

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 6 月 29 日 (29.06.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/107973 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/30 (2006.01) A61K 45/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61K 31/4025 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/111699

(22) 国际申请日: 2016 年 12 月 23 日 (23.12.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201510990545.6 2015 年 12 月 24 日 (24.12.2015) CN

(71) 申请人: 凯惠科技发展(上海)有限公司 (XD-CEXPLORER (SHANGHAI) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张江高科技园区蔡伦路 720 弄 3 号楼 302 室, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 孙晓岚 (SUN, Xiaolan); 中国上海市浦东新区自由贸易区哈雷路 965 号 303 室, Shanghai 201203 (CN)。张莹 (ZHANG, Ying); 中国上海市浦东新区自由贸易区哈雷路 965 号 303 室, Shanghai 201203 (CN)。张瑜 (ZHANG, Yu); 中国上海市浦东新区自由贸易区哈雷路 965 号 303 室, Shanghai 201203 (CN)。胡飞飞 (HU, Feifei); 中国上海市浦东新区自由贸易区哈雷路 965 号 303 室, Shanghai 201203 (CN)。宫世勇 (GONG, Shiyong); 中国上海市浦东新区自由贸易区哈雷路 965 号 303 室, Shanghai 201203 (CN)。刘礼乐 (LIU, Lile); 中国上海市浦东新区自由贸易区哈雷路 965 号 303 室, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 上海弼兴律师事务所 (SHANGHAI BE-SHINING LAW OFFICE); 中国上海市小木桥路 681 号外经大厦 21 楼, Shanghai 200032 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))
- 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: TPBG ANTIBODY AND PREPARATION METHOD THEREFOR, CONJUGATE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种 TPBG 抗体及其制备方法、其偶联物和应用

(57) Abstract: The present invention provides a TPBG antibody, a preparation method therefor, a conjugate and a use thereof. Amino acid sequences of a heavy chain variable region and a light chain variable region of the TPBG antibody are respectively shown as SEQ ID NO:1 and 5, SEQ ID NO:9 and 13, SEQ ID NO:17 and 21, SEQ ID NO:25 and 29, SEQ ID NO:33 and 37, SEQ ID NO:41 and 45, SEQ ID NO:49 and 53, SEQ ID NO:57 and 61, SEQ ID NO:65 and 69 or SEQ ID NO:73 and 77. The conjugates of the TPBG antibody and MMAF have a cytotoxic effect on TPBG-positive cells.

(57) 摘要: 本发明提供了一种 TPBG 抗体、其制备方法及其偶联物和应用。所述 TPBG 抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 1 和 5、SEQ ID NO: 9 和 13、SEQ ID NO: 17 和 21、SEQ ID NO: 25 和 29、SEQ ID NO: 33 和 37、SEQ ID NO: 41 和 45、SEQ ID NO: 49 和 53、SEQ ID NO: 57 和 61、SEQ ID NO: 65 和 69 或者 SEQ ID NO: 73 和 77 所示。所述 TPBG 抗体与 MMAF 的偶联物对 TPBG 阳性的细胞有杀伤作用。



WO 2017/107973 A1

一种 TPBG 抗体及其制备方法、其偶联物和应用

本申请要求申请日为 2015 年 12 月 24 日的中国专利申请 CN201510990545.6 的优先权。本申请引用上述中国专利申请的全文。

技术领域

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

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。

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。

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。

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。

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

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。

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。

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。

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。

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。

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。

综上所述，上述氨基酸序列的编号如表 1 所示：

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
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

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

本发明还提供一种核酸，其编码上述的蛋白质。

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。

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。

综上所述, 上述核苷酸序列的编号如表 2 所示:

表 2 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

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。

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;

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 151 位至第 198 位;

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;

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;

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 157 位至第 180 位;

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;

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;

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;

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;

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;

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;

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;

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;

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 151 位至第 198 位;

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;

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;

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;

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。

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;

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 151 位至第 198 位;

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;

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;

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;

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。

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;

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 151 位至第 198 位;

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;

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;

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;

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 268 位至第 291 位。

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;

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;

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;

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;

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;

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。

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;

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 154 位至第 198 位;

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;

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;

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;

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。

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;

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 151 位至第 198 位;

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;

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;

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;

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。

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;

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 151 位至第 198 位;

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;

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;

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;

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。

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;

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 151 位至第 198 位;

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;

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;

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;

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。

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。

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。

本发明还提供一种包含所述核酸的重组表达载体。

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。

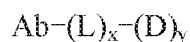
本发明还提供一种包含上述重组表达载体的重组表达转化体。

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。

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。

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。

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，



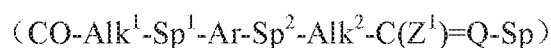
式 1

其中，Ab 为上述的蛋白质；L 为接头；D 为细胞毒剂；所述 x 为本领域常规的交联度，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。

所述 L 是本领域常规的接头（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）。

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、脲类、脲类、缩醛类、原酸酯类、氨基类、小肽段或核苷酸片段。

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：



式 2

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;

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

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;

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, 其中杂芳基优选是呋喃基、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-。

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;

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(CH₂)_nCOOR'、-S(CH₂)_nCOOR'、-O(CH₂)_nCONHR' 或 -S(CH₂)_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。

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(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; 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。

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)。

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。

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、哈米特林、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 N2'-脱乙酰-N2'-3-巯基-1 氧代丙基-美登素 (DM1)。

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。

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硝基脲类化学治疗剂，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-重氮基-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、莫哌达醇、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、

腺苷、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，更佳地选自紫杉醇、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、硫嘌呤或甲氨蝶呤。所述的铂类似物为本领域常规的铂类似物，更佳地选自顺铂、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，更佳地为视黄酸。

其中，所述放射性同位素为本领域常规的放射性同位素，更佳地，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。更佳地，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}F 、 ^{64}Cu 、 ^{65}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{77}Br 、 $^{80\text{m}}\text{Br}$ 、 ^{95}Tc 、 ^{97}Tc 、 ^{103}Tc 、 ^{105}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{107}Ag 、 ^{203}Ag 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{126}I 、 ^{131}I 、 ^{133}I 、 ^{111}In 、 ^{113}In 、 $^{99\text{m}}\text{In}$ 、 ^{105}In 、 ^{101}In 、 ^{186}In 、 ^{188}In 、 $^{121\text{m}}\text{Sb}$ 、 ^{99}Zr 、 $^{122\text{m}}\text{Sb}$ 、 $^{125\text{m}}\text{Sb}$ 、 ^{165}Yb 、 ^{167}Yb 、 ^{168}Yb 、 ^{90}Y 、 ^{213}Bi 、 ^{213}Po 或 ^{225}Ac ，或者其衍生的氮化物或氧化物。

其中，所述治疗性核酸为本领域常规的核酸，更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。

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，较佳地选自 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、TGFb、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。

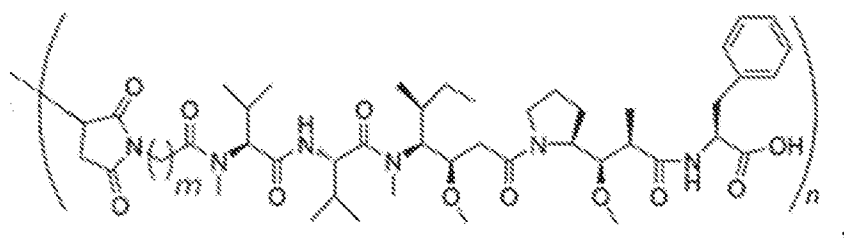
其中，所述的抗血管生成剂为本领域常规的抗血管生成剂，较佳地选自法尼基转移酶抑制剂、COX-2 抑制剂、VEGF 抑制剂、bFGF 抑制剂、类固醇硫酸酯酶抑制剂、白介素-24、凝血栓蛋白、metallospodin 蛋白质、I 类干扰素、白介素 12、鱼精蛋白、血管他丁、层粘连蛋白、内皮他丁或催乳激素片段。更佳地为 2-甲氧基雌二醇二氨基磺酸酯 (2-MeOE2bisMATE)。

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，较佳地选自 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，较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的三萜类化合物，较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，较佳地选自 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，较佳地为 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，较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，较佳地为 UCN-01 或格尔德霉素。

其中，所述细胞溶解酶为本领域常规的细胞溶解酶，较佳地为 RNA 酶。

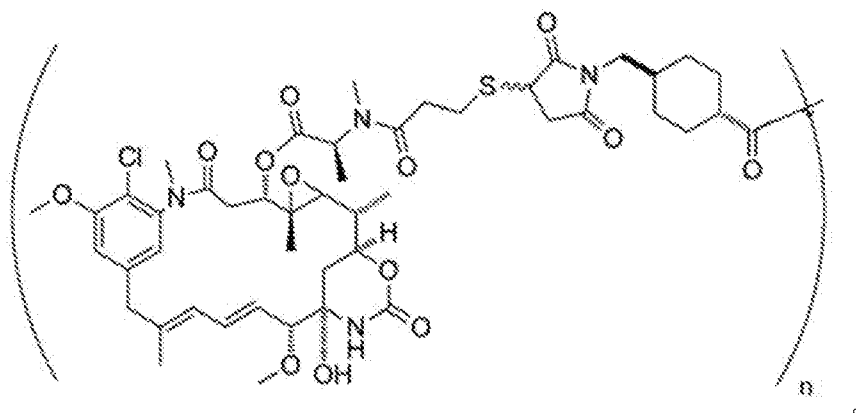
本发明优选地，式 1 中 $x=y=n$ ；由此

在一个优选实施例中， $-(L)_x-(D)_y$ 为：

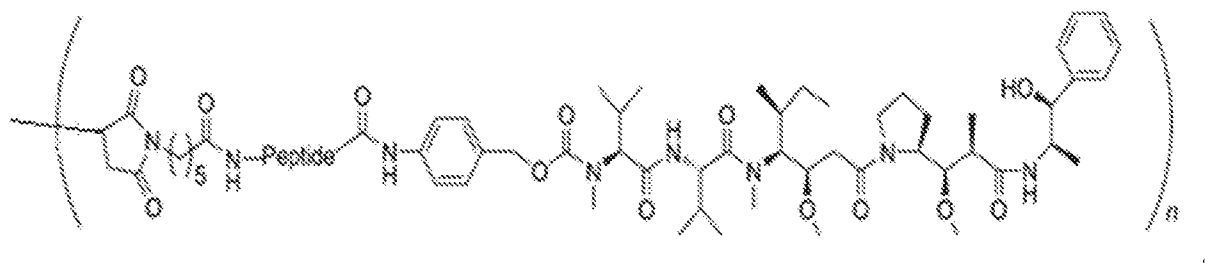


其中 m 为 1~10, 优选 m 为 5。

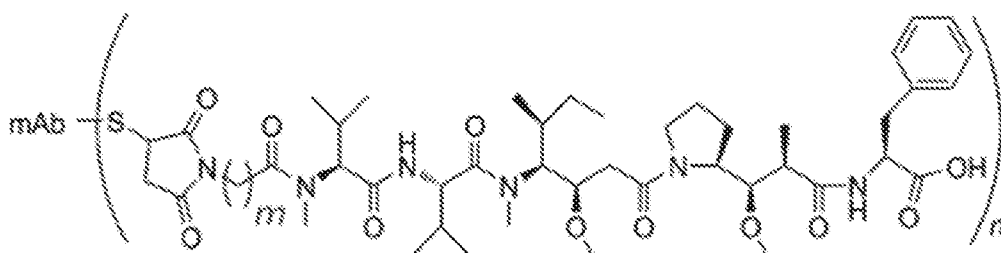
在一个优选实施例中, $-(L)_x-(D)_y$ 为:



在一个优选实施例中, $-(L)_x-(D)_y$ 为:

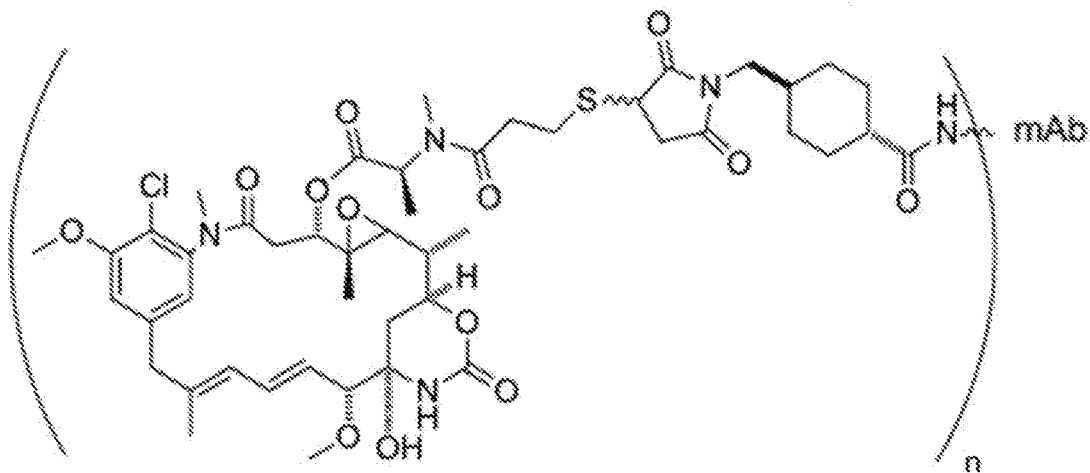


最佳地, 所述 D 为微管蛋白合成酶抑制剂——甲基奥瑞他汀 F (MMAF), 且所述接头 L 为马来酰亚胺基己酰 (maleimidocaproyl, MC), 所述免疫偶联物的结构如式 3 所示,



