



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107001471 B

(45) 授权公告日 2022. 01. 18

(21) 申请号 201580059801.8  
(22) 申请日 2015.09.15  
(65) 同一申请的已公布的文献号  
    申请公布号 CN 107001471 A  
(43) 申请公布日 2017.08.01  
(30) 优先权数据  
    62/051,190 2014.09.16 US  
(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
    2017.05.03  
(86) PCT国际申请的申请数据  
    PCT/IB2015/002110 2015.09.15  
(87) PCT国际申请的公布数据  
    W02016/042412 EN 2016.03.24  
(73) 专利权人 西福根有限公司  
    地址 丹麦巴勒鲁普  
(72) 发明人 T.布奎因 M.W.佩德森  
    H.J.雅克布森 T.T.波尔森  
    M.M.格兰达尔 K.科夫德  
    M.克拉格 K.W.埃里克森  
    P.康罗托  
(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
    11105  
    代理人 张文辉

(51) Int.Cl.  
    C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)  
C12N 15/13 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01)  
C07K 16/46 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A01K 67/027 (2006.01)  
(56) 对比文件  
    W0 2012059562 A1,2012.05.10  
    W0 2010059654 A1,2010.05.27  
    CN 102239182 A,2011.11.09  
    Edward Htun van der Horst 等  
    .Discovery of fully human anti-MET  
    monoclonal antibodies with antitumor  
    activity against colon cancer tumor  
    models in vivo.《Neoplasia》.2009,第11卷(第  
    4期),  
    武维斌 等.酪氨酸激酶类受体C-Met抑制剂  
    研究进展.《军事医学科学院院刊》.2007,第31卷  
    (第5期),  
    GenBank.immunoglobulin heavy chain  
    variable region, partial [Mus musculus].  
    《GenBank》.2006,  
    审查员 余璨

权利要求书3页 说明书73页  
序列表36页 附图30页

(54) 发明名称  
    抗MET抗体和组合物  
(57) 摘要

本发明涉及针对人MET(c-MET)的新的重组  
抗体,以及包含至少两种所述抗体的混合物的组  
合物,和抗体以及抗体组合物用于治疗MET介导  
的病症例如癌症的用途。

CN 107001471 B

1. 抗体组合物, 所述抗体组合物包含第一抗MET抗体或其抗原结合部分和第二抗MET抗体或其抗原结合部分, 其中:

所述第一抗MET抗体或其抗原结合部分具有分别为SEQ ID NO: 21、22、23、24、25和26的H-CDR1-3和L-CDR1-3氨基酸序列; 和

所述第二抗MET抗体或其抗原结合部分具有分别为SEQ ID NO: 27、28、29、30、31和32的H-CDR1-3和L-CDR1-3氨基酸序列。

2. 权利要求1的抗体组合物, 其中:

所述第一抗MET抗体的重链可变域 (VH) 和轻链可变域 (VL) 分别与SEQ ID NO: 6和8在序列上至少90%相同, 和

所述第二抗MET抗体的VH和VL分别与SEQ ID NO: 10和12在序列上至少90%相同。

3. 权利要求1的抗体组合物, 其中:

所述第一抗MET抗体具有分别为SEQ ID NO: 6和8的重链可变域 (VH) 和轻链可变域 (VL) 氨基酸序列; 和

所述第二抗MET抗体具有分别为SEQ ID NO: 10和12的VH和VL氨基酸序列。

4. 权利要求1的抗体组合物, 其中:

所述第一抗MET抗体的重链可变域 (VH) 和轻链可变域 (VL) 分别与SEQ ID NO: 14和16在序列上至少90%相同; 和

所述第二抗MET抗体的VH和VL分别与SEQ ID NO: 18和20在序列上至少90%相同。

5. 权利要求1的抗体组合物, 其中:

所述第一抗MET抗体具有分别为SEQ ID NO: 14和16的重链可变域 (VH) 和轻链可变域 (VL) 氨基酸序列; 和

所述第二抗MET抗体具有分别为SEQ ID NO: 18和20的VH和VL氨基酸序列。

6. 权利要求1-5中任一项的抗体组合物, 其中所述第一抗MET抗体, 所述第二抗MET抗体, 或两者为同种型IgG的抗体。

7. 权利要求6的抗体组合物, 其中所述第一抗MET抗体, 所述第二抗MET抗体, 或两者为同种型亚类IgG1的抗体。

8. 抗体组合物, 所述抗体组合物包含第一抗MET抗体和第二抗MET抗体, 其中:

所述第一抗MET抗体具有分别为SEQ ID NO: 34和33的重链 (HC) 和轻链 (LC) 氨基酸序列; 和

所述第二抗MET抗体具有分别为SEQ ID NO: 36和35的HC和LC氨基酸序列。

9. 药物组合物, 所述药物组合物包含权利要求1-8中任一项的抗体组合物和药学上可接受的赋形剂。

10. 抗MET抗体或其抗原结合部分, 其具有分别为SEQ ID NO: 21、22、23、24、25和26的H-CDR1-3和L-CDR1-3氨基酸序列。

11. 权利要求10的抗MET抗体或其抗原结合部分, 其中所述抗体具有:

a) 与SEQ ID NO: 6具有至少90%序列同一性的重链可变域 (VH), 和与SEQ ID NO: 8具有至少90%序列同一性的轻链可变域 (VL); 或

b) 与SEQ ID NO: 14具有至少90%序列同一性的VH, 和与SEQ ID NO: 16具有至少90%序列同一性的VL。

12. 权利要求10的抗MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体具有为SEQ ID NO: 6的重链可变域(VH) 氨基酸序列和为SEQ ID NO: 8的轻链可变域(VL) 氨基酸序列。

13. 权利要求10的抗MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体具有为SEQ ID NO: 14的重链可变域(VH) 氨基酸序列和为SEQ ID NO: 16的轻链可变域(VL) 氨基酸序列。

14. 权利要求10-13中任一项的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体是同种型IgG的抗体。

15. 权利要求14的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体是同种型亚类IgG1的抗体。

16. 抗MET抗体,其中所述抗体的重链(HC)的氨基酸序列为SEQ ID NO: 34且所述抗体的轻链(LC)的氨基酸序列为SEQ ID NO: 33。

17. 药物组合物,所述药物组合物包含权利要求10-16中任一项的抗MET抗体或其抗原结合部分和药学上可接受的载体。

18. 抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有分别为SEQ ID NO: 27、28、29、30、31和32的H-CDR1-3和L-CDR1-3氨基酸序列。

19. 权利要求18的抗MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体具有:

a) 与SEQ ID NO: 10具有至少90%序列同一性的重链可变域(VH),和与SEQ ID NO: 12具有至少90%序列同一性的轻链可变域(VL);或

b) 与SEQ ID NO: 18具有至少90%序列同一性的VH,和与SEQ ID NO: 20具有至少90%序列同一性的VL。

20. 权利要求18的抗MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体具有为SEQ ID NO: 10的重链可变域(VH) 氨基酸序列和为SEQ ID NO: 12的轻链可变域(VL) 氨基酸序列。

21. 权利要求18的抗MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体具有为SEQ ID NO: 18的重链可变域(VH) 氨基酸序列和为SEQ ID NO: 20的轻链可变域(VL) 氨基酸序列。

22. 权利要求18-21中任一项的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体是同种型IgG的抗体。

23. 权利要求22的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体是同种型亚类IgG1的抗体。

24. 抗MET抗体,其中所述抗体的重链(HC)的氨基酸序列为SEQ ID NO: 36且所述抗体的轻链(LC)的氨基酸序列为SEQ ID NO: 35。

25. 药物组合物,所述药物组合物包含权利要求18-24中任一项的抗MET抗体或其抗原结合部分和药学上可接受的载体。

26. 分离的核酸分子,所述核酸分子包含编码权利要求10-16和18-24中任一项的抗MET抗体或其抗原结合部分的重链的核苷酸序列,以及编码所述抗MET抗体或其抗原结合部分的轻链的核苷酸序列。

27. 权利要求26的分离的核酸分子,所述核酸分子包含为SEQ ID NO: 5、7、9、11、13、15、17或19的核苷酸序列。

28. 载体,所述载体包含权利要求26或27的分离的核酸分子,其中所述载体还包含表达控制序列。

29. 宿主细胞,所述宿主细胞包含编码权利要求10-16和18-24中任一项的抗MET抗体或其抗原结合部分的重链的核苷酸序列,和编码所述抗MET抗体或其抗原结合部分的轻链的核苷酸序列。

30. 用于产生权利要求10-16和18-24中任一项的抗体或其抗原结合部分的方法,所述方法包括提供根据权利要求29的宿主细胞,在适合所述抗体或其抗原结合部分的表达的条件下培养所述宿主细胞,并且分离所得的抗体或其抗原结合部分。

31. 用于产生权利要求1-8中任一项的抗体组合物的方法,所述方法包括提供能够表达第一抗MET抗体或其抗原结合部分的第一宿主细胞和能够表达第二抗MET抗体或其抗原结合部分的第二宿主细胞,在适合抗体或其抗原结合部分表达的条件下培养所述第一和第二宿主细胞,并且分离所得的抗体或其抗原结合部分。

32. 权利要求31的方法,其中在单个生物反应器中培养所述第一和第二宿主细胞。

33. 多克隆细胞系,所述多克隆细胞系能够表达权利要求1-8中任一项的抗体组合物,其中所述多克隆细胞系包含能够表达第一抗MET抗体或其抗原结合部分的第一宿主细胞和能够表达第二抗MET抗体或其抗原结合部分的第二宿主细胞。

34. 权利要求1-8中任一项的抗体组合物或权利要求9的药物组合物在制造用于在患者中治疗非小细胞肺癌、胃癌、肝细胞癌或食管癌的药物中的用途。

35. 权利要求10-16和18-24中任一项的抗MET抗体或其抗原结合部分,或权利要求17或25的药物组合物在制造用于在患者中治疗胃癌的药物中的用途。

36. 权利要求10-16中任一项的抗MET抗体或其抗原结合部分,或权利要求17的药物组合物在制造用于在患者中治疗非小细胞肺癌的药物中的用途。

37. 权利要求34-36中任一项的用途,其还包括施用化学治疗剂,抗肿瘤剂,抗血管生成剂,酪氨酸激酶抑制剂,或MET途径抑制剂。

## 抗MET抗体和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2014年9月16日提交的美国临时申请62/051,190的权益,其通过引用以其整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,其已经以ASCII格式电子提交,并通过引用以其整体并入本文。该ASCII拷贝,创建于2015年9月15日,命名为110285-0051-W01\_SL.txt且大小为78,490字节。

### 发明领域

[0005] 本发明涉及抗MET抗体和抗体组合物,以及在治疗与MET相关的疾病或状况中使用它们的方法。

[0006] 发明背景

[0007] MET(也称为c-MET)是受体酪氨酸激酶,其包含50kDa的 $\alpha$ 亚基和145kDa的 $\beta$ 亚基。MET的唯一已知配体是肝细胞生长因子(HGF),其也称为分散因子(scatter factor)。HGF对MET的结合导致受体二聚化和 $\beta$ 亚基残基Y1349和Y1356的自身磷酸化,激活下游信号传导途径,其包括磷酸肌醇3-激酶(PI3K)-蛋白激酶B(Akt)途径,信号转导物和转录因子激活物(STAT)途径,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径和活化B细胞核因子 $\kappa$ -轻链增强剂(NF $\kappa$ B)途径。这最终导致增加的有丝分裂,细胞增殖,细胞存活和细胞运动性。可以发生MET或HGF的失调,例如通过过表达,基因扩增,突变,或MET的可变剪接,或通过HGF配体诱导的自分泌/旁分泌环信号传导。此类失调在许多癌症中发挥作用,其通过促进癌症侵袭性,血管生成,转移和肿瘤生长,从而导致更具攻击性的癌症表型和较差的预后。

[0008] 还已知MET与涉及其它受体(例如EGFR,TGF- $\beta$ 和HER3)的信号传导途径相互作用,并且可以在对靶向那些受体的治疗的抗性中起作用。因此,MET抑制剂例如抗MET抗体可以与其它受体抑制剂组合有效克服抗性表型。

[0009] 目前的MET抑制剂包括可以靶向MET或其配体HGF的单克隆抗体,和小分子激酶抑制剂二者。已知的靶向MET途径的抗体包括人源化抗MET抗体onartuzumab(OA-5D5, OAM4558g, MetMAb);人源化抗HGF抗体ficlatuzumab(AV-299);人抗HGF抗体rilotumumab(AMG102);人源化抗HGF抗体TAK701;人源化IgG4抗c-MET抗体LY2875358/LA480;人源化抗c-MET抗体ABT-700(H224G11);和ARGX-111抗c-MET抗体(36C4)。已知的抗MET小分子受体酪氨酸激酶抑制剂包括tivantinib,cabozantinib,foretinib,golvatinib和crizotinib。然而,没有抗MET抗体已被批准用于治疗用途。

[0010] 鉴于MET在癌症进展中的关键作用,需要针对MET的新的和改进的疗法。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明针对靶向MET的新的重组抗体,以及包含两种或更多种这些抗体的组合物,以及该抗体和组合物用于治疗癌症的治疗的用途,包括非小细胞肺癌,胃癌,肝细胞癌,食管癌,结肠直肠癌,肾乳头状细胞癌,胶质母细胞瘤,肾上腺皮质癌,肾细胞癌,前列腺癌和

表达或过表达MET或依赖于MET途径活化的其它癌症。与此类癌症目前可用的治疗(包括抗体治疗)相比,预期本发明的抗体提供了优异的临床反应,不论是单独或在包含两种或更多种此类抗体的组合物中。

[0013] 在一个实施方案中,本发明提供包含第一抗MET抗体或其抗原结合部分和第二抗MET抗体或其抗原结合部分的抗体组合物。

[0014] 在一些实施方案中,第一抗MET抗体与具有分别包含SEQ ID NOs:21,22,23,24,25和26的氨基酸序列H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3的抗体竞争对人MET的结合,且第二抗MET抗体与具有分别包含SEQ ID NO:27,28,29,30,31和32的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3的抗体竞争对人MET的结合。

[0015] 在一些实施方案中,第一抗MET抗体与具有分别包含SEQ ID NOs:21,22,23,24,25和26的氨基酸序列H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3的抗体结合人MET的相同表位,且第二抗MET抗体与具有分别包含SEQ ID NO:27,28,29,30,31和32的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3的抗体结合人MET的相同表位。在一些实施方案中,第一MET抗体可以结合SEMA- $\alpha$ 片段(blade)3,且第二MET抗体可以结合SEMA- $\alpha$ 1片段2。这些抗体的组合靶向两个表位并且对MET信号传导途径产生令人惊讶的协同抑制作用。我们已经发现,这些表位的组合靶向对MET信号传导途径产生高得令人惊讶的抑制活性。

[0016] 在一些实施方案中,第一抗MET抗体包含H-CDR3,其包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗MET抗体包含H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3,其分别包含SEQ ID NO:21,22和23的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗MET抗体包含序列与SEQ ID NO:6或14的氨基酸序列的序列至少90%相同的重链可变结构域(VH)。在一些实施方案中,第一抗MET抗体包含VH,其包含SEQ ID NO:6或14的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗MET抗体包含重链(HC),其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列。

[0017] 在一些实施方案中,第一抗MET抗体包含L-CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗MET抗体包含L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3,其分别包含SEQ ID NO:24,25和26的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗MET抗体包含序列与SEQ ID NO:8或16的氨基酸序列的序列至少90%相同的轻链可变结构域(VL)。在一些实施方案中,第一抗MET抗体包含VL,其包含SEQ ID NO:8或16的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗MET抗体包含轻链(LC),其包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列。

[0018] 在一些实施方案中,第一抗MET抗体包含H-CDR3,其包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,和L-CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗MET抗体包含H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3,其分别包含SEQ ID NO:21,22,23,24,25和26的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗MET抗体包含序列与SEQ ID NO:6或14的氨基酸序列的序列至少90%相同的重链可变结构域(VH)和序列与SEQ ID NO:8或16的氨基酸序列的序列至少90%相同的轻链可变结构域(VL)。在一些实施方案中,第一抗MET抗体包含VH,其包含SEQ ID NO:6或14的氨基酸序列,和VL,其包含SEQ ID NO:8或16的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗MET抗体包含VH,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,和VL,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗MET抗体包含VH,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,和VL,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗

MET抗体包含HC,其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,和LC,其包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列。

[0019] 在一些实施方案中,第二抗MET抗体包含H-CDR3,其包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二抗MET抗体包含H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3,其分别包含SEQ ID NO:27,28和29的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二抗MET抗体包含序列与SEQ ID NO:10或18的氨基酸序列的序列至少90%相同的VH。在一些实施方案中,第二抗MET抗体包含VH,其包含SEQ ID NO:10或18的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二抗MET抗体包含HC,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。

[0020] 在一些实施方案中,第二抗MET抗体包含L-CDR3,其包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二抗MET抗体包含L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3,其分别包含SEQ ID NO:30,31和32的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二抗MET抗体包含序列与SEQ ID NO:12或20的氨基酸序列的序列至少90%相同的VL。在一些实施方案中,第二抗MET抗体包含SEQ ID NO:12或20的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二抗MET抗体包含LC,其包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施方案中,第二抗MET抗体包含H-CDR3,其包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列,和L-CDR3,其包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二抗MET抗体包含H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3,其分别包含SEQ ID NO:27,28,29,30,31和32的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二抗MET抗体包含序列与SEQ ID NO:10或18的氨基酸序列的序列至少90%相同的重链可变结构域(VH)和序列与SEQ ID NO:12或20的氨基酸序列的序列至少90%相同的轻链可变结构域(VL)。在一些实施方案中,第二抗MET抗体包含VH,其包含SEQ ID NO:10或18的氨基酸序列,和VL,其包含SEQ ID NO:12或20的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二抗MET抗体包含VH,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,和VL,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二抗MET抗体包含VH,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,和VL,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二抗MET抗体包含HC,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,和LC,其包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

[0022] 本申请还提供包含如本文所述的第一和第二抗MET抗体的任意组合的抗体组合物。

[0023] 例如,在一些实施方案中,第一抗MET抗体具有分别包含SEQ ID NO:23和26的氨基酸序列的H-CDR3和L-CDR3,且第二抗体具有分别包含SEQ ID NO:29和32的氨基酸序列的H-CDR3和L-CDR3。在一些实施方案中,第一抗MET抗体具有分别包含SEQ ID NO:21,22,23,24,25和26的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3,且第二抗MET抗体具有分别包含SEQ ID NO:27,28,29,30,31和32的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3。

[0024] 在一些实施方案中,第一抗MET抗体的VH与VL序列分别于SEQ ID NO:6和8的氨基酸序列至少90%相同,且第二抗MET抗体的VH与VL序列分别于SEQ ID NO:10和12的氨基酸序列至少90%相同。在一些实施方案中,第一抗MET抗体的VH与VL序列分别于SEQ ID NO:14和16的氨基酸序列至少90%相同,且第二抗MET抗体的VH与VL序列分别于SEQ ID NO:18和20的氨基酸序列至少90%相同。在一些实施方案中,第一抗MET抗体的VH和VL分别包含SEQ

ID NO:6和8的氨基酸序列,且第二抗MET抗体的VH与VL分别包含SEQ ID NO:10和12的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗MET抗体的VH和VL分别包含SEQ ID NO:14和16的氨基酸序列,且第二抗MET抗体的VH与VL分别包含SEQ ID NO:18和20的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一抗MET抗体的HC和LC分别包含SEQ ID NO:34和33的氨基酸序列,且第一抗MET抗体的HC和LC分别包含SEQ ID NO:36和35的氨基酸序列。

[0025] 在本文所述的抗MET抗体组合物的一些实施方案中,第一抗MET抗体,第二抗MET抗体,或两者为同种型IgG的抗体。在某些实施方案中,第一抗MET抗体,第二抗MET抗体,或两者为同种型亚类IgG1的抗体。

[0026] 在一些实施方案中,本文所述的组合物中的至少一种,至少两种,或所有的抗MET抗体具有至少一种选自下组的特性,或特性的任意组合:

[0027] ●不结合小鼠或鸡MET;

[0028] ●结合人MET的表位,所述表位包含存在于SEMA域上的残基;

[0029] ●诱导MET的降解;

[0030] ●以 $1 \times 10^{-9}$ M或更小的 $K_D$ 结合人MET;

[0031] ●抑制至少一种选自SNU5、EBC1、MKN45、KatoII、OE33和Okajima的细胞系的体外生长;

[0032] ●抑制MET磷酸化;

[0033] ●抑制MET下游信号传导;

[0034] ●在HGF的存在或不存在下抑制原代内皮细胞增殖;和

[0035] ●抑制体内肿瘤生长。

[0036] 在一些实施方案中,本文所述的抗MET抗体组合物的任一种具有至少一种选自下组的特性,或特性的任意组合:

[0037] ●诱导MET的降解;

[0038] ●抑制至少一种选自SNU5、EBC1、MKN45、KatoII、OE33和Okajima的细胞系的体外生长;

[0039] ●抑制MET磷酸化;

[0040] ●抑制MET下游信号传导;

[0041] ●在HGF的存在或不存在下抑制原代内皮细胞增殖;和

[0042] ●抑制体内肿瘤生长。

[0043] 本申请还提供药物组合物,其包含本文所述的抗MET抗体组合物的任一种和药学上可接受的赋形剂。

[0044] 本申请还提供抗MET抗体或其抗原结合部分。在一些实施方案中,抗体或部分与其H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3分别包含SEQ ID NO:21,22,23,24,25和26的氨基酸序列的抗体竞争对人MET的结合。在一些实施方案中,抗体或部分与其H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3分别包含SEQ ID NO:27,28,29,30,31和32的氨基酸序列的抗体竞争对人MET的结合。

[0045] 在一些实施方案中,抗体或部分与其H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3分别包含SEQ ID NO:21,22,23,24,25和26的氨基酸序列的抗体结合人MET的相同表位。在一些实施方案中,抗体或部分与其H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3



分别包含SEQ ID NO:27,28,29,30,31和32的氨基酸序列的抗体结合人MET的相同表位。

[0046] 在一些实施方案中,抗体包含H-CDR3,其包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列和/或L-CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列,H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3,其分别包含SEQ ID NO:21,22和23的氨基酸序列和/或L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3,其分别包含SEQ ID NO:24,25和26的氨基酸序列,具有与SEQ ID NO:6或14的氨基酸序列至少90%序列同一性的VH和/或具有与SEQ ID NO:8或16的氨基酸序列至少90%序列同一性的VL;或包含SEQ ID NO:6或14的氨基酸序列的VH和/或包含SEQ ID NO:8或16的氨基酸序列的VL。在某些实施方案中,抗体包含VH,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,和VL,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体包含VH,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,和VL,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体包含HC,其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,和LC,其包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列。

