 1.67 | 0.29 | 0.13 | 0.10 | 0.11 |
| | 5G4H10G5 | 2.72 | 2.80 | 2.68 | 1.76 | 0.34 | 0.10 | 0.08 | 0.07 |
| | 37H9C5G2 | 2.61 | 2.63 | 2.52 | 1.55 | 0.35 | 0.11 | 0.09 | 0.09 |
| | 39A11G5F2 | 2.55 | 2.50 | 2.43 | 1.36 | 0.30 | 0.11 | 0.09 | 0.09 |
| | 52C9E9F6 | 2.65 | 2.69 | 2.68 | 1.39 | 0.27 | 0.12 | 0.09 | 0.08 |
| | 28D4E6A9 | 2.60 | 2.59 | 2.64 | 1.97 | 0.46 | 0.14 | 0.10 | 0.09 |
| | 36A10D8B12 | 2.51 | 3.07 | 3.06 | 2.15 | 0.51 | 0.18 | 0.16 | 0.19 |
| | 99E12C7H1 | 2.93 | 2.88 | 2.93 | 2.62 | 0.78 | 0.21 | 0.11 | 0.08 |
| | 103E2E9C2 | 2.60 | 2.62 | 2.64 | 1.89 | 0.48 | 0.14 | 0.10 | 0.13 |
| | 106D5G3D10 | 2.88 | 2.82 | 2.81 | 2.36 | 0.56 | 0.16 | 0.11 | 0.10 |
| | IgG 对照 | 0.24 | 0.11 | 0.10 | 0.11 | 0.10 | 0.10 | 0.11 | 0.11 |

[0231] B、流式细胞实验 (FACS) 检测TPBG抗体与TPBG表达细胞的结合

[0232] 将实施例1步骤(二)中所述含有编码人源TPBG全长氨基酸序列的核苷酸序列的pIRES质粒转染CHO-k1细胞株得含人源TPBG的CHO-k1稳定细胞株(此处称为CHOk1-hTPBG稳定细胞株)。类似地,将带有猴源TPBG全长基因的pIRES质粒(其制备方法与实施例1步骤(一)“免疫原A的制备”中带有人源IgG Fc片段(hFc)的pCpC载体的制备方法相同,食蟹猴TPBG全长氨基酸序列(Genebank ID:BAE00432.1)转染CHO-k1细胞株得含猴TPBG的CHO-k1稳定细胞株(此处称为CHOk1-cTPBG稳定细胞株)。将带有小鼠源TPBG全长基因的pIRES质粒(其制备方法与实施例1步骤(一)“免疫原A的制备”中带有人源IgG Fc片段(hFc)的pCpC载体的制备方法相同,小鼠TPBG全长氨基酸序列(Genebank ID:CAA09931.1)转染CHO-k1细胞株得含小鼠TPBG的CHO-k1稳定细胞株(此处称为CHOk1-mTPBG稳定细胞株)。

[0233] 用FACS检测血清中TPBG抗体的效价和特异性,检测方法参见实施例1步骤(二)“免疫原B的制备”中鉴定HEK293-hTPBG稳定细胞株的方法。检测结果如表7和图2~4所示,图2~4中横坐标为细胞荧光强度,纵坐标为细胞数。其中,CHOk1-hTPBG 3A2F1为用来筛选的人TPBG表达细胞株,其FACS筛选检测结果如图2所示;CHOk1-cTPBG 3F13G4为用来筛选的食蟹猴TPBG表达细胞株,其FACS筛选检测结果如图3所示;CHOk1-mTPBG3A3为用来筛选的小鼠TPBG表达细胞株,其FACS筛选检测结果如图4所示。表7的结果说明,CHOk1-hTPBG稳定细胞株、CHOk1-cTPBG稳定细胞株和CHOk1-mTPBG稳定细胞株的细胞膜上分别过表达人、猴或小鼠的TPBG蛋白,其可以用于筛选TPBG抗体。

[0234] 表7人/猴/小鼠TPBG转染的CHO-k1细胞FACS筛选检测结果

| 转染细胞克隆号 | 细胞平均荧光密度 | |
|--------------------------|----------|-----------|
| | 对照 IgG | 抗 TPBG 抗体 |
| [0235] CHOk1-hTPBG 3A2F1 | 3.24 | 798.37 |
| CHOk1-cTPBG 3F13G4 | 2.66 | 198.35 |
| CHOk1-mTPBG 3A3 | 2.38 | 135.25 |

[0236] 将CHOk1-hTPBG稳定细胞株、CHOk1-cTPBG稳定细胞株、CHOk1-mTPBG稳定细胞株(即表7所示的CHOk1-hTPBG 3A2F1、CHOk1-cTPBG 3F13G4和CHOk1-mTPBG 3A3)以及CHO-k1细胞分别在T-75细胞培养瓶中扩大培养至90%汇合度,吸尽培养基,用HBSS缓冲液(Hanks Balanced Salt Solution)(购自Invitrogen)洗涤2次,然后用无酶细胞解离液(Versene solution:购自Life technology公司)处理和收集细胞。用HBSS缓冲液洗涤细胞2次,进行细胞计数后将细胞用HBSS缓冲液稀释至 2×10^6 个细胞/mL,加入10%山羊血清封闭液,所述百分比为质量百分比,冰上孵育30分钟,然后用HBSS缓冲液离心洗涤2次。将收集的细胞用FACS缓冲液(HBSS+1%BSA,所述百分比为质量百分比)悬浮至 2×10^6 个细胞/mL,按每孔100微升加入到96孔FACS反应板中,加入实施例2所得的纯化的TPBG抗体待测样品每孔100微升,冰上孵育2小时。用FACS缓冲液离心洗涤2次,加入每孔100微升荧光(Alexa 488)标记的二抗(购自Invitrogen),冰上孵育1小时。用FACS缓冲液离心洗涤3次,加入每孔100微升固定液[4% (v/v) 多聚甲醛]重悬细胞,10分钟后用FACS缓冲液离心洗涤2次。用100微升FACS缓冲液悬浮细胞,用FACS (FACS Calibur, 购自BD公司) 检测和分析结果。通过软件(CellQuest)进行数据分析,得到细胞的平均荧光密度(MFI)。再通过软件(GraphPad Prism5)分析,进行数据拟合,计算EC50值。分析结果如表8以及图7~10所示,图7~10的数据为细胞的平均荧光密度(MFI)。表8中的数据为根据MFI计算得到的EC50值。表8说明,TPBG抗体可结合细胞表面的TPBG蛋白。

[0237] 表8 FACS分析TPBG抗体与人/猴/小鼠TPBG表达细胞株结合活性

[0238]

| 克隆号 | EC50 (nM) | | | |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| | CHOk1-hTPBG | CHOk1-cTPBG | CHOk1-mTPBG | CHOk1 |
| 12B12C7C3 | 0.65 | 0.59 | 阴性 | 阴性 |
| 5G4H10G5 | 1.75 | 0.84 | 9.07 | 阴性 |
| 37H9C5G2 | 0.94 | 0.62 | 11.05 | 阴性 |
| 39A11G5F2 | 2.34 | 1.35 | 1.88 | 阴性 |
| 52C9E9F6 | 3.27 | 1.54 | 阴性 | 阴性 |
| 28D4E6A9 | 0.63 | 0.25 | 阴性 | 阴性 |
| 36A10D8B12 | 0.94 | 0.60 | 阴性 | 阴性 |
| 99E12C7H1 | 3.54 | 2.29 | 阴性 | 阴性 |
| 103E2E9C2 | 0.85 | 0.83 | 阴性 | 阴性 |
| 106D5G3D10 | 1.72 | 1.26 | 阴性 | 阴性 |

[0239] 实施例4 TPBG抗体药物偶联物的细胞杀伤活性实验

[0240] 将实施例2所得的纯化的TPBG抗体经过pH 6.5~8.5的硼酸钠缓冲液透析后,加入三(2-羧乙基)膦(TCEP),其中TCEP与纯化的TPBG抗体的摩尔比比率为2,室温下还原1小时,得反应液A。将反应液A经过G25柱脱盐(购自GE),去除多余的TCEP,得反应液B。向反应液B中加入MC-MMAF(购自南京联宁),其中MC-MMAF与纯化的TPBG抗体的摩尔比比率为5,室温下反应4小时。再加入半胱氨酸用以中和多余的MC-MMAF,并通过G25柱脱盐除去多余的小分子。得到纯化的TPBG抗体药物偶联物(偶联方法参见Doronina,2006,Bioconjugate Chem.17,114-124)。通过HIC分析药物的交联率、纯度等参数后,进行细胞毒活性的分析。所有抗体偶联物的药物交联率(DAR)为8。其中,DAR(drug antibody ratio)指抗体偶联后一个抗体分子上携带的小分子药物的平均数量。

[0241] 将获得的纯化的TPBG抗体药物偶联物分别用完全培养基进行梯度稀释,96孔细胞培养板以2000细胞/孔加入100微升TPBG阳性的NCI-H1568细胞株(购自ATCC,货号#CRL5876)细胞悬液过夜培养后,每孔分别加入10微升不同浓度的纯化的TPBG抗体药物偶联物的稀释液,继续培养5天后,用CellTiter-Glo试剂盒(购自Promega,使用方法参照产品说明书)检测细胞活力。同时选用TPBG阴性的肿瘤细胞系NCI-H1770(购自ATCC,货号#CRL5893)进行细胞杀伤活性检测,方法同上。结果如表9以及图11-12所示,其中表9的EC50指药物作用后,细胞的活性受到抑制的半数有效量,能够通过检测细胞的活性从而反映细胞杀伤活性。其中,图11A和11B为纯化的TPBG抗体药物偶联物对TPBG阳性的肿瘤细胞系NCI-H1568的细胞杀伤活性检测,图12A和12B为纯化的TPBG抗体药物偶联物对TPBG阴性的肿瘤细胞系NCI-H1770的细胞杀伤活性检测。结果说明,纯化的TPBG抗体药物偶联物对TPBG阳性的细胞有杀伤作用。

[0242] 此外还检测了单独使用实施例2所得的纯化的TPBG抗体对细胞的杀伤作用,使用同实施例4中TPBG抗体药物偶联物进行细胞杀伤活性检测的方法进行检测。结果如表9以及

图11C所示,结果说明,单独的纯化的TPBG抗体对TPBG阳性的细胞并没有显著的杀伤作用。

[0243] 表9细胞杀伤实验检测纯化的TPBG抗体药物偶联物对TPBG阳性细胞的特异性杀伤作用

| [0244] | 克隆号 | 交联率 | EC50 (nM) | |
|--------|-----------------|-----|--------------|--------------|
| | | | NCI-1568 (+) | NCI-1770 (-) |
| | 12B12C7C3-MMAF | 8 | 0.042 | 阴性 |
| | 5G4H10G5-MMAF | 8 | 0.626 | 阴性 |
| | 37H9C5G2-MMAF | 8 | 0.120 | 阴性 |
| | 39A11G5F2-MMAF | 8 | 0.285 | 阴性 |
| | 52C9E9F6-MMAF | 8 | 1.485 | 阴性 |
| | 28D4E6A9-MMAF | 8 | 0.038 | 阴性 |
| | 36A10D8B12-MMAF | 8 | 0.066 | 阴性 |
| [0245] | 99E12C7H1-MMAF | 8 | 0.844 | 阴性 |
| | 103E2E9C2-MMAF | 8 | 0.135 | 阴性 |
| | 106D5G3D10-MMAF | 8 | 0.208 | 阴性 |
| | 12B12C7C3 | 0 | 阴性 | 阴性 |
| | 5G4H10G5 | 0 | 阴性 | 阴性 |
| | 39A11G5F2 | 0 | 阴性 | 阴性 |
| | 28D4E6A9 | 0 | 阴性 | 阴性 |
| | 36A10D8B12 | 0 | 阴性 | 阴性 |

[0246] 实施例5竞争性ELISA检测分析TPBG抗体与抗原的表位分布

[0247] 为了鉴定抗体对抗原的结合位点,采用竞争ELISA的方法对TPBG抗体进行分组。

[0248] 纯化的待测抗体用PBS稀释至1 μ g/mL,以50 μ L/孔包被96孔高吸附酶标板,4 $^{\circ}$ C过夜包被后用250微升封闭液[含有0.01% (v/v) Tween20和1% (w/w) BSA的PBS]进行室温一小时封闭,每孔加入0.05 μ g/mL的生物素标记的重组TPBG蛋白。同时加入5 μ g/mL的竞争抗体,即实施例2所得的纯化的TPBG抗体,其克隆号分别为12B12C7C3、5G4H10G5、37H9C5G2、39A11G5F2、52C9E9F6、28D4E6A9、36A10D8B12、99E12C7H1、103E2E9C2和106D5G3D10,并于25-37 $^{\circ}$ C孵育1-2小时。用洗板液[含有0.01% (v/v) Tween20的PBS]洗板3次,加入HRP(辣根过氧化物酶)标记的链亲和素(购自Sigma)。37 $^{\circ}$ C孵育0.5小时后,用洗板液[含有0.01% (v/v) Tween20的PBS]洗板3次。加入TMB底物100 μ L每孔,室温孵育30分钟后,加入终止液(1.0N HCl) 100 μ L每孔。用ELISA读板机(SpectraMax 384plus,购自Molecular Device)读取A_{450nm}数值,结果如图6所示。根据A_{450nm}数值,计算出抗体相互之间的竞争率,结果如表10所示。竞争率的数值越高,表示两个抗体的抗原表面越是接近。

[0249] 表10 TPBG抗体相互之间的竞争率

[0250]

| A \ B | 12B12 C7C3 | 106D5 G3D1 0 | 5G4H 10G5 | 99E12 C7H1 | 37H9C 5G2 | 36A10 D8B12 | 39A11 G5F2 | 52C9E 9F6 | 28D4E 6A9 | 103E2 E9C2 |
|----------------|---------------|--------------------|--------------|---------------|--------------|----------------|---------------|--------------|--------------|---------------|
| 12B12C 7C3 | 97% | 96% | 47% | 25% | 1% | 3% | 0% | 4% | 74% | 0% |
| 106D5 G3D10 | 95% | 94% | 40% | 11% | 3% | 1% | 1% | 0% | 1% | 0% |
| 5G4H1 0G5 | 9% | 3% | 97% | 95% | 5% | 1% | 10% | 19% | -1% | 2% |
| 99E12C 7H1 | 11% | 12% | 95% | 94% | 5% | 8% | 1% | 0% | 38% | 1% |
| 37H9C 5G2 | 6% | 4% | 12% | 7% | 96% | 94% | 3% | 5% | 58% | 38% |
| 36A10 D8B12 | 21% | 14% | 17% | 25% | 96% | 85% | 4% | 23% | 86% | 40% |
| 39A11 G5F2 | 9% | 4% | 19% | 16% | 0% | 0% | 96% | 95% | 0% | 0% |
| 52C9E9 F6 | 27% | 7% | 32% | 18% | 4% | 19% | 97% | 97% | 17% | 0% |
| 28D4E6 A9 | 24% | 5% | 11% | 11% | 0% | 75% | 0% | 0% | 96% | 88% |
| 103E2E 9C2 | 0% | 0% | 7% | 3% | 23% | 31% | 0% | 0% | 95% | 88% |

[0251] 其中,A的含义是各列为包被抗体,浓度为1 μ g/mL;B的含义是各行为竞争抗体,浓度为5 μ g/mL。

[0252] 结果说明,12B12C7C3和106D5G3D10可以互相竞争,为相似表位;5G4H10G5和99E12C7H1可以互相竞争,为相似表位;37H9C5G2和36A10D8B12可以互相竞争,为相似表位;39A11G5F2和52C9E9F6可以互相竞争,为相似表位;28D4E6A9和103E2E9C2可以互相竞争,为相似表位。

[0253] 实施例6轻重链可变区氨基酸序列测定

[0254] 总RNA分离:通过离心搜集实施例1所得的杂交瘤细胞 5×10^7 个,加入1mL Trizol

混匀并转移到1.5mL离心管中,室温静置5分钟。加0.2mL氯仿,振荡15秒,静置10分钟后于4℃,12000g离心5分钟,取上清转移到新的1.5mL离心管中。加入0.5mL异丙醇,将管中液体轻轻混匀,室温静置10分钟后于4℃,12000g离心15分钟,弃上清。加入1mL 75% (v/v) 乙醇,轻轻洗涤沉淀,4℃,12000g离心5分钟后弃上清,将沉淀物晾干,加入DEPC处理过的H₂O溶解(55℃水浴促进溶解10分钟),即得总RNA。