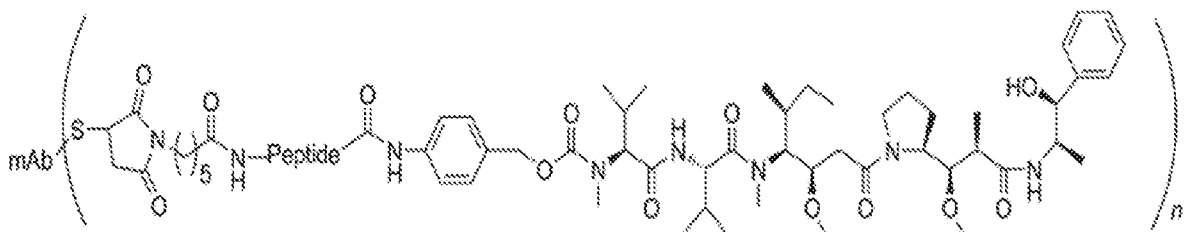
式 3

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。

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,



式 5

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。

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。

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 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。

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。

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。

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。

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、浸润性子宫内膜腺癌、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、子宫颈癌、胰腺癌或精囊癌的药物。

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、腹膜内或肌肉施用。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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

本发明提供一种上述的蛋白质在治疗肿瘤中的应用。

本发明提供一种上述的免疫偶联物在治疗肿瘤中的应用。

本发明提供一种上述的药物组合物在治疗肿瘤中的应用。

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。

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。

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。

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。

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。

本发明所用试剂和原料均市售可得。

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

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

图 2 为人 TPBG 蛋白转染的 CHOK1 细胞 FACS 筛选检测结果。

图 3 为食蟹猴 TPBG 蛋白转染的 CHOK1 细胞 FACS 筛选检测结果。

图 4 为小鼠 TPBG 蛋白转染的 CHOK1 细胞 FACS 筛选检测结果。

图 5 为 ELISA 检测 TPBG 免疫后小鼠血清抗体效价情况。

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

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

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

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

图 10A 和图 10B 为 FACS 检测 TPBG 抗体与 CHOk1 的结合反应。

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。

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。

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。

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。

图 14 A 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。

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。

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。

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。

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。

图 15 A 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。

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。

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。

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。

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。

图 16 A 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。

图 16 C 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。

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。

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

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。

实施例中所指的室温为本领域常规的室温，一般为 10~30℃。

若无特别说明，实施例中所指的 PBS 为 PBS 磷酸缓冲液，pH7.2。

实施例 1 TPBG 抗体的制备

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 Genbank 的编号为 Genbank 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 TM 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 (A_{280nm}) 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。

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。

(二)、免疫原 B 的制备

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 细胞系和 CHOK1 细胞系 (均购自 Invitrogen) 进行质粒转染 (PEI, 购自 Polysciences) 后, 在含 0.5 μ g/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%。

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
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

(三)、杂交瘤细胞的制备和抗体筛选

A、免疫原 A 免疫

采用 6~8 周龄 BALB/cAnNCrl 小鼠或 SJL/JorllcoCrl 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鼠血清, 表中的数据为 OD_{450nm} 值。

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

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

B、免疫原 B 免疫

采用 6~8 周龄 BALB/cAnNCrl 小鼠或 SJL/JorllcoCrl 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 细胞每 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。

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 NH_4OH 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、 $1 \times \text{HAT}$ 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) CO_2 、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 $\text{OD}_{450\text{nm}} > 1.0$ 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) CO_2 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)。

根据 24 孔板筛选结果, 挑选 ELISA 实验中 $\text{OD}_{450\text{nm}} > 1.0$ 、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。

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。

实施例 2 先导抗体的生产和纯化

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。

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 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ 。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。

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。

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。

表 5 纯化的 TPBG 抗体检测分析

克隆号	抗体纯度	蛋白浓度 (mg/mL)	内毒素 (EU/mg)
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

实施例 3 先导抗体的检定

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

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。

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。

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
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

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

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 CHOK1 细胞株得含人源 TPBG 的 CHOK1 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 CHOK1 细胞株得含猴 TPBG 的 CHOK1 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 CHOK1 细胞株得含小鼠 TPBG 的 CHOK1 稳定细胞株 (此处称为 CHOK1-mTPBG 稳定细胞株)。

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-mTPBG 3A3 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。

表 7 人/猴/小鼠 TPBG 转染的 CHOK1 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
CHOK1-hTPBG 3A2F1	3.24	798.37
CHOK1-cTPBG 3F13G4	2.66	198.35
CHOK1-mTPBG 3A3	2.38	135.25

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 CHOK1 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。

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

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

实施例 4 TPBG 抗体药物偶联物的细胞杀伤活性实验

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。

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。

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。

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

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
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

实施例 5 竞争性 ELISA 检测分析 TPBG 抗体与抗原的表位分布

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。

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℃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 100μL 每孔,室温孵育 30 分钟后,加入终止液 (1.0N HCl) 100μL 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。

表 10 TPBG 抗体相互之间的竞争率

A B	12B1 2C7C 3	106D 5G3D 10	5G4H 10G5	99E1 2C7H 1	37H9 C5G2	36A1 0D8B 12	39A1 1G5F 2	52C9 E9F6	28D4 E6A9	103E 2E9C 2
12B12 C7C3	97%	96%	47%	25%	1%	3%	0%	4%	74%	0%
106D5 G3D1 0	95%	94%	40%	11%	3%	1%	1%	0%	1%	0%
5G4H 10G5	9%	3%	97%	95%	5%	1%	10%	19%	-1%	2%
99E12 C7H1	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%
52C9E 9F6	27%	7%	32%	18%	4%	19%	97%	97%	17%	0%
28D4E 6A9	24%	5%	11%	11%	0%	75%	0%	0%	96%	88%
103E2 E9C2	0%	0%	7%	3%	23%	31%	0%	0%	95%	88%

其中, A 的含义是各列为包被抗体, 浓度为 1μg/mL; B 的含义是各行竞争抗体,

浓度为 5 μ g/mL。

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。

实施例 6 轻重链可变区氨基酸序列测定

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 $^{\circ}$ C, 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 $^{\circ}$ C, 12000g 离心 15 分钟, 弃上清。加入 1mL 75% (v/v) 乙醇, 轻轻洗涤沉淀, 4 $^{\circ}$ C, 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 $^{\circ}$ C 水浴促进溶解 10 分钟), 即得总 RNA。

逆转录与 PCR: 取 1 μ g 总 RNA, 配置 20 μ L 体系, 加入逆转录酶后于 42 $^{\circ}$ C 反应 60 分钟, 于 7 $^{\circ}$ C 反应 10 分钟终止反应。配置 50 μ L PCR 体系, 包括 1 μ L cDNA、每种引物 25pmol、1 μ L DNA 聚合酶以及相配的缓冲体系、250 μ mol dNTPs; 设置 PCR 程序, 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 分钟, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 秒, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 延伸 35 秒, 35 个循环后再额外于 72 $^{\circ}$ C 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。

克隆与测序: 取 5 μ L 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 $^{\circledR}$ 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 0.5 μ L, 缓冲液 1 μ L, 反应体系 10 μ L, 于 16 $^{\circ}$ C 反应半小时得连接产物。其中连接的试剂盒为 T4 DNA 连接酶, 购自 NEB, 货号 M0402; 取 5 μ L 连接产物加入 100 μ L 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 $^{\circ}$ C 水浴热激 1 分钟, 放回冰上 1 分钟后加入 650 μ L 无抗生素 SOC 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 摇床上以 200RPM 的速度复苏 30 分钟。取出 200 μ L 涂布于含抗生素的 LB 固体培养基上于 37 $^{\circ}$ C 孵箱过夜培养。次日, 使用 T 载体上引物 M13F 和 M13R 配置 30 μ L PCR 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 0.5 μ L 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 5 μ L 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。

表 11 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
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

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。

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

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。

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；

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 151 位至第 198 位；

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；

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；

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 157 位至第 180 位；

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；

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；

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；

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；

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；

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；

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；

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；

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 151 位至第 198 位；

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；

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;

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;

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。

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;

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 151 位至第 198 位;

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;

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;

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;

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。

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;

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 151 位至第 198 位;

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;

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;

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;

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 268 位至第 291 位。

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;

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;

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;

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;

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;

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。

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;

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 154 位至第 198 位;

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;

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;

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;

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。

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;

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 151 位至第 198 位;

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;

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;

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;

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。

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;

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 151 位至第 198 位;

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;

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;

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;

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。

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;

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 151 位至第 198 位;

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;

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;

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;

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。

实施例 7 鼠-人嵌合抗体构建、以及抗体的生产和纯化

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 MACHERY-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 Millopore)过滤,供转染使用。

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 Freestyle 293 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。第二天加入蛋白胨至终浓度为 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。

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。

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。

实施例 8 嵌合抗体的体外药效实验

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 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，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。

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。

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

实施例 9 嵌合抗体的体内药效实验

将 NCI-H1299（非小细胞肺癌细胞株，ATCC，CRL-5803）（ 5×10^6 个）200 μ l 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。

表 14 TPBG 嵌合抗体及其抗体药物偶联物的体内药效实验

分组	动物数量(只)	处理组	剂量(mg/kg)	注射体积(μl/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
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

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14 A-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15 A-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。

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

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或MC-VC-PAB-MMAE（购自南京联宇），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。

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pH 6.5~7.4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。

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16 A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16 C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。

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

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。

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	IC ₅₀ (nM)	
	293-TPBG	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

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。

权利要求

1、一种分离的蛋白质，其特征在于，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，

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。

2、如权利要求 1 所述的蛋白质，其特征在于，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；或，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。

3、一种分离的蛋白质，其特征在于，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。

4、如权利要求 3 所述的蛋白质，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.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。

5、如权利要求 1~4 中至少一项所述的蛋白质，其特征在于，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。

6、如权利要求 5 所述的蛋白质，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。

7、如权利要求 6 所述的蛋白质，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。

8、如权利要求 1 或 3 所述的蛋白质，其特征在于，所述的蛋白质是 TPBG 抗体、单克隆抗体、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、单域抗体或单区抗体。

9、一种核酸，其特征在于，其编码如权利要求 1~7 中至少一项所述的蛋白质。

10、如权利要求 9 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.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。

11、如权利要求 10 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.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。

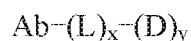
12、一种包含如权利要求 9~11 中至少一项所述的核酸的重组表达载体。

13、一种包含如权利要求 12 所述的重组表达载体的重组表达转化体。

14、一种 TPBG 抗体的制备方法, 其包括如下步骤: 培养如权利要求 13 所述的重组表达转化体, 从培养物中获得 TPBG 抗体。

15、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 1~7 中至少一项所述的蛋白质。

16、如权利要求 15 所述的免疫偶联物, 其特征在于, 1 当量如权利要求 1~7 中至少一项所述的蛋白质通过 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

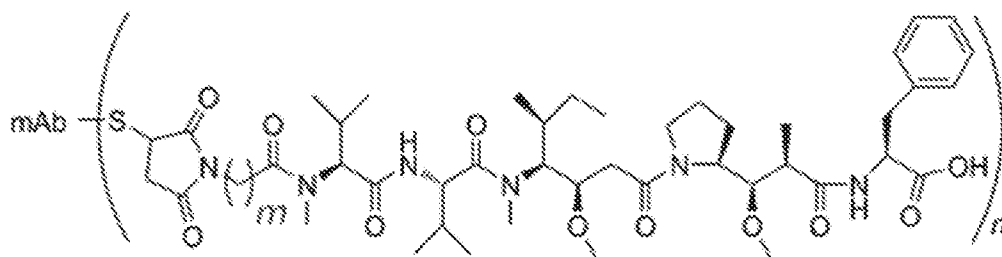
其中, Ab 为如权利要求 1~7 中至少一项所述的蛋白质; L 为接头; D 为细胞毒剂; x 为自然数, 优选 1-20 的整数; y 为 0 或自然数, 优选 0-20 的整数; x 和 y 各自独立地优选为 1~2, 或 2~4, 或 4~8, 或 8~20 的整数; x 和 y 的比例优选为 1:1。

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 为活性酯、碳酸盐类、氨基甲酸酯类、亚胺磷酸酯、肟类、胺类、缩醛类、原酸酯类、氨基类、小肽段或核苷酸片段, 较佳地, 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

琥珀酰亚胺酯 (SMCC);

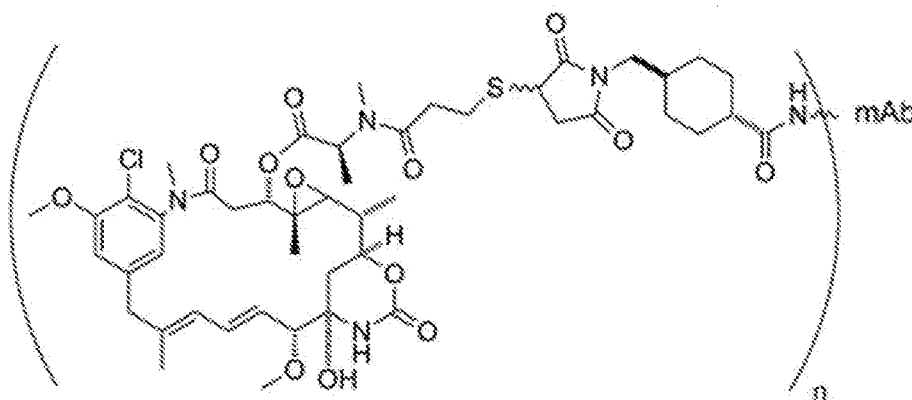
和/或, 所述 D 选自细胞毒素、化学治疗剂、放射性同位素、治疗性核酸、免疫调节剂、抗血管生成剂、抗增殖促凋亡剂或细胞溶解酶, 较佳地, 选自甲基奥瑞他汀 E、甲基奥瑞他汀 F 或 N2'-脱乙酰-N2'-3-巯基-1 氧代丙基-美登素。