[0047] 在某些实施方案中,抗体包含重链,所述重链包含HCDR-3,其包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列;H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3,其分别包含SEQ ID NO:21,22和23的氨基酸序列;具有与SEQ ID NO:6或14的氨基酸序列至少90%序列同一性的VH;包含SEQ ID NO:6或14的氨基酸序列的VH;或包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的HC;且含包含轻链,所述轻链包含L-CDR3,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列;L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3,其分别包含SEQ ID NO:24,25和26的氨基酸序列;与SEQ ID NO:8或16的氨基酸序列至少90%序列同一性的VL;包含SEQ ID NO:8或16的氨基酸序列的VL;或包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的LC。

[0048] 在一些实施方案中,抗体包含H-CDR3,其包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列和/或L-CDR3,其包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列,H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3,其分别包含SEQ ID NO:27,28和29的氨基酸序列和/或L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3,其分别包含SEQ ID NO:30,31和32的氨基酸序列,具有与SEQ ID NO:10或18的氨基酸序列至少90%序列同一性的VH和/或具有与SEQ ID NO:12或20的氨基酸序列至少90%序列同一性的VL;或包含SEQ ID NO:10或18的氨基酸序列的VH和/或包含SEQ ID NO:12或20的氨基酸序列的VL。在某些实施方案中,抗体包含VH,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,和VL,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体包含VH,其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,和VL,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体包含HC,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,和LC,其包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

[0049] 在某些实施方案中,抗体包含重链,所述重链包含HCDR-3,其包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3,其分别包含SEQ ID NO:27,28和29的氨基酸序列;具有与SEQ ID NO:10或18的氨基酸序列至少90%序列同一性的VH;包含SEQ ID NO:10或18的氨基酸序列的VH;或包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HC;且含包含轻链,所述轻链包含L-CDR3,其包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3,其分别包含SEQ ID NO:30,31和32的氨基酸序列;与SEQ ID NO:12或20的氨基酸序列至少90%序列同一性的VL;包含SEQ ID NO:12或20的氨基酸序列的VL;或包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的LC。

[0050] 在一些实施方案中,抗体具有分别包含SEQ ID NO:21,22,23,24,25和26的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3。

[0051] 在一些实施方案中,抗体具有分别包含SEQ ID NO:27,28,29,30,31和32的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3。

[0052] 在一些实施方案中,抗体具有重链可变结构域(VH),其与SEQ ID NO:6或14的氨基酸序列具有至少90%序列的同一性,和轻链可变结构域(VL),其与SEQ ID NO:8或16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性。

[0053] 在一些实施方案中,抗体具有重链可变结构域(VH),其与SEQ ID NO:10或18的氨基酸序列具有至少90%序列的同一性,和轻链可变结构域(VL),其与SEQ ID NO:12或20的氨基酸序列具有至少90%序列同一性。

[0054] 在一些实施方案中,抗体具有包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变结构域(VH)和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变结构域(VL)。

[0055] 在一些实施方案中,抗体具有包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变结构域(VH)和包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链可变结构域(VL)。

[0056] 在一些实施方案中,抗体具有包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变结构域(VH)和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变结构域(VL)。

[0057] 在一些实施方案中,抗体具有包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的重链可变结构域(VH)和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变结构域(VL)。

[0058] 在一些实施方案中,抗体具有包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链(HC)和包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的轻链(LC)。

[0059] 在一些实施方案中,抗体具有包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链(HC)和包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的轻链(LC)。

[0060] 本发明提供本文所述的人源化形式的嵌合抗体和抗原能结合部分,特别是具有分别于SEQ ID NO:6和8或分别于SEQ ID NO:10和12相关的重链和轻链氨基酸序列的抗体和抗原结合部分。

[0061] 在本文所述的抗体和抗原结合部分的一些实施方案中,抗体可以是同种型IgG。在某些实施方案中,抗体是同种型亚类IgG1。

[0062] 在一些实施方案中,抗体具有至少一种选自下组的特性,或特性的任意组合:

[0063] ●不结合小鼠或鸡MET;

[0064] ●结合人MET的表位,所述表位包含存在于SEMA域上的残基;

[0065] ●诱导MET的降解;

[0066] ●以 $1 \times 10^{-9}$ M或更小的 $K_D$ 结合人MET;

[0067] ●抑制至少一种选自SNU5、EBC1、MKN45、KatoII、OE33和Okajima的细胞系的体外生长;

[0068] ●抑制MET磷酸化;

[0069] ●抑制MET下游信号传导;

[0070] ●在HGF的存在或不存在下抑制原代内皮细胞增殖;和

[0071] ●抑制体内肿瘤生长。

[0072] 本发明还提供药物组合物,其包含本文所述的任意抗MET抗体或其抗原结合部分和药学上可接受的赋形剂。

[0073] 本发明提供分离的核酸分子,其包含编码本文所述的抗MET抗体的重链或其抗原结合部分的核苷酸序列,编码轻链或其抗原结合部分的核苷酸序列,或两者。在一些实施方案中,分离的核酸分子包含选自下组的核苷酸序列:SEQ ID NO:5,7,9,11,13,15,17或19。

[0074] 本发明还提供包含分离的核酸分子的载体,其中所述载体还包含表达控制序列。

[0075] 本发明还提供宿主细胞,其包含编码本发明所述的抗MET抗体的重链或其抗原结合部分的核苷酸序列,编码轻链或其抗原结合部分的核苷酸序列,或两者。在一些实施方案中,宿主细胞包含选自下组的核苷酸序列:SEQ ID NO:5,7,9,11,13,15,17或19。

[0076] 本发明还提供非人转基因动物或植物,其包含编码本发明所述的抗MET抗体的重链或其抗原结合部分的核苷酸序列,编码轻链或其抗原结合部分的核苷酸序列,或两者,其中所述动物或植物表达该核苷酸序列。在一些实施方案中,动物和植物包含选自下组的核苷酸序列:SEQ ID NO:5,7,9,11,13,15,17或19。

[0077] 本发明还提供用于产生本文所述的抗MET抗体或其抗原结合部分的方法,包括提供上文所述的宿主细胞,在适合抗体或部分表达的条件下培养所述宿主细胞,并且分离所得的抗体或部分。

[0078] 本发明还提供用于产生本文所述的抗MET抗体组合物的方法,包括提供能够表达如本文所述的第一抗MET抗体或抗原结合部分的第一宿主细胞和能够表达如本文所述的第二抗MET抗体或抗原结合部分的第二宿主细胞,在适合抗体或部分表达的条件下培养所述第一和第二宿主细胞,并且分离所得的抗体或部分。在某些实施方案中,第一和第二宿主细胞在单个生物反应器中培养。在其它实施方案中,第一和第二宿主细胞在单独的生物反应器中培养。

[0079] 本发明还提供能够表达抗MET抗体组合物的多克隆细胞系,其中所述多克隆细胞系包含能够表达本文所述的第一抗MET抗体或其抗原结合部分的第一宿主细胞和能够表达本文所述的第二抗MET抗体或其抗原结合部分的第二宿主细胞。

[0080] 本发明还提供双特异性结合分子,其具有本发明所述的抗MET抗体组合物的第一和第二抗MET抗体或其抗原结合部分的结合特异性。在某些实施方案中,双特异性结合分子包含其H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3分别包含SEQ ID NO:21,22,23,24,25和26的氨基酸序列的抗体的抗原结合部分;和其H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3分别包含SEQ ID NO:27,28,29,30,31和32的氨基酸序列的抗体的抗原结合部分。

[0081] 本发明还提供用于治疗患有MET介导的病症的患者的方法,包括向所述患者使用本文所述的抗MET抗体组合物,或包含抗MET抗体组合物的药物组合物。

[0082] 本发明还提供用于治疗患有MET介导的病症的患者的方法,包括向所述患者施用本文所述的抗MET抗体或抗原结合部分,或包含抗MET抗体或抗原结合部分的药物组合物。

[0083] 本文还提供用于治疗患有癌症的患者的方法,包括向所述患者使用本文所述的抗MET抗体组合物,或包含抗MET抗体组合物的药物组合物。在一些实施方案中,该癌症依赖于MET活化。在某些实施方案中,该癌症是非小细胞肺癌,结直肠癌,肾乳头状细胞癌,胶质母细胞瘤,肾细胞癌,前列腺癌或肾上腺皮质癌。

[0084] 本发明还提供用于治疗患有癌症的患者的方法,包括向所述患者使用本文所述的抗MET抗体或抗原结合部分,或包含抗MET抗体或抗原结合部分的药物组合物。此外,本发明提供本文所述的抗MET抗体或抗原结合部分或包含抗MET抗体或抗原结合部分的药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。此外,本发明提供本文所述的抗MET抗体或抗原结合部分,或包含抗MET抗体或抗原结合部分的药物组合物,用于治疗癌症。在一些实施方案中,

该癌症依赖于MET活化。在某些实施方案中,癌症是非小细胞肺癌,结直肠癌,肾乳头状细胞癌,胶质母细胞瘤,肾细胞癌,前列腺癌或肾上腺皮质癌。在某些实施方案中,治疗还包括施用化学治疗剂,抗肿瘤剂,抗血管生成剂,酪氨酸激酶抑制剂,或MET途径抑制剂。

[0085] 在本发明所述的治疗方法的一些实施方案中,患者是哺乳动物。在某些实施方案中,患者是灵长类动物。在具体实施方案中,患者是人。

[0086] 附图简述

[0087] 图1示出了测试的十三种MET抗体针对彼此的竞争矩阵。施用至少50%抑制用于区分表位库(灰色方框)。点虚线方框:单向竞争。黑框方框:与相同抗体的竞争。

[0088] 图2示出了MET抗体对HEK293细胞上表达的不同人,小鼠,鸡和嵌合MET构建体的结合的总结。氨基酸序列编号(AA)指代人MET序列,其交换为鸡或小鼠。示出了不同构建体的示意图。标识了个体结构域或亚结构域。SP:信号肽。SV5-GPI:SV5序列随后为甘氨酸-丝氨酸接头和GPI锚定。注意突变位置的图示是近似的。白色方框:人MET序列。灰色方框:鸡序列。阴影线方框:小鼠序列。对转染细胞的阳性结合标示为+。弱结合为(+)。无结合为-。

[0089] 图3示出了使用阴性对照抗体9006,9338或9006+9338处理24或48小时的细胞系中MET受体水平的Western印记分析的结果。

[0090] 图4示出了使用阴性对照抗体9006+9338,或C8-H241处理24或48小时的细胞系中MET受体水平的Simple Western印记分析的结果。

[0091] 图5A-5B显示了使用嵌合抗体9006,9338或9006+9338处理的细胞系中MET磷酸化水平的Simple Western印记分析的结果。

[0092] 图6A-6B显示了使用嵌合抗体9006,9338或抗体混合物9006+9338处理的细胞系中ERK2和AKT磷酸化水平的Simple Western印记分析的结果。

[0093] 图7A显示了使用嵌合抗体9006或9338,或对照抗体处理后的HUVEC的数量。使用25 µg/ml的总抗体(单独或抗体混合物)。图7B描述了最终时间点,孵育404小时的测定结果。数据相对于未处理的细胞(100%)标准化。

[0094] 图8A显示了在20ng/ml的HGF的存在下,使用嵌合抗体9006,9338,抗体混合物9006+9338或对照抗体处理后HUVEC的数量。使用25 µg/ml的总抗体(单独或抗体混合物)。图8B描述了最终时间点,孵育404小时的测定结果。数据相对于未处理的细胞(100%)标准化。

[0095] 图9A-9B显示了使用不同量的嵌合抗体9338和9006(分别为A和B)处理后HUVEC的数量的滴定曲线。

[0096] 图10显示了使用不同量的抗体混合物9338+9006处理后HUVEC的数量的滴定曲线。

[0097] 图11描述了图9和图10的最终时间点的结果。数据相对于未处理的细胞标准化。

[0098] 图12A-12C显示了代谢活性测定的结果,表明嵌合(左侧小图)或人源化(右侧小图)9006,9338或9006+9338对细胞系HCC827R1\_cet#3(12A),HCC827R1\_cet#1(12B)和MKN45(12C)的抗增殖效果。

[0099] 图13A-13C显示了代谢活性测定的结果,表明嵌合(左侧小图)或人源化(右侧小图)9006,9338或9006+9338对细胞系EBC-1(13A),KatoII(13B)和Okajima(13C)的抗增殖效果。

[0100] 图14显示了来自Hu9338+Hu9006,13-MET,28-MET和13-MET+28-MET抗体对细胞系EBC1,MKN45,SNU5和KatoII的滴定的活力结果。

[0101] 图15显示了嵌合9006,9338,9006+9338或媒介物处理对小鼠中人非小细胞肺癌细胞系EBC-1异种移植的肿瘤生长的效果。灰色区域表示处理周期。

[0102] 图16显示了与媒介物处理相比,使用四种不同浓度的嵌合9006+9338处理对小鼠中人非小细胞肺癌细胞系EBC-1异种移植的肿瘤生长的效果。灰色区域表示处理周期。

[0103] 图17显示了嵌合9006,9338,9006+9338或媒介物处理对小鼠中人胃癌细胞系MKN-45异种移植的肿瘤生长的效果。灰色区域表示处理周期。

[0104] 图18显示了嵌合9006,9338,9006+9338或媒介物处理对小鼠中人胃癌细胞系SNU5异种移植的肿瘤生长的效果。灰色区域表示处理周期。

[0105] 图19显示了嵌合抗体混合物9006+9338或媒介物处理对小鼠中人HCC患者衍生的异种移植模型LI1037的肿瘤生长的效果。灰色区域表示处理周期。

[0106] 图20显示了9006+9338,Hu9006+Hu9338或媒介物处理对人非小细胞肺癌细胞系EBC-1异种移植的肿瘤生长的效果。灰色区域表示处理周期。

[0107] 图21显示了嵌合9006+9338,人源化9006+9338 (Hu9006+Hu9338),或媒介物处理对人食管癌细胞系OE33异种移植的肿瘤生长的效果。灰色区域表示处理周期。

[0108] 图22显示了C8-H241,Hu9006+Hu9338或媒介物处理对人非小细胞肺癌细胞系EBC-1异种移植的肿瘤生长的效果(n=10只小鼠每组)。灰色区域表示处理周期。虚线表示在C8-H241处理的组中,对剩下的小鼠(n=4)用Hu9006+Hu9338再处理的起始。

[0109] 图23显示了C8-H241,Hu9006,Hu9338,Hu9006+Hu9338或媒介物处理对人胃癌细胞系Hs746T异种移植的肿瘤生长的效果(n=8只小鼠每组)。灰色区域表示初始处理周期。虚线表示在C8-H241,Hu9006和Hu9338处理的组中,对剩下的小鼠用Hu9006+Hu9338的单剂量再处理。

[0110] 图24显示了C8-H241,Hu9006+Hu9338或媒介物处理在四种患者衍生的异种移植模型中对肿瘤生长的效果(对于LU0858,L1901和LU2503,n=5只小鼠每组;对于LXFA0526,n=8只小鼠每组)。灰色区域表示处理周期。

[0111] 图25显示了Hu9006+Hu9338或媒介物处理对人非小细胞肺癌细胞系EBC-1异种移植的肿瘤生长的平衡或倾斜比率的效果(n=8只小鼠每组)。灰色区域表示处理周期。

[0112] 图26显示了嵌合9006抗体的重链和轻链可变结构域核苷酸和氨基酸序列(SEQ ID NOs:5-8)。通过箭头标示CDR(SEQ ID NOs:21-26)。

[0113] 图27显示了嵌合9338抗体的重链和轻链可变结构域核苷酸和氨基酸序列(SEQ ID NOs:9-12)。通过箭头标示CDR(SEQ ID NOs:27-32)。

[0114] 图28显示了人源化9006抗体的重链和轻链可变结构域核苷酸和氨基酸序列(SEQ ID NOs:13-16)。通过箭头标示CDR(SEQ ID NOs:21-26)。

[0115] 图29显示了人源化9338抗体的重链和轻链可变结构域核苷酸和氨基酸序列(SEQ ID NOs:17-20)。通过箭头标示CDR(SEQ ID NOs:27-32)。

[0116] 图30显示了人源化抗体9006(分别为SEQ ID NO:33和34)和人源化抗体9338(分别为SEQ ID NO:35和36)的全长轻链和重链氨基酸序列。通过箭头表示CDR。

[0117] 图31显示了MET的结构。

[0118] 发明详述

[0119] 定义和一般技术

[0120] 除非本文另有说明,与本发明相关的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。下面描述示例性的方法和材料,尽管与本文所述相似或相当的方法和材料也可用于本发明的实践或测试。本文提及的所有出版物和其他参考文献通过引用整体并入本文。在冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。尽管引用了一些文献,但是该引用并不构成承认任何这些文献形成本领域普通知识的一部分。

[0121] 此外,除非上下文另有要求,单数项应包括复数且复数项应包括单数。通常,本文所述的与细胞和组织培养,分子生物学,免疫学,微生物学,遗传学,分析化学,合成有机化学,医药和药物化学以及蛋白质和核酸化学和杂交相关使用的命名法和技术是本领域中公知且通常使用的。根据制造商的说明书进行酶反应和纯化技术,如通常在本领域中完成的或如本文所述。

[0122] 在本说明书和实施例中,词语“具有”和“包含”或变体将理解为意味着包括所述整数或整数组,但不排除任何其他整数或整数组。

[0123] 抗体相关定义

[0124] 除非另有说明,如本文使用的“MET”指代人MET(也称为人c-MET)。人MET多肽序列可以在NCBI登录号NM\_000245.2下获得,如本文SEQ ID NO:1所示。除非另有说明,“人MET”是指SEQ ID NO:1的氨基酸序列。人MET还以不同的同种型存在(同种型2;SEQ ID NO:2),其中19个氨基酸插入IPT结构域3(755-755:S→STWWKEPLNIVSFLFCFAS(SEQ ID NO:2))。

[0125] 本文所用的术语“抗体”(Ab)或“免疫球蛋白”(Ig)是指包含两条重(H)链(约50-70kDa)和两条轻链(L)链(约25kDa)通过二硫键相互连接的四聚体。每条重链由重链可变结构域(VH)和重链恒定区(CH)组成。每条轻链由轻链可变结构域(VL)和轻链恒定区(CL)组成。VH和VL结构域可以进一步细分为称为“互补决定区”(CDR)的高变区域,其与较为保守的称为“框架区”(FR)的区域穿插。每个VH和VL由三个CDR组成(H-CDR在本文中表示来自重链的CDR;L-CDR在本文中表示来自轻链的CDR)和四个FR,从氨基末端至羧基末端排列顺序如下:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。每个区域的氨基酸分配可以根据IMGT®定义(Lefranc et al.,Dev Comp Immunol 27(1):55-77(2003);或Kabat,Sequences of Proteins of Immunological Interest的定义(National Institutes of Health,Bethesda,MD(1987and 1991));Chothia&Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987);或Chothia et al.,Nature 342:878-883(1989)。

[0126] 术语“重组抗体”是指从包含编码抗体的核苷酸序列的细胞或细胞系表达的抗体,其中所述核苷酸序列不与该细胞天然相关。

[0127] 术语“抗体组合物”是指两种或更多种抗体或其抗原结合部分的组合。抗体组合物可以是单克隆的(即由相同的抗体或抗原结合部分分子组成)或多克隆(即由两种或更多中不同的抗体或抗原结合部分组成,其与相同抗原上的相同或不同的表位反应或甚至与不同的抗原反应)。

[0128] 术语“分离的蛋白”,“分离的多肽”或“分离的抗体”是指蛋白,多肽或抗体,凭借其起源或衍生的来源(1)与天然相关的组分不相关,所述天然组分在其天然状态下与其相伴随,(2)不含来自相同物种的其它蛋白,(3)由来自不同物种的细胞表达,或(4)不在自然界中发生。因此,化学合成或在与其自然起源不同的细胞的细胞系统中合成的多肽将是从其天然相关组分“分离的”。使用本领域中公知的蛋白纯化技术,蛋白可以通过分离而基本上

不含天然相关组分。

[0129] 本文所用的术语“种系”是指抗体基因和基因区段的核苷酸和氨基酸序列,当它们从亲本通过生殖细胞传递给后代。种系序列不同于成熟B细胞中编码抗体的核苷酸序列,其在B细胞成熟过程中已经通过重组和超突变事件所改变。“利用”特定种系序列的抗体具有与该种系核苷酸序列或与其指定的氨基酸序列比任何其它种系核苷酸或氨基酸序列更紧密的对齐。

[0130] 术语“亲和力”是指抗原和抗体之间的吸引力的测量。抗体对抗原的固有吸引力通常表达为特定抗体-抗原相互作用的结合亲和力平衡常数( $K_D$ )。当 $K_D \leq 1\text{mM}$ ,优选 $\leq 100\text{nM}$ 时,称抗体特异性结合抗原。可以例如通过表面等离子体共振(BIAcore™)或Bio-Layer Interferometry,例如使用Octet™系统测量 $K_D$ 结合亲和力常数。

[0131] 术语“ $k_{\text{off}}$ ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。可以通过Bio-Layer Interferometry测量 $k_{\text{off}}$ 解离速率常数,例如使用Octet™系统或通过表面等离子体共振(BIAcore™)。

[0132] 本文所用的术语“表位”是指抗原的部分(决定簇),其特异性结合相关分子例如双特异性结合分子。表位决定簇通常由分子的化学活性表面分组组成,例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。表位可以是“线性的”或“构象的”。在线性表位中,蛋白(例如,抗原)和相互作用的分子(例如抗体)之间的所有相互作用点沿着蛋白的初级氨基酸序列发生。在构象表位中,相互作用点发生的点在蛋白上的氨基酸残基之间,所述氨基酸残基在初级氨基酸序列中彼此分离。一旦确定了抗原上期望的表位,可以使用本领域公知的技术生成对该表位的抗体。此外,抗体的生成和表征可以产阐明关于期望的表位的信息。根据该信息,可以竞争性筛选结合相同或相似表位的抗体,例如通过竞争性研究以发现竞争结合该抗原的抗体。