[0255] 逆转录与PCR:取1μg总RNA,配置20μL体系,加入逆转录酶后于42℃反应60分钟,于7℃反应10分钟终止反应。配置50μL PCR体系,包括1μL cDNA、每种引物25pmol、1μL DNA聚合酶以及相配的缓冲体系、250μmol dNTPs;设置PCR程序,95℃预变性3分钟,95℃变性30秒,55℃退火30秒,72℃延伸35秒,35个循环后再额外于72℃延伸5分钟,得PCR产物。其中逆转录所用的试剂盒为PrimeScript RT Master Mix,购自Takara,货号RR036;PCR所用的试剂盒包括Q5超保真酶,购自NEB,货号M0492。

[0256] 克隆与测序:取5μL PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,将检测阳性样品使用柱回收试剂盒纯化,其中回收试剂盒为NucleoSpin® Gel&PCR Clean-up,购自MACHEREY-NAGEL,货号740609。进行连接反应:样品50ng,T载体50ng,连接酶0.5μL,缓冲液1μL,反应体系10μL,于16℃反应半小时得连接产物。其中连接的试剂盒为T4DNA连接酶,购自NEB,货号M0402;取5μL连接产物加入100μL的感受态细胞(Ecos 101competent cells,购自Yeastern,货号FYE607)中,冰浴5分钟,而后于42℃水浴热激1分钟,放回冰上1分钟后加入650μL无抗生素SOC培养基,于37℃摇床上以200RPM的速度复苏30分钟。取出200μL涂布于含抗生素的LB固体培养基上于37℃孵箱过夜培养。次日,使用T载体上引物M13F和M13R配置30μLPCR体系,进行菌落PCR,用移液器枪头蘸取菌落于PCR反应体系中吹吸,并吸出0.5μL点于另一块含100nM氨苄青霉素的LB固体培养皿上以保存菌株。PCR反应结束后,取出5μL进行琼脂糖凝胶电泳检测,将阳性样品进行测序和分析[参见Kabat,“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)]。测序结果如表11~12所示。

[0257] 表11 TPBG抗体蛋白序列编号

[0258]

| 克隆号 | 重链蛋白 | | | | 轻链蛋白 | | | |
|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 可变区 | CDR1 | CDR2 | CDR3 | 可变区 | CDR1 | CDR2 | CDR3 |
| 12B12C7C3 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 5G4H10G5 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| 37H9C5G2 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
| 39A11G5F2 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 |
| 52C9E9F6 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 |
| 28D4E6A9 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 |
| 36A10D8B12 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 |
| 99E12C7H1 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 |
| 103E2E9C2 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 |
| 106D5G3D10 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 |

[0259] 其中,表11中的数字即为序列表中序列号,如12B12C7C3的重链蛋白可变区的氨基酸序列为SEQ ID No.1,而12B12C7C3的重链蛋白可变区中CDR1的氨基酸序列为SEQ ID No.2。

[0260] 表12 TPBG抗体基因序列编号

| 克隆号 | 重链蛋白可变区 | 轻链蛋白可变区 |
|------------|---------|---------|
| 12B12C7C3 | 81 | 82 |
| 5G4H10G5 | 83 | 84 |
| 37H9C5G2 | 85 | 86 |
| 39A11G5F2 | 87 | 88 |
| 52C9E9F6 | 89 | 90 |
| 28D4E6A9 | 91 | 92 |
| 36A10D8B12 | 93 | 94 |
| 99E12C7H1 | 95 | 96 |
| 103E2E9C2 | 97 | 98 |
| 106D5G3D10 | 99 | 100 |

[0263] 其中,表12中的数字即为序列表中序列号,如编码12B12C7C3的重链蛋白可变区的核苷酸序列为SEQ ID No.81。

[0264] 其中,编码12B12C7C3的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID

No.81中的第91位至第105位；

[0265] 编码12B12C7C3的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.81中的第148位至第198位；

[0266] 编码12B12C7C3的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.81中的第295位至第327位；

[0267] 编码12B12C7C3的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.82中的第70位至第114位；

[0268] 编码12B12C7C3的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.82中的第160位至第180位；

[0269] 编码12B12C7C3的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.82中的第277位至第303位；

[0270] 编码5G4H10G5的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.83中的第91位至第105位；

[0271] 编码5G4H10G5的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.83中的第148位至第198位；

[0272] 编码5G4H10G5的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.83中的第295位至第330位；

[0273] 编码5G4H10G5的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.84中的第70位至第102位；

[0274] 编码5G4H10G53的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.84中的第148位至第168位；

[0275] 编码5G4H10G5的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.84中的第265位至第288位；

[0276] 编码37H9C5G2的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.85中的第91位至第105位；

[0277] 编码37H9C5G2的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.85中的第148位至第198位；

[0278] 编码37H9C5G2的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.85中的第295位至第327位；

[0279] 编码37H9C5G2的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.86中的第70位至第102位；

[0280] 编码37H9C5G2的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.86中的第148位至第168位；

[0281] 编码37H9C5G2的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.86中的第265位至第291位。

[0282] 编码39A11G5F2的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.87中的第91位至第105位；

[0283] 编码39A11G5F2的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.87中的第148位至第198位；

- [0284] 编码39A11G5F2的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.87中的第295位至第315位；
- [0285] 编码39A11G5F2的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.88中的第70位至第102位；
- [0286] 编码39A11G5F2的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.88中的第148位至第168位；
- [0287] 编码39A11G5F2的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.88中的第265位至第291位。
- [0288] 编码52C9E9F6的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.89中的第91位至第105位；
- [0289] 编码52C9E9F6的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.89中的第148位至第198位；
- [0290] 编码52C9E9F6的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.89中的第295位至第315位；
- [0291] 编码52C9E9F6的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.90中的第70位至第102位；
- [0292] 编码52C9E9F6的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.90中的第148位至第168位；
- [0293] 编码52C9E9F6的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.90中的第265位至第291位。
- [0294] 编码28D4E6A9的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.91中的第91位至第105位；
- [0295] 编码28D4E6A9的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.91中的第148位至第198位；
- [0296] 编码28D4E6A9的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.91中的第295位至第327位；
- [0297] 编码28D4E6A9的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.92中的第70位至第102位；
- [0298] 编码28D4E6A9的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.92中的第148位至第168位；
- [0299] 编码28D4E6A9的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.92中的第265位至第291位。
- [0300] 编码36A10D8B12的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.93中的第91位至第108位；
- [0301] 编码36A10D8B12的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.93中的第151位至第198位；
- [0302] 编码36A10D8B12的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.93中的第295位至第324位；
- [0303] 编码36A10D8B12的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.94

中的第70位至第102位；

[0304] 编码36A10D8B12的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.94中的第148位至第168位；

[0305] 编码36A10D8B12的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.94中的第265位至第291位。

[0306] 编码99E12C7H1的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.95中的第91位至第105位；

[0307] 编码99E12C7H1的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.95中的第148位至第198位；

[0308] 编码99E12C7H1的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.95中的第295位至第318位；

[0309] 编码99E12C7H1的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.96中的第70位至第102位；

[0310] 编码99E12C7H1的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.96中的第148位至第168位；

[0311] 编码99E12C7H1的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.96中的第265位至第291位。

[0312] 编码103E2E9C2的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.97中的第91位至第105位；

[0313] 编码103E2E9C2的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.97中的第148位至第198位；

[0314] 编码103E2E9C2的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.97中的第295位至第324位；

[0315] 编码103E2E9C2的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.98中的第70位至第105位；

[0316] 编码103E2E9C2的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.98中的第151位至第171位；

[0317] 编码103E2E9C2的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.98中的第268位至第294位。

[0318] 编码106D5G3D10的重链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.99中的第91位至第105位；

[0319] 编码106D5G3D10的重链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.99中的第148位至第198位；

[0320] 编码106D5G3D10的重链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.99中的第295位至第318位；

[0321] 编码106D5G3D10的轻链蛋白可变区中CDR1的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.100中的第70位至第99位；

[0322] 编码106D5G3D10的轻链蛋白可变区中CDR2的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.100中的第145位至第165位；

[0323] 编码106D5G3D10的轻链蛋白可变区中CDR3的核苷酸序列为序列表SEQ ID No.100中的第262位至第294位。

[0324] 实施例7鼠-人嵌合抗体构建、以及抗体的生产和纯化

[0325] 1. 质粒构建与准备:根据实施例6的测序结果明确了TPBG抗体重链可变区和轻链可变区序列。将实施例2和实施例3所得的先导抗体的重链可变区序列重组到包含信号肽和人源重链抗体IgG1恒定区的表达载体(其中表达载体购买自Invitrogen,重组步骤也由上海睿智化学完成)中,将TPBG抗体的轻链可变区序列重组到包含信号肽和人源抗体轻链kappa恒定区的表达载体当中,得重组质粒并经测序验证(测序方法与实施例6中测序方法相同)。使用碱裂解法试剂盒(购自MACHEREY-NAGEL)中量抽提高纯度的重组质粒,质量为500 μ g以上,经0.22 μ m滤膜(购自Milipore)过滤,供转染使用。

[0326] 2. 细胞转染:在培养基Freestyle 293 expression medium(购自Invitrogen)培养293E细胞(购自Invitrogen)。摇床设置为37 $^{\circ}$ C、130RPM和8%CO₂(v/v)。Freestyle 293 expression medium在转染时添加10%(v/v)F68(购自Invitrogen)至F68终浓度为0.1%(v/v),得含0.1%(v/v)F68的Freestyle293表达培养基,即培养基A。取5mL培养基A和200 μ g/mL PEI(购自Sigma)混匀,得培养基B。取5mL培养基A和100 μ g/mL步骤(1)所得的重组质粒混匀,得培养基C。5分钟后将培养基B和培养基C合并混匀,静置15分钟,得混合液D。将10mL混合液D缓缓加入100mL含293E细胞的培养基Freestyle 293 expression medium中至293E的细胞密度为 1.5×10^6 个/mL,边加边振荡,避免PEI过度集中,放入摇床培养。第二天加入蛋白胍至终浓度为0.5%(w/v)。第5~7天,测培养液抗体效价。第6~7天,离心(3500RPM,30分钟)收集上清,经0.22 μ m滤膜过滤,得滤好的细胞上清液,以供纯化。

[0327] 3. 抗体纯化:对于连续生产的无内毒素的层析柱和Protein A填料,使用0.1M NaOH处理30min或者5个柱体积0.5M NaOH冲洗;对于长期未使用的柱料和层析柱至少使用1M NaOH浸泡1h,用无内毒的水冲洗至中性,用10倍柱体积的1%Triton X100对柱料清洗。使用5个柱体积的PBS进行平衡,将过滤好的细胞上清上柱,必要时收集流穿液。上柱完成后,使用5倍柱体积PBS清洗。用5倍柱体积的0.1M pH3.0的Glycine-HCl进行洗脱,收集洗脱液,并用1/10体积的pH8.5的1M Tris-HCl(1.5M NaCl)中和。收获抗体后,在1 \times PBS中透析过夜,避免内毒素污染。透析结束后,使用分光光度或试剂盒测定浓度,使用HPLC-SEC测定抗体纯度,使用内毒素检测试剂盒(购自Lonza)检测抗体内毒素含量。

[0328] 下述实施例中嵌合抗体命名中首段字符选用对应的先导抗体克隆号的前3~5位字符,例如嵌合抗体12B12-MMAF对应的先导抗体克隆号为12B12C7C3,嵌合抗体5G4-MMAF对应的先导抗体克隆号为5G4H10G5等等。

[0329] 实施例8嵌合抗体的体外药效实验

[0330] 将实施例7所得的纯化的TPBG嵌合抗体与MC-MMAF进行偶联,方法同实施例4,经过pH6.5~8.5的硼酸钠缓冲液透析后,加入三(2-羧乙基)膦(TCEP),其中TCEP与纯化的TPBG抗体的摩尔比比率为2,室温下还原1小时,得反应液A。将反应液A经过G25柱脱盐(购自GE),去除多余的TCEP,得反应液B。向反应液B中加入MC-MMAF,其中MC-MMAF与纯化的TPBG抗体的摩尔比比率为5,室温下反应4小时。再加入半胱氨酸用以中和多余的MC-MMAF,并通过G25柱脱盐除去多余的小分子。得到纯化的TPBG抗体药物偶联物(偶联方法参见Doronina,2006,Bioconjugate Chem.17,114-124)。通过HIC分析药物的交联率、通过SEC分析抗体药物偶联

物的纯度等参数后,进行细胞毒活性的分析。所有抗体偶联物的药物交联率(DAR)为3.0-5.0。其中,DAR(drug antibody ratio)指抗体偶联后一个抗体分子上携带的小分子药物的平均数量。

[0331] 将获得的纯化的TPBG抗体药物偶联物分别用完全培养基进行梯度稀释,96孔细胞培养板以2000细胞/孔加入100微升TPBG阳性的NCI-H1299细胞株(购自ATCC,货号#CRL5803)细胞悬液过夜培养后,每孔分别加入10微升不同浓度的纯化的TPBG嵌合抗体药物偶联物的稀释液,继续培养5天后,用CellTiter-Glo试剂盒(购自Promega,使用方法参照产品说明书)检测细胞活力。结果如表13以及图13所示,其中表13的IC₅₀指药物作用后,细胞的活性受到抑制的半数有效量,能够通过检测细胞的活性从而反映细胞杀伤活性。图13为纯化的TPBG嵌合抗体药物偶联物对TPBG阳性的肿瘤细胞系NCI-H1299的细胞杀伤活性检测,结果说明,纯化的TPBG抗体药物偶联物对TPBG阳性的细胞有杀伤作用。

[0332] 表13细胞杀伤实验检测纯化的TPBG嵌合抗体药物偶联物对TPBG阳性NCI-H1299细胞的特异性杀伤作用

| 样品名称 | 交联率 | IC ₅₀ (nM) |
|-----------------|-----|-----------------------|
| | | NCI-H1299 (+) |
| 嵌合抗体 12B12-MMAF | | 0.13 |
| 嵌合抗体 5G4-MMAF | | 87.27 |
| 嵌合抗体 39A11-MMAF | | 4.30 |
| 嵌合抗体 28D4-MMAF | | 0.21 |
| 嵌合抗体 36A10-MMAF | | 0.70 |
| 对照 hIgG-MMAF | | >100 |

[0334] 实施例9嵌合抗体的体内药效实验

[0335] 将NCI-H1299(非小细胞肺癌细胞株,ATCC,CRL-5803)(5X10⁶个)200μl接种与Balb/c nude小鼠右肋皮下,待7-10天肿瘤长至200mm³后,去除体重、肿瘤过大和过小的,按肿瘤体积将小鼠随机分为几组,每组7只。D0开始尾静脉注射抗体,4天一次,共给药4次,每周测2次瘤体积,称鼠重,记录数据。肿瘤体积(V)计算公式为: $V=1/2 \times a \times b^2$;其中a、b分别表示长、宽。分组如表14。

[0336] 表14 TPBG嵌合抗体及其抗体药物偶联物的体内药效实验

[0337]

| 分组 | 动物数量(只) | 处理组 | 剂量(mg/kg) | 注射体积(μ l/g) | 给药途径 | 给药安排 |
|----|---------|-----------------|-----------|------------------|-------------|--------------|
| 1 | 7 | 溶剂对照 | -- | 10 | 尾静脉注射 i.v. | 每4天给药一次 × 4次 |
| 2 | 7 | 嵌合抗体 12B12-MMAF | 1 | 10 | 尾静脉注射 i.v | 每4天给药一次 × 4次 |
| 3 | 7 | 嵌合抗体 12B12-MMAF | 10 | 10 | 尾静脉注射 i.v . | 每4天给药一次 ×4次 |

| | | | | | | | |
|--------|----|---|-----------------|----|----|------------|-----------------|
| [0338] | 4 | 7 | 嵌合抗体 5G4-MMAF | 1 | 10 | 尾静脉注射 i.v. | 每 4 天给药一次 × 4 次 |
| | 5 | 7 | 嵌合抗体 5G4-MMAF | 10 | 10 | 尾静脉注射 i.v. | 每 4 天给药一次 × 4 次 |
| | 6 | 7 | 嵌合抗体 39A11-MMAF | 1 | 10 | 尾静脉注射 i.v. | 每 4 天给药一次 × 4 次 |
| | 7 | 7 | 嵌合抗体 39A11-MMAF | 10 | 10 | 尾静脉注射 i.v. | 每 4 天给药一次 × 4 次 |
| | 8 | 7 | 嵌合抗体 28D4-MMAF | 1 | 10 | 尾静脉注射 i.v. | 每 4 天给药一次 × 4 次 |
| | 9 | 7 | 嵌合抗体 28D4-MMAF | 10 | 10 | 尾静脉注射 i.v. | 每 4 天给药一次 × 4 次 |
| | 10 | 7 | 嵌合抗体 36A10-MMAF | 1 | 10 | 尾静脉注射 i.v. | 每 4 天给药一次 × 4 次 |
| | 11 | 7 | 嵌合抗体 36A10-MMAF | 10 | 10 | 尾静脉注射 i.v. | 每 4 天给药一次 × 4 次 |
| | 12 | 7 | 嵌合抗体 12B12 | 10 | 10 | 尾静脉注射 i.v. | 每 4 天给药一次 × 4 次 |
| | 13 | 7 | 嵌合抗体 5G4 | 10 | 10 | 尾静脉注射 i.v. | 每 4 天给药一次 × 4 次 |
| | 14 | 7 | 嵌合抗体 39A11 | 10 | 10 | 尾静脉注射 i.v. | 每 4 天给药一次 × 4 次 |
| | 15 | 7 | 嵌合抗体 28D4 | 10 | 10 | 尾静脉注射 i.v. | 每 4 天给药一次 × 4 次 |
| | 16 | 7 | 嵌合抗体 36A10 | 10 | 10 | 尾静脉注射 i.v. | 每 4 天给药一次 × 4 次 |
| | 17 | 7 | 对照 hIgG-MMAF | 10 | 10 | 尾静脉注射 i.v. | 每 4 天给药一次 × 4 次 |