18、如权利要求 17 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,



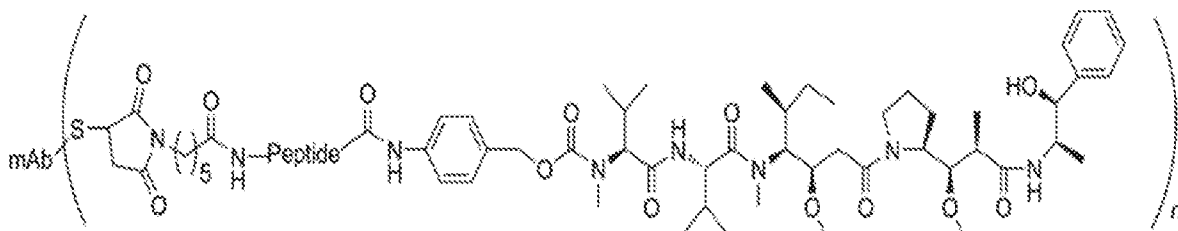
式 3

式 3 中 m 为 1~10, 优选 m 为 5 (即 L 为马来酰亚胺基己酰); D 为甲基奥瑞他汀 F;



式 4

式 4 中, 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, 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, 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。

19、一种药物组合物, 其特征在于, 其包括如权利要求 15~18 中至少一项所述的免疫偶联物和药学可接受的载体。

20、如权利要求 19 所述的药物组合物, 其特征在于, 所述的药物组合物包括 0.01~99.99%的如权利要求 1~7 中至少一项所述的蛋白质和 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。

21、一种如权利要求 1~7 中至少一项所述的蛋白质在制备抗肿瘤药物中的应用。

22、一种如权利要求 15~18 中至少一项所述的免疫偶联物在制备抗肿瘤药物中的应用。

23、一种如权利要求 19~20 中至少一项所述的药物组合物在制备抗肿瘤药物中的应用。

24、一种检测过表达 TPBG 蛋白的细胞的方法, 其特征在于, 包括如下的步骤: 如权利要求 1~7 中至少一项所述的蛋白质与待检样品在体外接触, 检测如权利要求 1~7 中至少一项所述的蛋白质与所述待检样品的结合即可。