[0133] 可以通过使用本领域已知的方法确定与抗MET抗体结合相同表位或交叉竞争结合的抗体。在一个实施方案中,允许本发明的抗MET抗体在饱和的条件下结合MET,然后测量测试抗体结合MET的能力。如果测试抗体能够与参考抗MET抗体同时结合MET,则测试抗体结合与参考抗MET抗体不同的表位。然而,如果测试不能同时结合MET,则测试抗体结合与本发明的抗MET抗体结合的表位相同的表位,重叠的表位,或与该表位靠近的表位。可以使用ELISA,RIA,BIACORE™,Bio-Layer Interferometry或流式细胞术进行该实验。为了测试抗MET抗体是否与另一种抗MET抗体交叉竞争,可以使用上文所述的两个方向的竞争方法,即确定已知抗体是否阻断测试抗体,和反之亦然。在优选的实施方案中,使用Octet™进行实验。

[0134] “嵌合抗体”在其最广义上指以下抗体,其含有来自一种抗体的一个或多个区域以及来自一种或多种其他抗体的一个或多个区域,通常是具有部分人起源和部分非人起源(即部分源自非人动物,例如小鼠、大鼠或其他啮齿动物,或禽类如鸡)的抗体。相对于非人抗体嵌合抗体是优选的,以减少人抗抗体反应的风险,例如在鼠抗体的情况下人抗小鼠抗体反应。典型嵌合抗体的一个例子如下:其中可变区序列是鼠的,而恒定区序列是人的。在嵌合抗体的情况下,可对非人部分进行进一步改变以使抗体人源化。如本文所述的嵌合抗体具有鼠可变结构域序列和人恒定结构域序列。

[0135] 术语“人源化”指以下事实,即当抗体全部或部分为非人起源时(例如用目的抗原

免疫小鼠获得的鼠抗体或基于此类鼠抗体的嵌合抗体),可以替换某些氨基酸,特别是在重链和轻链的框架区和恒定区中,从而避免或最小化人中的免疫反应。抗体与靶抗原残基的相互作用主要在定位于重链和轻链的六个CDR的中的氨基酸残基中。因此在个体抗体之间CDR中的氨基酸序列比CDR外部的序列更为可变。由于CDR序列负责大部分抗体-抗原相互作用,可以表达模拟特定天然发生的抗体或更一般地具有给定氨基酸序列的任何特定抗体的性质的重组抗体,例如通过构建表达接枝到不同抗体的框架序列中的来自特定抗体的CDR序列的表达载体。作为结果,可以对非人抗体进行“人源化”而仍然基本维持原始抗体的结合特异性和亲和力。虽然不可能精确地预测特定抗体的免疫原性并由此预测人抗体抗体的反应,但非人抗体倾向于比人抗体更具免疫原性。嵌合抗体,其中外源(通常为啮齿动物)恒定区已经被人源的序列替代,已经证明通常比完全外源的抗体具有更少的免疫原性,而治疗性抗体的趋势是朝向人源化或完全人抗体。因此,嵌合抗体或非人源的其他抗体可以人源化以降低人抗抗体反应的风险。

[0136] 对于嵌合抗体,人源化通常涉及修饰可变区序列的框架区。作为互补决定区(CDR)的一部分的氨基酸残基通常不会随着人源化而被改变,尽管在某些情况下可能需要改变个别CDR氨基酸残基,例如去除糖基化位点,脱酰胺基位点,天冬氨酸异构化位点或不需要的半胱氨酸或甲硫氨酸残基。通过将寡糖链连接到三肽序列Asn-X-Ser或Asn-X-Thr中的天冬酰胺残基而发生N-连接的糖基化,其中X可以是Pro以外的任何氨基酸。通过将Asn或Ser/Thr残基突变成不同的残基,优选通过保守取代来实现N-糖基化位点的去除。天冬酰胺和谷氨酰胺残基的脱酰胺可以依赖于pH和表面暴露等因素而发生。天冬酰胺残基特别易于脱酰胺化,主要是当存在于序列Asn-Gly中时,而在其它二肽序列如Asn-Ala中则程度较少。当此类脱酰胺基化位点特别是Asn-Gly存在于CDR序列中时,因此可能需要去除该位点,通常可以通过保守取代以去除牵涉的残基中的一个。

[0137] 用于抗体序列的人源化的许多方法是本领域已知的;参见例如,Almagro & Fransson, *Front Biosci.* 13:1619-1633 (2008) 的综述。一种常用的方法是CDR移植,其对于例如鼠来源的嵌合抗体涉及鉴定鼠可变区基因的人种系基因对应物并将鼠CDR序列移植到该框架中。CDR移植可以基于Kabat CDR定义,尽管最近的出版物(Magdelaine-Beuzelin et al., *Crit Rev. Oncol Hematol.* 64:210-225 (2007)) 已经提出 **IMGT®** 定义(国际ImMunoGeneTics**信息系统®**, [www.imgt.org](http://www.imgt.org)) 可以改善人源化的结果(参见Lefranc et al., *Dev. Comp Immunol.* 27:55-77 (2003))。在一些情况下,与获得CDR的亲本抗体相比,CDR移植可以降低CDR移植的非人抗体的结合特异性和亲和力,并因此降低其生物学活性。为了重新建立亲本抗体的结合特异性和亲和力,可以在CDR移植抗体的选定位置(通常在框架区域)中引入回复突变(有时称为“框架修复”)。使用文献和抗体数据库中可获得的信息可以鉴定可能的回复突变的位置。作为回复突变的候选物的氨基酸残基通常是位于抗体分子表面的那些,而被掩埋或具有低表面暴露程度的残基通常不会改变。CDR移植和反向突变的替代人源化技术是表面重构(resurfacing),其中保留了非人源的非表面暴露残基,而表面残基被改变为人残基。

[0138] 在某些情况下,为了提高对目标表位的结合亲和力,也可能需要改变一个或多个CDR氨基酸残基。这被称为“亲和力成熟”,并且可以任选地与人源化相关地进行,例如在抗体的人源化导致结合特异性或亲和力降低的情况下,并且不可能通过仅反向突变充分改善



结合特异性或亲和力。各种亲和力成熟方法是本领域已知的,例如Burks et al.,Proc Natl Acad Sci USA,94:412-417(1997)描述的体外扫描饱和诱变方法,以及Wu et al.Proc Natl Acad Sci USA95:6037-6042(1998)的逐步体外亲和力成熟方法。

[0139] 如本文所使用的术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”)是指保留特异性结合抗原(例如人MET,或其部分)的能力的抗体的一个或多个部分或片段。已经表明,全长抗体的某些片段可以进行抗体的抗原结合功能。包含在术语“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括(i) Fab片段:由 $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$ 和 $C_H1$ 结构域组成的单价片段;(ii)  $(Fab')_2$ 片段:包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)由 $V_H$ 和 $C_H1$ 结构域组成的Fd片段;(iv)由抗体单个臂的 $V_L$ 和 $V_H$ 结构域组成的Fv片段,(v)由 $V_H$ 结构域组成的dAb片段;和(vi)能够特异性结合抗原的分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域 $V_L$ 和 $V_H$ 由单独的基因编码,但是使用重组技术可以将它们连接,通过合成接头使得它们被制成单个的蛋白链,其中 $V_L$ 和 $V_H$ 区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv))。本发明中还包括包含 $V_H$ 和/或 $V_L$ 的抗原结合分子。在 $V_H$ 的情况下,分子还可以包含CH1,铰链,CH2或CH3区的一个或多个。此类单链抗体也意在被包括在抗体的术语“抗原结合部分”内。还包括其它形式的单链抗体,例如双抗体。双抗体是二价的双特异性抗体,其中 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域在单个多肽链上表达,但使用太短的而不允许同一链上的两个结构域之间的配对的接头,从而迫使结构域与另一条链上的互补结构域配对,并创造两个抗原结合位点。

[0140] 抗体部分,例如Fab和 $F(ab')_2$ 片段,可使用常规技术从完整抗体制备,例如完整抗体的木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化。此外,可以使用标准重组DNA技术例如如本文所述获得抗体,抗体部分和免疫粘附分子。

[0141] 在一个实施方案中,本发明的抗体是单克隆抗体。如本文所使用的,首字母缩写“mAb”是指单克隆抗体,即由细胞的单个克隆群体合成和分泌的抗体。克隆群体可以是永生生化细胞的克隆群体。在一些实施方案中,克隆群体中的永生生化细胞是杂交细胞-杂交瘤-通常通过将来自免疫动物的单个B淋巴细胞与淋巴细胞肿瘤的单个细胞融合而产生。

[0142] 可以通过本领域已知的任何方法确定抗MET抗体的种类(同种型)和亚类。通常,可以使用对抗体的特定种类和亚类特异性的抗体来确定抗体的类和亚类。这样的抗体在市场上可买到。可以通过ELISA,Western Blot以及其它技术来确定种类和亚类。或者,可以通过以下确定类型和亚类:测序抗体的重链和/或轻链的全部或部分恒定结构域,将它们的氨基酸序列与免疫球蛋白的各种类型和亚类的已知氨基酸序列比较,和确定抗体的类型和亚类。

[0143] 抗MET抗体

[0144] 本发明涉及针对人MET的抗体,或所述的抗体的抗原结合部分。本发明提供新的抗MET抗体9006和9338,以嵌合和人源化形式两者。图26-30描绘了这些抗体的全长(HC和LC)和可变结构域(VH和VL)重链和轻链核苷酸和氨基酸序列。以下表1提供了这些序列的SEQ ID NO。以下表2提供了抗体9006和9338的重链和轻链CDR氨基酸序列(其在嵌合和人源化形式之间相同)的SEQ ID NO。根据IMGT<sup>®</sup>定义指定CDR序列。

[0145] 表1:抗体9006和9338的重链和轻链可变结构域的核苷酸和氨基酸序列的SEQ ID NO。

[0146]	嵌合				人源化					
	VH		VL		VH		VL		HC	LC
	DNA	蛋白	DNA	蛋白	DNA	蛋白	DNA	蛋白	蛋白	蛋白
9006	5	6	7	8	13	14	15	16	34	33
9338	9	10	11	12	17	18	19	20	36	35

[0147] 表2:抗体9006和9338的CDR的氨基酸序列的SEQ ID NO。

[0148]	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
9006	21	22	23	24	25	26
9338	27	28	29	30	31	32

[0149] 在某些实施方案中,本发明提供:

[0150] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有分别包含SEQ ID NO:21,22,23,24,25和26的H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3的抗体竞争对人MET的结合;

[0151] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有分别包含SEQ ID NO:21,22,23,24,25和26的H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3的抗体结合人MET的相同表位;

[0152] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体竞争对人MET的结合;

[0153] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体竞争对人MET的结合;

[0154] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体结合人MET的相同表位;

[0155] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体结合人MET的相同表位;

[0156] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有分别包含SEQ ID NO:27,28,29,30,31和32的H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3的抗体竞争对人MET的结合;

[0157] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有分别包含SEQ ID NO:27,28,29,30,31和32的H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3的抗体结合人MET的相同表位;

[0158] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体竞争对人MET的结合;

[0159] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体竞争对人MET的结合;

[0160] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链

可变结构域和包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体结合人MET的相同表位；

[0161] -抗MET抗体或其抗原结合部分，其与具有包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体结合人MET的相同表位；

[0162] -抗MET抗体或其抗原结合部分，其与具有包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的轻链的抗体竞争对人MET的结合；

[0163] -抗MET抗体或其抗原结合部分，其与具有包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的轻链的抗体竞争对人MET的结合；

[0164] -抗MET抗体或其抗原结合部分，其与具有包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的轻链的抗体结合人MET的相同表位；

[0165] -抗MET抗体或其抗原结合部分，其与具有包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的轻链的抗体结合人MET的相同表位。

[0166] 在一个实施方案中，本发明提供抗MET抗体或其抗原结合部分，其具有包含SEQ ID NO:23或29的氨基酸序列的H-CDR3。在一个实施方案中，本发明提供抗MET抗体或其抗原结合部分，其具有包含SEQ ID NO:26或32的氨基酸序列的L-CDR3。在一个实施方案中，本发明提供抗MET抗体或其抗原结合部分，其具有包含SEQ ID NO:23或29的氨基酸序列的H-CDR3和包含SEQ ID NO:26或32的氨基酸序列的L-CDR3。在某些实施方案中，抗MET抗体或其抗原结合部分包含：

[0167] -SEQ ID NO:23的H-CDR3序列和SEQ ID NO:26的L-CDR3序列；或

[0168] -SEQ ID NO:29的H-CDR3序列和SEQ ID NO:32的L-CDR3序列。

[0169] 在一个实施方案中，抗MET抗体或其抗原结合片段包含：

[0170] -分别包含SEQ ID NO:21,22和23的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3；或

[0171] -分别包含SEQ ID NO:27,28和29的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3。

[0172] 在一个实施方案中，抗MET抗体或其抗原结合部分包含：

[0173] -分别包含SEQ ID NO:24,25和26的氨基酸序列的L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3；或

[0174] -分别包含SEQ ID NO:30,31和32的氨基酸序列的L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3。

[0175] 在一个实施方案中，抗MET抗体或其抗原结合部分包含：

[0176] -分别包含SEQ ID NO:21,22和23的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3，和分别包含SEQ ID NO:24,25和26的氨基酸序列的L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3；或

[0177] 分别包含SEQ ID NO:27,28和29的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3，和分别包含SEQ ID NO:30,31和32的氨基酸序列的L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3。

[0178] 在一个实施方案中，抗MET抗体或其抗原结合部分具有包含SEQ ID NO:6,10,14或18的氨基酸序列的重链可变结构域。在一个实施方案中，抗MET抗体或其抗原结合部分具有包含SEQ ID NO:8,12,16或20的氨基酸序列的轻链可变结构域。在一个实施方案中，抗MET抗体或其抗原结合部分具有包含SEQ ID NO:6,10,14或18的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:8,12,16或20的氨基酸序列的轻链可变结构域。在某些实施方案中，抗MET抗体或其抗原结合部分包含：

[0179] -包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:8的氨基酸

序列的轻链可变结构域;

[0180] -包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0181] -包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变结构域;或

[0182] 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变结构域。

[0183] 在某些实施方案中,抗MET抗体或其抗原结合部分包含重链,其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,和轻链,其包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列。

[0184] 在某些实施方案中,抗MET抗体或其抗原结合部分包含重链,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,和轻链,其包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

[0185] 在另一方面,本发明提供如上文所述的抗体或其部分的变体,其中所述变体与该抗体或其部分相差1,2,3,4,5,6,7,8,9或10个氨基酸取代。

[0186] 在一个实施方案中,本发明提供抗MET抗体,其包含与SEQ ID NO:6,10,14或18的氨基酸序列至少90%相同的重链可变结构域,或所述抗体的抗原结合部分。在某些实施方案中,重链可变结构域与SEQ ID NO:6,10,14或18的氨基酸序列至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同。在一个实施方案中,本发明提供抗MET抗体,其包含与SEQ ID NO:8,12,16或20的氨基酸序列至少90%相同的轻链可变结构域,或所述抗体的抗原结合部分。在某些实施方案中,轻链可变结构域与SEQ ID NO:8,12,16或20的氨基酸序列至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同。抗MET抗体也可以包含上述重链和轻链可变结构域的任意组合。

[0187] 在一个实施方案中,本发明提供抗MET抗体,其包含与SEQ ID NO:34或36的氨基酸序列至少90%相同的重链,或所述抗体的抗原结合部分。在某些实施方案中,重链与SEQ ID NO:34或36的氨基酸序列至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同。在一个实施方案中,本发明提供抗MET抗体,其包含与SEQ ID NO:33或35的氨基酸序列至少90%相同的轻链,或所述抗体的抗原结合部分。在某些实施方案中,轻链与SEQ ID NO:33或35的氨基酸序列至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同。抗MET抗体也可以包含上述重链和轻链可变结构域的任意组合。

[0188] 通常使用序列分析软件测量多肽的序列相似性,其也称为序列同一性。蛋白分析软件使用分配给各种取代,缺失和其它修饰,包括保守氨基酸取代的相似性来匹配相似序列。例如,GCG含有例如“Gap”和“Bestfit”的程序,其可以与默认参数一起使用以确定紧密相关多肽之间的序列同源性或序列同一性,例如来自不同物种的生物体的同源多肽或野生型蛋白和其突变体。参见例如GCG Version 6.1。也可以使用FASTA,采用默认或推荐参数比较多肽序列;GCG Version 6.1中的程序。FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供查询和搜索序列之间最佳重叠区域的比对和百分比序列同一性(Pearson,Methods Enzymol.183:63-98(1990);Pearson,Methods Mol.Biol.132:185-219(2000))。当本发明的序列与含有来自不同有机体的大量序列的数据库进行比较时的另一种优选算法是计算机程序BLAST,特别是blastp或tblastn,其使用默认参数。参见例如Altschul et al.,J.Mol.Biol.215:403-410(1990);Altschul et al.,Nucleic Acids Res.25:3389-402(1997);通过引用并入本文。

[0189] 比较同源性的多肽序列的长度一般为至少约16个氨基酸残基,通常至少约20个残基,更通常至少约24个残基,典型的至少约28个残基,优选大于约35个残基。

[0190] 根据本发明,可以进行的一种类型的氨基酸取代是将抗体中的一个或多个半胱氨酸(其可以是化学反应性的)改变为另一种残基,例如但不限于丙氨酸或丝氨酸。在另一个实施方案中,存在非典型半胱氨酸(non-canonical)的取代。可以在可变结构域的CDR或框架区域中或抗体的恒定结构域中进行取代。在一些实施方案中,该半胱氨酸是典型的(canonical)。

[0191] 可以进行的另一种类型的氨基酸取代是去除抗体中的潜在的蛋白水解位点。此类位点可以发生于可变结构域的CDR或框架区中或者抗体的恒定结构与中。半胱氨酸残基的取代和蛋白水解位点的去除可以降低抗体产物的异质性的风险并从而增加其同质性。

[0192] 另一种类型的氨基酸取代是通过改变一个或两个残基来消除形成潜在脱酰胺基位点的天冬酰胺-甘氨酸对。

[0193] 可以在根据本发明的变体之一中进行的另一种类型的氨基酸取代是保守的氨基酸取代。保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被另一种具有类似化学性质(例如电荷或疏水性)的侧链R基团)的另一种氨基酸残基取代。一般来说,保守氨基酸取代将不会实质上蛋白的功能特性。在其中两个或多个氨基酸序列通过保守取代彼此不同的情况下,可以向上调整序列百分比同一性或相似程度,以校正取代的保守性质。用于该调整的方式是本领域技术人员所熟知的。参见例如Pearson,Methods Mol.Biol.243:307-31(1994)。

[0194] 具有相似化学性质的侧链的氨基酸组的实例包括1)脂肪族侧链:甘氨酸,丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸;2)脂肪族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3)含酰胺侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;4)芳族侧链:苯丙氨酸,酪氨酸和色氨酸;5)碱性侧链:赖氨酸,精氨酸和组氨酸;6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸;和7)含硫侧链:半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代组是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸,苯丙氨酸-酪氨酸,赖氨酸-精氨酸,丙氨酸-缬氨酸,谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0195] 或者,保守替换可以定义为在Gonnet et al.,Science256:1443-45(1992)中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化。“中等保守”替代是在PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0196] 在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合部分的氨基酸取代为:(1)降低对蛋白水解的易感性,(2)降低对氧化的易感性,(3)改变形成蛋白复合物的结合亲和力,和(4)赋予或修饰此类类似物其它物理化学或功能特性,但仍保留对人MET的特异性结合。类似物可以包括对通常发生的肽序列的各种取代。例如,可以在通常发生的序列中进行单个或多个氨基酸取代,优选保守氨基酸取代,例如在形成分子间接触的结构域之外的肽的部分中。也可以在形成分子间接触的结构域中进行氨基酸取代,其可以改善该多肽的活性。保守氨基酸取代应当不实质性改变亲本序列的结构特征;例如替换氨基酸应当不改变构成亲本序列中发生的免疫球蛋白结合结构域的反向平行 $\beta$ -折叠,或破坏表征亲本序列的其它类型的二级结构。一般来说,甘氨酸和脯氨酸将不会用于反向平行 $\beta$ -折叠中。本领域公认的多肽二级和三级结构的例子描述于Proteins,Structures and Molecular Principles (Creighton,Ed.,W.H.Freeman and Company,New York(1984));Introduction to Protein Structure(C.Branden and J.Toose,eds.,Garland Publishing,New York,N.Y.