[0339] 结果见图14: 治疗后肿瘤的体积变化图, 和图15: 治疗后的鼠重变化图。其中, 图14A-E分别是嵌合抗体12B12, 嵌合抗体5G4, 嵌合抗体39A11, 嵌合抗体28D4, 嵌合抗体36A10的抗体药物偶联物及其裸抗的治疗后的肿瘤体积变化图。图15A-E分别是嵌合抗体12B12, 嵌合抗体5G4, 嵌合抗体39A11, 嵌合抗体28D4, 嵌合抗体36A10的抗体药物偶联物及其裸抗的治疗后的小鼠体重变化图。结果显示, 几种ADC可以很好的抑制肿瘤NCI-H1299的生长, 而且对小鼠的体重没有显著的影响。

[0340] 实施例10偶联不同连接子-毒素的抗体偶联物的体外药效实验

[0341] 将实施例7所得的纯化的TPBG嵌合抗体12B12和28D4分别与MC-MMAF和MC-VC-PAB-MMAE进行偶联,方法同实施例8,经过pH6.5~8.5的硼酸钠缓冲液透析后,加入三(2-羧乙基)膦(TCEP),其中TCEP与纯化的TPBG抗体的摩尔比比率为2,室温下还原1小时,得反应液A。将反应液A经过G25柱脱盐(购自GE),去除多余的TCEP,得反应液B。向反应液B中加入MC-MMAF或MC-VC-PAB-MMAE(购自南京联宁),其中MC-MMAF或MC-VC-PAB-MMAE与纯化的TPBG抗体的摩尔比比率为5,室温下反应4小时。再加入半胱氨酸用以中和多余的MC-MMAF或MC-VC-PAB-MMAE,并通过G25柱脱盐除去多余的小分子,得到纯化的TPBG嵌合抗体药物偶联物——即表格中所述的嵌合抗体12B12-MMAF、12B12-MMAE、28D4-MMAF、28D4-MMAE(偶联方法参见Doronina,2006,Bioconjugate Chem.17,114-124)。通过HIC分析药物的交联率、通过SEC分析抗体药物偶联物的纯度等参数后,进行细胞毒活性的分析。

[0342] 将实施例7所得的纯化的TPBG嵌合抗体12B12和28D4分别与SMCC进行偶联。将实施例7所得的纯化的TPBG嵌合抗体12B12和28D4经过pH6.5~7.4的磷酸盐缓冲液透析后,在体积比为30%DMA(二甲基乙酰胺)存在下加入4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC),其中SMCC与纯化的TPBG嵌合抗体的摩尔比比率为8,室温下反应1小时,得反应液A。将反应液A经过G25柱脱盐(购自GE),去除多余的小分子,得反应液B。向反应液B中加入终体积为10%DMA,然后加入DM1(化学名称为N2'-脱乙酰-N2'-3-巯基-1氧代丙基)-美登素),其中DM1与纯化的TPBG抗体的摩尔比比率为9,室温下反应3.5小时,得反应液C。将反应液C经过G25柱脱盐(购自GE),去除多余的小分子,得到纯化的TPBG嵌合抗体药物偶联物——即表格中所述的嵌合抗体12B12-DM1、28D4-DM1(偶联方法参见US5208020)。通过LC-MS分析药物的交联率、通过SEC分析抗体药物偶联物的纯度等参数后,进行细胞毒活性的分析,所有嵌合抗体偶联物的药物交联率(DAR)为3.0-5.0。其中,DAR(drug antibody ratio)指抗体偶联后一个抗体分子上携带的小分子药物的平均数量。

[0343] 将获得的纯化的TPBG嵌合抗体药物偶联物分别用完全培养基进行梯度稀释,96孔细胞培养板以2000细胞/孔加入100微升TPBG阳性的NCI-H1299细胞株(购自ATCC,货号#CRL5803),或NCI-H1568细胞株(购自ATCC,货号#CRL-5876)细胞悬液过夜培养后,每孔分别加入10微升不同浓度的纯化的TPBG嵌合抗体药物偶联物的稀释液,继续培养5天后,用CellTiter-Glo试剂盒(购自Promega,使用方法参照产品说明书)检测细胞活力。结果如表15以及图16所示,其中表15的IC₅₀指药物作用后,细胞的活性受到抑制的半数有效量,能够通过检测细胞的活性从而反映细胞杀伤活性。其中,图16A和16B分别为纯化的TPBG嵌合抗体12B12及其偶联了不同的小分子药的抗体药物偶联物对TPBG阳性的肿瘤细胞系NCI-H1299的细胞杀伤活性检测;图16C和16D分别为纯化的TPBG嵌合抗体12B12及其偶联了不同的小分子药的抗体药物偶联物对TPBG阳性的肿瘤细胞系NCI-H1568的细胞杀伤活性检测。结果说明,偶联不同的小分子毒素的纯化的TPBG嵌合抗体药物偶联物对TPBG阳性的细胞均具有不同程度的杀伤作用,并且偶联了MC-MMAF的TPBG嵌合抗体药物偶联物具有较低的IC₅₀,说明其细胞杀伤能力最强。

[0344] 表15细胞杀伤实验检测纯化的TPBG嵌合抗体药物偶联物对TPBG阳性NCI-H1299,NCI-H1568细胞的特异性杀伤作用

| 样品名称 | IC ₅₀ (nM) | |
|-----------------|-----------------------|-----------|
| | NCI-H1299 | NCI-H1568 |
| 嵌合抗体 12B12 | 无 | 无 |
| 嵌合抗体 12B12-MMAF | 0.04 | 0.025 |
| 嵌合抗体 12B12-MMAE | >100 | >100 |
| 嵌合抗体 12B12-DM1 | 10.42 | 1.271 |
| 嵌合抗体 28D4 | 无 | 无 |
| 嵌合抗体 28D4-MMAF | 0.132 | 0.066 |
| 嵌合抗体 28D4-MMAE | 368.6 | >100 |
| 嵌合抗体 28D4-DM1 | 6.084 | 2.507 |

[0346] 将获得的纯化的TPBG嵌合抗体药物偶联物分别用完全培养基进行梯度稀释,96孔细胞培养板以2000细胞/孔加入100微升表达TPBG的293-hTPBG稳转细胞株(构建方法参见实施例1:免疫原B的制备)及不表达TPBG的293细胞株(购自ATCC,货号#CRL-1573)细胞悬液过夜培养后,每孔分别加入10微升不同浓度的纯化的TPBG嵌合抗体药物偶联物的稀释液,继续培养5天后,用CellTiter-Glo试剂盒(购自Promega,使用方法参照产品说明书)检测细胞活力。结果如表16以及图17所示,其中表16的IC₅₀指药物作用后,细胞的活性受到抑制的半数有效量,能够通过检测细胞的活性从而反映细胞杀伤活性。图17A和17B为纯化的TPBG嵌合抗体药物偶联物对TPBG阳性的表达TPBG的293-hTPBG稳转细胞株的细胞杀伤活性检测;图17C和17D为纯化的TPBG嵌合抗体药物偶联物对不表达TPBG的293细胞株的细胞杀伤活性检测。结果说明,偶联不同的小分子毒素的纯化的TPBG嵌合抗体药物偶联物对TPBG阳性的细胞有不同程度的杀伤作用,对TPBG阴性的293细胞不具有细胞杀伤作用,说明纯化的TPBG嵌合抗体药物偶联物对TPBG阳性的细胞的杀伤是特异的,并且偶联了MC-MMAF的TPBG嵌合抗体药物偶联物具有较低的IC₅₀,说明其细胞杀伤能力最强。

[0347] 表16细胞杀伤实验检测纯化的TPBG嵌合抗体药物偶联物对TPBG阳性293-hTPBG和TPBG阴性的293细胞的特异性杀伤作用

| 样品名称 | IC50 (nM) | |
|-----------------|-----------|-------|
| | 293-hTPBG | 293 |
| 嵌合抗体 12B12 | 13.58 | 无 |
| 嵌合抗体 12B12-MMAF | 0.001 | >100 |
| 嵌合抗体 12B12-MMAE | 0.033 | >100 |
| 嵌合抗体 12B12-DM1 | 0.154 | 8.885 |
| 嵌合抗体 28D4 | 1.137 | 无 |
| 嵌合抗体 28D4-MMAF | 0.024 | >100 |
| 嵌合抗体 28D4-MMAE | 0.08 | >100 |
| 嵌合抗体 28D4-DM1 | 0.406 | 7.658 |

[0349] 应理解,在阅读了本发明的上述内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

115

120

<210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 2

Asn Phe Gly Met His
 1 5

<210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 3

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Thr Ser Phe Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys Gly
 1 5 10 15

[0002]

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4

Thr Asn Ser Leu Leu Arg Gly Phe Phe Asp Ala
 1 5 10

<210> 5
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 5

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Ser Tyr Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Ser Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
 85 90 95

Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 6

[0003] Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Ser Tyr Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 7

Ser Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 8

Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Leu Thr

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

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 14

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala
 1 5 10

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 15

[0006]

Phe Ala Thr Asn Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 16

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Thr
 1 5

<210> 17
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 17

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

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

[0007] <210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 18

Asp His Thr Ile His
 1 5

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 19

Tyr Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Gly Thr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 23

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
 1 5

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 24

Gln His His His Asp Thr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 25
 <211> 116
 <212> PRT
 [0009] <213> Mus musculus

<400> 25

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

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

Trp Leu Glu Trp Ile Lys Arg Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Arg Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Glu Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

| | 100 | 105 | 110 |
|--------|---|-----|-----|
| | Thr Val Ser Ser | | |
| | 115 | | |
| <210> | 26 | | |
| <211> | 5 | | |
| <212> | PRT | | |
| <213> | Mus musculus | | |
| <400> | 26 | | |
| | Gly Tyr Trp Leu Glu | | |
| | 1 5 | | |
| <210> | 27 | | |
| <211> | 17 | | |
| <212> | PRT | | |
| <213> | Mus musculus | | |
| <400> | 27 | | |
| [0010] | Glu Ile Leu Pro Gly Arg Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly | | |
| | 1 5 10 15 | | |
| <210> | 28 | | |
| <211> | 7 | | |
| <212> | PRT | | |
| <213> | Mus musculus | | |
| <400> | 28 | | |
| | Gly Gly Arg Asp Phe Asp Asn | | |
| | 1 5 | | |
| <210> | 29 | | |
| <211> | 107 | | |
| <212> | PRT | | |
| <213> | Mus musculus | | |
| <400> | 29 | | |
| | Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly | | |
| | 1 5 10 15 | | |

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn His
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Ser Lys Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Met Lys
 100 105

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

[0011]

<400> 30

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn His Leu Asn
 1 5 10

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
 1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Gln Gln Phe Ser Lys Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 33

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

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

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

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

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Arg Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

[0012]

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ala
115

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

Gly Tyr Trp Ile Glu
1 5

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

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 38

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

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 39

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

[0014]

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 40

Gln Gln Tyr Ser Lys Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 41
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 41

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

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

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

Ala Glu Ile Ser Thr Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60

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

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

Ile Met Phe Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

[0015]

<400> 42

Asn Tyr Val Met Ser
 1 5

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 43

Glu Ile Ser Thr Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Thr Gly
 1 5 10 15

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

Phe Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ser Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 45

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

[0016]

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

His Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

Gln Gln Gly Asp Thr Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 49

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

[0017]

<400> 49

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

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

Tyr Asp Trp His Trp Ile Arg His Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr His Asn Thr Ser Lys Asn His Phe Phe
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Gly Asn Trp Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 50
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 50

Ser Gly Tyr Asp Trp His
1 5

<210> 51
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 51

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

[0018]

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 52

Gly Tyr Gly Asn Trp Asp Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 53
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 53

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

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ile Val Asp Thr Asn
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 54

[0019]

Lys Ala Ser Gln Ile Val Asp Thr Asn Val Ala
 1 5 10

<210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 55

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
 1 5

<210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 56

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 57
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 57

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

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

Gly Leu Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Phe Gln Trp Met
 35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Gly Thr Ala Ser
 65 70 75 80

[0020]

Leu Gln Ile Thr Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Ser Ile Pro Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 58
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 58

Ala Tyr Gly Leu Ser
 1 5

<210> 59
 <211> 17
 <212> PRT

Gly Val Phe Asn Pro Tyr Ser Gly Glu Ile Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Gly Val Tyr Ser Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Arg Ile Ser Tyr Tyr Ala Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Ala Val Ser Ser
115

<210> 66

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 66

[0023]

Asp Tyr Tyr Met Ser
1 5

<210> 67

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 67

Val Phe Asn Pro Tyr Ser Gly Glu Ile Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
1 5 10 15

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 68

Leu Arg Ile Ser Tyr Tyr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 69
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 69

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Gly
 20 25 30

His Phe His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ala Ser Pro Lys Val Trp
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu
 65 70 75 80

[0024]

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

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

<210> 70
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 70

Arg Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Gly His Phe His
 1 5 10

<210> 71
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 71

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 72

Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 73

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 73

[0025] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ser Thr Tyr Gly Ser Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 74
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 74

Asp Tyr Gly Met His
 1 5

<210> 75
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 75

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

[0026]

<210> 76
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 76

Tyr Gly Ser Asn Pro Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 77
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 77

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Met
 20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Val Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Gly Tyr Pro Pro Ile
85 90 95

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

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 78

Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Met His
1 5 10

[0027]

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 79

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 80

Gln Gln Arg Ser Gly Tyr Pro Pro Ile Phe Thr
1 5 10

<210> 81

<211> 360

| | | |
|--------|--|-----|
| | <212> DNA | |
| | <213> Mus musculus | |
| | <400> 81 | |
| | gatgtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc | 60 |
| | tctctgtcag cctctggatt cactttcagc aactttggaa tgcactgggt tcgtcagget | 120 |
| | ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac attagtagtg gtagtacttc cttctactat | 180 |
| | gcagacaccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atccaagaa caccctgttc | 240 |
| | ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgttc aagaacgaat | 300 |
| | tcattactac gaggattcct cgatgcctgg ggcgcaggga ccacggtcac cgtctcctca | 360 |
| | <210> 82 | |
| | <211> 333 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Mus musculus | |
| | <400> 82 | |
| [0028] | gacattgtcc tgacacagtc tctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc | 60 |
| | atctcatgca gggccagcca aagtgtcagt tcattctagtt atacttattt gcaactgtac | 120 |
| | caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatcaagt ctgcatccaa cctagaatct | 180 |
| | ggggtccctg ccaggttcag tggcactggg tctgggacag acttcaccct caacatacat | 240 |
| | cctgtggagg aggaggatac tgcaacatat tactgtcagc acagttggga gattcactc | 300 |
| | acgttcggtg ctgggaccaa gttggagctg aaa | 333 |
| | <210> 83 | |
| | <211> 363 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Mus musculus | |
| | <400> 83 | |
| | gaggtacaac tggaggagtc tgggggagac ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc | 60 |
| | ttctgtcagc cctctggatt cactttcagc acctatggcc tgccttgggt tcgccagact | 120 |
| | ccagacaaga ggctggagtt ggtcgcgaacc attactaata atgatggtag tgcctattat | 180 |

| | |
|---|-----|
| ccagacagtg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca aggccaagaa caccctgttc | 240 |
| ttgcaaatga ccagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attattgtgc aagagagacg | 300 |
| ggtttcggta gcagctacct gtttgattat tggggccaag ggactctggt cactgtctct | 360 |
| gca | 363 |
| <210> 84 | |
| <211> 318 | |
| <212> DNA | |
| <213> Mus musculus | |
| <400> 84 | |
| aatattgtga tgaccagac tcccaaattc ctgcttgtat cagcaggaga cagggttacc | 60 |
| ataacctgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtacca acagaagcca | 120 |
| gggcagtctc ctaaactgct gatatacttt gcaaccaatc gttatactgg agtcctaata | 180 |
| cgcttcaactg gcagtgagata tgggacggaa ttcactttca ccatcagctc tgtgcaggct | 240 |
| [0029] gaagacctgg cggtttattt ctgtcagcag gattatagtt ctccgacgtt cgggtggaggc | 300 |
| accaagctgg aatcaaaa | 318 |
| <210> 85 | |
| <211> 360 | |
| <212> DNA | |
| <213> Mus musculus | |
| <400> 85 | |
| caggtccagc tgcaacagtc tgacgctgag ttggtgagac ctggagcctc agtgaagatg | 60 |
| tcctgcaagg tttctggcta taccttcaact gaccatacta ttcactggat gaagcagagg | 120 |
| cctgaacagg gcttggaaatg gattggatat atttataccta gagatggtag tggtagctac | 180 |
| aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac | 240 |
| atgcagctca acagcctgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagagacggt | 300 |
| agtagtcaact actggtactt cgatgtctgg ggcacaggga ccacggtcac cgtctctca | 360 |