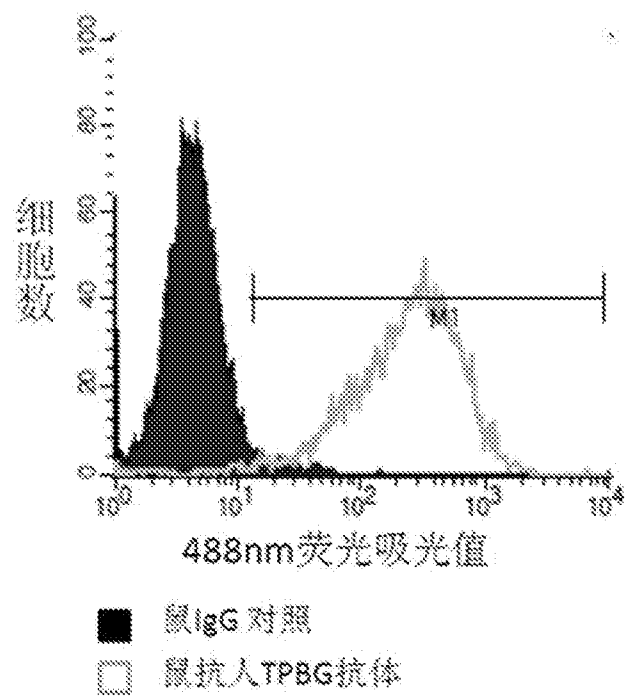


图 1

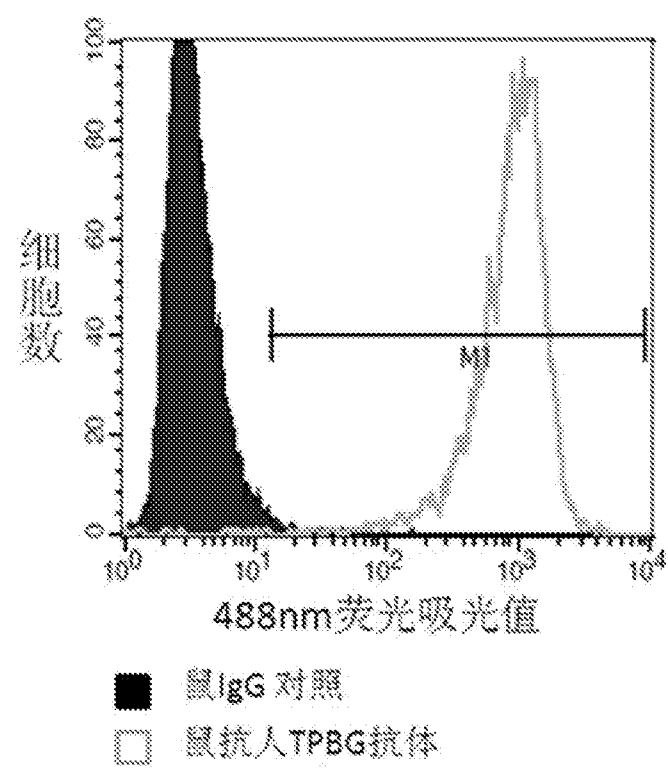


图 2

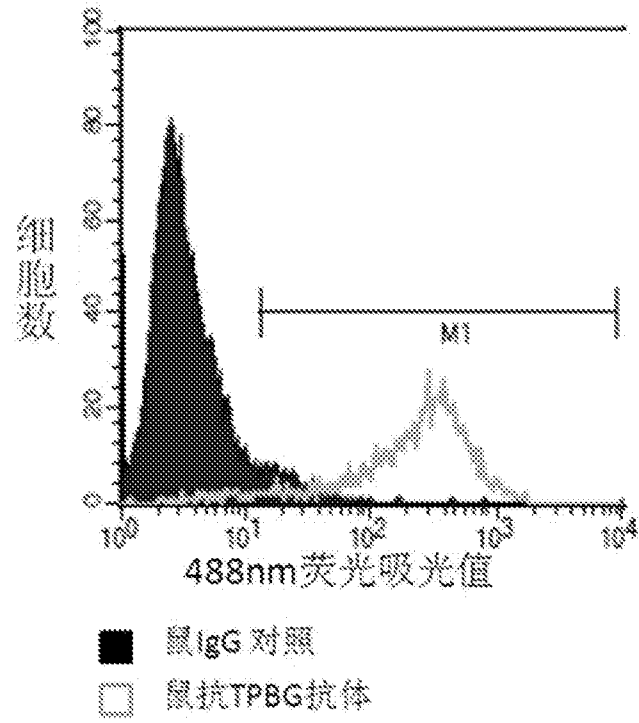


图 3

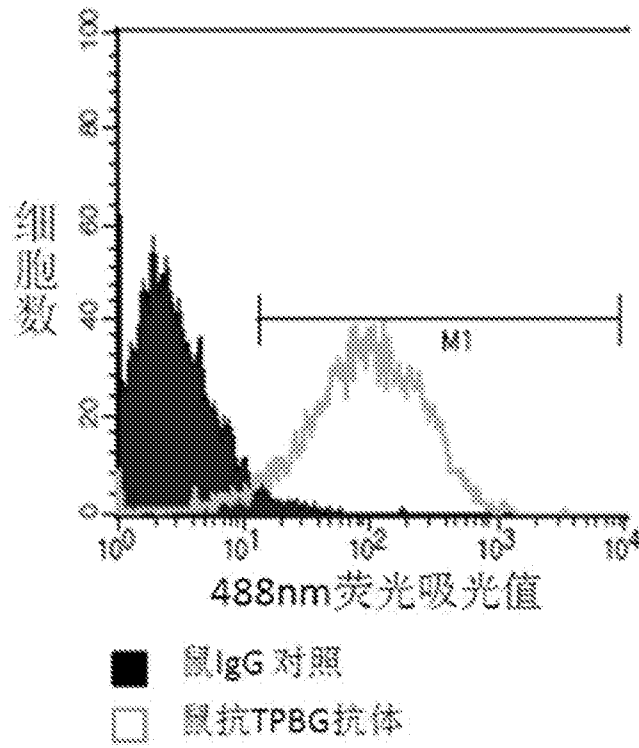


图 4

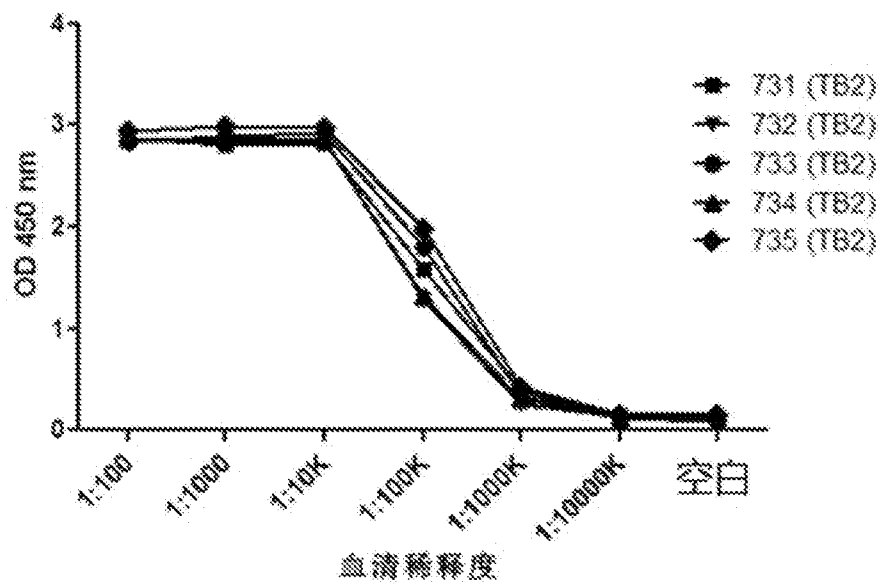


图 5

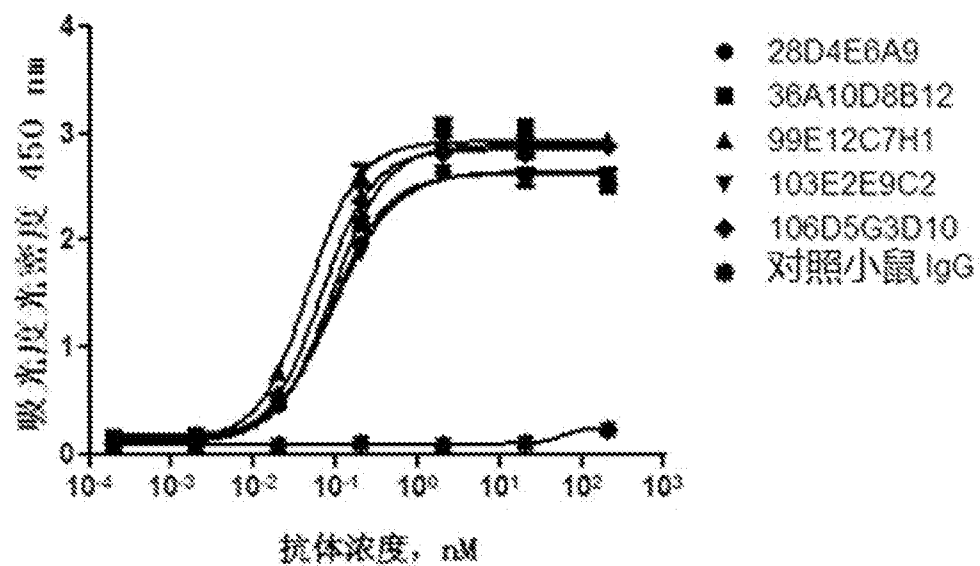


图 6A

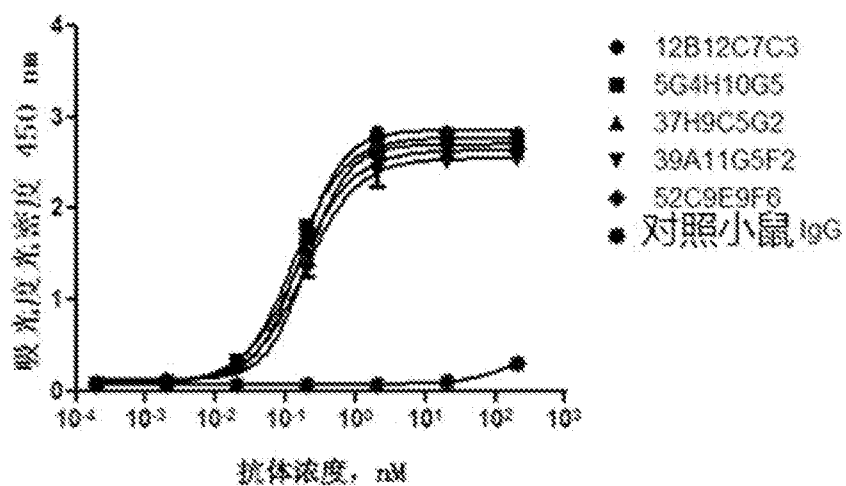


图 6B

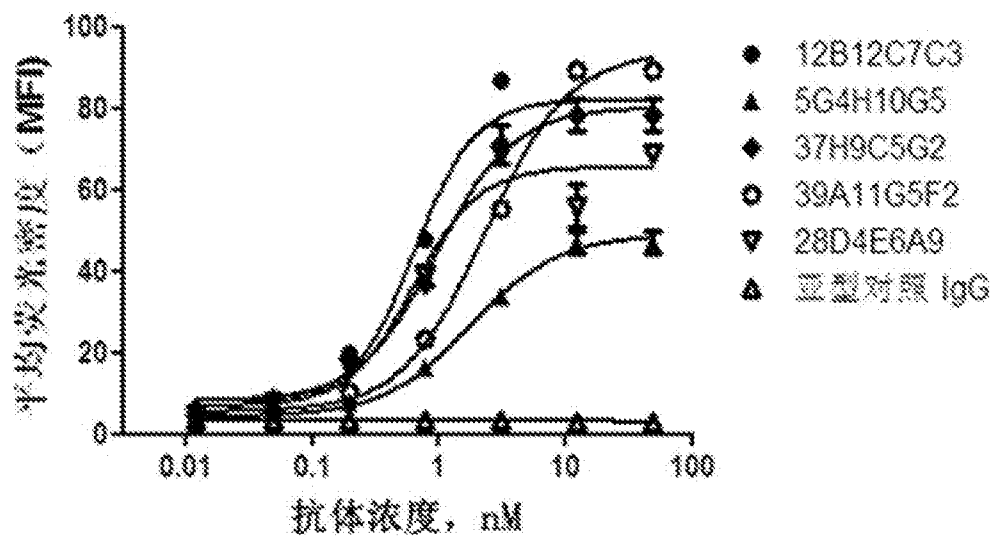


图 7A

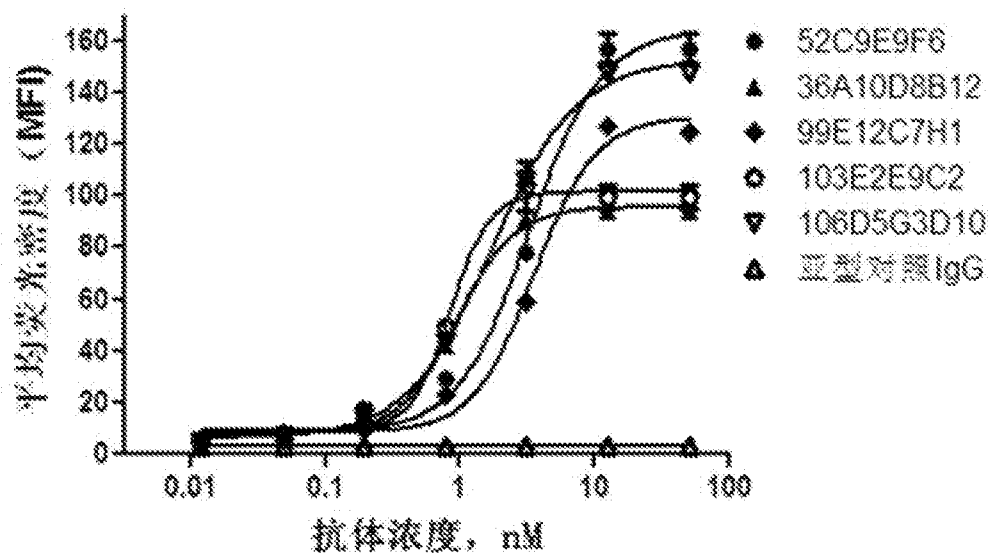


图 7B

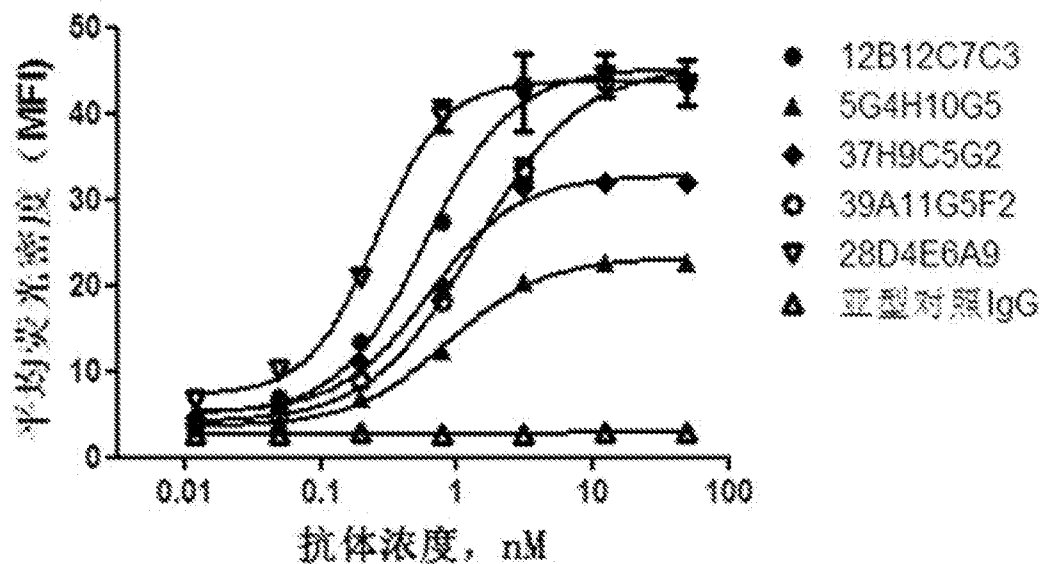


图 8A

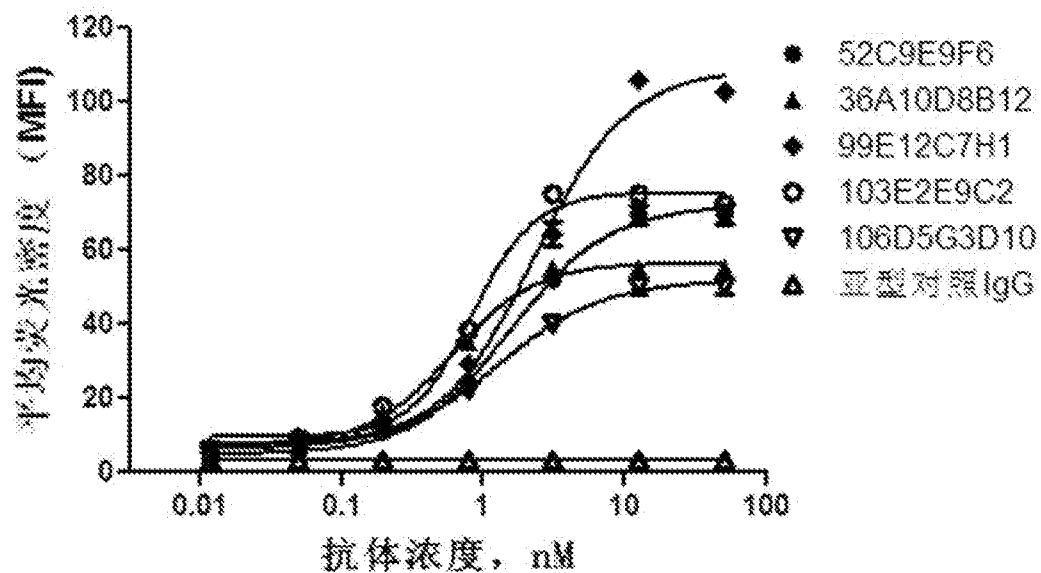


图 8B

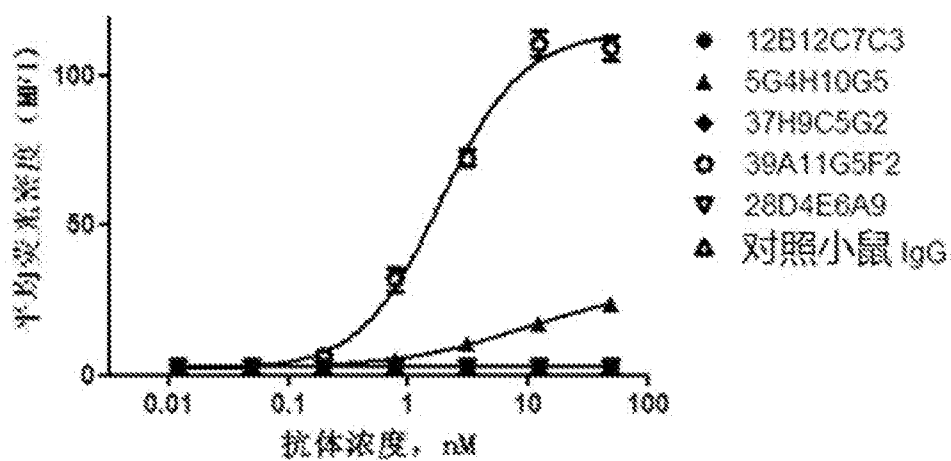


图 9A

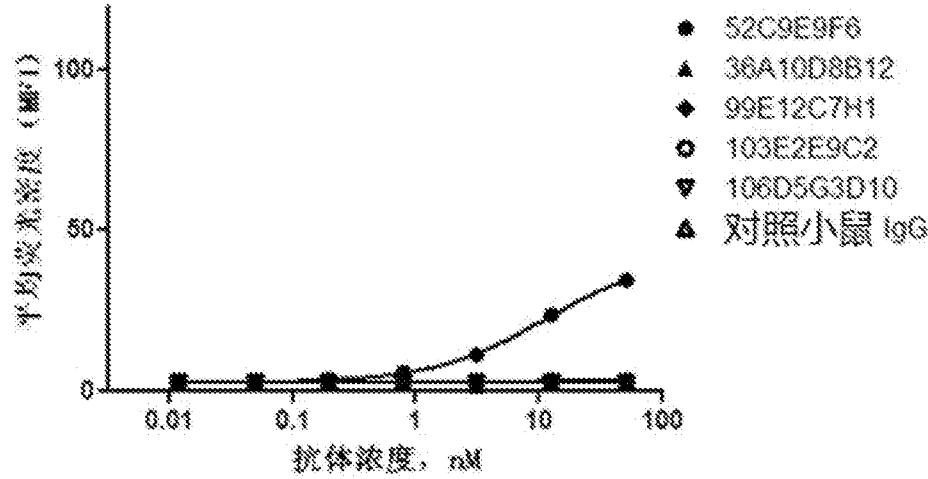