(1991));和Thornton et al.,Nature354:105(1991)。

[0197] 在本发明的另一方面,可以使用例如PCT公开WO 98/52976和WO 00/34317中描述的技术将抗体去免疫(deimmunized)以降低其免疫原性。

[0198] 在一些实施方案中,本文所述的任何抗MET抗体或抗原结合部分还可以具有至少一种选自下组的功能特性:

[0199] -不结合小鼠或鸡MET;

[0200] -结合人MET的表位,所述表位包含存在于SEMA域上的残基;

[0201] -诱导MET的降解;

[0202] -以 $1 \times 10^{-9}$ M或更小的 $K_D$ 结合人MET;

[0203] -抑制至少一种选自SNU5、EBC1、MKN45、KatoII、OE33和Okajima的细胞系的体外生长;和

[0204] -抑制体内肿瘤生长;

[0205] 或所述功能特性的任意组合。在一些实施方案中,本发明的一种或多种抗体或抗原结合部分(特别是本发明的抗MET抗体组合物)对MET的结合可以抑制表达该受体的细胞(即肿瘤细胞)的生长和增殖。

[0206] 在一些实施方案中,本文所述的任何抗MET抗体或抗原结合部分可以抑制HGF alpha或HGF beta对MET的结合。在一些实施方案中,该抗体或部分可以抑制未加工的HGF对MET的结合。

[0207] 如本文所使用的,术语“抑制生长”(例如指代细胞)旨在包括当与抗MET抗体或抗原结合部分或抗MET抗体组合物接触时,与不存在抗体或组合物的相同细胞相比,细胞的增殖(细胞数量的增加)或代谢的任何可测量降低,例如抑制细胞培养物的生长至少约10%,且优选更多,例如至少约20%或30%,更优选的至少约40%或50%,例如至少约60%,70%,80%,90%,95%或99%,或甚至约100%。可以在相关癌细胞系中确定生长抑制,例如如下实施例中所述。

[0208] 通过本文描述的方法获得的抗MET抗体的类型可以转换为另一种类型。在本发明的一个方面,使用本领域公知的方法分离编码VL或VH的核酸分子,使得其不包括编码CL或CH的核酸序列。然后将编码VL或VH的核酸分子分别与来自不同类型的免疫球蛋白分子的编码CL或CH的核酸序列连接。这可以使用如上所述的包含CL或CH链的载体或核酸分子来实现。例如,最初是IgM的抗MET抗体可以转换成IgG。此外,可以使用类别转换将一种IgG亚类转化为另一种,例如从IgG1转化为IgG2。制备具有所需同种型的本发明抗体的优选方法包括分离编码抗MET抗体重链的核酸分子和编码抗MET抗体轻链的核酸分子的步骤,获得重链的可变结构域,将重链的可变结构域与所需同种型的重链的恒定结构域连接,在细胞中表达轻链和连接的重链,和收集具有所需的同种型的抗MET抗体。

[0209] 本发明的抗MET抗体可以是IgG,IgM,IgE,IgA或IgD分子。在一个实施方案中,抗MET抗体是IgG分子,并且是IgG1,IgG2,IgG3或IgG4亚类。在某些实施方案中,抗体是IgG1亚类。

[0210] 在某些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合部分可以是更大的免疫粘附分子的一部分,所述分子由抗体或抗体部分与一种或多种其它蛋白或肽的共价或非共价缔合形成。此类免疫粘附分子的例子包括使用链霉亲和素核心区域来制备四聚体scFv分子

(Kipriyanov et al., Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101 (1995)) 和使用半胱氨酸残基, 标记肽和C末端多组氨酸标签以制备二价和生物素化的scFv分子 (Kipriyanov et al., Mol. Immunol. 31:1047-1058 (1994))。其他例子包括其中来自抗体的一个或多个CDR共价或非共价整合到分子中, 以使其成为特异性结合感兴趣的抗原的免疫粘附分子。在此类实施方案中, CDR可以作为较大多肽链的一部分整合, 可以共价连接到另一多肽链, 或可以非共价整合。

[0211] 在另一个实施方案中, 可以制备融合抗体或免疫粘附蛋白, 其包含本发明的抗MET抗体的全部或部分连接到另一多肽。在某些实施方案中, 仅抗MET抗体的可变结构域连接到多肽。在某些实施方案中, 抗MET抗体的VH结构域与第一多肽连接, 而抗MET抗体的VL结构域以与第一多肽缔合的第二多肽连接, 使得VH和VL结构域可以相互作用以形成抗原结合位点。在另一个优选的实施方案中, VH结构域通过接头从VL结构域分开, 使得VH和VL结构域可以彼此相互作用 (例如, 单链抗体)。然后将VH-接头-VL抗体与感兴趣的多肽连接。此外, 可以产生融合抗体, 其中两个 (或更多个) 单链抗体彼此连接。如果想要在单个多肽链上产生二价或多价抗体, 或者想要产生双特异性抗体, 这是有用的。

[0212] 为了产生单链抗体 (scFv), 将编码VH-和VL的DNA片段可操作地连接到编码柔性接头的另一个片段, 例如编码氨基酸序列 (Gly4-Ser)3, 使得VH和VL序列可以表达为连续的单链蛋白, 其中VL和VH结构域通过柔性接头连接。参见例如Bird et al., Science 242:423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); 和McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990)。如果仅使用单个VH和VL, 则单链抗体可以是单价的; 如果使用两个VH和VL; 则是二价的; 或者如果使用多于两个VH和VL, 则是多价的。例如, 可以产生特异性结合人MET和另一分子的双特异性或多价抗体。

[0213] 在其它实施方案中, 可以使用编码抗MET抗体的核酸分子制备其它修饰的抗体。例如, 根据本说明书的教导使用标准的分子生物学技术可以制备“kappa bodies” (Ill et al., Protein Eng. 10:949-57 (1997)), “minibodies” (Martin et al., EMBO J. 13:5303-9 (1994)), “双抗体 (diabodies)” (Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)) 或“Janusins” (Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991) and Traunecker et al., Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52 (1992))。

[0214] 本发明的抗MET抗体或抗原结合部分可以衍生化或连接到另一分子 (例如另一种肽或蛋白)。通常, 抗体或其部分衍生化, 使得MET结合不受衍生化或标记的不利影响。因此, 本发明的抗体和抗体部分旨在包括本文所述的人抗MET抗体的完整和修饰形式。例如, 本发明的抗体或抗体部分可以功能性连接 (通过化学偶联, 遗传融合, 非共价缔合或其他方式) 至一个或多个其它分子实体, 例如另一种抗体 (例如, 双特异性抗体或双抗体), 检测试剂, 药物试剂和/或可以接到抗体或抗体部分与另一分子缔合的蛋白或肽 (例如链霉亲和素核心区域或多组氨酸标签)。

[0215] 一种衍生化抗体通过交联两个或更多个抗体 (相同类型或不同类型, 例如产生双特异性抗体) 产生。适合的交联剂包括异双功能的, 其具有由适合的间隔区 (例如m-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯) 分开的两个不同的反应性基团, 或同双功能的 (例如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)。此类接头可以从Pierce Chemical Company, Rockford, IL获得。

[0216] 抗MET抗体也可以用化学基团例如聚乙二醇(PEG),甲基或乙基,或碳水化合物基团衍生化。这些基团可用于改善抗体的生物学特性,例如增加血清半衰期。

[0217] 也可以标记根据本发明的抗体。如本文所用,术语“标记”或“标记的”是指在抗体中整合另一种分子。在一个实施方案中,该标记是可检测标志物,例如,放射标记的氨基酸整合或可以被标记的亲合素(例如含有荧光标志物的链霉亲和素或者可以通过光学或比色法检测的酶活性)检测的生物素基部分衔接至多肽。在另一个实施方案中,标记或标志物可以是治疗性的,例如药物缀合物或毒素。标记多肽和糖蛋白的各种方法是本领域已知的并且可以使用。多肽标记的例子包括但不限于以下:放射性同位素或放射性核素(例如<sup>3</sup>H,<sup>14</sup>C,<sup>15</sup>N,<sup>35</sup>S,<sup>90</sup>Y,<sup>99</sup>Tc,<sup>111</sup>In,<sup>125</sup>I,<sup>131</sup>I),荧光标记(例如FITC,罗丹明(rhodamine),镧系荧光体),酶标记(例如辣根过氧化物酶, $\beta$ -半乳糖苷酶,荧光素酶,碱性磷酸酶),化学发光标志物,生物素基团,由第二报告子识别的预先确定的多肽表位(例如亮氨酸拉链对序列,二抗结合位点,金属结合结构域,表位标签),磁性试剂如钆螯合物,毒素如百日咳毒素,紫杉醇,细胞松弛素B,短杆菌肽D,溴化乙锭,吐根碱(emetine),丝裂霉素,依托泊苷(etoposide),替尼泊苷(tenoposide),长春新碱,长春碱,秋水仙素,阿霉素,柔红霉素,二羟基蒽酮二酮,米托蒽醌,光神霉素(mithramycin),放线菌素D,1-脱氢睾酮,糖皮质激素,普鲁卡因,丁卡因,利多卡因,普萘洛尔和嘌呤霉素及其类似物或同系物。在一些实施例中,通过各种长度的间隔臂衔接标签以减少潜在的空间位阻。

[0218] 在某些实施方案中,本发明的抗体可以以中性形式(包括两性离子形式)或作为带正电或带负电的种类存在。在一些实施方案中,抗体可以与平衡离子络合以形成药学上可接受的盐。

[0219] 术语“药学上可接受的盐”是指包含一种或多种抗体和一种或多种平衡离子的复合物,其中抗衡离子衍生自药学上可接受的无机和有机酸和碱。

[0220] 药学上可接受的无机碱包括金属离子,包括但不限于适合的碱金属盐,碱土金属盐和其它生理上可接受的金属离子。衍生自无机碱的盐包括铝,铵,钙,钴,镍,钼,钒,锰,铬,硒,锡,铜,铁,亚铁,锂,镁,锰或锰盐,钾,铷,钠和锌,例如以其通常的效价。

[0221] 本发明抗体的药学上可接受的酸加成盐可以由以下酸制备,包括但不限于甲酸,乙酸,乙酰氨基苯甲酸,己二酸,抗坏血酸,硼酸,丙酸,苯甲酸,樟脑酸,碳酸,环拉酸,脱氢胆碱,丙二酸,依地酸(edetic),乙基硫酸,芬地柞酸(fendizoic),偏磷酸,琥珀酸,乙醇酸,葡萄糖酸,乳酸,苹果酸,酒石酸,丹宁酸(tannic),柠檬酸,硝酸,抗坏血酸,葡萄糖醛酸,马来酸,叶酸,富马酸,丙酸,丙酮酸,天冬氨酸,谷氨酸,苯甲酸,苯甲酸,盐酸,氢溴酸,氢碘酸,赖氨酸,异柠檬酸,三氟乙酸,双羟萘酸,丙酸,邻氨基苯甲酸,甲磺酸(mesylic),乳清酸,草酸,草乙酸,油酸,硬脂酸,水杨酸,氨基水杨酸,硅酸盐,对羟基苯甲酸,烟酸,苯乙酸,扁桃酸,乌木酸(embonic),磺酸,甲基磺酸,磷酸,膦酸,乙磺酸,乙二磺酸,铵,苯磺酸,泛酸,萘磺酸,甲苯磺酸,2-羟基乙磺酸,磺氨酸,硫酸,硝酸,亚硝酸,硫酸单甲基酯,环己基氨基磺酸, $\beta$ -羟基丁酸,甘氨酸,甘氨酸甘氨酸,谷氨酸,二甲胂酸,二氨基己酸,樟脑磺酸,葡萄糖酸,硫氰酸,酮戊二酸,吡哆醛5-磷酸,氯苯氧乙酸,十一烷酸,N-乙酰基-L-天冬氨酸,半乳糖酸和半乳糖醛酸。

[0222] 药学上可接受的有机碱包括三甲胺,二乙胺,N,N'-二苄基乙二胺,氯普鲁卡因,胆碱,二苄胺,二乙醇胺,乙二胺,葡甲胺(N-甲基葡糖胺),普鲁卡因,环胺,季铵阳离子,精氨



酸,甜菜碱,咖啡因,克立咪唑,2-乙基氨基乙醇,2-二乙基氨基乙醇,2-二甲基氨基乙醇,乙二胺(ethanediamine),丁胺,乙醇胺,乙二胺(ethylenediamine),N-乙基吗啉,N-乙基哌啶,乙基葡萄糖胺,还原葡萄糖胺,葡萄糖胺,组氨酸,海巴明(hydrabamine),咪唑,异丙胺,甲基葡萄糖胺,吗啉,哌嗪,吡啶,吡哆醇,钼,哌啶,多胺树脂,普鲁卡因,嘌呤,可可碱,三乙胺,三丙胺,三乙醇胺,氨丁三醇,甲胺,牛磺酸,胆酸酯,6-氨基-2-甲基-2-庚醇,2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇,2-氨基-2-甲基-1-丙醇,脂族单羧酸和二羧酸,苯基取代的链烷酸,羟基链烷酸,芳族酸,脂族和芳族磺酸,锶,三甲基甘氨酸,胍,苯基环己胺,2-(N-吗啉代)-乙磺酸,双(2-羟乙基)氨基-三(羟甲基)甲烷,N-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸,1,4-哌嗪二乙磺酸,3-吗啉代-2-羟基丙磺酸,1,3-双[三(羟甲基)甲基氨基]丙烷,4-吗啉丙磺酸,4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸,2-[(2-羟基-1,1-双(羟甲基)乙基)氨基]乙磺酸,N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸,4-(N-吗啉代)丁磺酸,3-(N,N-双[2-羟乙基]氨基)-2-羟基丙磺酸,2-羟基-3-[三(羟甲基)甲基氨基]-1-丙磺酸,4-(2-羟乙基)-哌嗪-1-(2-羟基丙磺酸),哌嗪-1,4-双(2-羟基丙磺酸)二水合物,4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪丙磺酸,N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸,N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(4-丁磺酸),N-[三(羟甲基)甲基]-3-氨基丙磺酸,N-三(羟甲基)甲基-4-氨基丁磺酸,N-(1,1-二甲基-2-羟乙基)-3-氨基-2-羟基丙磺酸,2-(环己基氨基)乙磺酸,3-(环己基氨基)-2-羟基-1-丙磺酸,3-(环己基氨基)-1-丙磺酸,N-(2-乙酰氨基)亚氨基二乙酸,4-(环己基氨基)-1-丁磺酸,N-[三(羟甲基)甲基]甘氨酸,2-氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇,和氨基甲烷醇。

[0223] 抗MET抗体组合物

[0224] 在一个方面,本发明提供抗体组合物,其包含至少两种本发明的抗体或其抗原结合部分。术语“抗MET抗体组合物”是指包含至少两种抗MET抗体或其抗原结合部分的组合物。

[0225] 在一个实施方案中,抗体组合物包含第一抗MET抗体或其抗原结合部分和第二抗MET抗体或其抗原结合部分,其中第一抗MET抗体选自下组:

[0226] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有分别包含SEQ ID NO:21,22,23,24,25和26的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3的抗体竞争对人MET的结合;

[0227] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有分别包含SEQ ID NO:21,22,23,24,25和26的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3的抗体结合人MET的相同表位;

[0228] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体竞争对人MET的结合;

[0229] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体竞争对人MET的结合;

[0230] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体结合人MET的相同表位;

- [0231] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体结合人MET的相同表位;
- [0232] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的H-CDR3;
- [0233] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的L-CDR3;
- [0234] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的H-CDR3和其具有包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的L-CDR3;
- [0235] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有分别包含SEQ ID NO:21,22和23的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3;
- [0236] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有分别包含SEQ ID NO:24,25和26的氨基酸序列的L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3;
- [0237] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有分别包含SEQ ID NO:21,22和23的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3,和分别包含SEQ ID NO:24,25和26的氨基酸序列的L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3;
- [0238] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:6或14的氨基酸序列的重链可变结构域;
- [0239] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:8或16的氨基酸序列的轻链可变结构域;
- [0240] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变结构域;
- [0241] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变结构域;
- [0242] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%相同的轻链可变结构域;
- [0243] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%相同的轻链可变结构域;
- [0244] 抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的轻链;和
- [0245] 抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有与SEQ ID NO:34的氨基酸序列至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%相同的重链和与SEQ ID NO:33的氨基酸序列至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%相同的轻链;
- [0246] 且其中第二抗MET抗体选自下组:
- [0247] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有分别包含SEQ ID NO:27,28,29,30,31和

32的H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3的抗体竞争对人MET的结合;

[0248] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有分别包含SEQ ID NO:27,28,29,30,31和32的H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3的抗体结合人MET的相同表位;

[0249] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体竞争对人MET的结合;

[0250] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体竞争对人MET的结合;

[0251] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体结合人MET的相同表位;

[0252] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体结合人MET的相同表位;

[0253] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的H-CDR3;

[0254] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的L-CDR3;

[0255] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的H-CDR3和其具有包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的L-CDR3;

[0256] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有分别包含SEQ ID NO:27,28和29的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3;

[0257] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有分别包含SEQ ID NO:30,31和32的氨基酸序列的L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3;

[0258] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有分别包含SEQ ID NO:27,28和29的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3,和分别包含SEQ ID NO:30,31和32的氨基酸序列的L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3;

[0259] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:10或18的氨基酸序列的重链可变结构域;

[0260] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:12或20的氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0261] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0262] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0263] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%相同的轻链可

变结构域;

[0264] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%相同的轻链可变结构域;

[0265] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的轻链;和

[0266] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有与SEQ ID NO:36的氨基酸序列至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%相同的重链和与SEQ ID NO:35的氨基酸序列至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%相同的轻链;

[0267] 考虑上述第一和第二抗MET抗体的任意组合。

[0268] 在一个实施方案中,抗体组合物包含:

[0269] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有分别包含SEQ ID NO:21,22,23,24,25和26的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3的抗体竞争对人MET的结合;和

[0270] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有分别包含SEQ ID NO:27,28,29,30,31和32的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3的抗体竞争对人MET的结合。

[0271] 在一个实施方案中,抗体组合物包含:

[0272] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有分别包含SEQ ID NO:21,22,23,24,25和26的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3的抗体结合人MET的相同表位;和

[0273] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有分别包含SEQ ID NO:27,28,29,30,31和32的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2,H-CDR3,L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3的抗体结合人MET的相同表位。

[0274] 在一个实施方案中,抗体组合物包含:

[0275] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体竞争对人MET的结合;和

[0276] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体竞争对人MET的结合。

[0277] 在一个实施方案中,抗体组合物包含:

[0278] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体竞争对人MET的结合;和

[0279] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体竞争对人MET的结合。

[0280] 在一个实施方案中,抗体组合物包含:

[0281] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的轻链的抗体竞争对人MET的结合;和

[0282] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的轻链的抗体竞争对人MET的结合。

[0283] 在一个实施方案中,抗体组合物包含:

[0284] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体结合人MET的相同表位;和

[0285] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体结合人MET的相同表位。

[0286] 在一个实施方案中,抗体组合物包含:

[0287] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体结合人MET的相同表位;和

[0288] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体结合人MET的相同表位。

[0289] 在一个实施方案中,抗体组合物包含:

[0290] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的轻链的抗体结合人MET的相同表位;和

[0291] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其与具有包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的轻链的抗体结合人MET的相同表位。

[0292] 在一个实施方案中,抗体组合物包含:

[0293] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的H-CDR3;和

[0294] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的H-CDR3。

[0295] 在一个实施方案中,抗体组合物包含:

[0296] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的L-CDR3;和

[0297] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的L-CDR3。

[0298] 在一个实施方案中,抗体组合物包含:

[0299] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的H-CDR3和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的L-CDR3;和

[0300] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的H-CDR3和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的L-CDR3。

[0301] 在一个实施方案中,抗体组合物包含:

[0302] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有分别包含SEQ ID NO:21,22和23的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3;和

[0303] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有分别包含SEQ ID NO:27,28和29的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3。

[0304] 在一个实施方案中,抗体组合物包含:

[0305] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有分别包含SEQ ID NO:24,25和26的氨基酸序列的L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3;和

[0306] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有分别包含SEQ ID NO:30,31和32的氨基酸序列的L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3。

[0307] 在一个实施方案中,抗体组合物包含:

[0308] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有分别包含SEQ ID NO:21,22和23的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3和分别包含SEQ ID NO:24,25和26的氨基酸序列的L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3;和

[0309] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有分别包含SEQ ID NO:27,28和29的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3和分别包含SEQ ID NO:30,31和32的氨基酸序列的L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3。

[0310] 在一个实施方案中,抗体组合物包含:

[0311] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变结构域;和

[0312] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链可变结构域。

[0313] 在一个实施方案中,抗体组合物包含:

[0314] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变结构域;和

[0315] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变结构域。

[0316] 在一个实施方案中,抗体组合物包含:

[0317] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的轻链;和

[0318] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的轻链。

[0319] 在一个实施方案中,抗体组合物包含:

[0320] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%相同的轻链可变结构域;和

[0321] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:12

的氨基酸序列至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或99%相同的轻链可变结构域。

[0322] 考虑上述第一和第二抗体的同一性百分比的任意组合。

[0323] -抗MET抗体或其抗原结合部分，其具有与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或99%相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或99%相同的轻链可变结构域；和

[0324] -抗MET抗体或其抗原结合部分，其具有与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或99%相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或99%相同的轻链可变结构域。

[0325] 考虑上述第一和第二抗体的同一性百分比的任意组合。

[0326] -抗MET抗体或其抗原结合部分，其具有与SEQ ID NO:34的氨基酸序列至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或99%相同的重链和与SEQ ID NO:33的氨基酸序列至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或99%相同的轻链；和

[0327] -抗MET抗体或其抗原结合部分，其具有与SEQ ID NO:36的氨基酸序列至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或99%相同的重链和与SEQ ID NO:35的氨基酸序列至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或99%相同的轻链。

[0328] 考虑上述第一和第二抗体的同一性百分比的任意组合。

[0329] 双特异性结合分子

[0330] 在进一步的方面，本文公开的任意两个单独抗体的结合特异性可以组合到一个双特异性结合分子中。例如，双特异性结合分子可以具有抗MET抗体9006和9338的结合特异性。在一些实施方案中，双特异性结合分子具有以下结合特异性：

[0331] -抗MET抗体或其抗原结合部分，其具有分别包含SEQ ID NO:21,22和23的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3和分别包含SEQ ID NO:24,25和26的氨基酸序列的L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3；和

[0332] -抗MET抗体或其抗原结合部分，其具有分别包含SEQ ID NO:27,28和29的氨基酸序列的H-CDR1,H-CDR2和H-CDR3和分别包含SEQ ID NO:30,31和32的氨基酸序列的L-CDR1,L-CDR2和L-CDR3。

[0333] 在一些实施方案中，双特异性结合分子具有以下结合特异性：

[0334] -抗MET抗体或其抗原结合部分，其具有包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变结构域；和

[0335] -抗MET抗体或其抗原结合部分，其具有包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链可变结构域。

[0336] 在一些实施方案中，双特异性结合分子具有以下结合特异性：

[0337] -抗MET抗体或其抗原结合部分，其具有包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变结构域；和

[0338] -抗MET抗体或其抗原结合部分，其具有包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变结构域。

[0339] 在一些实施方案中,双特异性结合分子具有以下结合特异性:

[0340] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的轻链;和

[0341] -抗MET抗体或其抗原结合部分,其具有包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的轻链。

[0342] 双特异性结合分子可以是双可变结构域抗体,即其中抗体的两个臂包含两个不同的可变结构域,或者可以是抗体片段的形式,例如双特异性Fab片段或双特异性scFv。

[0343] 核酸分子和载体

[0344] 本发明还提供了编码本文所述的抗MET抗体或其抗原结合部分的核酸分子和序列。在一些实施方案中,不同的核酸分子编码抗MET抗体或其抗原结合部分的重链和轻链氨基酸序列。在其它实施方案中,相同的核酸分子编码抗MET抗体或其抗原结合部分的重链和轻链氨基酸序列。

[0345] 除非另有说明,否则提及核苷酸序列包括其互补体。因此,提及具有特定序列的核酸应理解为包括具有其互补序列的其互补链。如本文所指的术语“多核苷酸”是指长度为至少10个碱基的核苷酸的聚合形式,核糖核苷酸或脱氧核苷酸或任一类型核苷酸的修饰形式。该术语包括单链和双链形式。