[0030]

<210> 86

<211> 321

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 86

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60

atcacatgtc gagcaagtga gattatttac aattatntag catggtatca gcagaaacag 120

ggaaaatctc ctcagctcct ggtctataat gcaaaaacct tagcagaagg tgtgccatca 180

aggttcagtg gcagttactc aggcacacag ttttctctga atatcaacag cctgcagtct 240

gaagatthttg ggatttatta ctgtcaacat catcatgata ctccgctcac gttcgggtct 300

gggaccaagc tggatctgaa a 321

<210> 87

<211> 348

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 87

caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctgatgaage ctggggcctc aatgagactt 60

tcttgcaagg ctactggcta cacattcact ggctactggc tagagtggat aaagcggagg 120

cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttacctg gaagaggtag tactaattac 180

aatgagaaat tcaagggcaa ggccacattc actgcagaga catcttcaa caccgcctac 240

atgcaactca ccagcctgac aactgaggac tctgcatctt attactgtgc aaggggggga 300

cgcgactttg acaactgggg ccaaggcacc actctcacag tctctca 348

<210> 88

<211> 321

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

[0031]

<400> 88

gatatccaga tgacacagag tacatcctcc ctgtctgct ctctgggaga cagagtcacc 60
atcagttgca gtgcaagtca gggcattaac aatcatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gatggaactg ttaaactcct gatctattat acatcaagtt tacactcagg agtcccatca 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct 240
gaagatattg ccatttacta ttgtcagcag tttagtaage ttccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaaag tggaaatgaa a 321

<210> 89

<211> 348

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 89

caggttcagc tgcagcagtc tggagctgaa ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagctt 60
tcctgcaagg ctactggcta cacattcact ggctattgga tagagtggat aaagcagagg 120
cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttacctg gaagaggtag tactgactac 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattc actgcagata catcctcaa tacagcctac 240
atgcagctca gcagcctgac aactgaagac tctgcatct attattgtac aagagggaga 300
ctggacttta ctactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca 348

<210> 90

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 90

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgct ctctgggaga cagagtcacc 60
atcagttgca gtgcaagtca gggcattagg aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120
gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca 180

| | | |
|--------|--|-----|
| | aggttcagtg gcagtgggtc tggcacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct | 240 |
| | gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagg ttccgtggac gttcgggtgga | 300 |
| | ggcaccaagc tggaaatcaa a | 321 |
| | <210> 91 | |
| | <211> 360 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Mus musculus | |
| | <400> 91 | |
| | gatgtacaac tgggtgaatc tgggggaggc ttagtgaggc ctggagggtc cctgaaactc | 60 |
| | tcctgtgcag cctccggatt cactttcagt aactatgtca tgtcttgggc tcgccagtct | 120 |
| | ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcagaa attagtactg gtgggagtca cacctactat | 180 |
| | tcagacactg tgacgggccg atttaccatc tccagagaca atgccaagaa agccctatac | 240 |
| | ctggaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatat attattgtat tatgttttac | 300 |
| [0032] | tacggtagta gctattctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctctca | 360 |
| | <210> 92 | |
| | <211> 321 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Mus musculus | |
| | <400> 92 | |
| | gatatccaga tgacacagag tacatctccc ctgtctgect ctctgggaga cagaatcacc | 60 |
| | atcagttgca gggcaagtca ggacattagg aattatttaa actggtatca gcagaaacca | 120 |
| | gatgggactg ttaaactcct gatctaccac acatcaagat tacactcagg agtcccatca | 180 |
| | aggttcagtg gcagtgggtc tggcacagat tattctctca ccattagtaa cctggaacaa | 240 |
| | gaagatattg ccacttattt ttgccaacag ggtgatacgc ttccgctcac gttcgggtgcc | 300 |
| | gggaccaggc tggagctgaa a | 321 |
| | <210> 93 | |

[0033]

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 93

gatgtgcagc ttcaggagtc aggacctggc atggtgaaac cttctcagtc actttccctc 60
acctgcactg tcaactggcta ctccatcacc agtggttacg actggcactg gatccgacat 120
tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc tacataagct acagtggtaa cactaactac 180
aaccatccc tcaaaagtcg aatctccatc actcataaca catctaagaa ccatttcttc 240
ctgaggttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aagaggctat 300
ggtaactggg atgctatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctca 357

<210> 94

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 94

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
gtcacctgca aggccagtc gattgtggac actaatgtag cctggatca acagaaacca 120
gggcaatctc ctaaagcact gatttctctg gcatectacc gctacagtgg agtccctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcaa tgtacagtct 240
gaagacttgg cagaatattt ctgtcagcaa tataacagct atcctctcac gttcgggtct 300
gggaccaagc tggagctgac a 321

<210> 95

<211> 351

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 95

cagatccagt tggtagctc tggacctgag ttgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
tcttgcaagc cttctggata taccttcaca gcctatggat tgagctgggt gaaacaggct 120

[0034]

ccaggacagg gtttccagtg gatgggctgg ataaacacct actctggagt gcccacatat 180
 actgatgatt tcaagggacg atttgccttc tctttgaaa cctctgccgg cactgcctct 240
 ttgcagatca ccaacctcaa aaatgaggac acggctactt atttctgtgc aagatcttca 300
 attccccctt ttgagtaactg gggcccagge accactctca cagtctcctc a 351

<210> 96
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 96
 agttttgtga tgaccagag tcccaaattc ctgcttgtat cagtaggaga cagggttacc 60
 ataacctgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtag cttggtacca acagaagcca 120
 gggcagcctc ctagagtact gatatacttt gcatccaatc gctacactgg agtcctgat 180
 cgcttactg gcagtggata tgggacggat ttcactttca ccatcagcac tgtgcaggct 240
 gaagacctgg cactttattt ctgtcagcag gattatagct ctccgtggac gttcgggtgga 300
 ggcaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 97
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 97
 gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgtg ctggtgaaac ctggggcttc ggtgaagatg 60
 tctgtgagg cttctggata ctctttcatt gactactaca tgagttgggt gaagcagagc 120
 cgtggaagga gccttgagtg gattggagtt tttaatcctt acagtggatga gataatttac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagcctac 240
 atggagctca gtagcctgac atctgaggac tctggagtct attcctgtgc aagattacgc 300
 atctcttatt atgctatcga ttactggggt caagggacct cagtcgccgt ctctca 357

[0035]

<210> 98

<211> 324

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 98

gaaaatgtgc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga aaaggtcacc 60

atgacctgca gggccacctc aagtgttagt tccggctact tccactggta ccagcagaag 120

tcagggtgctt cccccaaagt ctggatttat agcacatcca acttggett c tggagtcct 180

gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tctttctctc tcacaatcag cagtgtggag 240

gctgaagatg tagccactta tttctgccag caatacagtg gttacceact cacgttcgga 300

ggggggacca agctggaaat aaaa 324

<210> 99

<211> 351

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 99

gaggtgcaac tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gactatggaa tgcaactgggt tcgtcaggct 120

ccagagaagg gactggagtg ggttgatac attagtagtg gcacttatgt cgtctactat 180

gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgttc 240

ctgcaaatga ccagtctgag gtctgaggac acggccatat attactgttc aacgtacggt 300

agtaaccctt ttgactactg gggccaagge accactctca cagtctctc a 351

<210> 100

<211> 324

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 100

[0036]

| | |
|---|-----|
| caacttgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat cccagggga gaaggtcacc | 60 |
| ataacctgca gtgccacctc aagtgtaagt tccatgcact gttccagca gaagccagtc | 120 |
| acttctccca aactctggat ttatagcacc tccaatttgg cttctggagt cctactcgc | 180 |
| ttcagtggca gtggatctgg gacctcttac tctctcacia tcagccgaat ggaggctgaa | 240 |
| gatgctgcca cttattactg ccagcaaagg agtgggtacc cacccatatt cacgttcggc | 300 |
| tcggggacaa agttggaaat aaaa | 324 |