图 9B

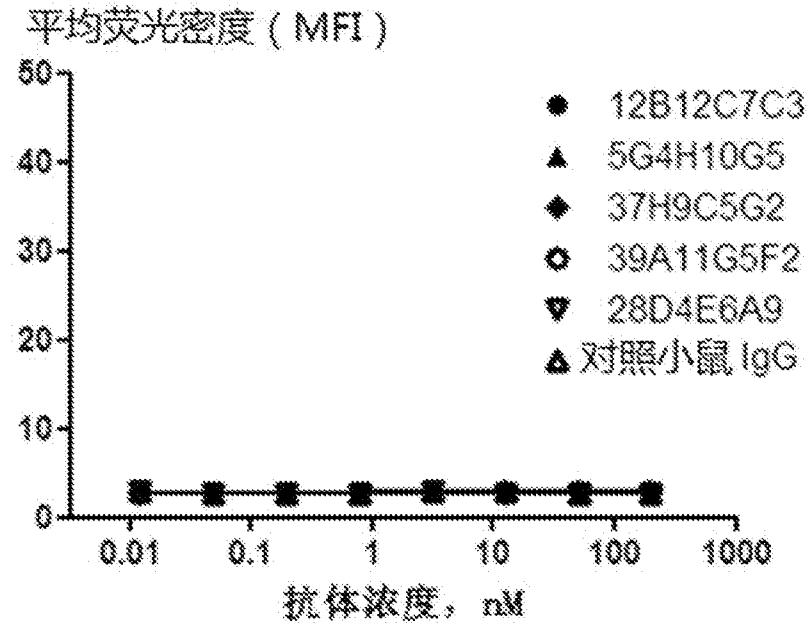


图 10A

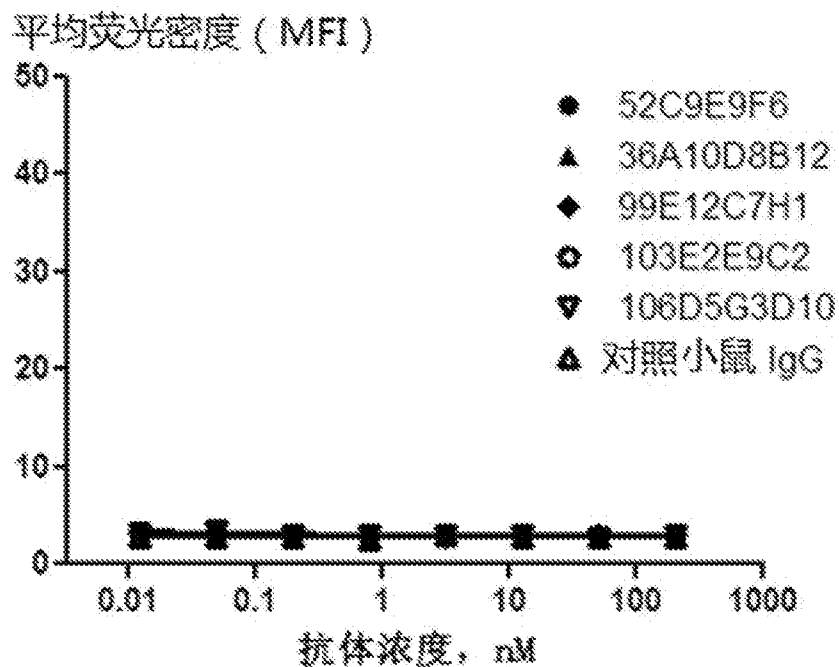


图 10B

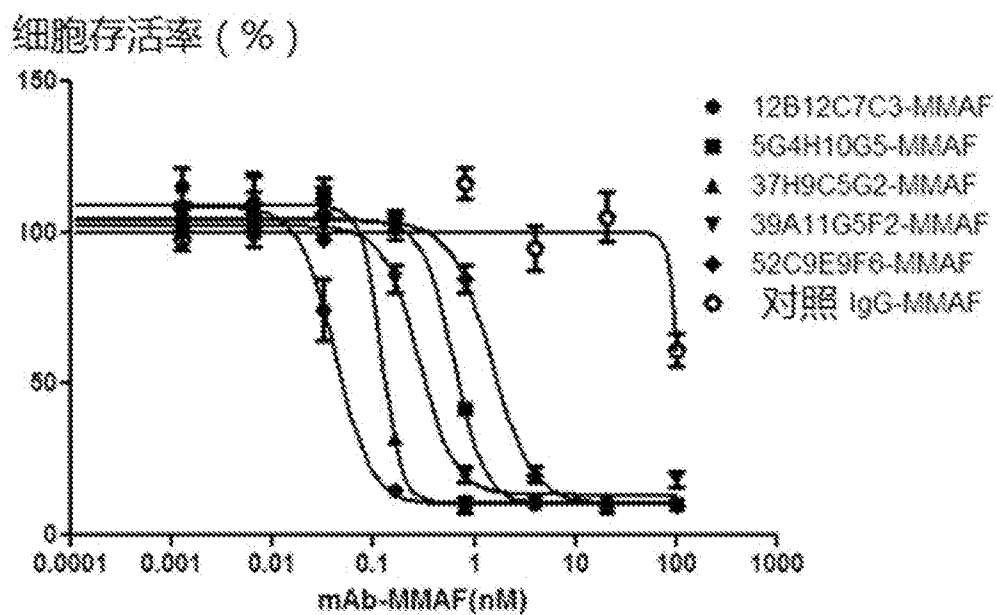


图 11A

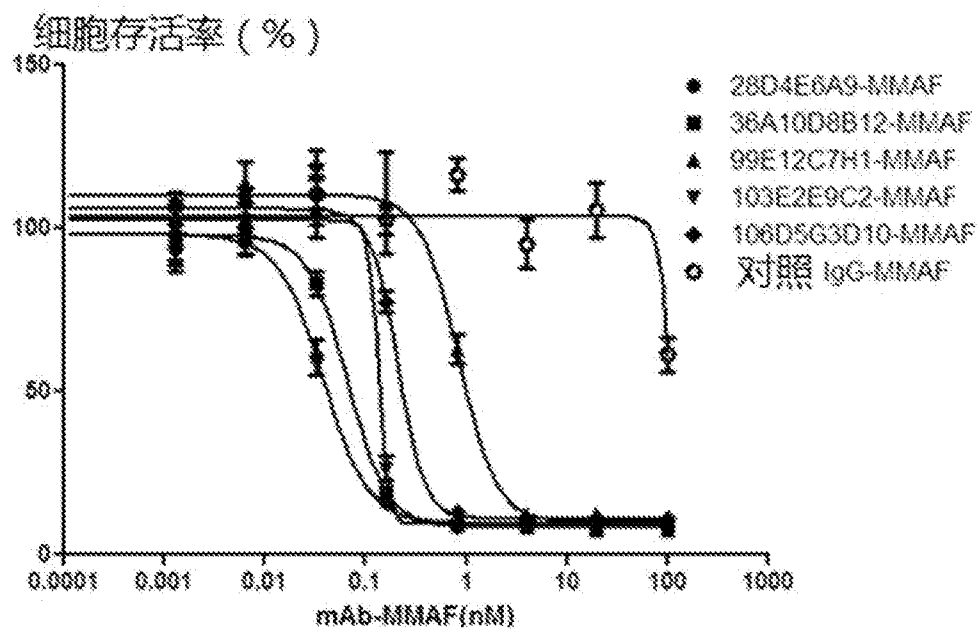


图 11B

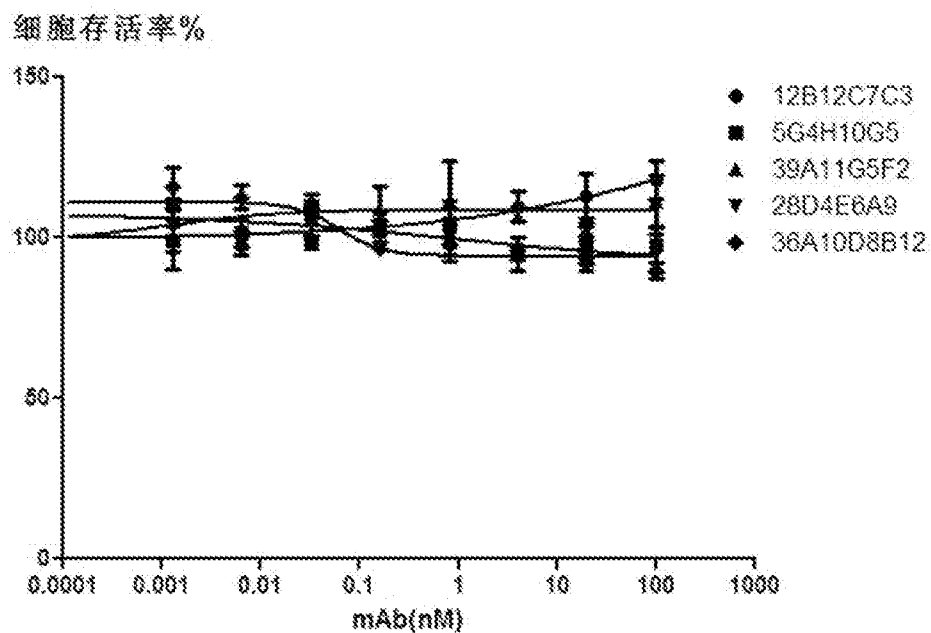


图 11C

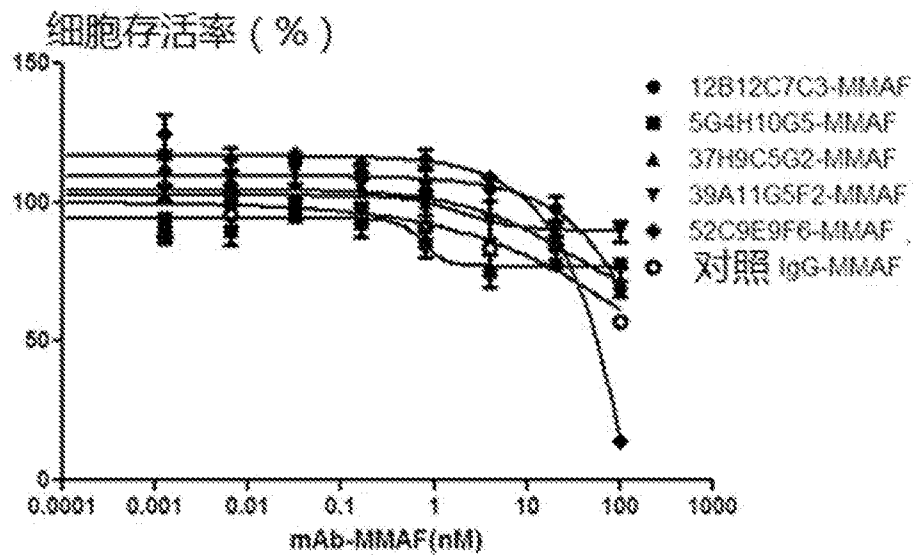


图 12A

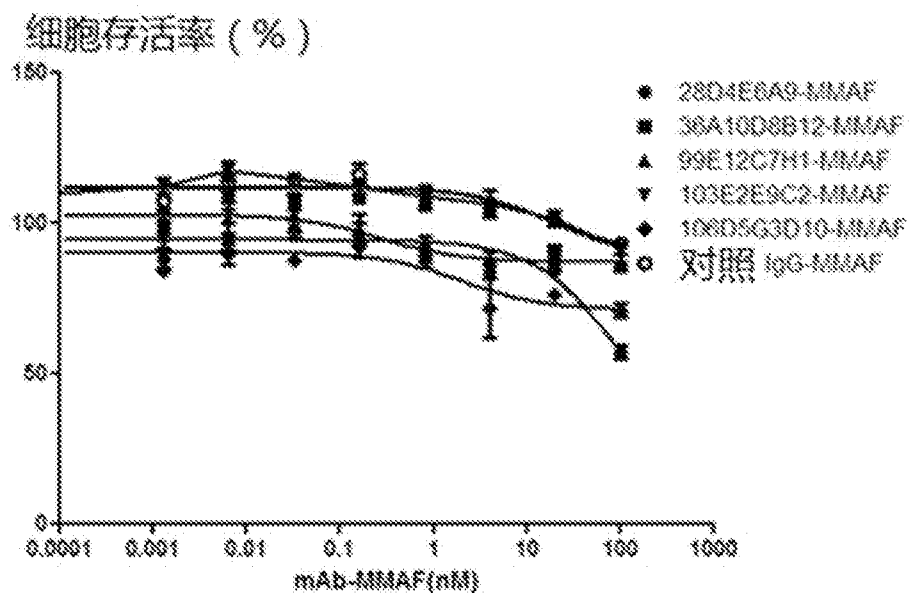


图 12B

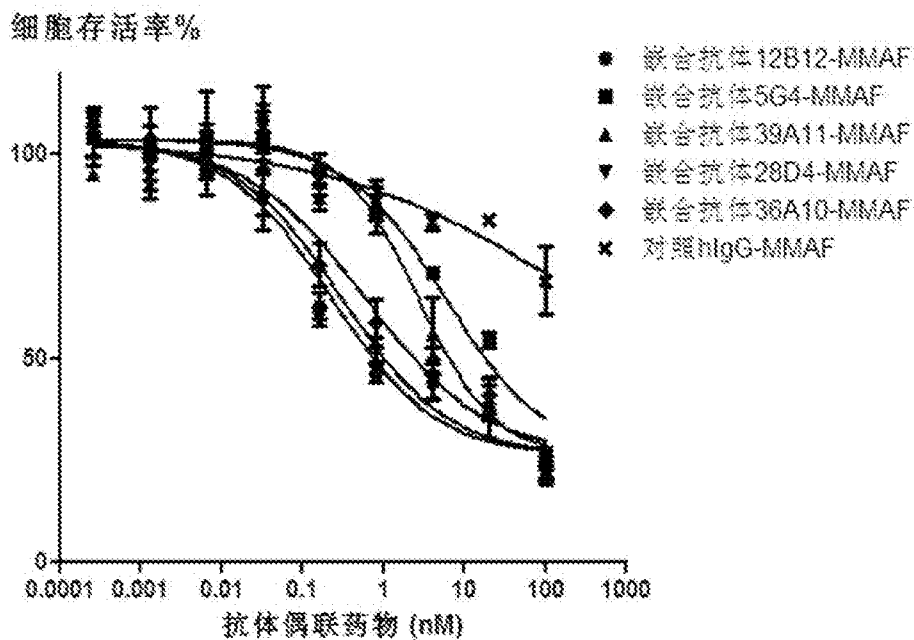


图 13

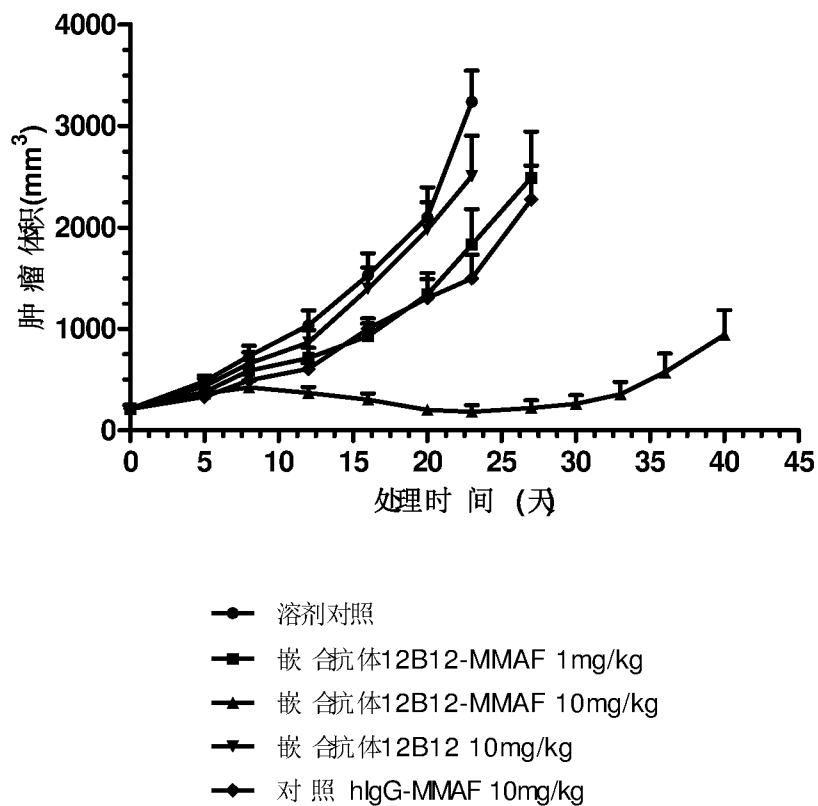


图 14 A

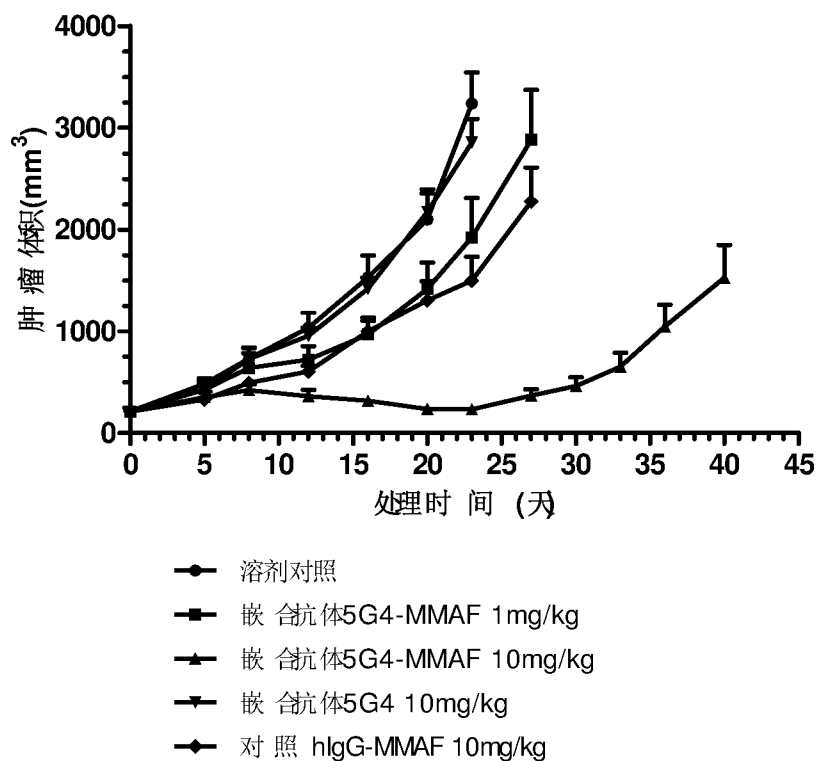


图 14B

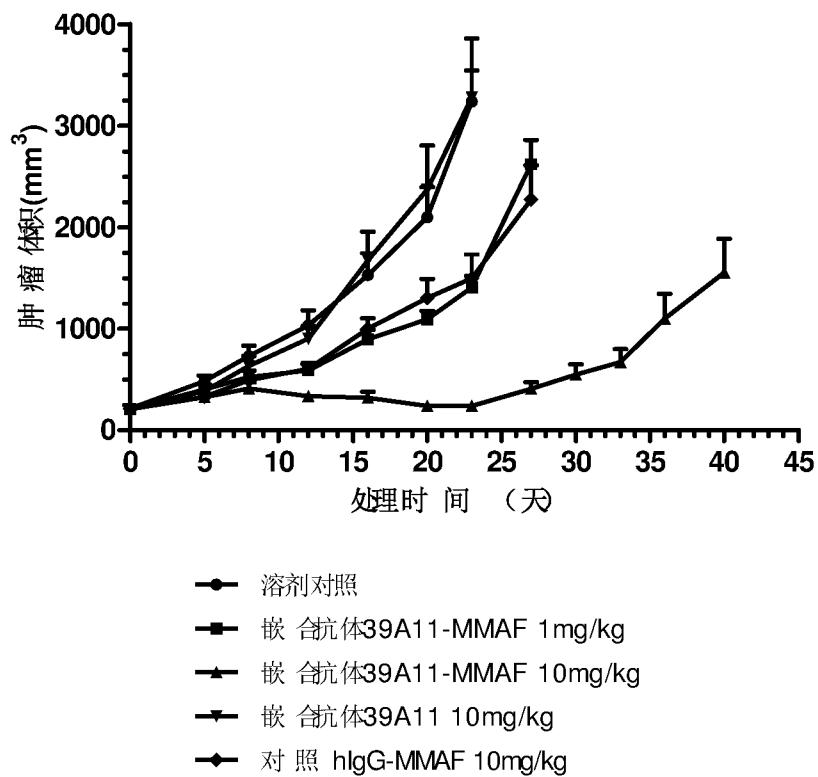


图 14C

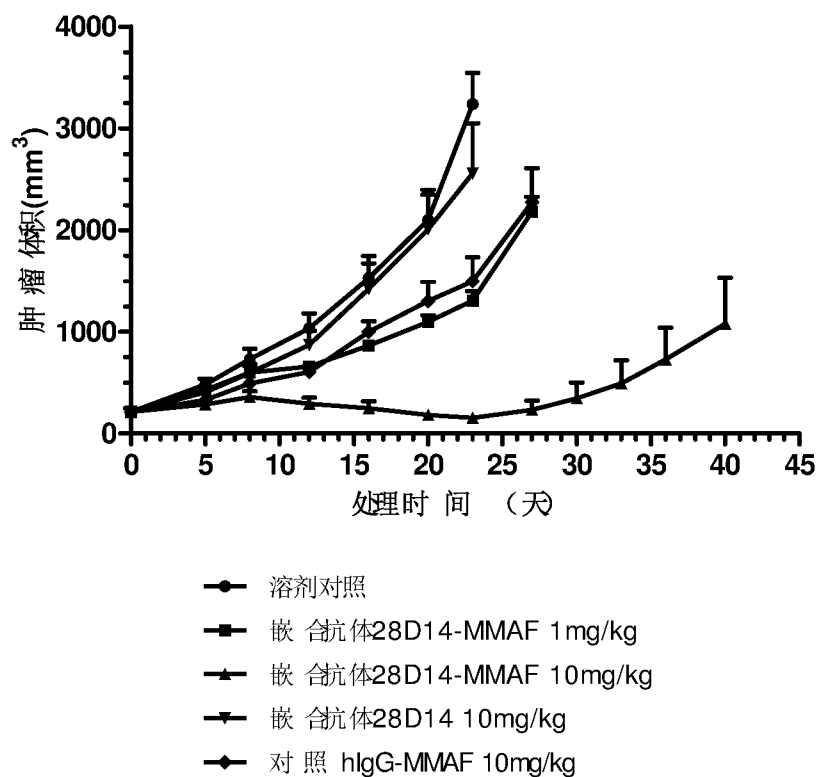


图 14D