[0346] 本发明还提供与一种或多种上述核苷酸或编码选自SEQ ID NO:6,8,10,12,14,16,18,20和33-36的氨基酸序列的核苷酸序列至少70%,75%,80%,85%,90%,95%,97%,98%或99%相同的核苷酸序列。在核酸序列的上下文中,术语“百分比序列同一性”是指当最大对应性比对时,两个序列中相同的残基。序列同一性比较的长度可以超过至少约九个核苷酸,通常至少约18个核苷酸,更通常至少约24个核苷酸,典型地至少约28个核苷酸,更典型地至少约32个核苷酸,且优选地至少约36个,48个或更多个核苷酸。本领域已知一些可用于测量核苷酸序列同一性的不同算法。例如,可以使用FASTA,Gap或Bestfit来比较多核苷酸序列,这些是Wisconsin Package Version 10.0,Genetics Computer Group (GCG),Madison,Wisconsin中的程序。FASTA,其包括例如程序FASTA2和FASTA3,提供查询和搜索序列之间最佳重叠区域的比对和百分比序列同一性 (Pearson,Methods Enzymol.183:63-98 (1990);Pearson,Methods Mol.Biol.132:185-219 (2000);Pearson,Methods Enzymol.266:227-258 (1996);Pearson,J.Mol.Biol.276:71-84 (1998);通过引用并入本文)。除非另有说明,否则使用特定程序或算法的默认参数。例如,可以使用FASTA及其默认参数(字大小为6,且NOPAM因子用于评分矩阵)或使用GAP及其默认参数(如GCG Version 6.1中提供的,通过引用并入本文)来确定核酸序列之间的序列同一性。

[0347] 一方面,本发明提供包含选自SEQ ID NO:5,7,9,11,13,15,17和19的核苷酸序列的核酸分子。在一些实施方案中,核酸分子可以包含SEQ ID NO:5和7,9和11,13和15,或17和19的核苷酸序列。

[0348] 在任何上述实施方案中,核酸分子可以是分离的。

[0349] 在另一方面,本发明提供了适合于表达本文所述抗体或其抗原结合部分的一条链的载体。本文所用的术语“载体”是指能够转运与其连接的另一核酸的核酸分子。在一些实施方案中,载体是质粒,即可以在其中连接另外的DNA区段的环状双链DNA片段。在一些实施方案中,载体是病毒载体,其中另外的DNA区段可以连接到病毒基因组中。在一些实施方案



中,载体能够在其被引入的宿主细胞中进行自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和和附加型哺乳动物载体。在其它实施方案中,载体(例如,非附加型哺乳动物载体)可以在引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导它们可操作连接的基因的表达。此类的载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。

[0350] 本发明提供了包含编码本发明的抗MET抗体的重链或其抗原结合部分,本发明的抗MET抗体的轻链或抗原结合的核酸分子的载体部分,或本发明的抗MET抗体的重链和轻链或其抗原结合部分的核酸分子的载体。本发明还提供了包含编码融合蛋白,修饰的抗体,抗体片段及其探针的核酸分子的载体。

[0351] 可以从任何来源分离编码抗MET抗体的重链和/或轻链或其部分的核酸分子,其产生此类抗体或部分。在各种实施方案中,从分离自使用人MET免疫的动物分子的表达抗MET抗体的B细胞或从由此类B细胞产生的永生细胞分离核酸分子。分离编码抗体的核酸的方法是本领域公知的。可以分离mRNA并用于产生cDNA,其用于抗体基因的聚合酶链反应(PCR)或cDNA克隆。在某些实施方案中,可以合成而不是分离本发明的核酸分子。

[0352] 在一些实施方案中,本发明的核酸分子可以包含编码来自本发明的抗MET抗体或抗原结合部分的VH结构域的核苷酸序列,其与编码来自其他来源的重链恒定结构域的核苷酸序列符合读码框连接。类似地,本发明的核酸分子可以包含编码来自本发明的抗MET抗体或抗原结合部分的VL结构域的核苷酸序列,其与编码来自其他来源的轻链恒定结构域的核苷酸序列符合读码框连接。

[0353] 在本发明的另一方面,编码重(VH)和/或轻链(VL)链的可变结构域的核酸分子可以“转化”为全长抗体基因。在一个实施方案中,编码VH或VL结构域的核酸分子通过分别插入到已经编码重链恒定(CH)或轻链恒定(CL)结构域的表达载体中而转化为全长抗体基因,使得VH区段可操作地连接到载体中的CH区段,和/或VL区段可操作地连接到载体内的CL区段。在另一个实施方案中,通过使用标准分子生物学技术将编码VH和/或VL结构域的核酸分子与编码CH和/或CL结构域的核酸分子连接(例如,连接(ligating))而将编码VH和/或VL结构域的核酸分子转化为全长抗体基因。然后,可以在将其引入的细胞中表达编码全长重链和/或轻链的核酸分子,并且分离抗MET抗体。

[0354] 核酸分子可用于重组表达大量抗MET抗体。如本文所述,核酸分子还可用于产生嵌合抗体,双特异性抗体,单链抗体,免疫粘附分子,双抗体,突变抗体和抗体衍生物。

[0355] 在另一个实施方案中,本发明的核酸分子用作特定抗体序列的探针或PCR引物。例如,核酸可以用作诊断方法中的探针或作为PCR引物来扩增DNA区域,其特别可以用于分离编码抗MET抗体的可变结构域的另外的核酸分子。在一些实施方案中,核酸分子是寡核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸来自感兴趣的抗体的重链和轻链的高度可变结构域。在一些实施方案中,寡核苷酸编码如本文所述的本发明的抗MET抗体或其抗原结合部分的一个或多个CDR的全部或部分。

[0356] 在另一个实施方案中,核酸分子和载体可用于制备突变的抗MET抗体。抗体可以在重链和/或轻链的可变结构域中突变,例如以改变抗体的结合特性。例如,可以在一个或多个CDR区域中进行突变以增加或减少抗MET抗体的 $K_D$ ,增加或减少 $k_{off}$ ,或改变抗体的结合特异性。在另一个实施方案中,在与本发明的单克隆抗体中的种系相比已知改变的氨基酸残

基处进行一个或多个突变。可以在可变结构域的CDR区或框架区中,或在恒定结构域中进行突变。在优选的实施方案中,在0可变结构域中进行突变。在一些实施方案中,在与本发明的抗体或其抗原结合部分的可变结构域的CDR区或框架区中的种系相比已知改变的氨基酸残基处进行一个或多个突变。

[0357] 在另一个实施方案中,突变框架区,使得所得框架区具有相应种系基因的氨基酸序列。可以在框架区域或恒定结构域中进行突变以增加抗MET抗体的半衰期。参见例如PCT公开WO 00/09560。也可以在框架区域或恒定结构域中进行突变以改变抗体的免疫原性,和/或提供与另一分子共价或非共价结合的位点。根据本发明,单个抗体可以在可变结构域的CDR或框架区的任何一个或多个中或在恒定结构域中具有突变。

[0358] 在一些实施方案中,通过将编码部分或全长的轻链和重链的DNA(如上所述获得)插入表达载体中,使得基因可操作地连接到必需的表达控制序列,如转录和翻译控制序列,来表达本发明的抗MET抗体或其抗原结合部分。表达载体包括质粒,逆转录病毒,腺病毒,腺相关病毒(AAV),植物病毒如花椰菜花叶病毒,烟草花叶病毒,粘粒,YAC,EBV衍生的附加体等。抗体基因可以连接到载体中,使得载体内的转录和翻译控制序列用于其调控抗体基因的转录和翻译的预期功能。可以选择与所用的表达宿主细胞相容的表达载体和表达调控序列。抗体轻链基因和抗体重链基因可以插入到单独的载体中。在一个实施方案中,两种插入相同的表达载体中。可以通过标准方法将抗体基因插入表达载体中(例如,连接抗体基因片段和载体上的互补限制性位点,或者如果不存在限制性位点,则平端连接)。

[0359] 方便的载体是编码功能完整的人CH或CL免疫球蛋白序列的载体,其中设计适合的限制性位点使得任何VH或VL序列可以容易地插入和表达,如上文所述。在此类载体中,通常在插入的J区中的剪接供体位点和人C结构域之前的剪接受体位点之间发生剪接,也在人CH外显子中发生的剪接区域处发生剪接。聚腺苷酸化和转录终止可以发生在编码区下游的天然染色体位点处。重组表达载体还可以编码促进抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。抗体链基因可以克隆到载体中,使得信号肽与免疫球蛋白链的氨基末端符合读码框连接。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即来自非免疫球蛋白蛋白质的信号肽)。

[0360] 除了抗体链基因之外,本发明的重组表达载体可以携带控制宿主细胞中抗体链基因表达的调控序列。本领域技术人员将理解,表达载体的设计包括调控序列的选择可以取决于诸如待转化的宿主细胞的选择,所需蛋白质的表达水平等因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调控序列包括在哺乳动物细胞中指导高水平蛋白表达的病毒元件,例如衍生自逆转录病毒LTR,巨细胞病毒(CMV)(如CMV启动子/增强子),Simian病毒40(SV40)(例如SV40启动子/增强子),腺病毒(例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP)),多瘤病毒的启动子和/或增强子,和强哺乳动物启动子例如天然免疫球蛋白和肌动蛋白启动子。关于病毒调控元件及其序列的进一步描述,参见例如美国专利5,168,062,4,510,245和4,968,615。在植物中表达抗体的方法,包括启动子和载体的描述,以及植物的转化,是本领域已知的。参见例如美国专利6,517,529。在细菌细胞或真菌细胞,例如酵母细胞中表达多肽的方法也是本领域熟知的。

[0361] 除了抗体链基因和调控序列之外,本发明的重组表达载体可以携带另外的序列,例如调节载体在宿主细胞中的复制的序列(例如复制起点)和可选择标志物基因。可选择标志物基因有助于选择已经引入载体的宿主细胞的选择(参见例如美国专利4,399,216,4,

634,665和5,179,017)。例如,通常可选择标志物基因赋予载体已导入其中的宿主细胞对药物(例如G418,潮霉素或甲氨蝶呤)的抗性。例如,可选择标志物基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于具有甲氨蝶呤选择/扩增的dhfr-宿主细胞),neo基因(用于G418选择)和谷氨酸合成酶基因。

[0362] 本文所用的术语“表达控制序列”是指实现其连接的编码序列的表达和加工所必需的多核苷酸序列。表达控制序列包括适合转录起始,终止,启动子和增强子序列;高效的RNA处理信号,例如剪接和聚腺苷酸化信号;稳定细胞质mRNA的序列;提高翻译效率的序列(即Kozak共有序列);增强蛋白质稳定性的序列;和当需要时,增强蛋白质分泌的序列。此类控制序列的性质根据宿主生物体而不同;在原核生物中,此类控制序列通常包括启动子,核糖体结合位点和转录终止序列;在真核生物中,通常此类控制序列包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”旨在至少包括其存在对于表达和处理是必需的所有组分,并且还可以包括其存在是有利的其它组分,例如前导序列和融合伴侣序列。

[0363] 产生本发明的抗体和抗体组合物的杂交瘤方法

[0364] 在某些实施方案中,本发明提供用于产生针对MET的人单克隆抗体或其抗原结合部分的细胞系的方法,所述方法包括(a)用MET,MET的一部分,或表达MET的细胞或组织免疫非人转基因动物;(b)允许转基因动物进行对MET的免疫应答;(c)从转基因动物分离产生抗体的细胞;(d)使产生抗体的细胞永生化;(e)创建永生化的产生抗体的细胞的个体单克隆群体;和(f)筛选永生化的产生抗体的细胞以鉴定针对MET的抗体。

[0365] 另一方面,本发明提供了产生人抗MET抗体的细胞系。在一些实施方案中,细胞系是杂交瘤细胞系。在一些实施方案中,如上所述杂交瘤是小鼠杂交瘤。在其它实施方案中,杂交瘤在非人非小鼠物种如大鼠,绵羊,猪,山羊,牛或马中产生。在另一个实施方案中,杂交瘤是人杂交瘤。

[0366] 在另一个实施方案中,使用MET抗原免疫转基因动物,从免疫的转基因动物分离原代细胞,例如脾或外周血B细胞,并鉴定产生对期望的抗原特异性的抗体的个体细胞。从每个个体细胞分离多聚腺苷酸化mRNA,并使用与可变结构域序列退火的正义引物进行逆转录聚合酶链反应(RT-PCR),例如识别大多数或全部人重链和轻链可变结构域FR1区的简并引物,和与恒定或连接区序列退火的反义引物。

[0367] 然后将重链和轻链可变结构域的cDNA在任何合适的宿主细胞例如骨髓瘤细胞中克隆和表达,作为具有相应免疫球蛋白恒定区(例如重链和 $\kappa$ 或 $\lambda$ 恒定结构域)的嵌合抗体。参见Babcook et al.,Proc Natl Acad Sci USA93:7843-48(1996)。然后可以如本文所述鉴定并且分离抗MET抗体。

[0368] 噬菌体展示文库

[0369] 本发明提供产生抗MET抗体或其抗原结合部分的方法,其包括以下步骤:在噬菌体上合成抗体文库,用MET或其抗体结合部分筛选文库,分离与MET结合的噬菌体,并从噬菌体获得抗体。举例来说,一种制备抗体文库用于噬菌体展示技术的方法包括以下步骤:用MET或其抗原部分免疫非人动物以产生免疫应答,从免疫的动物提取产生抗体的动物;从提取的细胞分离编码本发明的抗体的重链和轻链的RNA,逆转录RNA以产生cDNA,使用引物扩增cDNA,并将cDNA插入到噬菌体展示载体中,使得抗体在噬菌体上表达。可以以这种方式获得本发明的重组抗MET抗体。

[0370] 可以通过筛选重组组合抗体文库来分离本发明的重组人抗MET抗体。优选地,该文库是使用从分离自B细胞的mRNA制备的人VL和VH cDNA生成的scFv噬菌体展示文库。用于制备和筛选此类文库的方法是本领域已知的。用于产生噬菌体展示文库的试剂盒是可商购的(例如,Pharmacia Recombinant Phage Antibody System,catalog no.27-9400-01;和Stratagene SurfZAP™ phage display kit,catalog no.240612)。还可以使用其他方法和试剂来产生和筛选抗体展示文库(参见例如美国专利5,223,409;PCT公开W0 92/18619,W0 91/17271,W0 92/20791,W0 92/15679,W0 93/01288,W0 92/01047和W0 92/09690;Fuchs et al.,Bio/Technology9:1370-1372(1991);Hay et al.,Hum Antibod Hybridomas3:81-85(1992);Huse et al.,Science246:1275-1281(1989);McCafferty et al.,Nature348:552-554(1990);Griffiths et al.,EMBO J 12:725-734(1993);Hawkins et al.,J Mol Biol 226:889-896(1992);Clackson et al.,Nature352:624-628(1991);Gram et al.,Proc Natl Acad Sci USA89:3576-3580(1992);Garrod et al.,Bio/Technology9:1373-1377(1991);Hoogenboom et al.,Nuc Acid Res 19:4133-4137(1991);和Barbas et al.,Proc Natl Acad Sci USA88:7978-7982(1991),其全部通过引用并入本文。

[0371] 在一个实施方案中,为了分离和产生具有所需特征的人抗MET抗体,首先使用如本文所述的人抗MET抗体选择具有相似的对MET结合活性的人重链和轻链序列,使用PCT公开W0 93/06213中描述的表位印记方法,其通过引用并入本文。在该方法中使用的抗体文库优选如PCT公开W0 92/01047,McCafferty et al.,Nature348:552-554(1990);和Griffiths et al.,EMBO J12:725-734(1993)中所述制备和筛选的scFv文库,其全部通过引用并入本文。优选使用人MET作为抗原筛选scFv抗体文库

[0372] 一旦选择了初始人VL和VH结构域,可以进行“混合和匹配”实验,其中筛选不同对的初始选择的VL和VH片段的MET结合以选择优选的VL/VH对组合。另外,为了进一步改善抗体的质量,优选的VL/VH对的VL和VH区段可以随机地突变,优选在VH和/或VL的CDR3区域内,类似于体内体细胞突变过程,其在天然免疫应答过程中负责抗体的亲和力成熟。这种体外亲和力成熟可以通过使用分别与VH CDR3或VL CDR3互补的PCR引物扩增VH和VL结构域来实现,该引物已经被特定位置处的四个核苷酸碱基的随机混合物“加标(spiked)”,使得产生的PCR产物编码其中VH和/或VL CDR3区域中已经引入随机突变的VH和VL区段。可以再筛选这些随机突变的VH和VL片段对MET的结合。

[0373] 从重组免疫球蛋白显示文库筛选并且分离本发明的抗MET抗体后,可以从噬菌体包装(例如,从噬菌体基因组)中回收编码所选抗体的核酸,并通过标准重组DNA技术将其亚克隆到其他表达载体中。如果需要,可以进一步操纵核酸以产生如本文所述的本发明的其它抗体形式。为了表达通过筛选组合文库分离的重组人抗体,将编码抗体的DNA克隆到重组表达载体中,并引入哺乳动物宿主细胞中,如本文所述。

[0374] 抗体和抗体组合物产生的非杂交瘤宿主细胞和方法

[0375] 本发明的另外一个方面涉及用于产生本发明的抗体组合物和抗体及其抗原结合部分的方法。本发明这一方面的一个实施方案涉及产生如本文所定义的抗体的方法,包括提供能够表达抗体的重组宿主细胞,在适合于抗体表达的条件下培养所述宿主细胞,并且分离所得抗体。在此类重组宿主细胞中通过此种表达产生的抗体在本文中称为“重组抗体”。本发明还提供了此类宿主细胞的后代细胞和由其产生的抗体。

[0376] 本文所用的术语“重组宿主细胞”(或简称“宿主细胞”)是指其中已经引入重组表达载体的细胞。本发明提供宿主细胞,其可以包含例如如上文所述根据本发明的载体。本发明还提供宿主细胞,其包含例如编码本发明的抗MET抗体或其抗原结合部分的重链或其抗原结合部分的核苷酸序列,编码轻链或其抗原结合部分的核苷酸序列,或两者。应当理解,“重组宿主细胞”和“宿主细胞”不仅意味着特定的对象细胞,而且也意味着此类细胞的后代。因为由于突变或环境影响,后代中可能发生某些修饰,实际上此类后代实际上可能不与母细胞相同,但是仍然包括在如本文所使用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0377] 编码抗MET抗体的核酸分子和包含这些核酸分子的载体可用于转染适合的哺乳动物,植物,细菌或酵母宿主细胞。可以通过用于将多核苷酸引入宿主细胞中的任何已知方法进行转化。用于将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞的方法是本领域熟知的,凝包括葡聚糖介导的转染,磷酸钙沉淀,聚凝胺介导的转染,原生质体融合,电穿孔,多核苷酸在脂质体中的包封以及DNA的直接显微注射到细胞核中。另外,可以通过病毒载体将核酸分子引入哺乳动物细胞。用于转化细胞的方法是本领域公知的。参见例如美国专利4,399,216,4,912,040,4,740,461和4,959,455。转化植物细胞的方法是本领域公知的,包括例如农杆菌介导的转化,基因枪转化(biolistic transformation),直接注射,电穿孔和病毒转化。转化细菌和酵母细胞的方法也是本领域熟知的。

[0378] 可以作为表达宿主的哺乳动物细胞系是本领域熟知的,并且包括可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的许多永生化细胞系。这些包括尤其是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,NS0细胞,SP2细胞,HEK-293T细胞,293Freestyle细胞(Invitrogen),NIH-3T3细胞,HeLa细胞,幼仓鼠肾(BHK)细胞,非洲绿猴肾细胞(COS),人肝细胞癌细胞(例如Hep G2),A549细胞和一些其他细胞系。通过确定哪些细胞系具有高表达水平来选择特别优选的细胞系。可以使用的其它细胞系是昆虫细胞系,例如Sf9或Sf21细胞。当将编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞时,通过将宿主细胞培养足以允许抗体在宿主细胞中表达的时间段来产生抗体,或者更优选将抗体分泌至其中宿主细胞生长的培养基中。可以使用标准的蛋白纯化方法从培养基中回收抗体。植物宿主细胞包括例如烟草,拟南芥,浮萍,玉米,小麦,马铃薯等。细菌宿主细胞包括大肠杆菌和链霉菌属物种。酵母宿主细胞包括粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*),酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。

[0379] 此外,可以使用一些已知的技术来增强本发明的抗体或其抗原结合部分从生产细胞系的表达。例如,谷氨酰胺合成酶基因表达系统(GS系统)是在某些条件下增强表达的常用方法。GS系统全部或部分与EP专利0 216 846,0 256 055,0 323 997和0 338 841相关讨论。

[0380] 由不同细胞系或转基因动物表达的抗体可能具有彼此不同的糖基化模式。然而,由本文提供的核酸分子编码的或包含本文提供的氨基酸序列的所有抗体都是本发明的一部分,不论该抗体的糖基化状态,且更一般性地,不论翻译后修饰存在或不存在。

[0381] 在进一步的实施方案中,本发明涉及用于产生包含至少两种抗MET抗体的抗体组合物的方法,所述方法包括:

[0382] -提供至少第一和第二宿主细胞,其中所述第一宿主细胞能够表达本发明的第一抗MET抗体,并且所述第二宿主细胞能够表达本发明的第二抗MET抗体;

[0383] -在适合抗MET抗体的表达的条件下培养第一和第二宿主细胞;和

[0384] -分离得到的抗体。

[0385] 可以通过本领域通常已知的用于产生重组单克隆或多克隆抗体的方法制备本发明的抗体或其抗原结合部分或抗体组合物。因此,在产生本发明的单一抗体的情况下,可以使用本领域已知的用于产生重组单克隆抗体的任何方法。为了产生包含抗体混合物的本发明的抗体组合物,可以分别产生个体抗体,即每种抗体在单独的生物反应器中产生,或者可以在单个生物反应器中一起生产个体抗体。如果抗体组合物在多于一个生物反应器中产生,则可以通过将从每个生物反应器的单独纯化的上清液获得的抗体合并来获得纯化的抗体组合物。用于在多个生物反应器中产生多克隆抗体组合物的各种方法,其中细胞系或抗体制备物在稍后的上游或在下游处理之前或期间组合,描述于W0 2009/129814(通过引用并入本文)中。

[0386] 在单个生物反应器中产生个体抗体的情况下,可以例如如W0 2004/06104104或W0 2008/145133(两者都通过引用并入本文)中所述进行。W0 2004/061104中描述的方法是基于抗体编码序列位点特异性整合到个体宿主细胞的基因组中,而W0 2008/145133的方法涉及使用随机整合以在单个生物反应器中产生抗体的替代方法。

[0387] 关于适合制备本发明的抗体和组合物的方法的进一步信息可以在W0 2012/059857(通过引用并入本文)中找到。

[0388] 转基因动物和植物

[0389] 也可以通过生成针对感兴趣的免疫球蛋白重链和轻链序列的转基因哺乳动物或植物和以可回收形式从其产生抗体来转基因产生本发明的抗MET抗体及其抗原结合部分。关于哺乳动物中的转基因产生,可以在山羊,奶牛或其它哺乳动物的乳中产生并从其回收抗MET抗体和部分。参见例如美国专利5,827,690,5,756,687,5,750,172和5,741,957。在一些实施方案中,如上文所述,使用人MET或其免疫原性部分免疫包含人免疫球蛋白基因座的非人转基因动物。用于在植物中制备抗体的方法描述于例如美国专利6,046,037和5,959,177中。