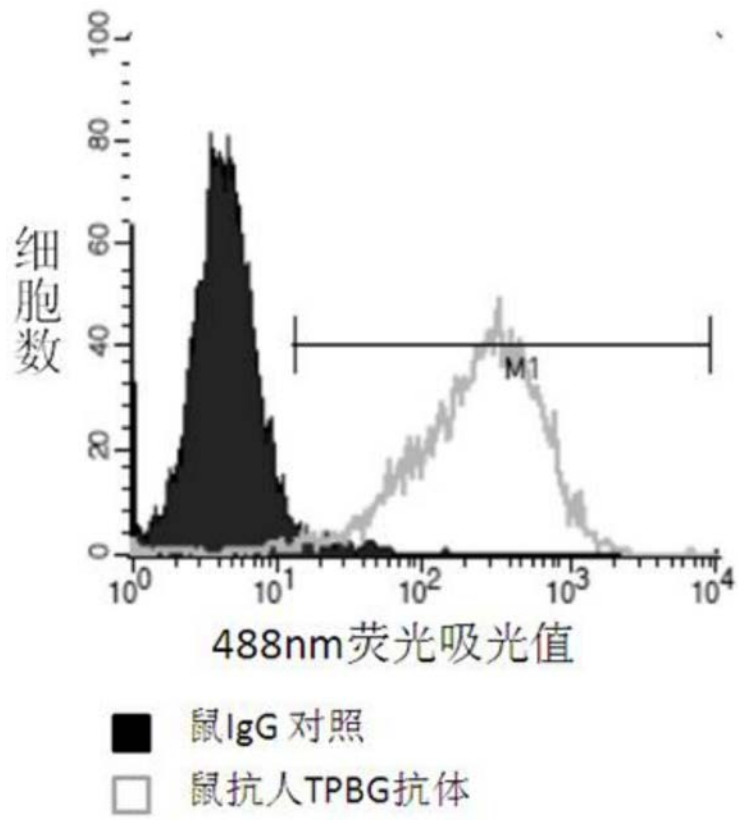


图1

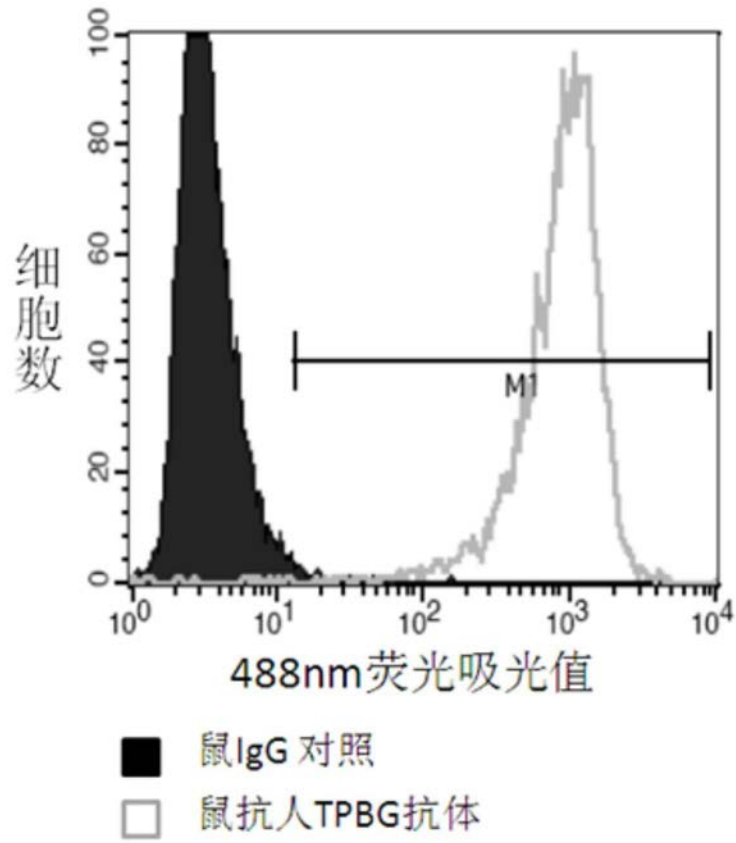


图2

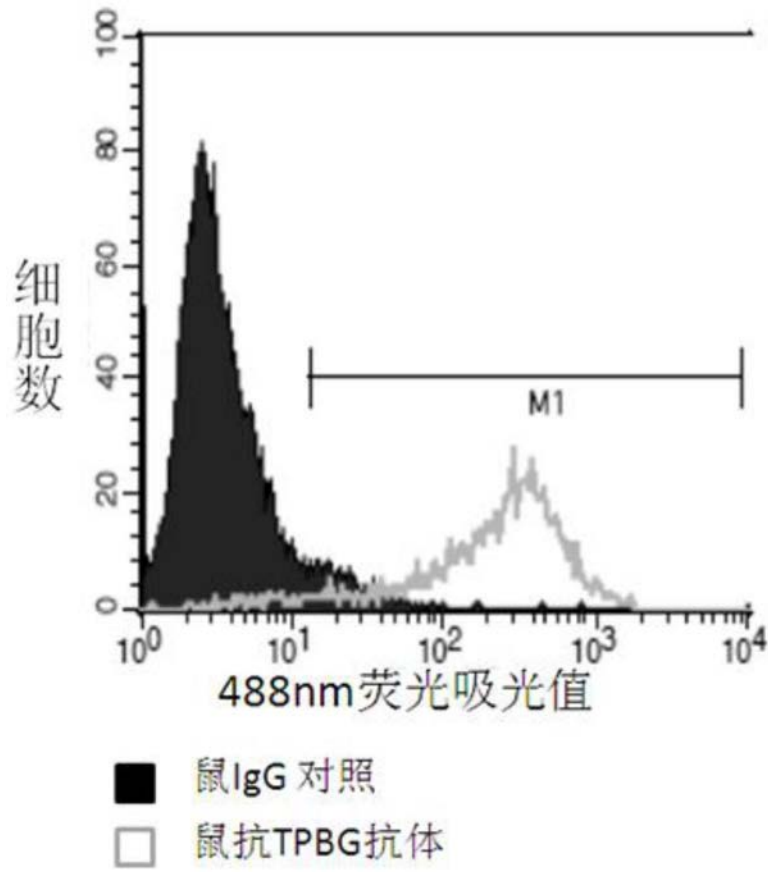


图3

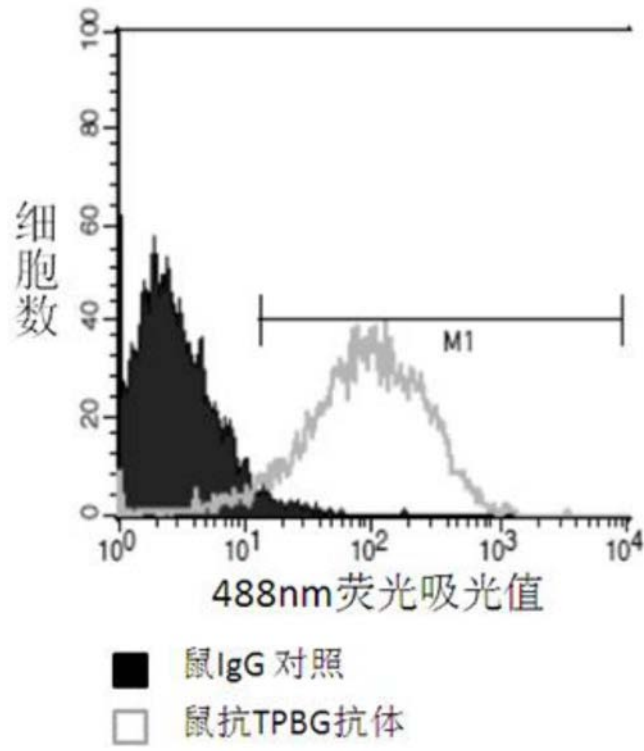


图4

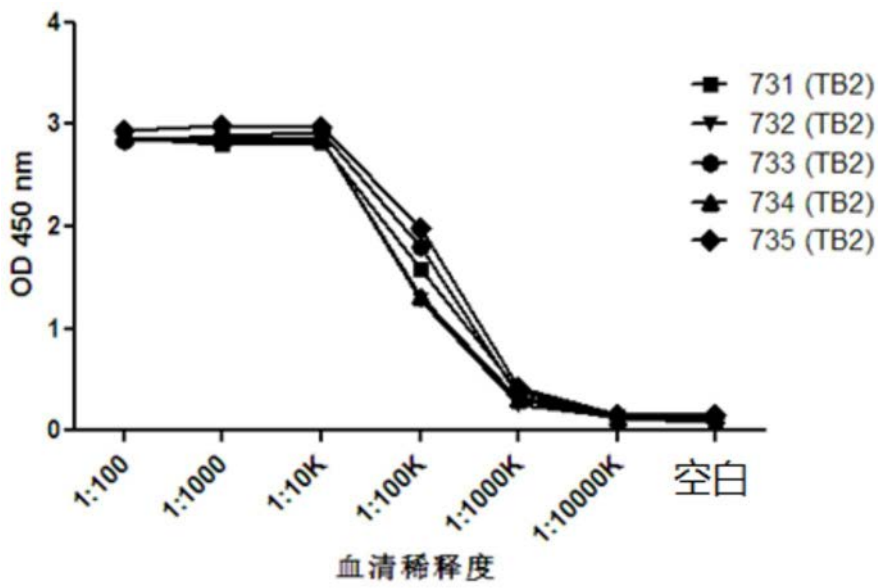


图5

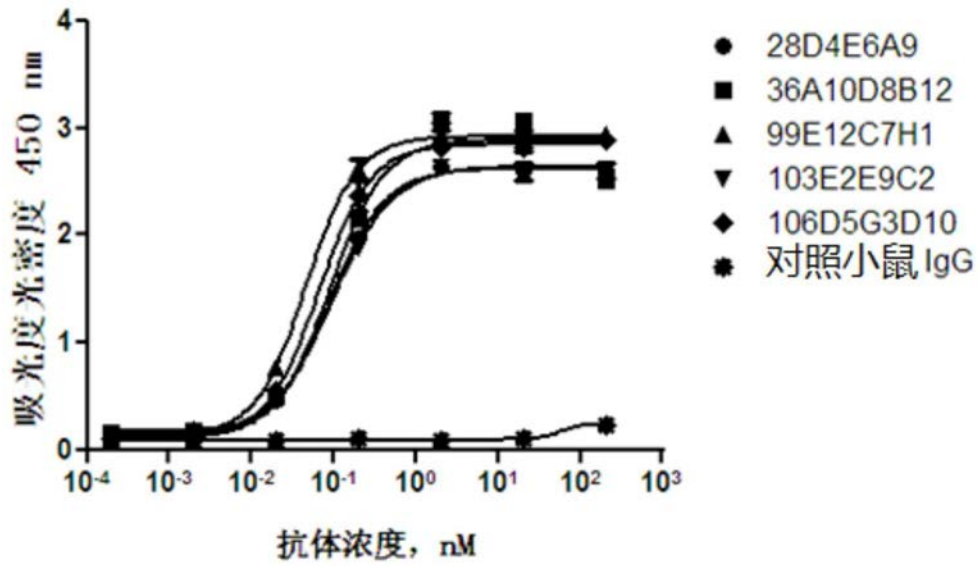


图6A

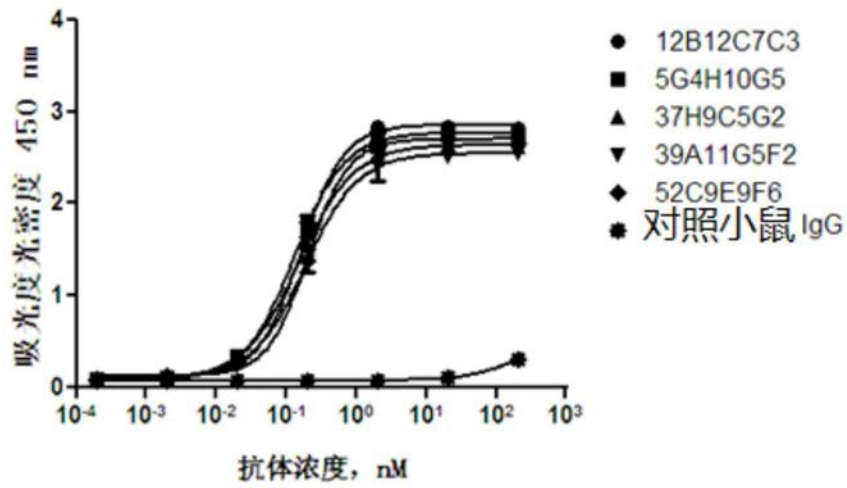


图6B

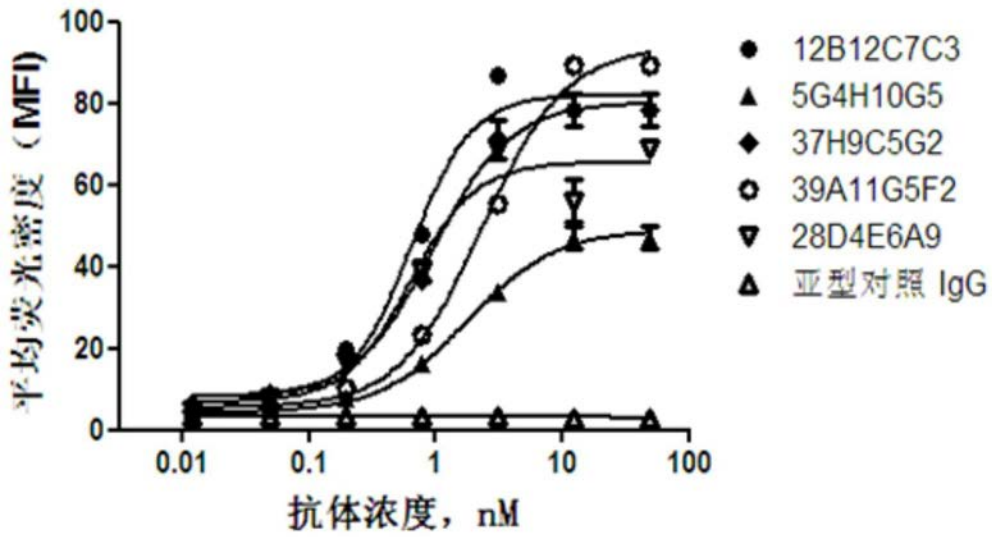


图7A

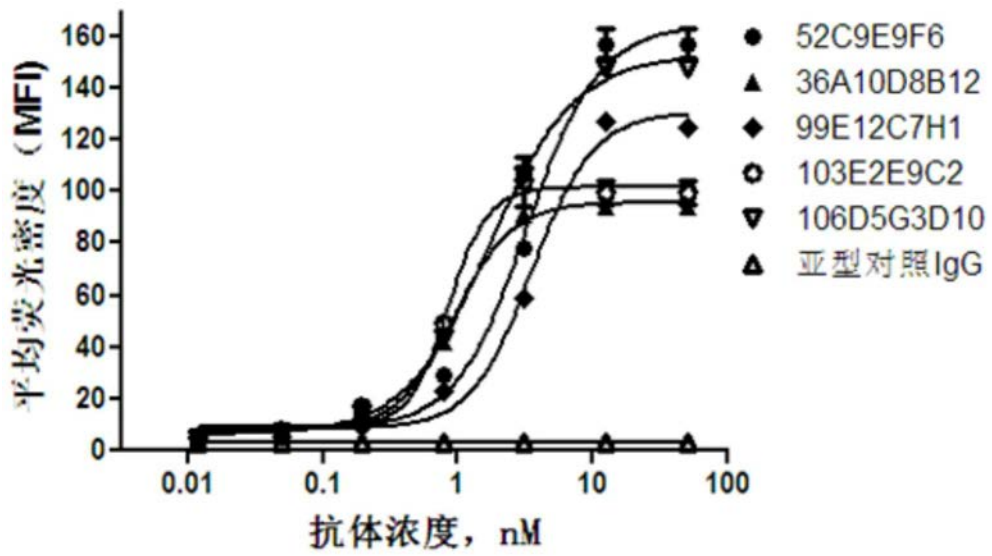


图7B

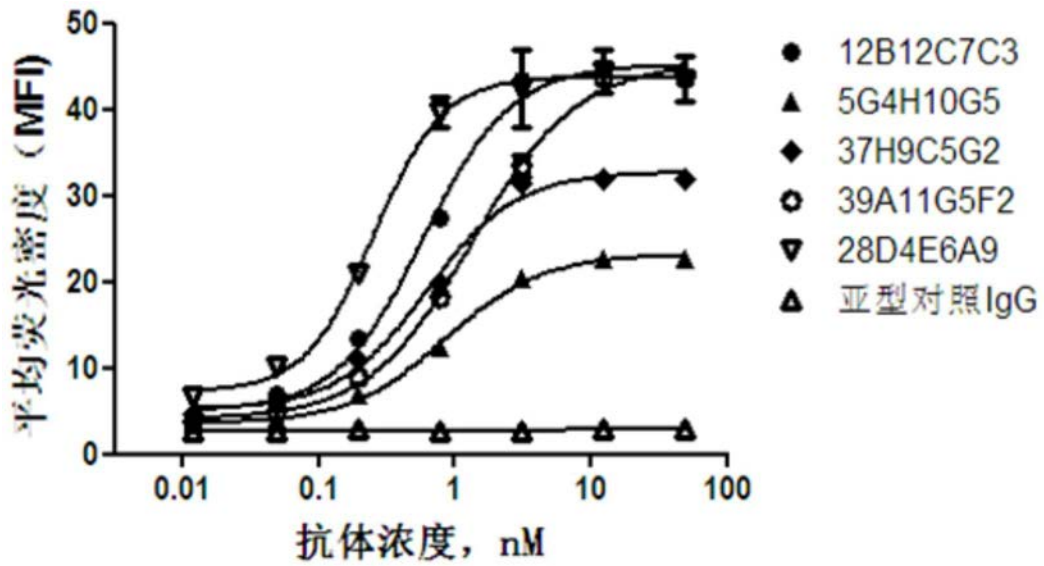