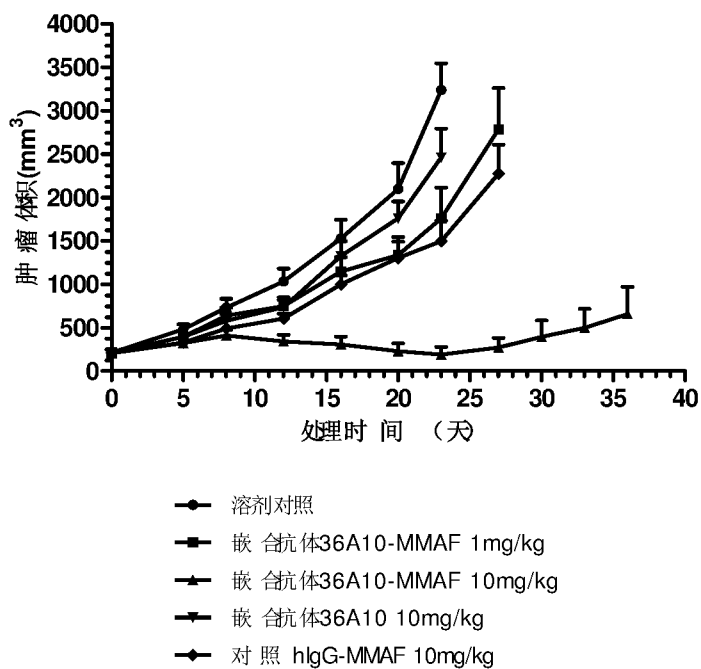


图 14E

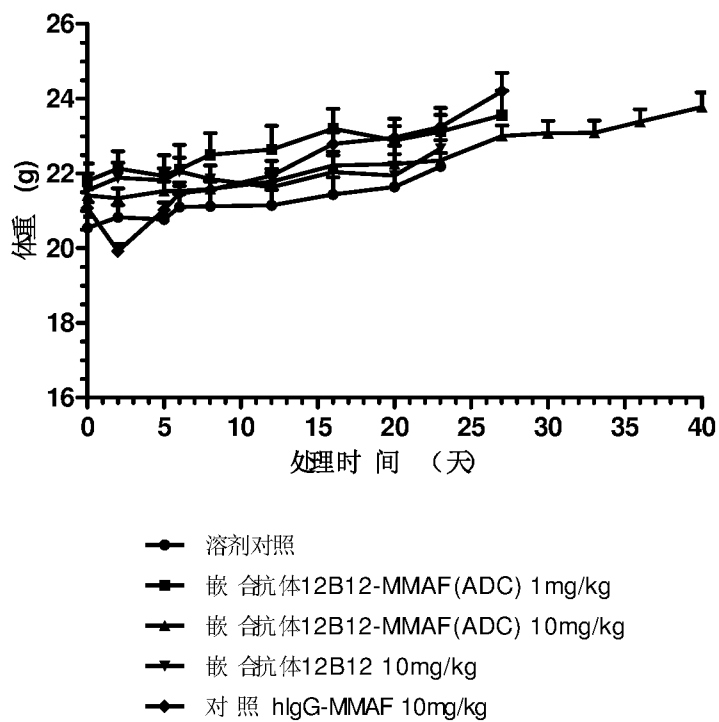


图 15A

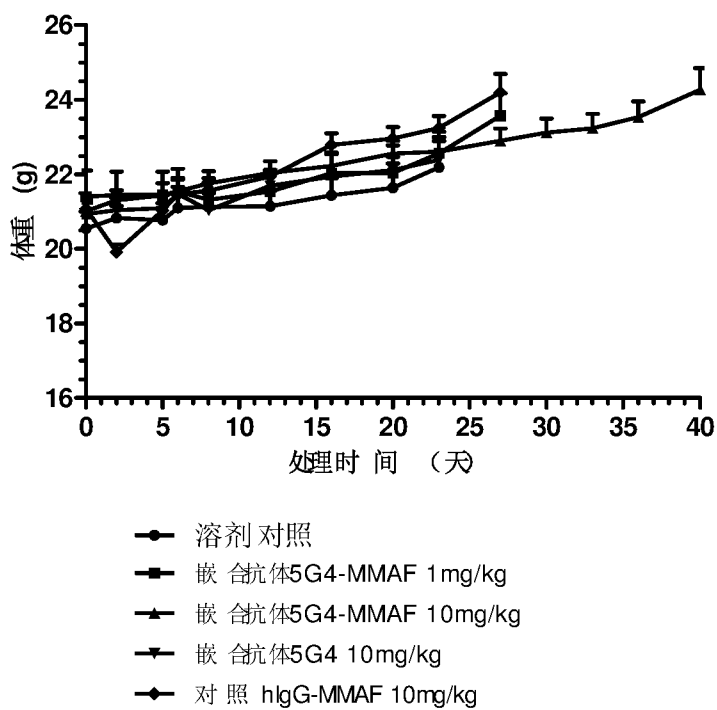


图 15B

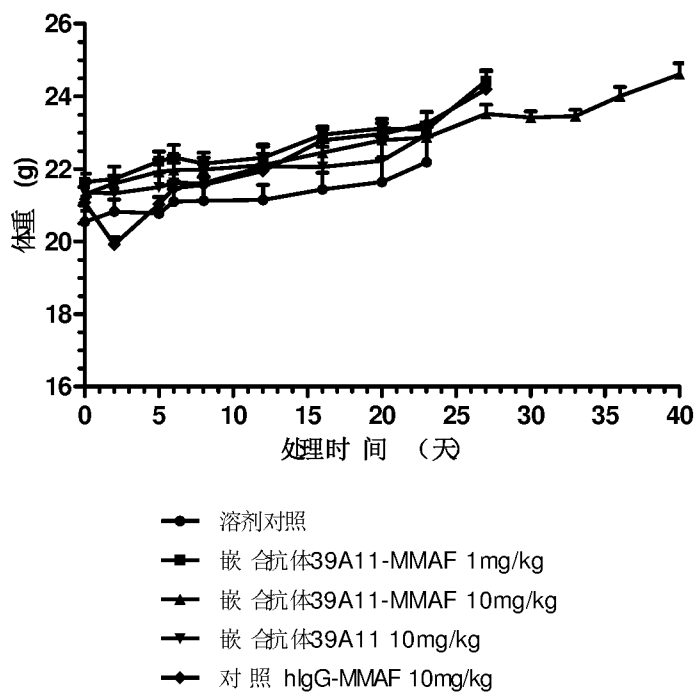


图 15C

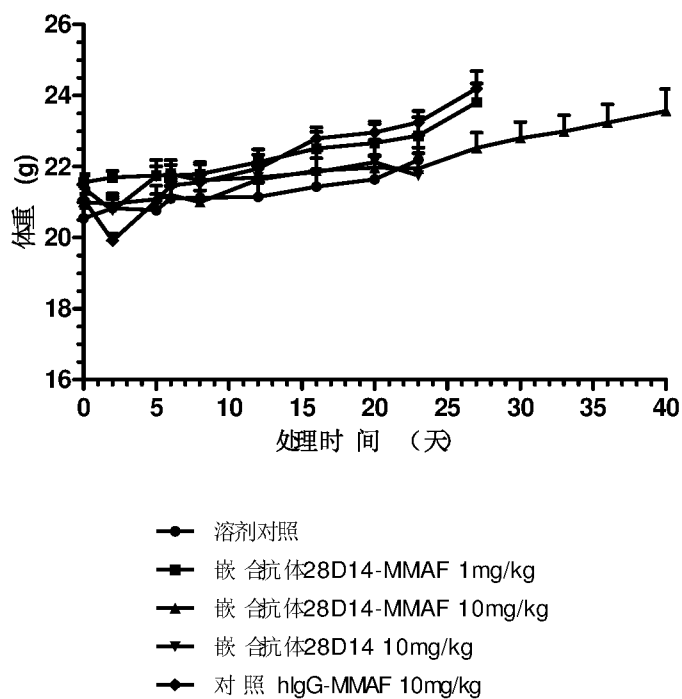


图 15D

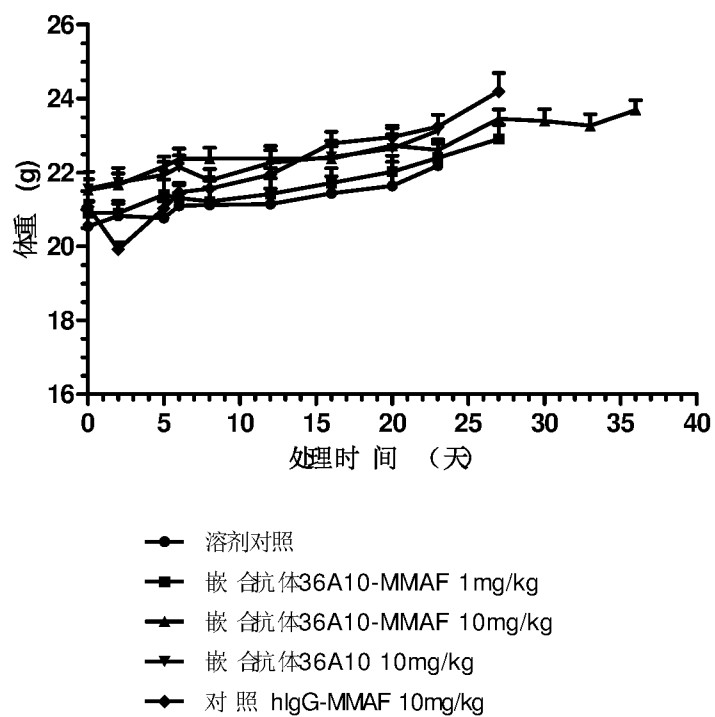


图 15E

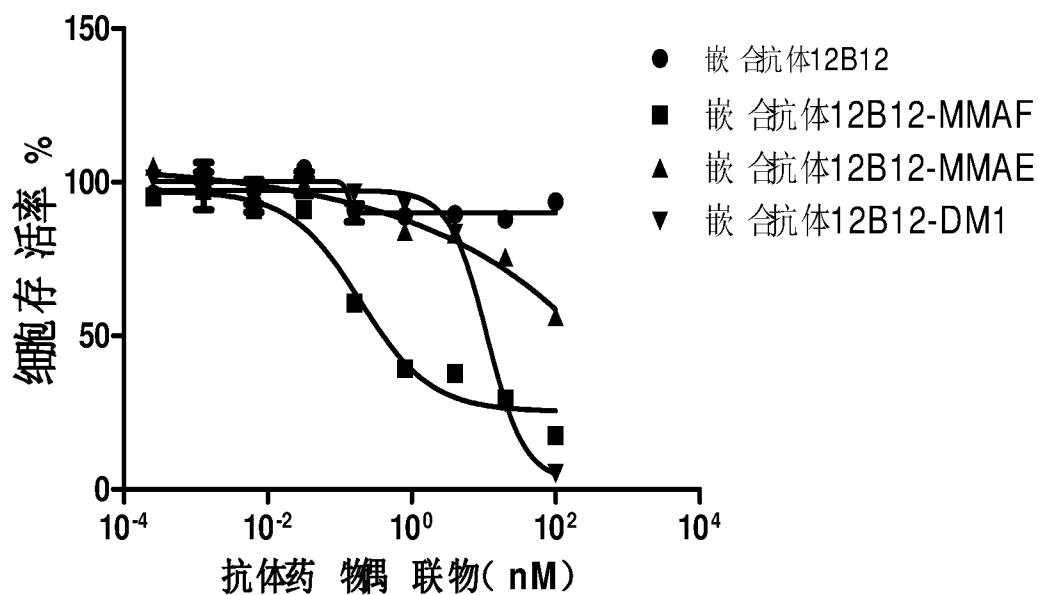


图 16A

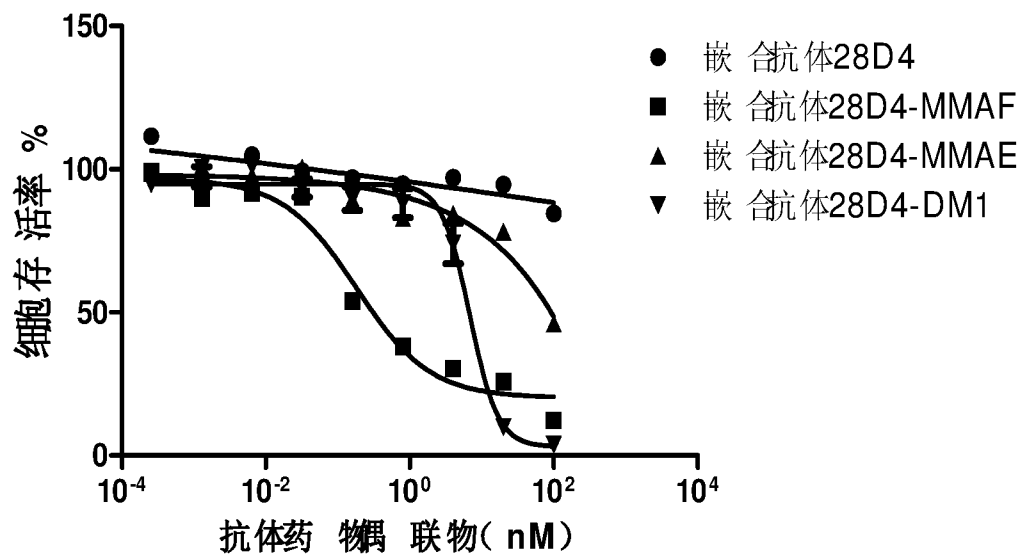


图 16B

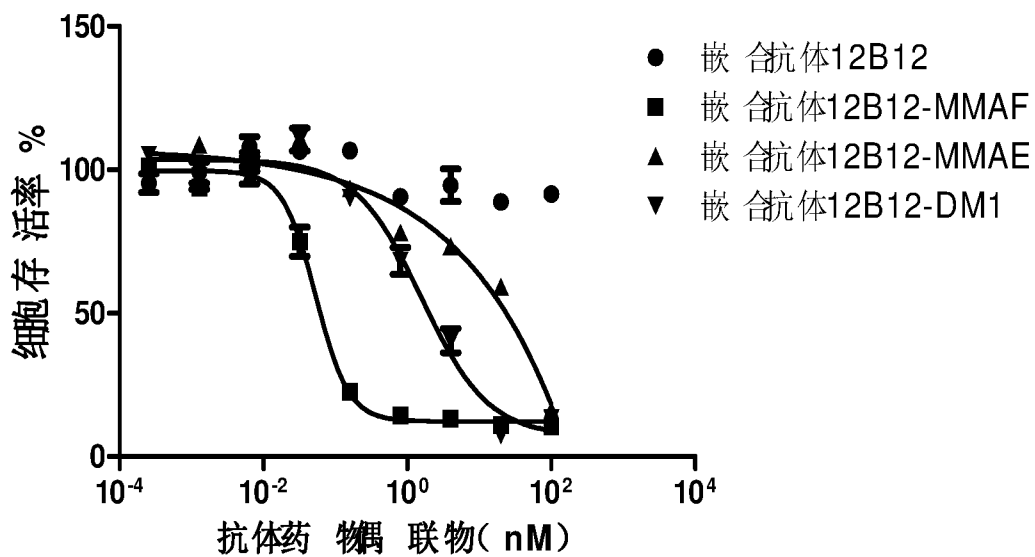


图 16C

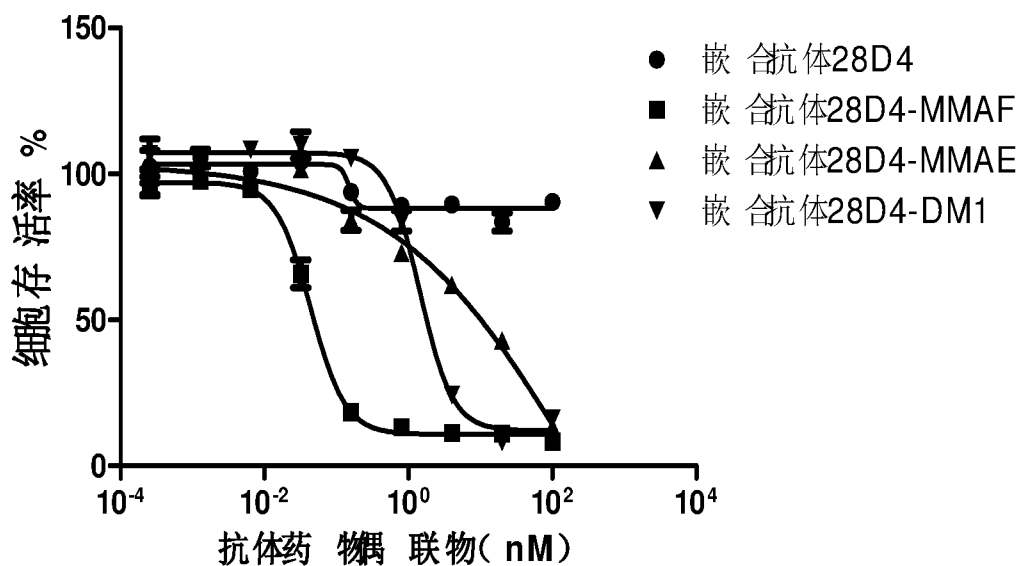


图 16D

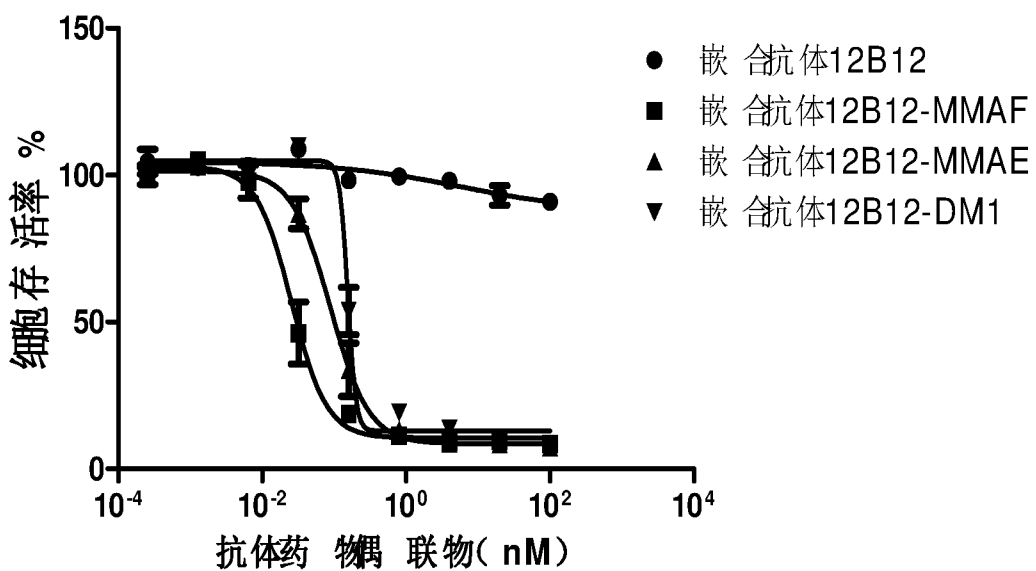


图 17A

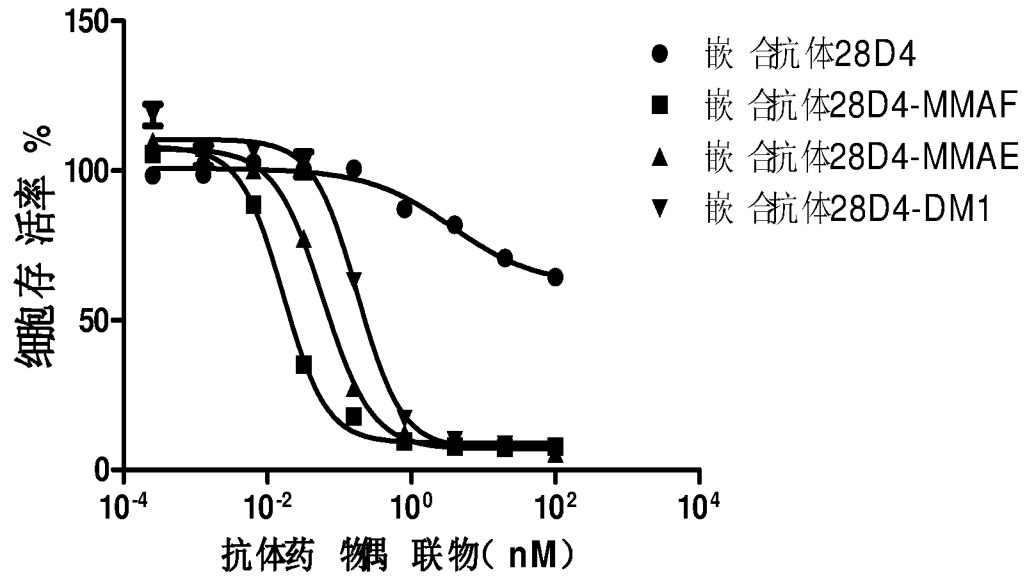


图 17B

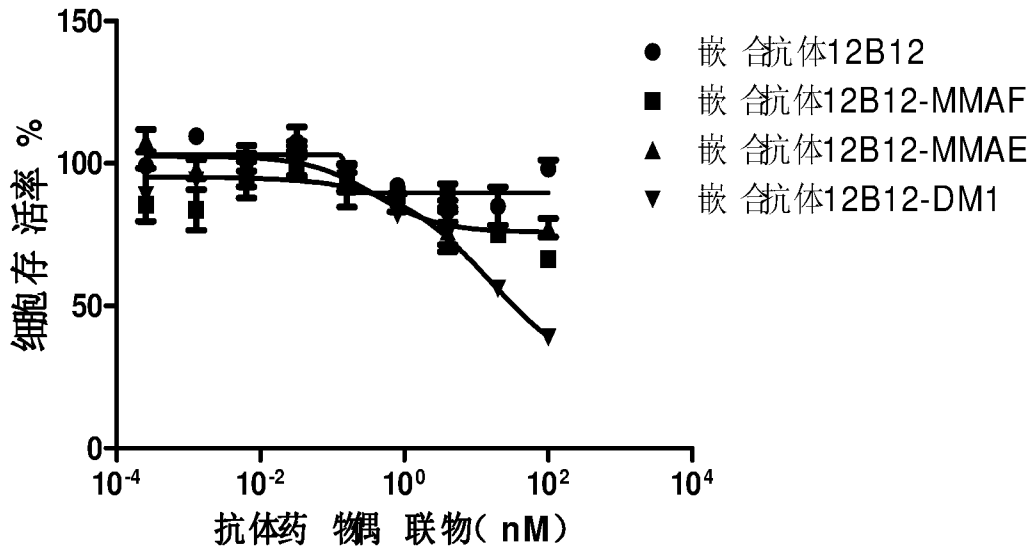