[0390] 在一些实施方案中,通过标准转基因技术,将编码本发明的抗MET抗体或其抗原结合部分的一种或多种核酸分子(例如,编码抗MET抗体或抗原结合部分的任何上述核酸分子)导入动物或植物,产生非人转基因动物或植物。参见例如美国专利6,417,429。用于制备转基因动物的转基因细胞可以是胚胎干细胞或体细胞或受精卵。转基因非人生物体可以是嵌合的,非嵌合的杂合体和非嵌合的纯合体。参见例如Hogan等人,Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> ed.,Cold Spring Harbor Press(1999);Jackson et al.,Mouse Genetics and Transgenics:A Practical Approach,Oxford University Press(2000);和Pinkert,Transgenic Animal Technology:A Laboratory Handbook,Academic Press(1999)。在一些实施方案中,转基因非人动物具有通过编码感兴趣的重链和/或轻链的靶向构建体的靶向破坏和置换。非人转基因动物或植物可以包括例如编码本发明的抗MET抗体的重链或其抗原结合部分的核苷酸序列,编码轻链或其抗原结合部分,或两者的核苷酸序列。在优选的实施方案中,转基因动物包含并表达编码特异性结合人MET的重链和轻链或其抗原结合部分的核酸分子。可以在任何转基因动物中制备抗MET抗体或部分。在优选的实施方案中,非人动物是小鼠,大鼠,绵

羊,猪,山羊,牛或马。非人转基因动物可以在例如血液,乳,尿液,唾液,眼泪,粘液和其它体液中表达所述编码的多肽。

[0391] 药物组合物

[0392] 本发明的另一方面是包含本发明的抗MET抗体或其抗原结合部分或抗MET抗体组合物作为活性成分(或作为唯一活性成分)的药物组合物。药物组合物可以包含本文所述的任何抗MET抗体组合物或抗体或其抗原结合部分。在一些实施方案中,组合物旨在用于改善,预防和/或治疗MET介导的病症(例如,表征为MET过表达的病症)和/或癌症。在某些实施方案中,组合物旨在用于改善,预防和/或治疗非小细胞肺癌,胃癌,肝细胞癌,食管癌,结肠直肠癌,肾乳头状细胞癌,胶质母细胞瘤,肾细胞癌,前列腺癌,和/或肾上腺皮质癌。

[0393] 通常,本发明的抗体或其抗原结合部分适于作为与一种或多种药学上可接受的赋形剂相关的制剂施用。术语“赋形剂”在本文中用于描述除本发明化合物之外的任何成分。赋形剂的选择在很大程度上取决于诸如特定施用方式,赋形剂对溶解度和稳定性的作用以及剂型的性质等因素。如本文所用,“药学上可接受的赋形剂”包括生理上相容的任何和所有溶剂,分散介质,包衣,抗菌和抗真菌剂,等渗和吸收延迟剂等。药学上可接受的赋形剂的一些实例是水,盐水,磷酸盐缓冲盐水,葡萄糖,甘油,乙醇等,以及其组合。在许多情况下,优选在组合物中包括等渗剂,例如糖,多元醇如甘露糖醇,山梨糖醇,或氯化钠。药学上可接受的物质的其它实例是润湿剂或少量辅助物质,例如润湿剂或乳化剂,防腐剂或缓冲剂,其增加抗体的保质期或有效性的。

[0394] 本发明的药物组合物及其制备方法对于本领域技术人员来说将是显而易见的。此类组合物及其制备方法可以在例如Remington's Pharmaceutical Sciences,19th Edition(Mack Publishing Company,1995)中找到。药物组合物优选在GMP(良好制造实践)条件下制造。

[0395] 本发明的药物组合物可以作为单一单位剂量或多个单一单位剂量批量制备,包装或销售。如本文所用,“单位剂量”是包含预定量的活性成分的药物组合物的离散量。活性成分的量通常等于将施用至受试者的活性成分的剂量,或此类剂量的方便的部分,例如此类剂量的一半或三分之一。

[0396] 本领域接受的用于施用的肽,蛋白或抗体的任何方法可适当地用于本发明的抗体和抗原结合部分。

[0397] 本发明的药物组合物通常适用于肠胃外施用。如本文所使用的,药物组合物的“肠胃外施用”包括以对象组织的物理破裂为特征,并通过组织中的破裂施用药物组合物,因此通常导致直接施用至血液中,肌肉中,或进入内脏中的任何施用途径。因此肠外施用包括但不限于通过注射组合物,通过外科手术切口应用组合物,通过组织穿透性非手术伤口应用组合物等来施用药物组合物。特别地,考虑肠胃外施用包括但不限于皮下,腹膜内,肌肉内,胸骨内,静脉内,动脉内,鞘内,心室内,尿道内,颅内,子宫内注射或输注;和肾透析输注技术。也考虑局部灌注。优选的实施方案包括静脉内和皮下途径。

[0398] 适用于肠胃外施用的药物组合物的制剂通常包含与药学上可接受的载体如无菌水或无菌等渗盐水组合的活性成分。此类制剂可以以适于推注给药或连续施用的形式制备,包装或出售。可注射制剂可以以单位剂型制备,包装或销售,例如在含有防腐剂的安瓿或多剂量容器中。肠胃外施用的制剂包括但不限于油性或水性媒介物中的悬浮液,溶液,乳



液,糊剂等。此类制剂还可以包含一种或多种另外的成分,包括但不限于悬浮剂,稳定剂或分散剂。在用于胃肠外施用的制剂的一个实施方案中,以干燥(即粉末或颗粒)形式提供活性成分,用于在肠胃外施用重组组合之前用合适的载体(例如无菌无热原水)重构。肠胃外制剂还包括可以含有赋形剂如盐,碳水化合物和缓冲剂(优选至3至9的pH)的水溶液,但是对于某些应用,它们可以更合适地配制成无菌非水性溶液或作为干燥形式与合适的媒介物如无菌,无热原水结合使用。示例性的肠胃外施用形式包括在无菌水溶液中的溶液或悬浮液,例如水性丙二醇或葡萄糖溶液。如果需要,此类剂型可以适当地缓冲。可以使用的其它肠胃外施用的制剂包括那些包含微晶形式或脂质体制剂中的活性成分。用于肠胃外施用的制剂可以配制成立即释放和/或改性释放。改性释放制剂包括延迟,持续,脉冲,受控,靶向和程序释放。

[0399] 例如,在一个方面,可以通过将所需量的抗MET抗体或其抗原结合部分或抗MET抗体组合物与根据需要以上列举的一种成分或组合在适合的溶剂中整合,然后通过过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。通常,通过将活性化合物整合到无菌媒介物中来制备分散剂,其中所述媒介物含有碱性分散介质和来自上文列举的所需的其它成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其从先前无菌过滤的溶液产生活性成分加上任何另外的所需成分的粉末。可以保持溶液的适合的流动性,例如通过使用诸如卵磷脂的涂层,在分散液的情况下维持所需的颗粒大小和使用表面活性剂。可以通过在组合物中包含延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸盐和明胶,和/或通过使用改性释放涂层(例如缓释涂层)来延长可注射组合物的吸收。

[0400] 本发明的抗体也可以通过鼻内或通过吸入施用,通常来自干粉吸入器的干粉的形式(单独,作为混合物,或作为混合的组分颗粒,例如与适合的药学上可接受的赋形剂混合),作为来自加压容器,泵,喷雾,雾化器(优选使用电动力学的雾化器以产生细雾)或喷雾器的气雾喷雾,使用或不使用适合的推进剂,或作为鼻滴剂。

[0401] 加压容器,泵,喷雾,雾化器或喷雾器通常含有本发明的抗体的溶液或悬浮液,其包含例如用于活性剂的分散,增溶或延长释放的适合的试剂,作为溶剂的推进剂。

[0402] 在使用干粉或悬浮液制剂之前,药物产品通常微粉化至适合通过吸入(通常小于5微米)递送的尺寸。这可以通过任何适当的粉碎方法来实现,例如螺旋喷射研磨,流体床喷射研磨,超临界流体加工以形成纳米颗粒,高压均化或喷雾干燥。

[0403] 用于吸入器或吹入器中的胶囊,泡罩(blister)和药筒可以配制成含有本发明化合物,适合的粉末基质和性能调节剂的粉末混合物。

[0404] 在使用电动力学以产生细雾的雾化器中使用的适合的溶液制剂可以含有每次致动适合剂量的本发明的抗体,并且致动体积例如可以在1 $\mu$ L至100 $\mu$ L之间变化

[0405] 适合的香料,如薄荷醇和左薄荷醇,或甜味剂,如糖精或糖精钠,可加入本发明的用于吸入/鼻内施用的制剂中。

[0406] 用于吸入/鼻内施用的制剂可以配制为立即释放和/或改性释放。改性释放制剂包括延迟,持续,脉冲,受控,靶向和程序释放。

[0407] 在干粉吸入器和气溶胶的情况下,通过阀的方式确定剂量单位,其递送计量的量。根据本发明的单位通常安排为施用本发明的抗体的计量剂量或“puff”。整个日剂量通常以单个剂量或更通常地作为全天分开的剂量施用。



[0408] 本发明的抗体和抗体部分也可以配制用于口服途径给药。口服施用可以涉及吞咽,使得化合物进入胃肠道,和/或颊,舌或舌下施用,通过其化合物直接从口中进入血液流。

[0409] 适合用于口服施用的制剂包括固体,半固体和液体系统,例如片剂;含有多个或纳米颗粒,液体或粉末的软或硬胶囊;锭剂(包括液体填充的);咀嚼物;凝胶;快速分散剂型;膜(film);胚珠(ovules);喷雾剂和颊/粘膜粘附贴剂。

[0410] 液体制剂包括悬浮液,溶液,糖浆和酏剂(elixirs)。此类制剂可以用作软或硬胶囊(例如由明胶或羟丙基甲基纤维素制成)中的填料,且通常包含载体,例如水,乙醇,聚乙二醇,丙二醇,甲基纤维素或适合的油,以及一种或多种乳化剂和/或悬浮剂。也可以通过例如,从小袋重构固体来制备液体制剂。

[0411] 免疫缀合物

[0412] 本发明的抗体组合物和抗体及其抗原结合部分的治疗用于的另一选项是免疫缀合物的形式,即与一种或多种试剂例如抗癌剂缀合的抗体或抗原结合部分。包含两种或更多种抗MET抗体的本发明的组合物可以含有免疫缀合物形式的单个抗体,或者它们可以含有免疫缀合物形式的两种或更多种抗体。

[0413] 各种类型的抗癌剂可以与本发明的抗体缀合,包括细胞毒性剂(例如常规化疗剂和其它小分子抗癌药物),细胞因子(在这种情况下,缀合物可以称为“免疫细胞因子”),毒素(在这种情况下,缀合物可称为“免疫毒素”)和放射性核素。一些免疫缀合物已被批准用于临床应用。这些包括 **Zevalin®** (一种与<sup>90</sup>Y缀合的鼠抗CD20抗体), **Bexxar®** (与<sup>131</sup>I缀合的鼠抗CD20抗体)和 **Mylotar®** (与卡里奇霉素缀合的人源化抗CD33抗体)。已经在临床试验中测试的其它免疫缀合物包括与例如阿霉素或美登木素生物碱化合物缀合的抗体。已经在临床试验中测试的免疫毒素包括几种与截短的假单胞菌外毒素A缀合的抗体。还已经测试了包含与IL-2缀合的人源化EpCAM抗体的免疫细胞因子。

[0414] 在本发明的抗体与细胞毒性剂缀合的情况下,它们可以属于例如任何主要类型的化疗药物,包括烷化剂(例如卡铂,顺铂,奥沙利铂),抗代谢药(例如甲氨蝶呤,卡培他滨,吉西他滨),蒽环类(例如博来霉素,阿霉素,丝裂霉素C)和植物生物碱(例如,紫杉烷如多西他赛和紫杉醇,和长春花生物碱例如长春花碱(vinblastine),长春新碱(vincristine)和长春瑞滨(vinorelbine))。由于使用免疫缀合物将抗癌剂特异性地指向肿瘤,基于本发明的抗体的免疫缀合物可有利地基于高度细胞毒性剂如加卡里奇霉素(calicheamicin)或美登素(maytansine)衍生物,或毒素如细菌毒素(例如假单胞菌外毒素A,白喉毒素)或植物毒素(例如蓖麻毒素)。

[0415] 免疫缀合物中的缀合的抗癌剂通常通过不稳定接头的方式与抗体连接,所述接头在血清中相对稳定,但当免疫缀合物内化到靶细胞中时,其允许该试剂的释放。适合的接头包括例如在血清中在中性pH下稳定但在内化后在溶酶体中的温和酸性条件下经受酸水解的化学接头,由细胞内硫醇裂解的二硫键接头,和在血清中稳定当在细胞内区室中经受酶裂解的肽接头。

[0416] 可以在含有本发明的两种或更多种抗体的组合物中设想各种缀合方案。例如,在两种抗体的情况下可以将抗体与两种或更多种不同的抗癌药物缀合,或者将一种抗体与原药缀合,其通过缀合至另一种抗体的试剂例如酶活化。已经对于单克隆抗体描述了抗体定

向的酶前药治疗(ADEPT)的一般概念,其中通过mAB-酶靶向肿瘤的酶活化原药,但本发明可以提供对于特定条件调整该方法的机会。因此,可以特异性地增加肿瘤细胞杀伤同时减少或降低对正常组织的损伤。

[0417] 关于抗癌免疫缀合物的更多信息,参见Wu et al.,Nature Biotechnology23(9):1137-1146(2005);Schrama et al.,Nature Reviews/Drug Discovery5:147-159(2006);和Rohrer,Chimica Oggi/Chemistry Today27(5):56-60(2009)。

[0418] 本发明的抗体和组合物的治疗用途

[0419] 在一个方面,本发明的抗MET抗体及其抗原结合部分和抗MET组合物用于治疗MET介导的病症。在一些实施方案中,MET介导的病症是表征为MET过表达的病症。在某些实施方案中,药物组合物用于癌症的治疗,例如非小细胞肺癌,胃癌,肝细胞癌,食管癌,结肠直肠癌,肾乳头状细胞癌,胶质母细胞瘤,肾上腺皮质癌,肾细胞癌,前列腺癌和其他表达或过度表达MET或依赖于MET途径活化的癌症。

[0420] 在一些方面,抗体或抗体组合物用于治疗表征为异常MET过度活跃的病症,例如癌症。在一些实施方案中,异常过度活动源于基因扩增,蛋白过表达,MET活化基因突变(例如点突变或异常基因剪接事件)或HGF过表达。

[0421] 在某些方面,本发明的抗MET抗体及其抗原结合部分和抗MET组合物可以用于治疗对于靶向不同酪氨酸激酶受体的试剂的治疗抗性的患者。在一些实施方案中,患者对用ErbB激酶抑制剂的治疗抗性。在某些实施方案中,ErbB激酶抑制剂靶向EGFR,ErbB2,ErbB3或ErbB4。在具体实施方案中,ErbB激酶抑制剂靶向EGFR。在另一个实施方案中,ErbB激酶抑制剂靶向HER3。ErbB激酶抑制剂可以选自例如吉非替尼(gefitinib),厄洛替尼(erlotinib),西妥昔单抗(cetuximab),潘太沙星(pantimumumab),曲妥珠单抗(trastuzumab)或其任何组合。

[0422] “治疗”是指减轻或消除生物学病症和/或其伴随症状中的至少一种的方法。如本文所使用的,为了“减轻”疾病,病症或状况,意味着降低疾病,病症或状况的症状的严重性和/或发生频率。此外,本文中提及“治疗”包括提及治愈性,缓和性和预防性治疗。

[0423] 在一个方面,治疗受试者或患者是哺乳动物,优选人受试者。所述受试者可以是任何年龄的雄性或雌性。

[0424] “治疗有效量”是指施用的治疗剂的量,其将在一定程度上缓解治疗的病症的一种或多种症状。

[0425] 本发明的治疗组合物中的个体抗体之间的比率,或在本发明的个体抗体同时,序贯或单独施用的情况下,将通常是以相等的量施用抗体,但这不一定是这种情况。因此,包含两种抗MET抗体或其抗原结合部分的本发明的组合物通常以约1:1的比例含有它们,但是取决于个体抗体的特征,可能希望使用不相等量的抗体或部分。例如,双抗体组合物中的一种抗体或部分相对于另一种抗体或部分的比例可以是例如5至95%之间,10至90%之间,20至80%之间,30至70%之间,40%至60%之间,或45%至55%之间。

[0426] 本发明的抗体组合物或其抗体或其抗原结合部分可以单独施用或与一种或多种其它药物或抗体(或其任何组合)组合施用。因此,本发明的药物组合物,方法和用途也包括与其它活性试剂的组的实施方案(共同施用),如下文详细描述。

[0427] 如本文所使用的,术语“共同施用”和“与……组合”是指抗体组合物和抗体及其与

一种或多种其它治疗剂的抗原结合部分,意指,并提及和包括以下:

[0428] -当将这些组分一起配制成单一剂型时,将本发明的抗体组合物/抗体/抗原结合部分与治疗剂的该组合同时施用于需要治疗的患者,所述单一剂型在基本上相同的时间向所述患者释放所述组分,

[0429] -当这些组分彼此分开配制成单独的剂型时,将本发明的抗体组合物/抗体/抗原结合部分和治疗剂的该组合基本上同时施用于需要治疗的患者,其被所述患者在基本上相同的时间吸收,其中所述组分在基本上相同的时间释放至所述患者,

[0430] -当这些组分彼此分开配制成单独的剂型时,本发明的抗体组合物/抗体/抗原结合部分和治疗剂的该组合在需要治疗的患者中序贯施用,其被所述患者在每次施用之间具有显著时间间隔的连续时间吸收,其中所述组分在基本上不同的时间释放至所述患者,和

[0431] -当将这些组分一起配制成单一剂型时,本发明的抗体组合物/抗体/抗原结合部分和治疗剂的该组合在需要治疗的患者中序贯施用,从其以受控的方式释放所述组分,其中它们在相同和/或不同的时间同时,连续和/或重叠释放至所述患者,其中每个部分可以通过相同或不同的途径施用。

[0432] 本发明的抗体组合物及其抗体及其抗原结合部分可以在没有另外的治疗方法的情况下施用,即作为独立治疗。或者,本发明的抗体组合物和抗体及其抗原结合部分的治疗可以包括至少一种另外的治疗性处理(组合疗法)。在一些实施方案中,抗体组合物或抗体或其抗原结合部分可以与用于治疗癌症的另一种药品/药物共同施用或配制。另外的治疗处理可以包括例如化疗,抗肿瘤或抗血管生成试剂,不同的抗癌抗体和/或放射治疗。

[0433] 通过将本发明的抗体组合物,抗体或抗原结合部分与已知诱导癌细胞终末分化的试剂组合,可以进一步改善其作用。此类化合物可以例如选自下组:视黄酸,反式视黄酸,顺式视黄酸,苯基丁酸酯,神经生长因子,二甲基亚砷,活性形式维生素D3,过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ ,12-0-十四烷酰佛波醚13-乙酸酯,六亚甲基-双-乙酰胺,转化生长因子- $\beta$ ,丁酸,环AMP和vesnarinone。在一些实施方案中,化合物选自下组:视黄酸,苯丁酸酯,全反式视黄酸和活性形式维生素D。

[0434] 包含本发明的抗MET抗体组合物或抗MET抗体或其抗原结合部分的和至少一种其它药剂(例如,化疗,抗肿瘤或抗血管生成剂)的药物制品可以用作癌症治疗中同时,分别或连续施用的联合治疗。另一种药剂可以是适合于治疗所述特定癌症的任何药剂,例如选自下组的药剂:烷化剂,例如铂衍生物如顺铂,卡铂和/或奥沙利铂;植物生物碱,例如紫杉醇,多西他赛和/或伊立替康;抗肿瘤抗生素,例如多柔比星(阿霉素),柔红霉素,表柔比星,伊达比星米托蒽醌,更生霉素,博来霉素,放线菌素,藤黄霉素和/或丝裂霉素;拓扑异构酶抑制剂如拓扑替康;和/或抗代谢物,例如氟尿嘧啶和/或其它氟嘧啶。

[0435] 还考虑本发明的抗MET抗体或其抗原结合部分或抗MET抗体组合物可用于与酪氨酸激酶抑制剂有关的辅助治疗。这些是合成的,主要是喹唑啉衍生的低分子量分子,其与受体的细胞内酪氨酸激酶结构域相互作用并通过竞争结合细胞内Mg-ATP结合位点抑制配体介导的受体磷酸化。因此,包含本发明的抗体组合物和至少一种靶向MET的TKI的药物制品也可以用作在癌症治疗中同时,分别或连续施用的组合治疗。

[0436] 在某些方面,本发明的抗体组合物和抗体及其抗原结合部分可以与另一种MET途径的抑制剂(其可以靶向MET或HGF)组合施用。在一些实施方案中,抑制剂选自但不限于下

组:AMG 102,AMG 208,AMG 458,ARQ 197,AV299,BAY-853474,CGEN241,DN30,E7050,EMD 1204831,EMD 1214063,INCB28060,JNJ38877605,K252a,LY-2875358,MGCD265,MK-2461,MP-470,NK4,OA-5D5,PF-02341066,PF-04217903,PF-02341066,PHA-665752,SGX-523,SU5416,SU11274,TAK701,XL184,XL880,cabozantinib,crizotinib,ficlatuzumab,foretinib,golvatinib,onartuzumab,rilotumumab和tivantinib。

[0437] 在一些实施方案中,本发明的抗体组合物和抗体及其抗原结合部分可以与ErbB抑制剂(如吉非替尼或埃罗替尼)或热休克蛋白90(hsp90)抑制剂(如17-AAG)组合施用。

[0438] 在其它实施方案中,本发明的抗体组合物和抗体及其抗原结合部分可以与其它抗体治疗剂,例如针对VEGF的抗体(例如Avastin®)组合使用。在其他实施方案中,本发明的抗体组合物可以与已知可刺激免疫系统细胞的试剂组合使用,此类组合治疗导致增强的免疫介导的本发明抗体组合物功效的增强。此类免疫刺激剂的实例包括重组白介素(例如IL-21和IL-2)。