图8A

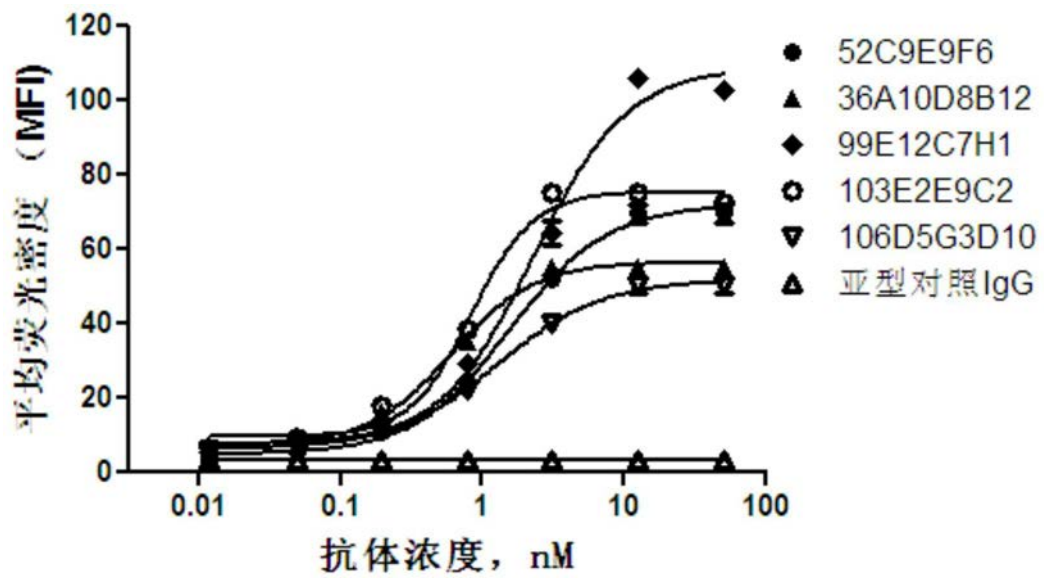


图8B

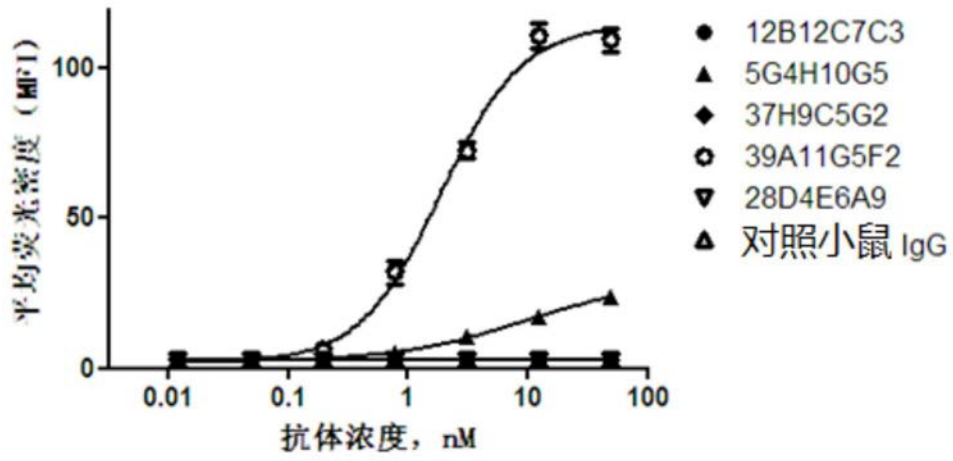


图9A

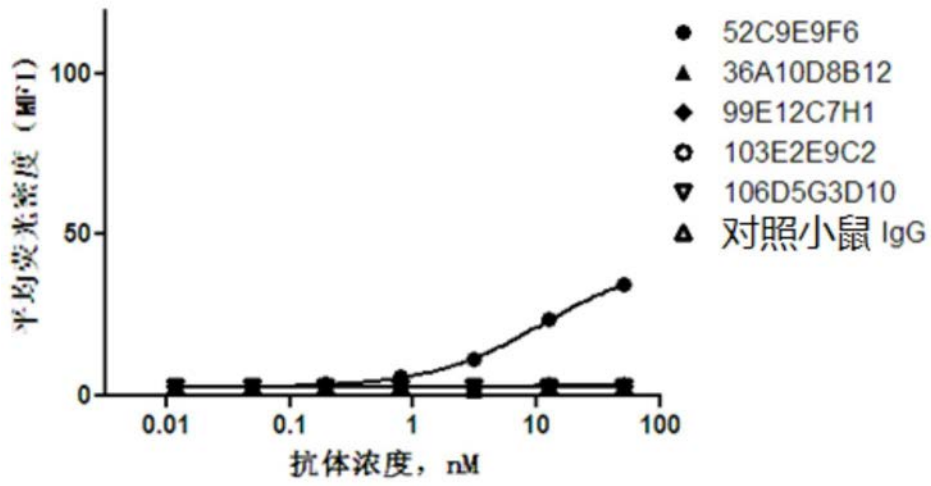


图9B

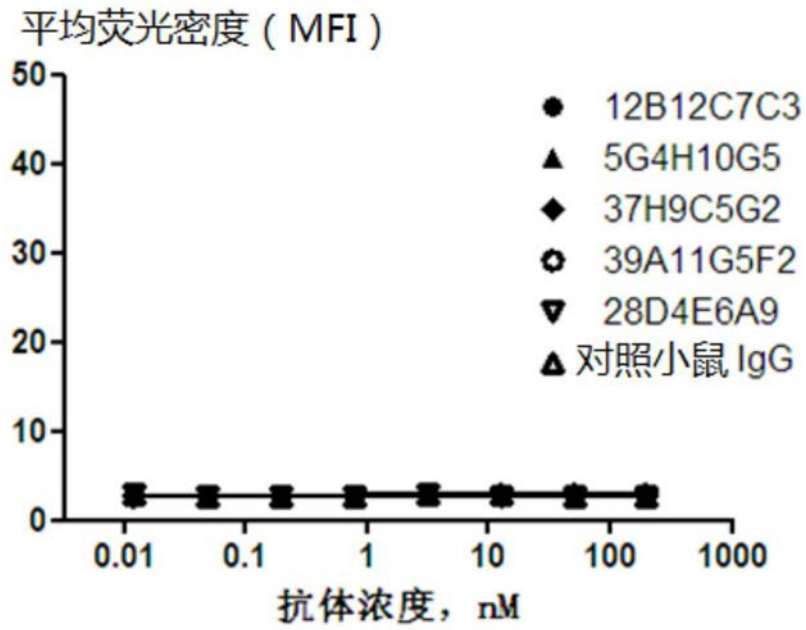


图10A

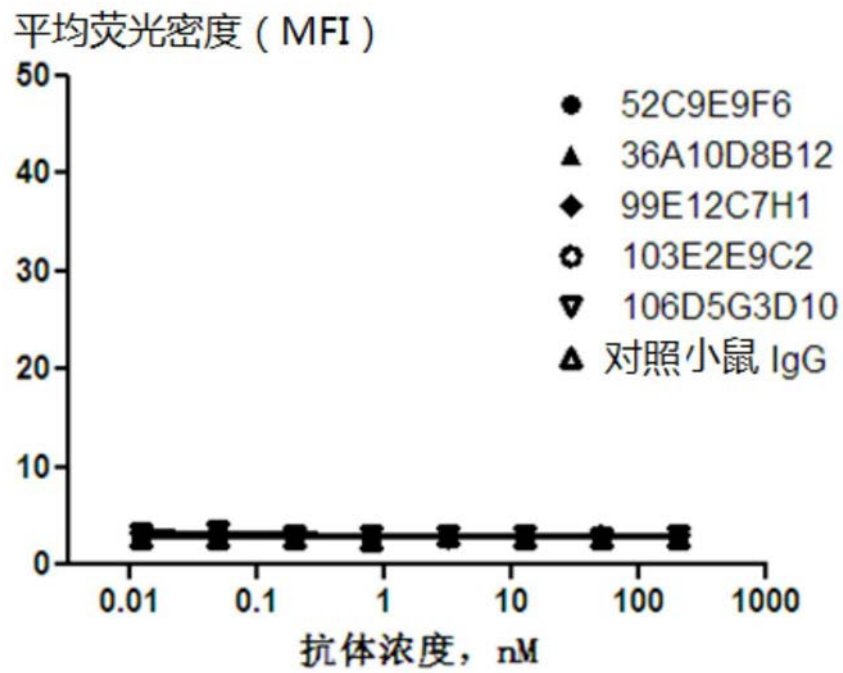


图10B

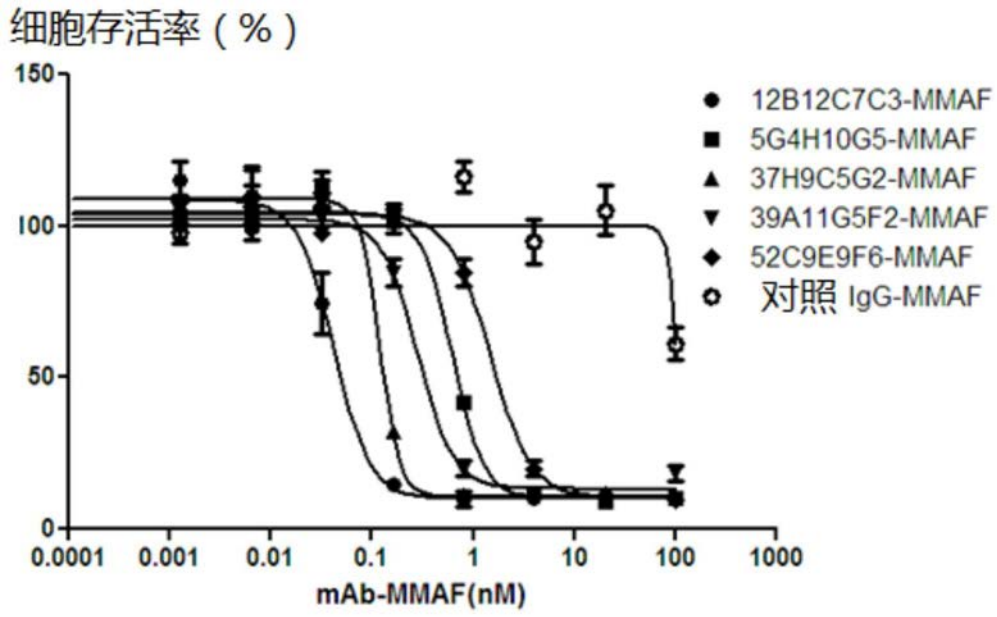


图11A

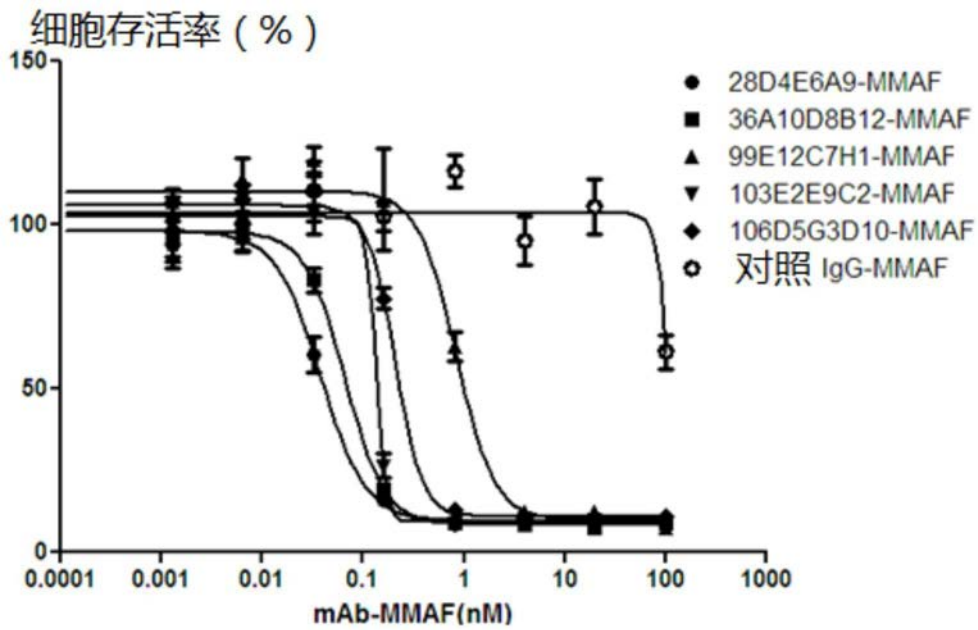


图11B

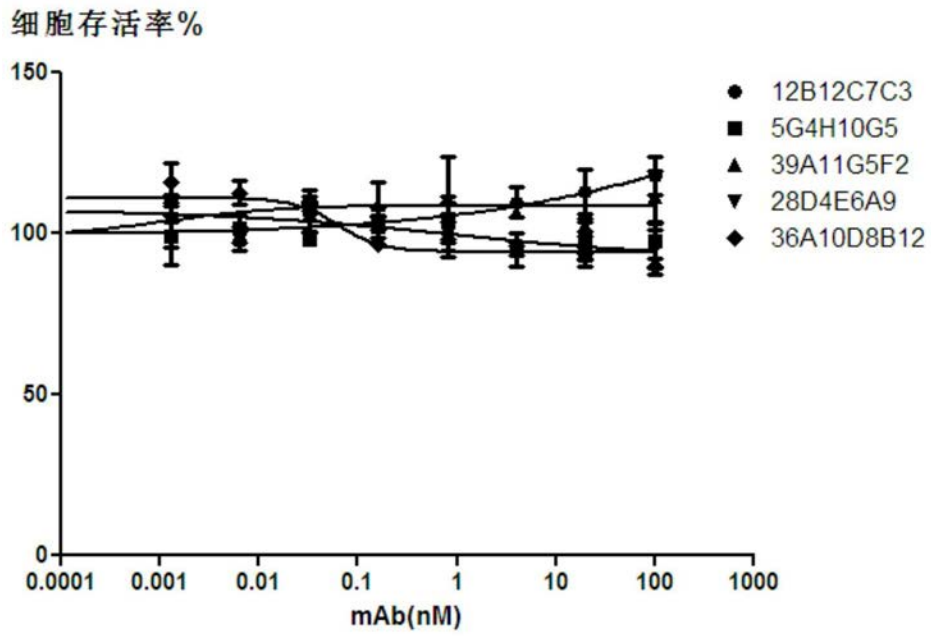


图11C

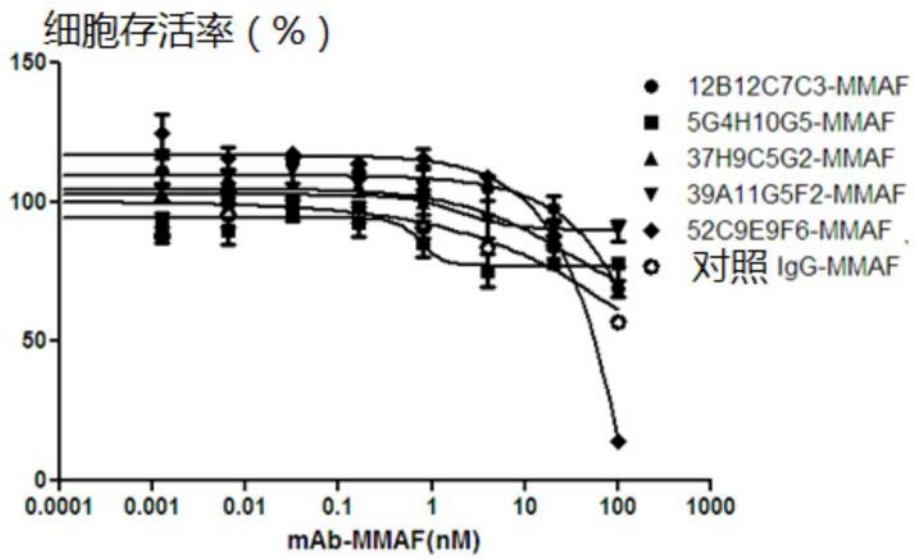


图12A

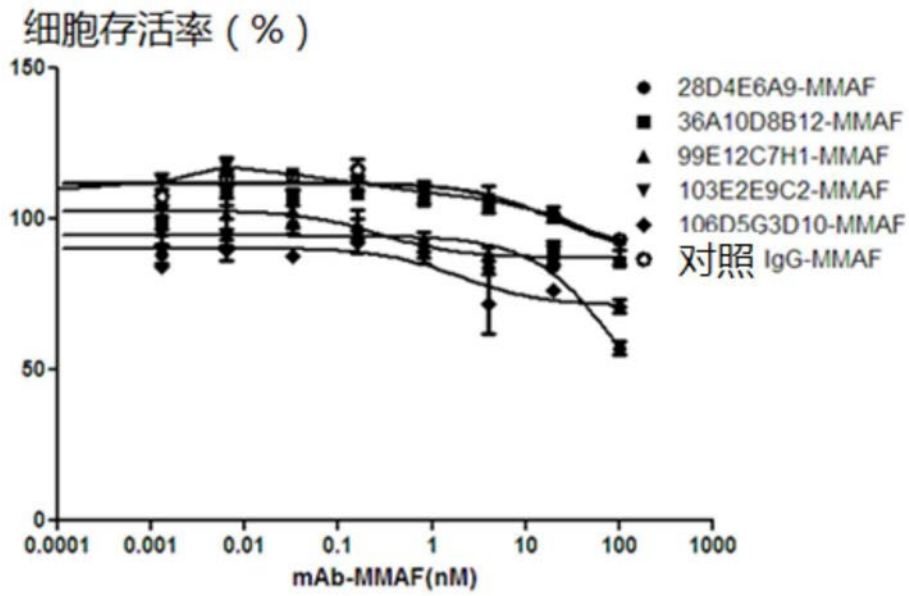