图 17C

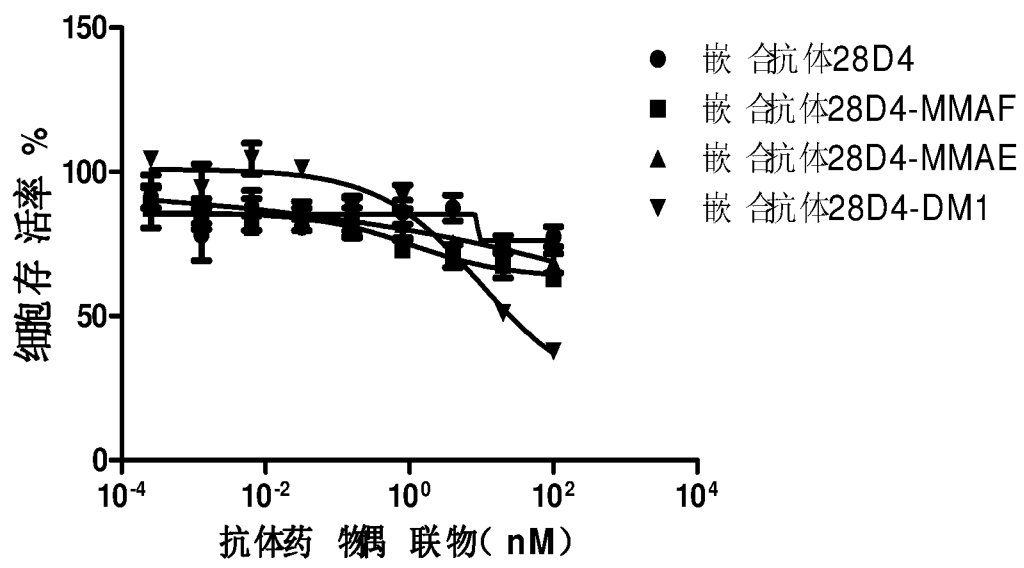


图 17D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/111699

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/30 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61K 45/00 (2006.01) i; A61K 31/4025 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; G01N 33/574 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P; G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRSABS; CNABS; CNKI; CNTXT; VEN; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT and Key Words: trophoblast glycoprotein; SUN, Xiaolan; TPBG, 5T4, antibod+, humaniz+, etc.

NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT; Genbank; EMBL; STN and searched sequences: SEQ ID NOs: 81-100, etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101437850 A (WYETH LLC.), 20 May 2009 (20.05.2009), see embodiments 1-7, and claims 1-41	1-24
X	CN 103517719 A (WYETH), 15 January 2014 (15.01.2014), see embodiments 1-8, and claims 1-12	1-24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 22 March 2017 (22.03.2017)	Date of mailing of the international search report 07 April 2017 (07.04.2017)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer WANG, Jinfeng Telephone No.: (86-10) 62412282

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/111699

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] invention 1: claims 1-24 (partial) relate to a protein containing a TPBG antibody, of which amino acid sequences of a heavy chain variable region and a light chain variable region are as shown in SEQ ID NOs: 1 and 5, a nucleic acid encoding the protein, a vector and transformant containing the nucleic acid, a method for preparing said protein, a conjugate, a pharmaceutical composition and the use; and
- [2] inventions 2-10 are respectively a protein containing a TPBG antibody, of which amino acid sequences of a heavy chain variable region and a light chain variable region are as shown in SEQ ID NOs: 9 and 13, SEQ ID NOs: 17 and 21, SEQ ID NOs: 25 and 29, SEQ ID NOs: 33 and 37, SEQ ID NOs: 41 and 45, SEQ ID NOs: 49 and 53, SEQ ID NOs: 57 and 61, SEQ ID NOs: 65 and 69 and SEQ ID NOs: 73 and 77, a nucleic acid encoding said protein, a vector and transformant containing the nucleic acid, a method for preparing said protein, a conjugate, a pharmaceutical composition and the use involved in claims 1-24 (partial).
- [3] Inventions 1-10 respectively relate to proteins containing a TPBG antibody, of which heavy chain and light chain variable regions are respectively defined by different sequence numbers. Amino acid compositions of sequences defined by these different sequence numbers are different from one another. The same or the corresponding technical feature of these inventions lies in that said proteins all contain a TPBG antibody. However, the same or the corresponding feature has been disclosed in the prior art (for example, CN 101437850 A and CN 103517719 A). Therefore, inventions 1-10 do not have the same or corresponding special technical feature, and lack unity of invention.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/111699

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101437850 A	20 May 2009	AU 2007226696 C1 RU 2008137074 A PT 1994055 E TW 200804424 A CN 101437850 B TW 201335189 A IL 240245 D0 WO 2007106744 A8 US 8759495 B2 KR 20080106345 A US 2012064600 A1 ES 2498517 T3 GT 200800181 A IL 193986 A AU 2007226696 A1 SG 170091 A1 JP 5523824 B2 KR 101443752 B1 MX 2008011492 A TW I409277 B IL 240245 A PA 8718601 A1 US 8044178 B2 ZA 200808075 B EC SP088733 A WO 2007106744 A3 NZ 596295 A EP 1994055 B1 EP 2368914 A1 US 2007231333 A1 HK 1121473 A1 AU 2007226696 B2 WO 2007106744 A2 DK 1994055 T3 TW I421257 B SI 1994055 T1 PE 01192008 A1 US 2016185859 A1 CR 10273 A CA 2645097 A1 IL 193986 D0 NO 20083891 A BR PI0708771 A2 MY 148763 A AR 059809 A1 NZ 571208 A KR 20130018980 A JP 2009529578 A US 2014308302 A1	04 February 2016 20 April 2010 15 September 2014 16 January 2008 09 October 2013 01 September 2013 24 September 2015 02 October 2008 24 June 2014 04 December 2008 15 March 2012 24 September 2014 25 May 2010 31 August 2015 20 September 2007 29 April 2011 18 June 2014 26 September 2014 22 September 2008 21 September 2013 24 September 2015 15 May 2009 25 October 2011 28 March 2012 31 October 2008 29 November 2007 25 January 2013 02 July 2014 28 September 2011 04 October 2007 24 July 2015 29 August 2013 20 September 2007 25 August 2014 01 January 2014 29 August 2014 04 March 2008 30 June 2016 26 November 2008 20 September 2007 01 August 2011 03 December 2008 14 June 2011 31 May 2013 30 April 2008 22 December 2011 25 February 2013 20 August 2009 16 October 2014
CN 103517719 A	15 January 2014	CA 2830338 C	15 November 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/111699

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		KR 20130125833 A	19 November 2013
		CA 2830338 A1	04 October 2012
		EP 3130356 A1	15 February 2017
		TW I471334 B	01 February 2015
		SG 193324 A1	30 October 2013
		TW I549968 B	21 September 2016
		AU 2012235817 B2	10 March 2016
		TW 201302795 A	16 January 2013
		AU 2016203839 A1	23 June 2016
		NZ 615308 A	30 October 2015
		RU 2013142004 A	10 May 2015
		DK 2694111 T3	10 October 2016
		EP 2694111 B1	10 August 2016
		AR 085747 A1	23 October 2013
		SI 2694111 T1	28 October 2016
		ES 2596194 T3	05 January 2017
		MX 2013011353 A	16 December 2013
		CO 6771458 A2	15 October 2013
		US 2012251558 A1	04 October 2012
		SG 10201605401W A	30 August 2016
		US 8586049 B2	19 November 2013
		TW 201534624 A	16 September 2015
		KR 101529810 B1	26 June 2015
		KR 20150018903 A	24 February 2015
		IL 228404 D0	31 December 2013
		US 8309094 B2	13 November 2012
		JP 2016172747 A	29 September 2016
		WO 2012131527 A1	04 October 2012
		CN 105288644 A	03 February 2016
		JP 5925875 B2	25 May 2016
		CN 103517719 B	12 October 2016
		EP 2694111 A1	12 February 2014
		JP 2014516508 A	17 July 2014
		US 2014081005 A1	20 March 2014
		US 2013011418 A1	10 January 2013
		AU 2012235817 A1	10 October 2013
		PE 05732014 A1	14 May 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/111699

A. 主题的分类

C07K 16/30(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61K 31/4025(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; A61K; A61P; G01N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CPRSABS; CNABS; CNKI; CNTXT; VEN; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT和关键词: 孙晓岚, 滋养层特异性糖蛋白, 抗体, 人源化, Sun xiaolan, TPBG, 5T4, antibod+, humaniz+, 等 中国专利生物序列检索系统: Genbank; EMBL; STN和检索的序列: SEQ ID NO:81-100等

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 101437850 A (惠氏公司) 2009年 5月 20日 (2009 - 05 - 20) 参见实施例1-7、权利要求1-41	1-24
X	CN 103517719 A (惠氏有限责任公司) 2014年 1月 15日 (2014 - 01 - 15) 参见实施例1-8、权利要求1-12	1-24

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2017年 3月 22日

国际检索报告邮寄日期

2017年 4月 7日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

王金凤

电话号码 (86-10)62412282

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

- [1] 发明1：权利要求1-24（部分），涉及包含TPBG抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列分别如SEQ ID NO：1和5所示的蛋白质，编码所述蛋白质的核酸、含有该核酸的载体和转化体，所述蛋白质的制备方法、偶联物、药物组合物以及用途；
- [2] 发明2-发明10分别是涉及权利要求1-24（部分）的包含TPBG抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列分别如SEQ ID NO：9和13、SEQ ID NO：17和21、SEQ ID NO：25和29、SEQ ID NO：33和37、SEQ ID NO：41和45、SEQ ID NO：49和53、SEQ ID NO：57和61、SEQ ID NO：65和69、SEQ ID NO：73和77所示的蛋白质，编码所述蛋白质的核酸、含有该核酸的载体和转化体，所述蛋白质的制备方法、偶联物、药物组合物以及用途。
- [3] 发明1-10分别涉及包含重链的和轻链的可变区分别由不同序列号限定的TPBG抗体的蛋白质，这些不同序列号所限定的序列的氨基酸组成各不相同，这些发明之间相同或相应的技术特征在于所述蛋白质均包含TPBG抗体，但该相同或相应的特征已经被现有技术（如CN101437850A、CN103517719A）所公开，因此发明1-10之间不具有相同或相应的特定技术特征，不具备单一性。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☒ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/111699

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101437850	A	2009年 5月 20日	AU	2007226696	C1	2016年 2月 4日
				RU	2008137074	A	2010年 4月 20日
				PT	1994055	E	2014年 9月 15日
				TW	200804424	A	2008年 1月 16日
				CN	101437850	B	2013年 10月 9日
				TW	201335189	A	2013年 9月 1日
				IL	240245	D0	2015年 9月 24日
				WO	2007106744	A8	2008年 10月 2日
				US	8759495	B2	2014年 6月 24日
				KR	20080106345	A	2008年 12月 4日
				US	2012064600	A1	2012年 3月 15日
				ES	2498517	T3	2014年 9月 24日
				GT	200800181	A	2010年 5月 25日
				IL	193986	A	2015年 8月 31日
				AU	2007226696	A1	2007年 9月 20日
				SG	170091	A1	2011年 4月 29日
				JP	5523824	B2	2014年 6月 18日
				KR	101443752	B1	2014年 9月 26日
				MX	2008011492	A	2008年 9月 22日
				TW	I409277	B	2013年 9月 21日
				IL	240245	A	2015年 9月 24日
				PA	8718601	A1	2009年 5月 15日
				US	8044178	B2	2011年 10月 25日
				ZA	200808075	B	2012年 3月 28日
				EC	SP088733	A	2008年 10月 31日
				WO	2007106744	A3	2007年 11月 29日
				NZ	596295	A	2013年 1月 25日
				EP	1994055	B1	2014年 7月 2日
				EP	2368914	A1	2011年 9月 28日
				US	2007231333	A1	2007年 10月 4日
				HK	1121473	A1	2015年 7月 24日
				AU	2007226696	B2	2013年 8月 29日
				WO	2007106744	A2	2007年 9月 20日
				DK	1994055	T3	2014年 8月 25日
				TW	I421257	B	2014年 1月 1日
				SI	1994055	T1	2014年 8月 29日
				PE	01192008	A1	2008年 3月 4日
				US	2016185859	A1	2016年 6月 30日
				CR	10273	A	2008年 11月 26日
				CA	2645097	A1	2007年 9月 20日
				IL	193986	D0	2011年 8月 1日
				NO	20083891	A	2008年 12月 3日
				BR	PI0708771	A2	2011年 6月 14日
				MY	148763	A	2013年 5月 31日
				AR	059809	A1	2008年 4月 30日
				NZ	571208	A	2011年 12月 22日
				KR	20130018980	A	2013年 2月 25日
				JP	2009529578	A	2009年 8月 20日
				US	2014308302	A1	2014年 10月 16日
CN	103517719	A	2014年 1月 15日	CA	2830338	C	2016年 11月 15日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/111699

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		KR 20130125833 A	2013年 11月 19日
		CA 2830338 A1	2012年 10月 4日
		EP 3130356 A1	2017年 2月 15日
		TW 1471334 B	2015年 2月 1日
		SG 193324 A1	2013年 10月 30日
		TW 1549968 B	2016年 9月 21日
		AU 2012235817 B2	2016年 3月 10日
		TW 201302795 A	2013年 1月 16日
		AU 2016203839 A1	2016年 6月 23日
		NZ 615308 A	2015年 10月 30日
		RU 2013142004 A	2015年 5月 10日
		DK 2694111 T3	2016年 10月 10日
		EP 2694111 B1	2016年 8月 10日
		AR 085747 A1	2013年 10月 23日
		SI 2694111 T1	2016年 10月 28日
		ES 2596194 T3	2017年 1月 5日
		MX 2013011353 A	2013年 12月 16日
		CO 6771458 A2	2013年 10月 15日
		US 2012251558 A1	2012年 10月 4日
		SG 10201605401W A	2016年 8月 30日
		US 8586049 B2	2013年 11月 19日
		TW 201534624 A	2015年 9月 16日
		KR 101529810 B1	2015年 6月 26日
		KR 20150018903 A	2015年 2月 24日
		IL 228404 D0	2013年 12月 31日
		US 8309094 B2	2012年 11月 13日
		JP 2016172747 A	2016年 9月 29日
		WO 2012131527 A1	2012年 10月 4日
		CN 105288644 A	2016年 2月 3日
		JP 5925875 B2	2016年 5月 25日
		CN 103517719 B	2016年 10月 12日
		EP 2694111 A1	2014年 2月 12日
		JP 2014516508 A	2014年 7月 17日
		US 2014081005 A1	2014年 3月 20日
		US 2013011418 A1	2013年 1月 10日
		AU 2012235817 A1	2013年 10月 10日
		PE 05732014 A1	2014年 5月 14日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)