[0439] 应当理解,本发明的抗体组合物和抗体及其抗原结合部分可以用于如上所述的治疗方法中,可用于如上所述的治疗中,和/或可用于制造如上所述的用于治疗的药物。

[0440] 剂量和施用途径

[0441] 本发明的抗体组合物将以有效量施用以治疗讨论中的状况,即以达到期望结果所需的剂量和时间段。治疗有效量可以根据诸如待治疗的具体状况,患者的年龄,性别和体重,以及抗体是作为独立治疗还是与一种或多种另外的抗-癌症治疗施用等因素而变化。

[0442] 可以调节剂量方案以提供最佳期望的反应。例如,可以施用单次推注,可以随着时间施用几个分开的剂量,或者如治疗情况的紧急程度所指示的,剂量可按比例减少或增加。以剂量单位形式配制肠胃外组合物以便于施用和剂量均匀是特别有利的。如本文所用的剂量单位形式是指适合作为待治疗的患者/受试者的单一剂量的物理上离散的单位;每个单位含有预定量的活性化合物,其经计算以与所需药物载体联合产生所需的治疗效果。本发明的剂量单位形式的规格通常由以下决定并直接依赖于(a)化学治疗剂的独特特征和要实现的具体治疗或预防效果和(b)将此类活性化合物用于治疗个体的敏感性复合的本领域固有限制。

[0443] 因此,本领域技术人员基于本文提供的公开内容将理解,根据治疗领域公知的方法调节剂量和给药方案。也就是说,可以容易地建立最大可耐受剂量,并且还可以确定为患者提供可检测的治疗益处的有效量,以及施用每种药剂向患者提供可检测的治疗益处的时间要求。因此,虽然在本文中示例说明了某些剂量和施用方案,但是这些实施例绝不限制在实施本发明时可以提供给患者的剂量和给药方案。

[0444] 值得注意的是,剂量值可以根据要缓解的病症的类型和严重程度而变化,并且可以包括单剂量或多剂量。应当进一步理解,对于任何特定受试者,应根据个体需要和施用或监督组合物施用的人员的专业判断随时间调整特定的剂量方案,并且本文所述的剂量范围仅是示例性的且并不意图限制具体组合的范围或实施。此外,使用本发明的组合物的给药方案可以基于各种因素,包括疾病的类型,患者的年龄,体重,性别,医疗条件,状况的严重程度,施用途径,和所用的具体抗体。因此,剂量方案可以广泛变化,但可以使用标准方法常规确定。例如,可以基于药代动力学或药效学参数调整剂量,其可以包括临床效果诸如毒性作用和/或实验室值。因此,本发明包括由本领域技术人员确定的患者内剂量递增。确定适

当的剂量和方案在相关领域中是众所周知的,并且应当理解为一旦提供本文公开的教导,本领域技术人员将涵盖。

[0445] 考虑本发明的抗体组合物的合适剂量将在0.1-100mg/kg,例如约0.5-50mg/kg,例如约1-20mg/kg的范围内。抗体组合物可以例如以至少0.25mg/kg,例如至少0.5mg/kg,例如至少1mg/kg,例如至少1.5mg/kg的剂量,例如至少2mg/kg,例如至少3mg/kg,例如至少4mg/kg,例如至少5mg/kg;且例如高达最多50mg/kg,例如高达最多30mg/kg,例如高达最多20mg/kg,例如高达最多15mg/kg。通常会以合适的间隔重复施用,例如每周一次,每两周一次,每三周一次,或每四周一次,并且只要主管医生认为适当,可以必要时任选地增加或减少剂量。

[0446] 用于肿瘤治疗的有效量可以通过其稳定疾病进展和/或改善患者症状的能力来测量,并且优选地例如通过减少肿瘤大小来逆转疾病进展。可以通过体外测定,例如如实施例中所述,以及适合的动物模型(其对于人肿瘤中的功效是预测性的)评估本发明的抗体或组合物抑制癌症的能力。为了在每种特定情况下提供最佳治疗反应,将选择合适的剂量方案,例如作为单次推注或连续输注施用,并且如每种情况的紧急程度所指示的可能调整剂量。

[0447] 诊断用途和组合物

[0448] 本发明的抗体也可用于诊断过程(例如体外,离体)。例如,抗体可用于检测和/或测量来自患者的样品(例如,组织样品或体液样品例如炎性渗出物,血液,血清,肠液,唾液或尿液)中的MET的水平。适合的检测和测量方法包括免疫学方法,例如流式细胞术,酶联免疫吸附测定(ELISA),化学发光测定,放射免疫测定和免疫组织学。本发明还包括试剂盒(例如,诊断试剂盒),其包含本文所述的抗体。

[0449] 为了更好地理解本发明,列出了以下实施例。这些实施例仅仅是为了说明的目的,不应被解释为以任何方式限制本发明的范围。

[0450] 本说明书中引用的所有出版物,专利和专利申请通过引用并入本文。虽然为了清楚理解的目的,通过说明和示例的方式已经对本发明进行了一些详细的描述,但是根据本发明的教导,对于本领域普通技术人员来说显而易见的是可以在不脱离所附实施例的精神或范围的情况下进行某些改变和修改。

## 实施例

[0451] 实施例1:抗MET抗体的克隆

[0452] 使用基本如WO 2005/042774中所述的Symplex™过程获得抗MET抗体。简言之,使用过表达MET的人癌症细胞系(HCT-116),重组人MET蛋白(Sino Biologicals),使用配体(HGF)预孵育的重组人MET蛋白,或胰蛋白酶消化的MET每两周免疫BALB/c,C57和C3H小鼠。从脾脏和腹股沟淋巴结获得的鼠血浆细胞进行FACS分选,并对分选的浆细胞进行VH和VL编码序列的连接,促进序列的同源配对,利用基于一歩多重重叠延伸RT-PCR然后是嵌套PCR的两步PCR过程。在WO 2005/042774和Meijer et al.,J Mol Biol 358(3):764-72(2006)中详细描述了同源VH和VL序列的连接原理。

[0453] 为了鉴定具有对MET结合特异性的抗体,将上述获得的VH和VL编码序列表示为全长抗体。这涉及使用WO 2012/059858中描述的方法将VH和VL编码对的库(repertoire)插入到表达载体中并转染到宿主细胞中。

[0454] 通过ELISA确定产生的抗体的特异性,其使用MET蛋白的细胞外结构域或与人免疫球蛋白Fc结构域融合的MET蛋白的细胞外结构域作为抗原。使用1 $\mu$ g/ml在PBS中稀释的重组MET蛋白包被Nunc MaxiSorp板 (Cat.No.464718),在4 $^{\circ}$ C过夜。用PBS+0.05%吐温20 (PBS-T) 洗涤板一次,然后在50 $\mu$ l 2% milk-PBS-T中封闭。再次用PBS-T洗涤板一次,然后加入20 $\mu$ l的2% milk-PBS-T洗板。加入10 $\mu$ l来自FreeStyle293转染子的上清液,并在室温下孵育1小时,然后用PBS-T洗涤板1次。加入在2% milk-PBS-T中以1:25000稀释的二抗 (HRP-山羊-抗-人 $\kappa$ 轻链, Serotec, Cat.No. STAR100P),以检测结合孔的抗体,并在室温下孵育1小时。将板在PBS-T中洗涤一次,然后加入25 $\mu$ l底物 (Kem-En-Tec Diagnostics, 目录号4518) 并孵育5分钟。孵育后,加入25 $\mu$ l 1M硫酸以停止反应。在ELISA读数器上在450nm检测特异性信号。从ELISA数据鉴定阳性抗体克隆并选择用于结合MET的序列分析和验证。

[0455] 实施例2:筛选功能性抗MET抗体混合物

[0456] 本实施例描述了靶向MET的嵌合单克隆抗体和这些单克隆抗体的混合物的体外测试以鉴定潜在候选物。评估单克隆抗体和混合物的抑制癌细胞系EBC1, MKN45, OE33和SNU5生长的能力。

[0457] 方法

[0458] 测定靶向人MET的小鼠来源的抗体在体外抑制人癌细胞系生长的能力。在补充有2% FBS和1% P/S的RPMI 1640 Glutamax培养基中将单克隆抗体和2-抗体混合物(两种单克隆抗体的1:1混合物)稀释至100 $\mu$ g/ml的最终总抗体浓度,产生终浓度为5 $\mu$ g/ml。然后将相关数量的细胞 (EBC1:1500细胞/孔, MKN45:2000细胞/孔, OE33:4300细胞/孔和SNU5:800细胞/孔) 加入到384孔板中的实验孔中,并在37 $^{\circ}$ C的加湿培养箱中与抗体孵育4天。随后将WST-1试剂添加至板,并在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。使用ELISA读数器在450nm和620nm(参考波长)测量吸光度。在450nm的吸光度中减去620nm的吸光度。代谢活性细胞的量 (MAC) 以未处理对照的百分比计算如下:

[0459] 
$$\%MAC = \left( \frac{OD_{exp.} - OD_{media}}{OD_{untreat.} - OD_{media}} \right) \times 100$$

[0460] 假设代谢活性与活细胞的数量相关,意味着较低的%MAC对应于抗体对细胞生长抑制的较高水平。

[0461] 结果

[0462] 抗体混合物基于它们在一组癌细胞系中抑制细胞生长的能力来排名。单克隆抗体和两种抗体的混合物对细胞系EBC1, MKN45, OE33和SNU5的代谢活性的活力结果显示在表3中。两种抗体的七种不同混合物抑制代谢活性至平均低于50%。

[0463] 在最有效的混合物中,两种抗体9006和9338的组合表现出广泛的细胞生长抑制活性。有趣的是,单独的每种抗体显示比组合更低的功效,这表明两种抗体可以协同作用。除了9006+9338外,从表3可以看出,其它高效混合物包括9206+9232, 8955+9338, 9206+9338, 9006+9232, 8955+9006, 8955+9096和8955+9232。此外,显然这些前八种混合物是基于相对较少的单个单克隆抗体,特别是8955, 9006, 9232, 9338和9206

[0464] 表3. 单克隆抗体和抗体混合物的抗增殖效果

[0465]

		使用mAb或mAb混合物处理的细胞的代谢活性 (% 未处理的对照)					
mAb或mAb混合物	序列簇(s)	SNU5	OE33	MKN4 5	EBC1	平均	排名
9206 + 9232	008 + 007	32	70	32	37	43	1
9006 + 9338	018 + 004	33	54	31	54	43	2
8955 + 9338	029 + 004	33	60	24	63	45	3
9206 + 9338	008 + 004	39	52	34	55	45	4
9006 + 9232	018 + 007	36	72	24	59	48	5
8955 + 9006	029 + 018	46	62	25	61	48	6
8955 + 9096	029 + 018	55	41	40	59	49	7
8955 + 9232	029 + 007	46	66	25	69	51	8
9206 + 9217	008 + 012	35	60	54	99	62	9
8955 + 9206	029 + 008	39	71	57	82	62	10
9044 + 9111	011 + 009	47	77	37	91	63	11
9111 + 9217	009 + 012	40	101	24	93	64	12
9111 + 9232	009 + 007	67	83	53	63	66	13
9006 + 9111	018 + 009	31	101	36	98	66	14
9111 + 9206	009 + 008	39	79	53	96	67	15

[0466]

		使用mAb或mAb混合物处理的细胞的代谢活性 (% 未处理的对照)					
mAb或mAb混合物	序列簇(s)	SNU5	OE33	MKN4 5	EBC1	平均	排名
9006 + 9154	018 + 009	34	91	49	98	68	16
9096 + 9232	018 + 007	50	79	54	94	69	17
9184 + 9217	009 + 012	45	103	30	101	70	18
9184 + 9206	009 + 008	30	88	63	97	70	19
9173 + 9232	028 + 007	51	90	84	57	71	20
9006 + 9184	018 + 009	35	105	44	107	73	21
9154 + 9217	009 + 012	52	98	36	105	73	22
9212 + 9232	025 + 007	57	92	90	64	76	23
9154 + 9206	009 + 008	48	66	87	103	76	24
9096 + 9184	018 + 009	47	80	71	108	76	25
9096 + 9111	018 + 009	43	107	65	94	77	26
9173 + 9340	028 + 072	40	98	79	98	79	27
9044 + 9184	011 + 009	57	104	54	102	79	28
9184 + 9232	009 + 007	92	100	62	63	79	29
9111 + 9173	009 + 028	47	103	69	103	80	30
9111 + 9133	009 + 028	54	103	64	106	82	31
9006 + 9122	018 + 031	46	112	50	118	82	32
9096 + 9338	018 + 004	50	57	100	120	82	33
9173	028	38	99	83	108	82	34
9006 + 9146	018 + 036	61	75	79	118	83	35
9146 + 9173	036 + 028	48	115	66	105	83	36
9173 + 9184	028 + 009	44	113	70	108	84	37
8820 + 9006	044 + 018	55	103	65	115	85	38
9044 + 9154	011 + 009	59	100	67	113	85	39
8908 + 9006	032 + 018	42	110	50	138	85	40
9173 + 9206	028 + 008	47	107	74	112	85	41



[0467]

		使用mAb或mAb混合物处理的细胞的代谢活性 (% 未处理的对照)					
mAb或mAb混合物	序列簇(s)	SNU5	OE33	MKN4 5	EBC1	平均	排名
9173 + 9212	028 + 025	46	99	93	102	85	42
9133 + 9232	028 + 007	77	110	88	66	85	43
9044 + 9206	011 + 008	89	65	83	107	86	44
9146 + 9232	036 + 007	105	90	86	65	86	45
8955 + 9111	029 + 009	73	96	61	117	87	46
9006 + 9173	018 + 028	43	109	84	113	87	47
9154 + 9173	009 + 028	55	104	79	112	88	48
9154 + 9232	009 + 007	94	115	73	70	88	49
9006 + 9212	018 + 025	61	79	94	120	88	50
9096 + 9154	018 + 009	73	82	83	115	88	51
9006	018	68	73	90	122	88	52
9122 + 9206	031 + 008	67	110	56	125	89	53
8820 + 8955	044 + 029	87	87	80	106	90	54
8908 + 9217	032 + 012	74	96	65	125	90	55
9006 + 9096	018 + 018	68	71	90	131	90	56
9133 + 9212	028 + 025	59	96	102	104	90	57
9122 + 9232	031 + 007	117	86	95	62	90	58
9006 + 9133	018 + 028	58	111	81	113	90	59
8955 + 9007	029 + 046	83	81	98	100	91	60
8908 + 8955	032 + 029	79	70	87	128	91	61
9096 + 9173	018 + 028	39	119	88	117	91	62
9133 + 9173	028 + 028	45	102	116	102	91	63
9217 + 9232	012 + 007	114	100	82	68	91	64
8955 + 9146	029 + 036	83	72	92	118	91	65
9122 + 9217	031 + 012	65	126	46	128	91	66
8955 + 9154	029 + 009	80	80	85	122	92	67

[0468]

		使用mAb或mAb混合物处理的细胞的代谢活性 (% 未处理的对照)					
mAb或mAb混合物	序列簇(s)	SNU5	OE33	MKN4 5	EBC1	平均	排名
9133 + 9184	028 + 009	58	112	85	111	92	68
9006 + 9044	018 + 011	66	75	91	135	92	69
8955 + 8958	029 + 029	72	94	81	121	92	70
8820 + 9111	044 + 009	61	135	53	120	92	71
8955 + 9122	029 + 031	69	91	81	129	93	72
9096 + 9133	018 + 028	57	99	95	120	93	73
9006 + 9217	018 + 012	67	93	92	120	93	74
9111 + 9122	009 + 031	98	106	50	118	93	75
9146 + 9184	036 + 009	89	93	81	110	93	76
9212 + 9340	025 + 072	69	117	86	99	93	77
8820 + 9232	044 + 007	88	103	75	108	93	78
9146 + 9206	036 + 008	79	75	101	119	94	79
9044 + 9122	011 + 031	80	109	63	124	94	80
9006 + 9340	018 + 072	70	78	101	127	94	81
9173 + 9338	028 + 004	61	102	92	120	94	82
8820 + 9184	044 + 009	67	121	60	128	94	83
9006 + 9206	018 + 008	81	78	101	117	94	84
9173 + 9217	028 + 012	58	124	72	123	94	85
9133 + 9206	028 + 008	67	102	95	112	94	86
9006 + 9007	018 + 046	61	92	81	142	94	87
9212	025	86	90	101	100	94	88
9232 + 9338	007 + 004	86	93	77	122	94	89
9133	028	68	102	99	109	95	90
8820 + 9206	044 + 008	58	129	69	123	95	91
8955 + 9340	029 + 072	81	70	97	133	95	92
9111 + 9146	009 + 036	93	108	74	109	96	93

[0469]

		使用mAb或mAb混合物处理的细胞的代谢活性 (% 未处理的对照)					
mAb或mAb混合物	序列簇(s)	SNU5	OE33	MKN4 5	EBC1	平均	排名
9096 + 9206	018 + 008	70	79	98	138	96	94
9133 + 9146	028 + 036	67	100	112	106	96	95
9096 + 9122	018 + 031	49	121	77	139	96	96
8906 + 9232	056 + 007	89	111	74	112	97	97
9133 + 9340	028 + 072	69	123	93	101	97	98
8908 + 9232	032 + 007	95	100	76	116	97	99
8955 + 9184	029 + 009	74	96	87	130	97	100
9044 + 9232	011 + 007	85	112	82	110	97	101
8955 + 9212	029 + 025	105	75	91	118	97	102
8899 + 8955	029 + 029	78	77	97	137	97	103
9111 + 9212	009 + 025	89	91	101	109	97	104
8820 + 9173	044 + 028	46	158	77	112	98	105
9096 + 9146	018 + 036	81	78	101	133	98	106
9096 + 9212	018 + 025	83	86	98	127	98	107
8955 + 9133	029 + 028	85	96	89	126	99	108
9212 + 9338	025 + 004	66	118	93	119	99	109
8820 + 9338	044 + 004	90	96	91	119	99	110
8906 + 9217	056 + 012	82	106	81	128	99	111
9206	008	90	86	97	125	99	112
8955 + 9173	029 + 028	69	113	94	123	100	113
9007 + 9232	046 + 007	109	99	77	114	100	114
8908 + 9111	032 + 009	93	114	79	114	100	115
9111 + 9184	009 + 009	88	99	100	115	100	116
9007 + 9217	046 + 012	89	97	90	126	100	117
8955	029	100	68	101	132	100	118
9154 + 9184	009 + 009	90	102	91	119	101	119

[0470]

		使用mAb或mAb混合物处理的细胞的代谢活性 (% 未处理的对照)					
mAb或mAb混合物	序列簇(s)	SNU5	OE33	MKN4 5	EBC1	平均	排名
9122 + 9173	031 + 028	75	131	80	116	101	120
8820 + 9096	044 + 018	82	95	86	140	101	121
9111 + 9154	009 + 009	93	103	91	117	101	122
9096 + 9340	018 + 072	80	81	105	139	101	123
8908 + 9206	032 + 008	90	108	80	127	101	124
9206 + 9212	008 + 025	91	77	114	124	101	125
8820 + 9122	044 + 031	63	158	61	125	102	126
9146	036	119	92	100	100	103	127
9206 + 9340	008 + 072	103	94	94	120	103	128
8906 + 9006	056 + 018	66	142	52	152	103	129
8820 + 9133	044 + 028	63	152	80	116	103	130
8902 + 8955	029 + 029	72	87	105	149	103	131
9232 + 9340	007 + 072	115	93	85	120	103	132
8955 + 9026	029 + 029	91	75	101	146	104	133
9146 + 9212	036 + 025	110	93	106	106	104	134
9111	009	97	96	102	119	104	135
8955 + 9217	029 + 012	94	97	91	134	104	136
8820 + 9154	044 + 009	72	148	73	123	104	137
8906 + 9206	056 + 008	90	126	75	127	104	138
8820 + 9217	044 + 012	91	151	65	112	105	139
9044 + 9217	011 + 012	103	102	93	120	105	140
9232	007	115	100	84	121	105	141
9340	072	113	99	95	114	105	142
9217 + 9338	012 + 004	83	124	89	126	106	143
9096	018	90	86	103	144	106	144
9184 + 9212	009 + 025	98	103	108	114	106	145

[0471]

		使用mAb或mAb混合物处理的细胞的代谢活性 (% 未处理的对照)					
mAb或mAb混合物	序列簇(s)	SNU5	OE33	MKN4 5	EBC1	平均	排名
9007 + 9173	046 + 028	67	153	95	109	106	146
8908 + 9184	032 + 009	85	127	90	123	106	147
9111 + 9340	009 + 072	107	109	101	111	107	148
9044 + 9133	011 + 028	91	132	87	119	107	149
9133 + 9154	028 + 009	90	123	101	117	108	150
8820 + 9044	044 + 011	97	138	79	117	108	151
8820 + 9212	044 + 025	82	143	87	119	108	152
9122 + 9184	031 + 009	96	140	73	124	108	153
9007 + 9206	046 + 008	89	113	95	136	108	154
9184	009	101	110	101	123	109	155
9338	004	100	98	96	141	109	156
8906 + 9111	056 + 009	112	120	84	122	110	157
9111 + 9338	009 + 004	107	121	90	121	110	158
9146 + 9340	036 + 072	112	137	90	100	110	159
9133 + 9338	028 + 004	89	133	96	120	110	160
8820 + 8906	044 + 056	86	148	80	126	110	161
9217	012	96	108	100	135	110	162
9044 + 9338	011 + 004	101	101	103	135	110	163
8908 + 9154	032 + 009	98	132	87	124	110	164
9007 + 9096	046 + 018	88	96	96	160	110	165
9212 + 9217	025 + 012	80	121	111	129	110	166
9044 + 9173	011 + 028	72	150	95	126	111	167
9007 + 9154	046 + 009	100	135	83	126	111	168
9154 + 9340	009 + 072	113	117	85	131	111	169
9338 + 9340	004 + 072	103	106	103	134	112	170
9096 + 9217	018 + 012	106	108	96	137	112	171

[0472]