图12B

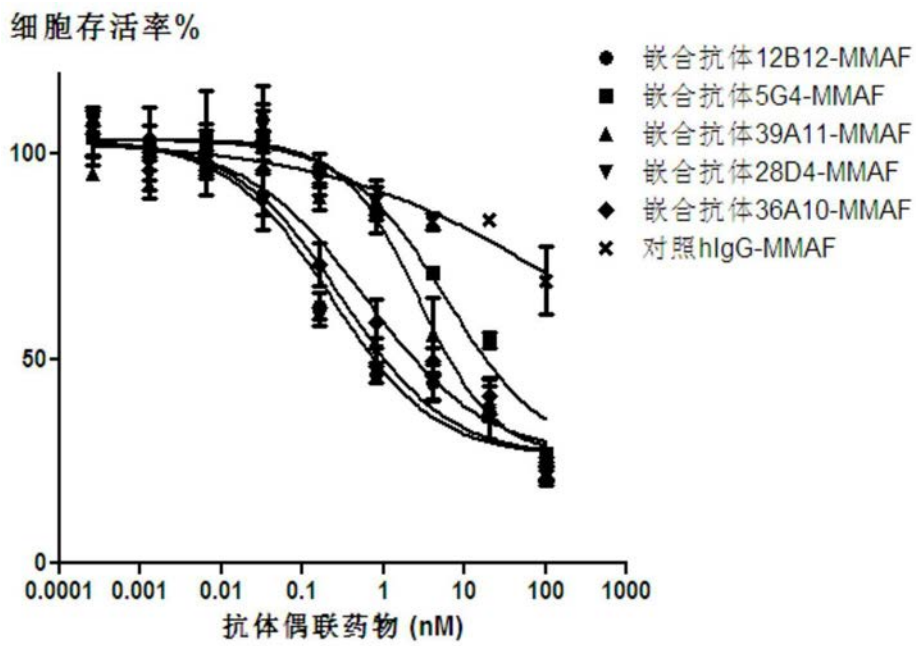


图13

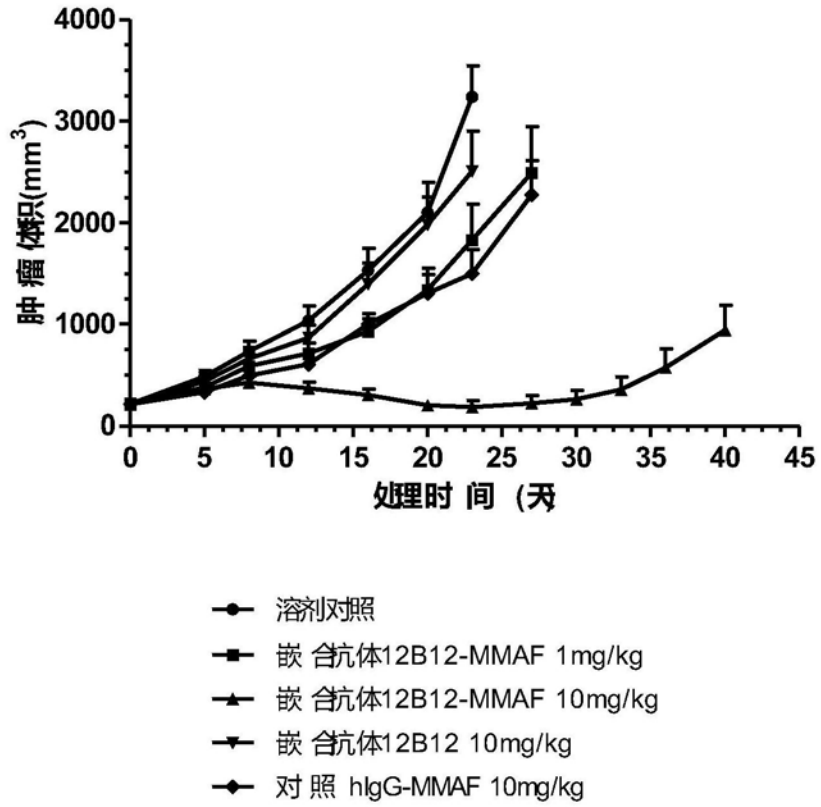


图14A

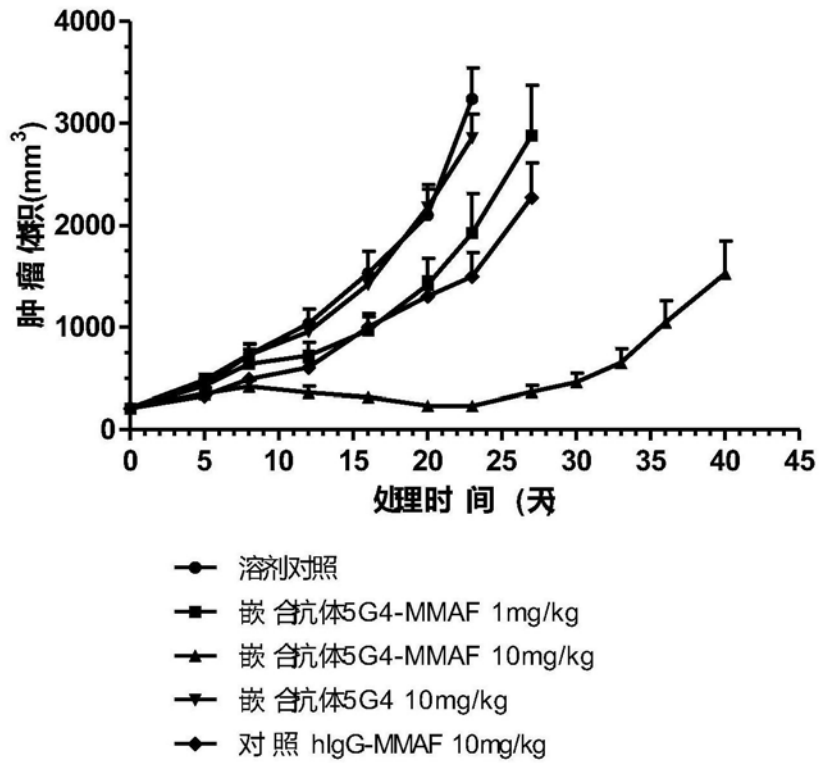


图14B

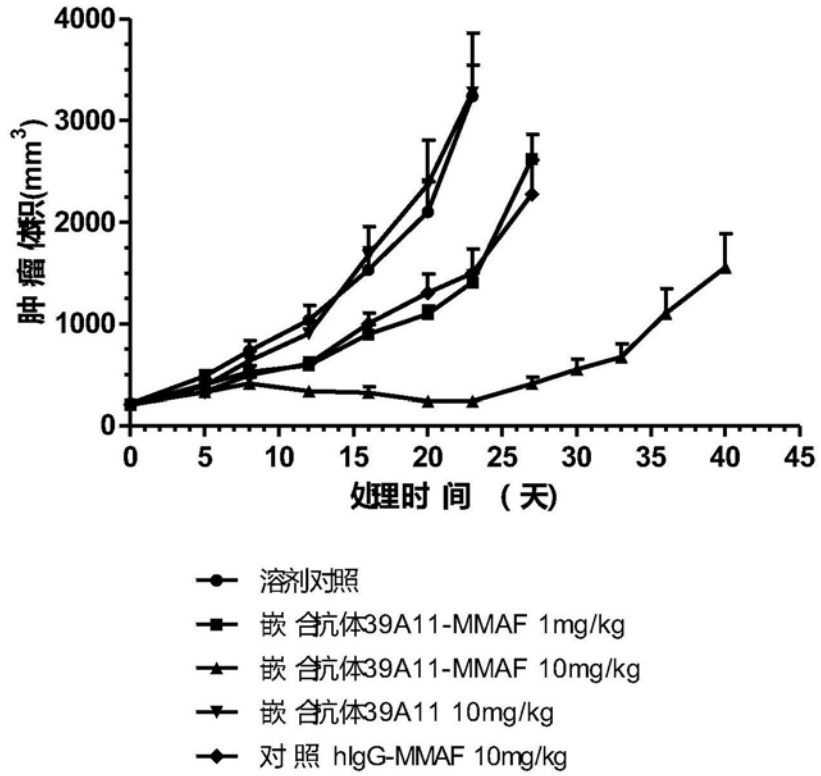


图14C

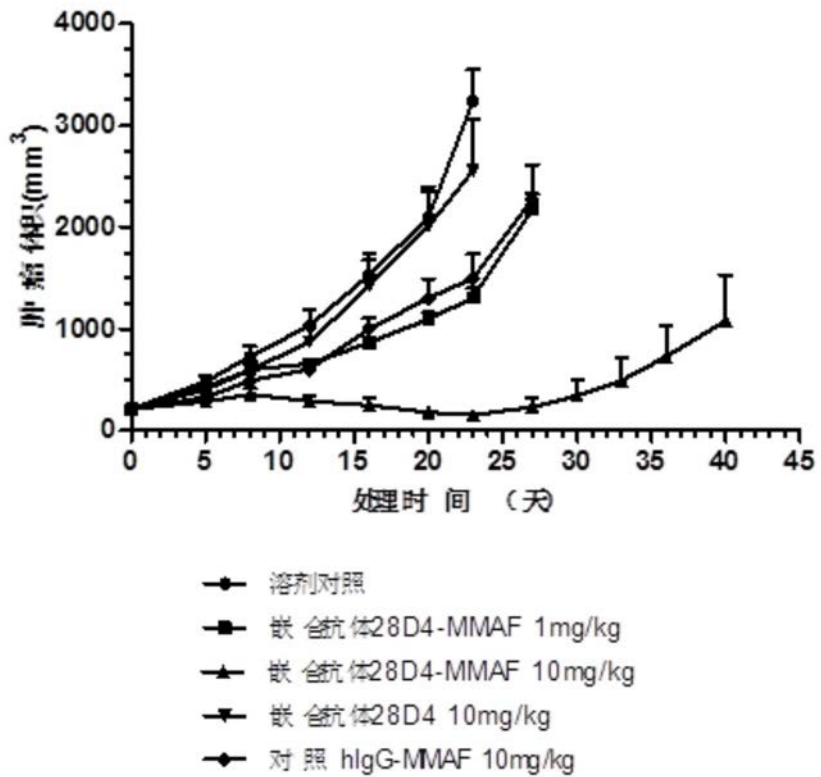


图14D

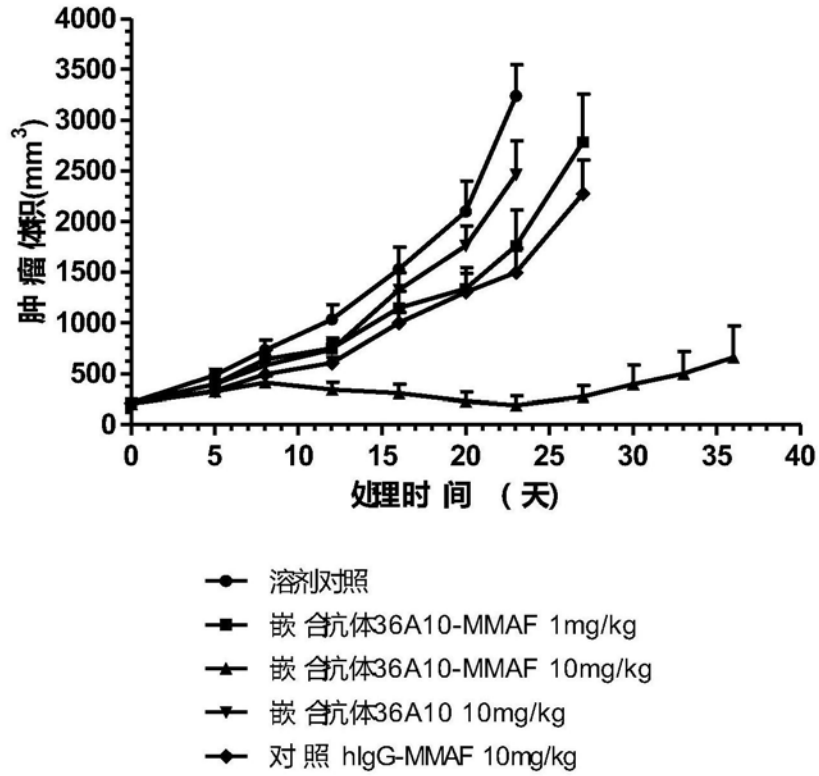


图14E

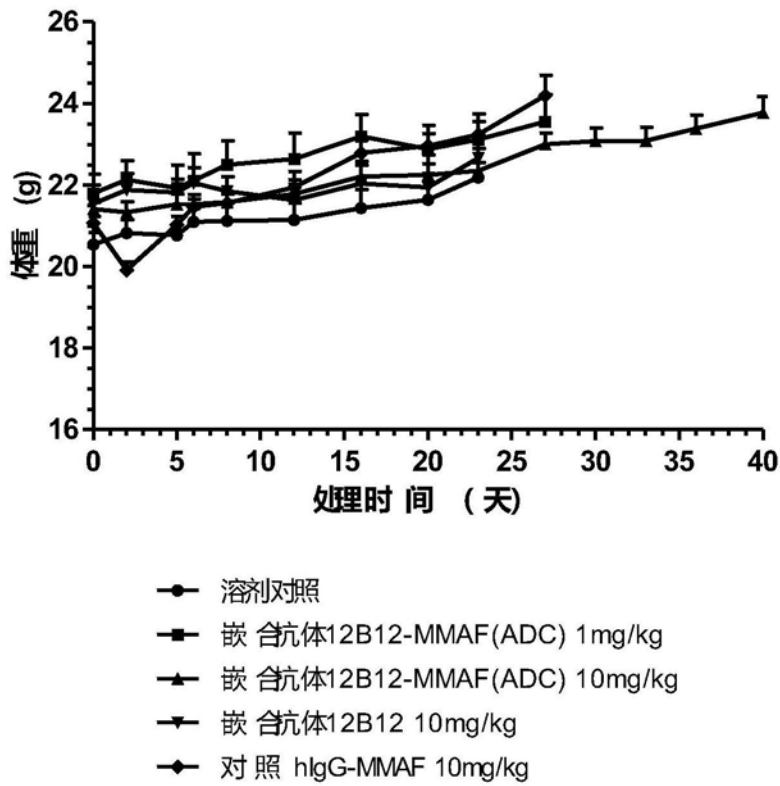


图15A

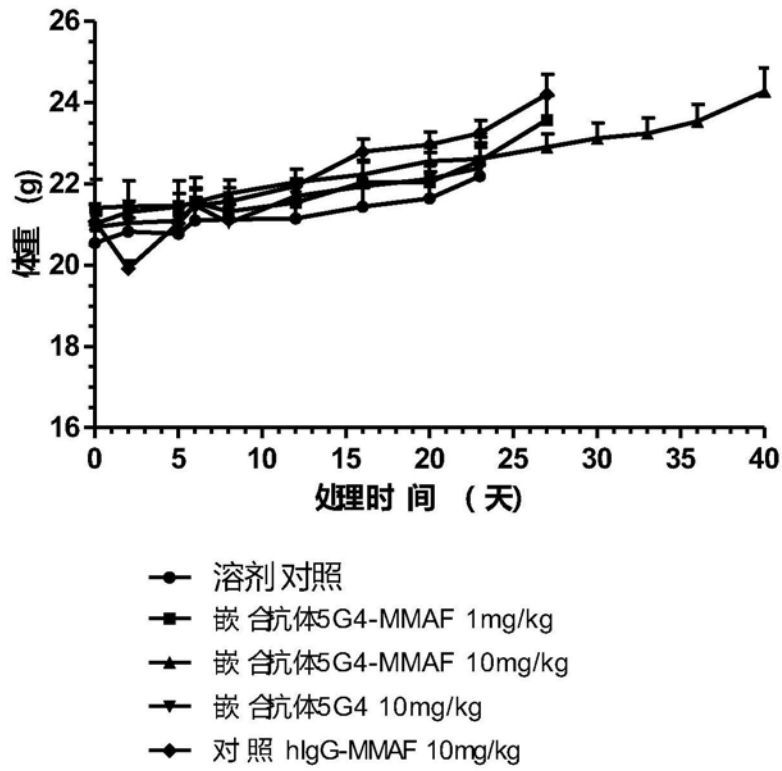


图15B

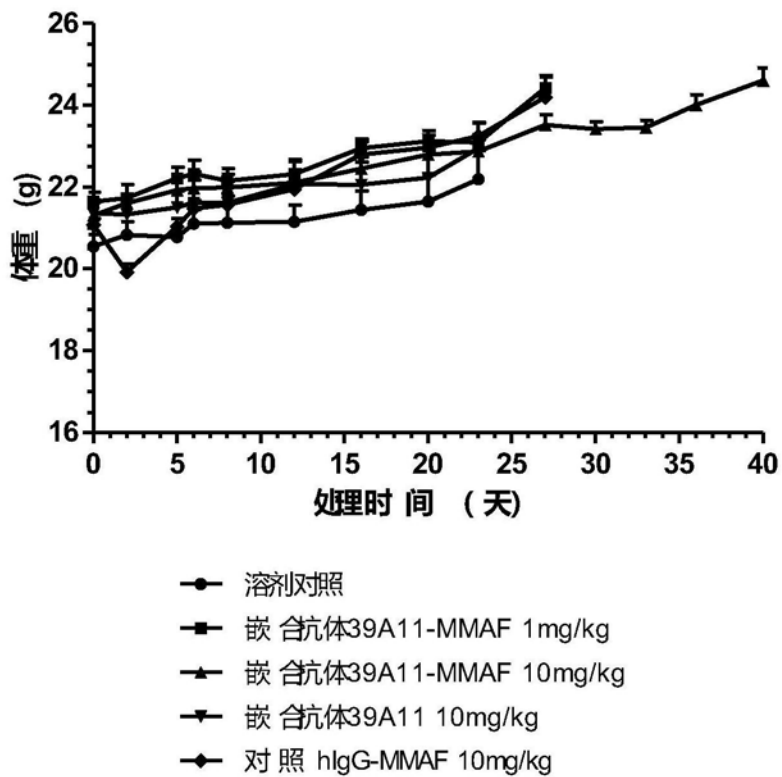


图15C

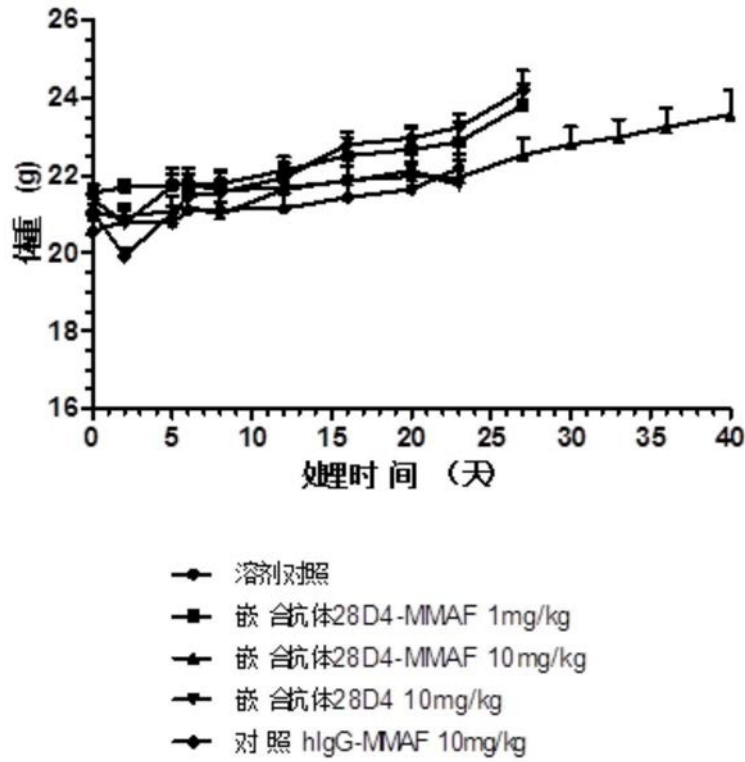


图15D

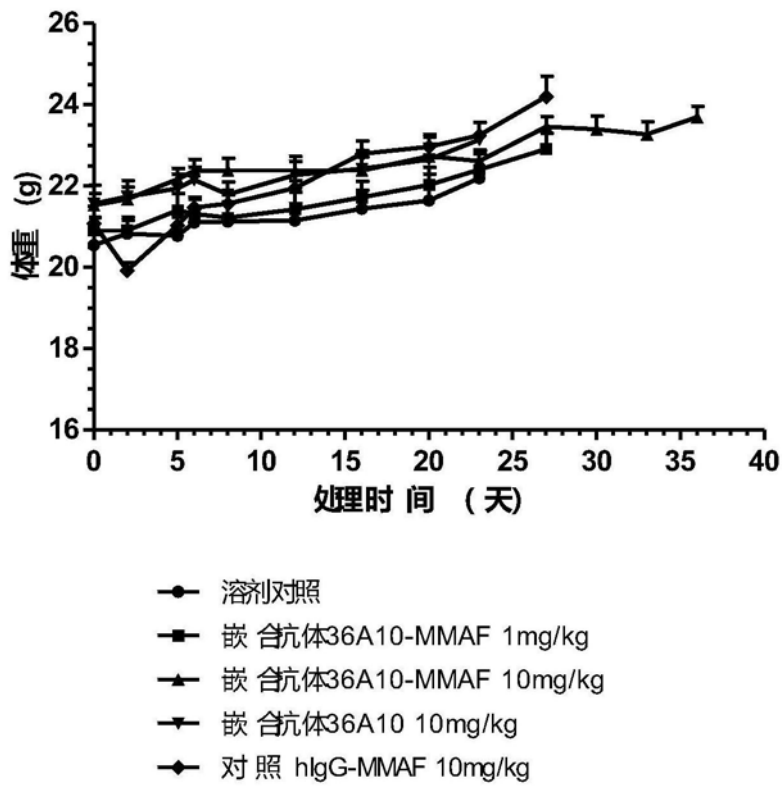


图15E

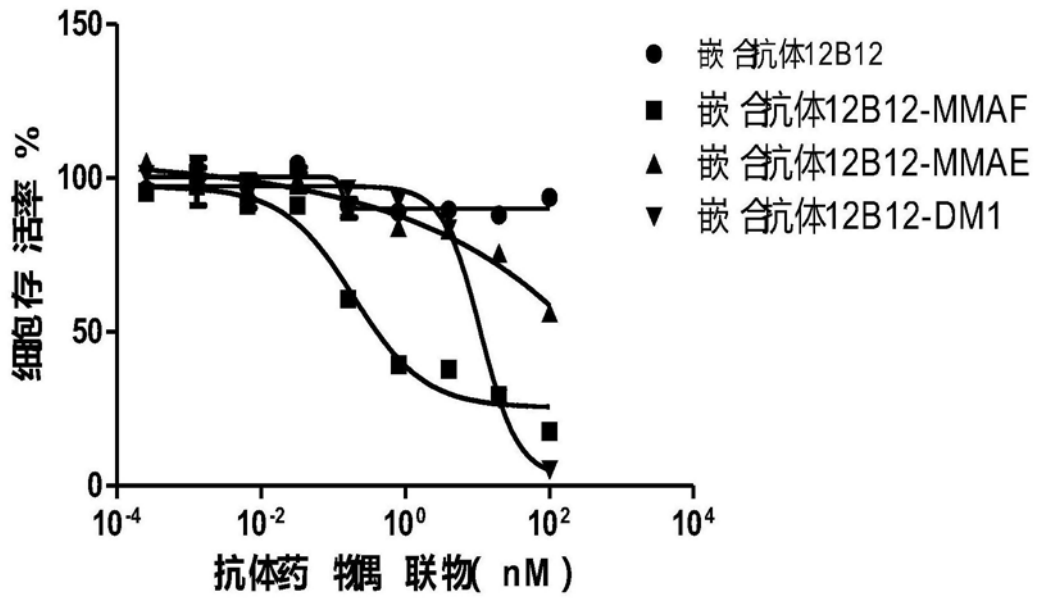


图16A

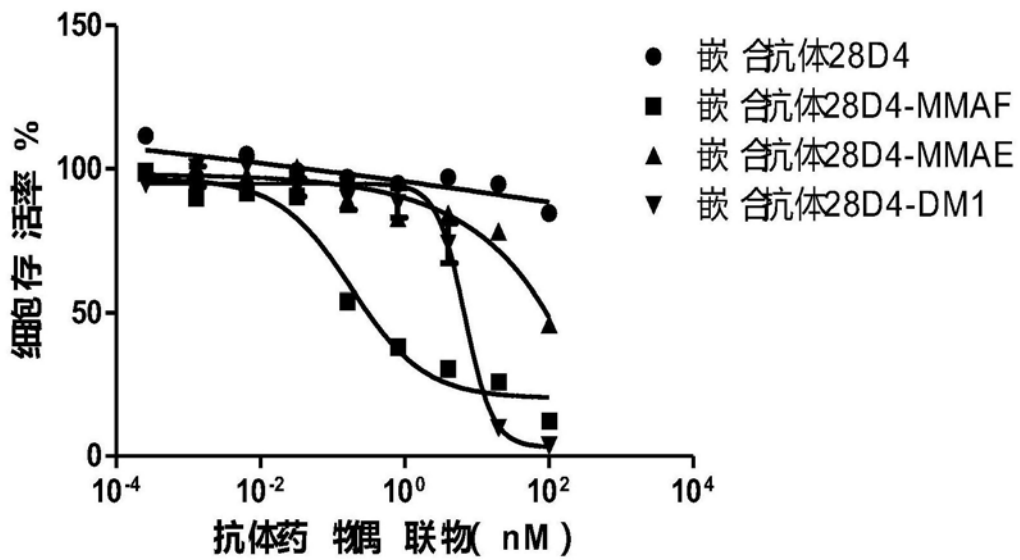


图16B

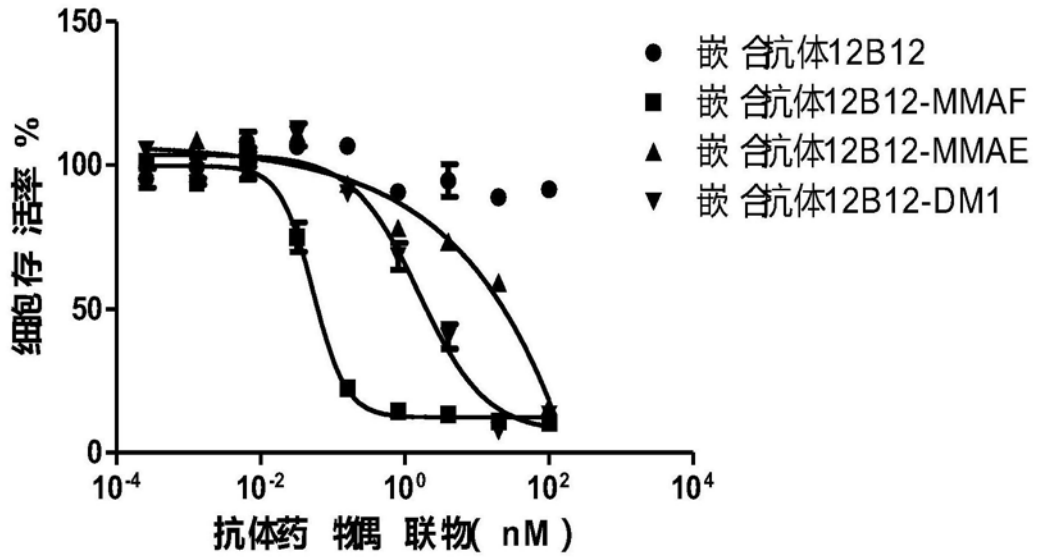


图16C

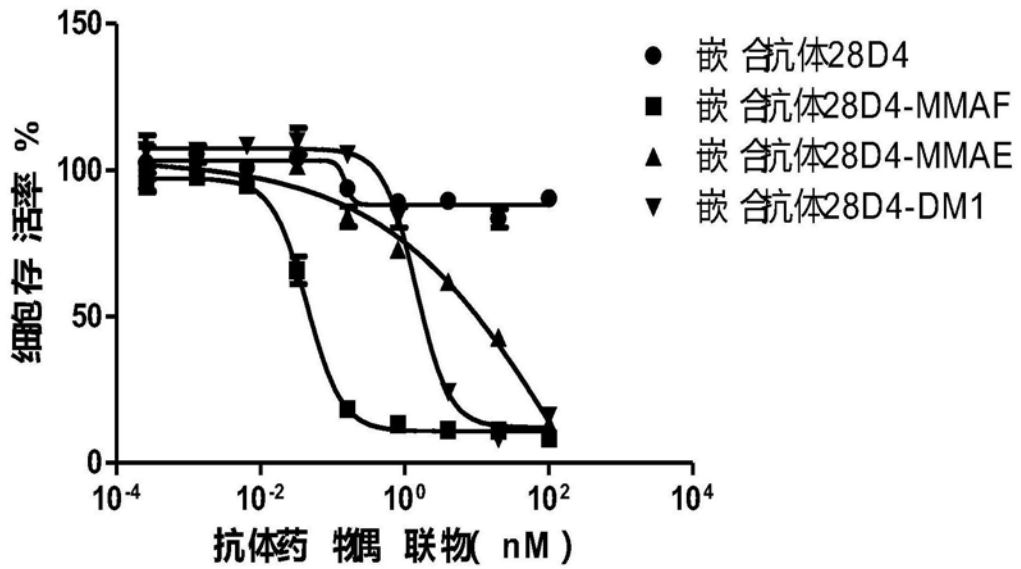


图16D

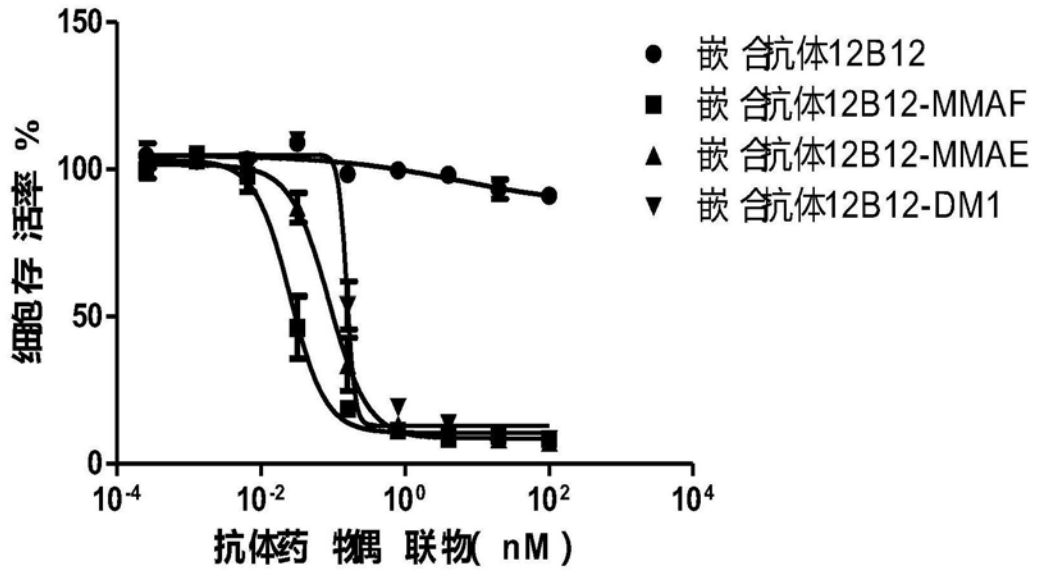


图17A

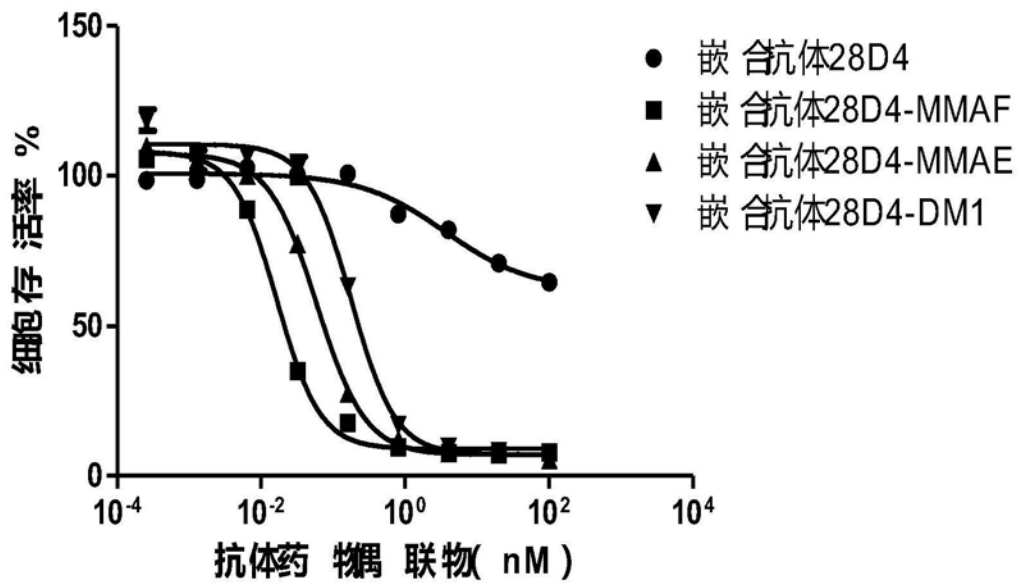


图17B

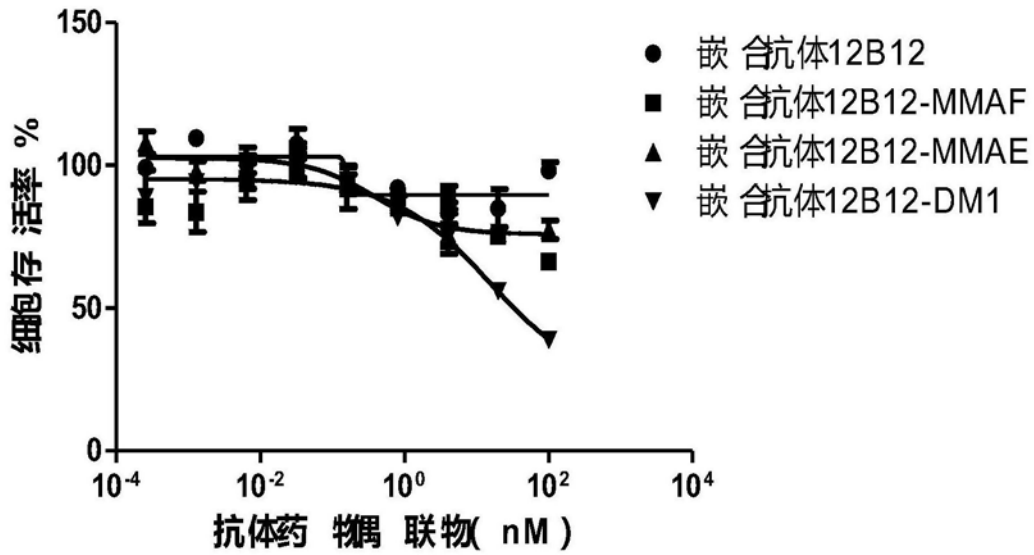


图17C

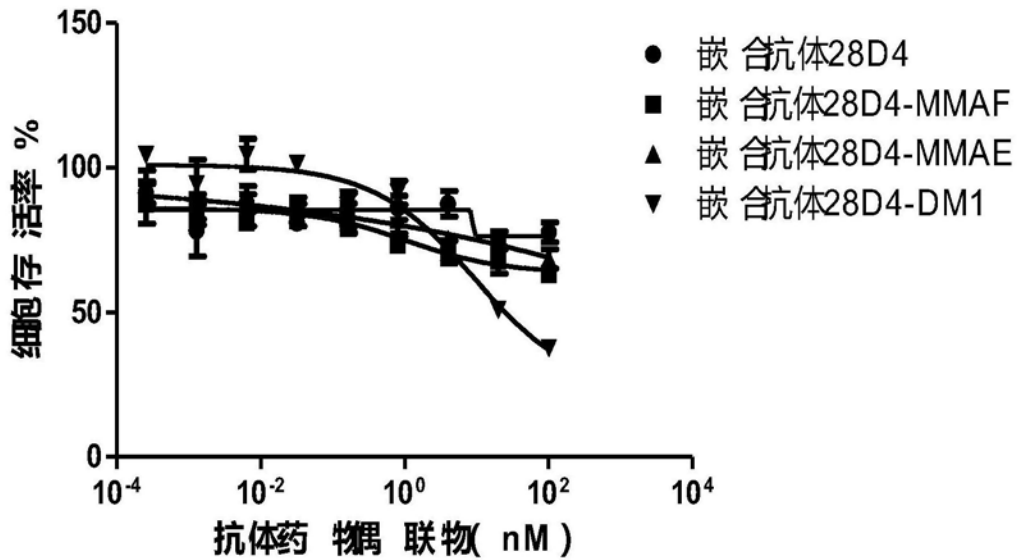


图17D