		使用mAb或mAb混合物处理的细胞的代谢活性 (% 未处理的对照)					
mAb或mAb混合物	序列簇(s)	SNU5	OE33	MKN4 5	EBC1	平均	排名
9007 + 9184	046 + 009	85	137	95	131	112	172
9007 + 9340	046 + 072	109	112	95	133	112	173
9044 + 9340	011 + 072	92	120	100	138	113	174
9184 + 9340	009 + 072	109	132	99	110	113	175
9122 + 9133	031 + 028	92	133	105	124	113	176
8955 + 9044	029 + 011	102	100	102	151	114	177
8906 + 9044	056 + 011	96	122	86	151	114	178
9007 + 9122	046 + 031	108	135	85	127	114	179
8820 + 9146	044 + 036	101	153	84	119	114	180
8908 + 9122	032 + 031	131	132	76	117	114	181
8906 + 9133	056 + 028	92	155	92	118	114	182
8908 + 9133	032 + 028	95	158	96	110	115	183
8908 + 9096	032 + 018	85	117	88	169	115	184
9217 + 9340	012 + 072	106	137	87	129	115	185
9133 + 9217	028 + 012	99	135	98	127	115	186
8906 + 9173	056 + 028	72	185	79	122	115	187
9007 + 9146	046 + 036	108	146	79	127	115	188
8906 + 9184	056 + 009	105	147	81	128	115	189
9007 + 9111	046 + 009	108	138	86	129	115	190
8908 + 9173	032 + 028	85	170	90	118	116	191
8908 + 9044	032 + 011	87	135	81	159	116	192
9044 + 9146	011 + 036	119	129	93	122	116	193
8908 + 9212	032 + 025	120	125	95	123	116	194
9007 + 9212	046 + 025	115	127	93	128	116	195
9044 + 9212	011 + 025	133	117	96	118	116	196
8820 + 9007	044 + 046	96	152	84	134	117	197

[0473]

		使用mAb或mAb混合物处理的细胞的代谢活性 (% 未处理的对照)					
mAb或mAb混合物	序列簇(s)	SNU5	OE33	MKN4 5	EBC1	平均	排名
9044	011	115	118	98	137	117	198
8906 + 9122	056 + 031	122	148	78	120	117	199
8908 + 9340	032 + 072	106	128	94	141	117	200
9184 + 9338	009 + 004	124	129	92	126	118	201
8906 + 9154	056 + 009	119	144	79	128	118	202
9007 + 9044	046 + 011	112	129	87	145	118	203
8906 + 9212	056 + 025	133	136	86	120	119	204
9146 + 9338	036 + 004	135	126	91	123	119	205
8908 + 9338	032 + 004	106	129	101	139	119	206
9007 + 9338	046 + 004	96	136	101	144	119	207
9154	009	123	119	97	138	119	208
9122 + 9338	031 + 004	129	123	99	126	119	209
8820 + 8908	044 + 032	110	154	83	131	119	210
8820	044	111	157	88	121	119	211
9007 + 9133	046 + 028	92	166	101	119	120	212
9146 + 9217	036 + 012	123	128	104	126	120	213
9122 + 9154	031 + 009	112	151	88	129	120	214
8906 + 9096	056 + 018	93	127	86	176	120	215
8906 + 9146	056 + 036	102	176	83	121	121	216
9154 + 9212	009 + 025	135	111	110	128	121	217
8908 + 9146	032 + 036	126	150	90	121	122	218
8906 + 9340	056 + 072	106	157	95	129	122	219
9146 + 9154	036 + 009	116	130	111	132	122	220
9154 + 9338	009 + 004	137	128	88	139	123	221
8820 + 9340	044 + 072	113	143	96	140	123	222
9007	046	122	141	94	139	124	223

[0474]

		使用mAb或mAb混合物处理的细胞的代谢活性 (% 未处理的对照)					
mAb或mAb混合物	序列簇(s)	SNU5	OE33	MKN4 5	EBC1	平均	排名
8906 + 8908	056 + 032	93	147	98	157	124	224
9122 + 9212	031 + 025	130	138	110	123	125	225
8908	032	135	134	96	140	126	226
8906 + 9338	056 + 004	119	166	93	129	127	227
9122 + 9146	031 + 036	146	128	109	128	128	228
8906	056	127	153	95	136	128	229
8906 + 9007	056 + 046	84	157	100	172	128	230
9044 + 9096	011 + 018	124	138	98	155	129	231
9122	031	142	134	106	136	130	232
9122 + 9340	031 + 072	146	150	98	125	130	233
8908 + 9007	032 + 046	109	152	101	169	133	234
8906 + 8955	056 + 029	136	167	99	150	138	235

[0475] 实施例3:9006和9338抗体的人源化

[0476] 本实施例描述了9006和9338抗体的鼠抗体构架区的人源化。进行抗体人源化以产生当应用于人时具有最小免疫原性的分子,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。

[0477] 方法

[0478] 使用“CDR移植”方法进行9006和9338抗体的人源化。首先,通过Blast搜索9006(图26)和9338(图27)的V基因序列与小鼠种系V和J基因数据库来鉴定原始鼠种系基因。这表明对于9006的可变重链和可变轻链基因,最接近的小鼠种系基因分别为IGHV9-1\*02/IGHJ4\*01和IGKV8-28\*01/IGKJ2\*01。类似地,对于9338的可变重链和可变轻链基因,最接近的小鼠种系基因分别为IGHV1-4\*01/IGHJ3\*01和IGKV4-79\*01/IGKJ4\*01。第二,将抗体VH和VL基因与鼠种系进行比对以鉴定可能在抗体功能和/或结构中起作用的框架区中的体细胞突变。此类残基可以包括在最终的人源化抗体基因中,作为所谓的“反向突变”残基。然后将9006和9338可变抗体序列与人免疫球蛋白数据库进行Blast搜索,以鉴定其框架区将用于抗体人源化的最接近的人种系。对于抗体9006,对于可变重链和可变轻链基因保留的人种系分别为IGHV7-4-1\*02/IGHJ6\*01和IGKV4-1\*01/IGKJ2\*01。对于抗体9338,对于可变重链和可变轻链基因保留的人种系分别为IGHV1-69\*08/IGHJ1\*01和IGKV3-11\*01/IGKJ2\*01。最后,对于每种抗体,将嵌合抗体的CDR区移植到选定的人框架和J基因区段上。根据IMGT®定义分配CDR序列。

[0479] 结果

[0480] 最终的人源化9006和9338抗体序列分别显示在图28和图29中。



[0481] 实施例4:抗MET参考抗体类似物的克隆

[0482] 本实施例列出了用于产生抗MET参考抗体类似物的氨基酸序列和最终抗体形式的来源。一些列出的抗体已被广泛表征并具有明确定义的表位。一些抗体也进入了临床评估。

[0483] 方法

[0484] 从列出的专利或专利申请中获得编码表4中抗体类似物的可变重链和轻链结构域的氨基酸序列。将蛋白序列反向翻译成具有人密码子使用的DNA序列。将相应的DNA序列进行基因合成并克隆到含有恒定人重链或轻链结构域的表达载体中,导致全长抗体的表达。一个例外是5D5抗体,期表达为Fab片段。选择用于表达的人抗体同种型列在抗体形式列中,连同在适用的Fc区中引入的另外的突变。使用标准蛋白质表达系统用相应的表达质粒转染CHO细胞,除了使用标准杂交瘤培养技术培养的杂交瘤克隆HB-12093。使用标准蛋白A纯化柱层析纯化相应的抗体上清液。

[0485] 表4:基因合成的抗体类似物和相应抗体形式的列表

[0486]	抗体克隆	研究代码	抗体形式	参考文献
	224G11	ABT-700, h224G11	重组 IgG1	EP2014681A1
	223C4	N.A.	重组 IgG1	EP2014681A1
	C8-H241	LY2875358, LA480, emibetuzumab	重组 IgG4 (S228P, F234A, L235A)	WO2010059654A1
	36C4	ARGX-111	重组 IgG1	US2012/0148607A1
	5D5	OA-5D5, MetMAb, onartuzumab	重组 IgG1 Fab	US 7476724 B2
	13-MET	N.A.	重组 IgG1	WO2009/142738 A2

[0487]	抗体克隆	研究代码	抗体形式	参考文献
	28-MET	N.A.	重组 IgG1	WO2009/142738 A2
	HB-12093	N.A.	小鼠杂交瘤	EP 0922102

[0488] 实施例5:MET抗体的表位分组 (binning)

[0489] 本实施例说明了如何基于成对竞争模式,将MET抗体分组到表位组中。属于不同表位组的抗体识别MET细胞外结构域 (ECD) 上的不同表位。

[0490] 方法

[0491] 使用Octet QK384仪器 (ForteBio, USA) 通过Bio-layer Interferometry (BLI) 分析进行成对抗体竞争的研究。在抗人Fc传感器芯片 (ForteBio, USA) 上捕获可商购的人MET Fc融合蛋白 (R&D Systems), 并用赫赛汀阴性对照抗体阻断残留的抗Fc位点。抗原包被的表面用抗MET抗体浓度为80μg/ml饱和,然后在竞争性结合实验中评价成对抗MET抗体组合。通过用10mM甘氨酸-HCl, pH为1.5孵育来再生传感器表面并重新用于新的竞争循环。

[0492] 结果

[0493] 13种测试的MET抗体的竞争模式如图1所示。发现MET抗体在12个不同的表位组中分组。发现抗体Hu9006结合与C8-H241重叠的不同表位。然而,与C8-H241相比表位不同,因为C8-H241也被Hu9338和36C4阻断,而Hu9006没有被阻断。因此,Hu9006和C8-H241被分配到不同的表位组。Hu9338的表位与36C4重叠,且两种抗体均与测试组中的其他抗体显示出相

同的竞争模式,且将这些分配到相同的表位组。

[0494] 在一些情况下,抗体224G11,28-MET,5D5,9206和13-MET显示出单向抑制。这种观察到的现象可以由变构效应引起,并且在反复的竞争实验中观察到。

[0495] 实施例6:MET抗体的HGF配体阻断活性分析

[0496] 本实施例说明如何通过使用Bio-Layer Interferometry分析进行竞争测定来分析抗MET抗体组的HGF配体阻断活性。

[0497] 方法

[0498] 使用Octet QK384仪器 (Fortebio,USA) 通过Bio-Layer Interferometry (BLI) 分析进行HGF配体阻断活性的研究。在抗人Fc传感器芯片 (Fortebio,USA) 上捕获可商购的人MET Fc融合蛋白 (R&D Systems),并用赫赛汀阴性对照抗体阻断残留的抗Fc位点。接下来,抗原包被的表面用抗MET抗体浓度为80 $\mu$ g/ml (533nM) 饱和,除了5D5Fab片段,其被稀释至26.7 $\mu$ g/ml (533nM)。使用抗体进行MET饱和后,通过与20 $\mu$ g/ml (222nM) 测试的人HGF配体 (R&D Systems) 孵育来评估抗体HGF配体阻断活性。赫赛汀 IgG1用作阴性对照抗体。

[0499] 结果

[0500] 竞争分析的结果列于下表5中。发现抗体Hu9006和Hu9338都能抑制HGF配体结合约80%,而5D5Fab发现完全阻断HGF结合(100%)。当等摩尔浓度的Hu9006和Hu9338混合(80 $\mu$ g/ml总浓度,533nM)时,HGF配体结合被抑制约90%。因此,通过将抗体Hu9006和Hu9338 1:1混合,获得更有效的HGF配体阻断活性。发现抗体C8-H241和36C4分别抑制HGF配体结合约80%和75%,而抗体13-MET和28-MET分别阻断了HGF配体结合约80%和50%。激动性抗体5882和阴性对照抗体赫赛汀不阻断HGF结合(3-7%HGF结合抑制)。

[0501] 表5.MET抗体饱和后HGF结合抑制

抗体	%HGF结合抑制
Hu9006	78
Hu9338	81
5882	3
Hu9006+Hu9338	89
C8-H241	81
36C4	74
224G11	20
223C4	69
13-MET	81
28-MET	50
HB-12093	9
5D5Fab	100
12398	84
9206	62
Herceptin	6

[0503] 实施例7:抗MET抗体的表位作图

[0504] 本实施例说明如何通过分析对细胞上表达的嵌合MET构建体的结合,将本发明的

MET抗体的结合表位定位至SEMA- $\alpha$ 区域中的片段 (blade) 2或3。本实施例还说明了与测试的参考抗体类似物相比本发明抗体的表位是如何不同的。

#### [0505] 方法

[0506] 人MET受体由907个氨基酸的细胞外结构域 (残基25-932) 组成。细胞外结构域可以细分为SEMA结构域 (残基27-515), 富含半胱氨酸的PlexinSemaphorin Integrin结构域 (PSI结构域, 残基520-561) 和由以下氨基酸序列定义四个免疫球蛋白样结构域。IPT1:AA 563-655。IPT2:AA 657-739。IPT3:AA 742-836。IPT4:AA 837-932。结构域定义描述于Gherardi et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 100 (21):12039-44 (2003) 和Uniprot entry P08581。SEMA结构域由七个 $\beta$ 片 (blade) 组成, 其折叠成七叶螺旋桨结构 (Stamos J. et al., EMBO J. 23:2325-2335. (2004))。弗林蛋白酶切割位点存在于307-308位, 将SEMA结构域分为 $\alpha$ 和 $\beta$ 链。SEMA- $\alpha$ 结构域由构成片段1-4的氨基酸残基27-307编码, 而SEMA- $\beta$ 结构域由构成片段5-7的氨基酸残基308-515编码。SEMA- $\alpha$ 结构域含有HGF配体的 $\beta$ 链的结合位点, 而HGF $\alpha$ 链的MET结合位点仍然不清楚 (Merchant et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 110 (32): E2987-96 (2013))。单个报道称MET ECD的IPT3和IPT4结构域也介导高亲和力HGF结合 (Basilico et al., J Biol Chem. 283 (30):21267-21277 (2008))。

[0507] 从NCBI下载人MET同种型1的mRNA序列 (ACCESSION NM\_000245.2; 氨基酸序列显示于SEQ ID NO:1)。人MET也存在不同的同种型 (同种型2) 中, 其中19个氨基酸 (STWWKEPLNIVSFLFCFAS (SEQ ID NO:2)) 替代IPT结构域3中的S755。同种型2的氨基酸序列列于SEQ ID NO:2。包括前导肽序列的全长鸡和鼠MET蛋白序列从NCBI (分别为ACCESSION NP\_990543 (SEQ ID NO:3) 和NP\_032617 (SEQ ID NO:4)) 下载。细胞外结构域 (ECD) 的嵌合人/鸡结构域交换变体, 其中每个结构域或亚结构域依次用鸡DNA序列替代, 与完全人, 鼠或鸡MET ECD基因一起进行基因合成。还合成了其中SEMA结构域中的七个片段 (blade) 的每一个依次从人交换为鼠序列的嵌合构建体。

[0508] 用于确定片段结合特异性的构建体如下 (数字表示交换为小鼠序列的序列): 小鼠片段AA 25-83。小鼠片段1-2:AA 25-162。小鼠片段1-3:AA 25-233。小鼠片段1-4:AA 25-295。小鼠片段1-5:AA 25-430。小鼠片段1-6:AA 25-479。小鼠片段1-7:AA 25-513。还制成了反向构建体。小鼠PSI-IPT4: (AA 515-932)。鼠标片段7-IPT4: (AA 480-932)。小鼠片段6-IPT4: (AA 431-932)。小鼠片段5b-IPT4: (AA 382-932)。小鼠片段5a-IPT4: (AA 293-932)。小鼠片段4-IPT4: (AA 234-932)。小鼠片段3-IPT4: (AA 163-932)。小鼠片段2-IPT4: (AA 84-932)。片段1-4位于SEMA- $\alpha$ 亚结构域中, 而片段5-7位于SEMA- $\beta$ 亚结构域中。

[0509] 最近已经描述了其中美洲驼序列与MET SEMA结构域中的人序列交换的其他嵌合构建体 (Basilico C. et al. J. Clin Invest. 124:3172-3186 (2014))。也合成了这些构建体, 但是进行了修改, 即插入小鼠序列而不是美洲驼序列, 因为美洲驼MET序列不是公开可用的。另外的嵌合蛋白的序列定义如下 (AA号表示交换为小鼠序列的序列): LS1:AA25-122, LS2:AA25-224, LS3:AA25-312, LS4:AA25-371, LS5:AA25-473。LS1-3存在于SEMA- $\alpha$ 亚结构域中, 而LS4-6存在于SEMA- $\beta$ 亚结构域中。最后, 合成了其中SEMA- $\alpha$ 亚结构域中的人MET ECD序列的15个AA序列交换为小鼠序列的构建体, 用于线性表位的更详细的作图。对于构建体109-120, 仅11个氨基酸交换成小鼠序列。每个构建体设计为重叠2个氨基酸, 并且制成了具有15 AA取代的共22个构建体, 覆盖人MET SEMA- $\alpha$ 亚结构域片段1之后的序列 (AA 89-313)。

[0510] 将上述合成的所有合成的嵌合或野生型构建体亚克隆到含有SV5肽标签,甘氨酸丝氨酸接头和糖基磷酸肌醇(GPI)锚的编码序列的表达载体中,产生该基因盒的C末端融合至感兴趣的基因(Bouquin T.et al.,J.Biotechnol.125:516-528(2006))。生成的表位构建体用于HEK293细胞的瞬时FreeStyle™转染,且产生的融合蛋白经由GPI锚靶向细胞膜。通过流式细胞术使用iQue® Screener(IntelliCyt corporation)分析MET抗体对转染的细胞的结合。在8点滴定(8-point titration)实验中测试抗体,使用从50μg/ml开始的3倍稀释,并使用抗人IgG(H+L) AlexaFluor® 647染料检测。通过生物素化的抗SV5mAb MCA 1360B监测MET构建体的表达水平,并使用链霉亲和素APC Cy7检测。采用定义为以50μg/ml测试的所有抗体的平均荧光信号对阴性对照鸡或小鼠MET构建体+四倍标准偏差的截断值从结构域交换或片段交换构建体的特异性结合区分背景结合。其中单个氨基酸或15个氨基酸交换为小鼠序列的构建体的抗体结合对以3μg/ml测试的5D5结合标准化,因为突变定位于SEMA-α亚结构域中,并且显示不影响5D5针对SEMA-β亚结构域的结合。

[0511] 结果

[0512] 使用SV5染色评估野生型和嵌合人,鸡或小鼠MET ECD构建体的表面表达水平。所有评估的构建体表达良好并可以使用SV5抗体染色,除了含有鸡SEMA-β亚结构域的构建体。评估了每种MET抗体结合构建体的滴度(数据未显示)。结合不同的测试的嵌合构建体的抗体的总结示于图2中。表6中示出了结合其中SEMA-α亚结构域中的15个AA区段序贯交换为小鼠的人MET ECD构建体结合的差异抗体的总结,而表7中示出了结合SEMA-α亚结构域中的表面暴露残基突变为小鼠序列的人MET ECD构建体的差异抗体的总结,最后,所有的表位发现示于表8中。

[0513] 发现除5D5和224G11之外的所有测试抗体都与SEMA-α亚结构域结合。

[0514] 使用在SEMA-α结构域中引入突变的嵌合构建体的精细表位作图说明了Hu9338结合位于点段2中的线性表位,如通过将序列区段AA 99-113交换为小鼠时(表6)结合的显著缺失所说明的(与5D5相比36%的结合)。Hu9338的表位是不同的,且在测试的MET组中没有发现其他抗体。发现Hu9006与存在于片段3(AA 163-224)中的表位结合。没有单个氨基酸点突变的MET构建体或具有15个AA插入的小鼠MET序列的MET构建体显示出与完全人MET ECD相比显著不同的hu9006结合。因此,与抗MET抗体组的其他成员相比,hu9006的表位是不同的。Hu9338和Hu9006分别与位于片段2和3中的表位结合的发现与这些抗体是非竞争性的并且属于不同的表位组一致。

[0515] 还发现激动抗体5882与片段3结合(AA 163-224),但是与位置F206,D208,H209和P210处的残基接触,如通过将这些位置交换为小鼠序列时,与5D5相比至少50%或更少得结合揭示的。重要的是,这些紧密定位的突变没有显著影响组中的其他抗体的结合,说明5882的强的激动活性与结合由这4个取代定义的区域相关。

[0516] 发现C8-H241抗体与位于片段2和3两者中的表位结合,尽管片段交换构建体显示该抗体结合片段3(AA 163-224)中的重要表位,通过观察到的对其中片段2(AA 119-133)中的15AA或片段3(AA 209-233)中的24 AA交换为小鼠序列时结合的降低(相比于5D5,68-30%的结合),可以获得进一步的表位细化。最后,与片段3中鉴定的接触残基(K223)导致与5D5相比仅19%的结合,表明C8-H241抗体的核心表位位于片段3中。该结果与先前发表的数据很好的一致(Liu L.et al.,Clin.Cancer.Res.20:6059-6070(2014)),其示出了通过HD

Exchange Mass Spectroscopy确定的C8-H241的表位存在于位置123-128,144-156,192-195和220-227。

[0517] 最后,我们能够以更精细的细节定位36C4的表位。尽管Basilico等人(Basilico C.et al.J.Clin Invest.124:3172-3186(2014))描述了36C4的表位存在于片段2和3(AA 98-199),我们现实了特异性可以分为片段2中129-143位的线性表位(与5D5相比58%的结合)和片段3中H209位的接触残基(与5D5相比43%的结合)。H209位的接触残基也与激动5882抗体共享,但由于5882还结合三个其它的紧密定位的接触残基,因此结合和激动特性明显不同。

[0518] 5D5结合SEMA结构域的晶体结构先前已经发表(Merchant M.et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA.110:E2987-E2996(2013)),并且研究显示5D5主要识别SEMA $\beta$ 亚结构域中的片段5和6。位置Q328,R331,L337和N338处的关键氨基酸残基存在于片段5中,且当突变为小鼠残基时,这些显著结合亲和力。该结果与我们的结合分析一致,清楚地表明5D5识别片段5(AA 313-371)中的关键表位。

[0519] 我们还发现与Basilico及其同事提供的信息(Basilico C.et al.J.Clin Invest.124:3172-3186(2014))一致,抗体224G11识别ITP1结构域。

[0520] 表6.抗体对HEK 293细胞上表达的人MET ECD构建体的结合,其中SEMA- $\alpha$ 结构域中的15 AA区段序贯交换为小鼠

[0521]	构建体	Hu9338	Hu9006	C8-H241	36C4	5D5	西妥昔单抗
	MET 99-113	36	112	113	94	100	2
	MET 119-133	131	88	68	107	100	2
	MET 129-143	124	97	77	58	100	2
	MET 209-223	133	114	57	96	100	2
	MET 219-233	130	141	30	109	100	2
	人MET	144	137	135	162	100	1

[0522] 抗体结合表示为5D5结合的百分比。灰色格表示与5D5相比小于70%的抗体结合。

[0523] 表7.抗体对HEK 293细胞上表达的人MET ECD构建体的结合,其中SEMA- $\alpha$ 结构域中的表面暴露残基交换为小鼠

[0524]

构建体	Hu9338	Hu9006	5882	C8-H241	36C4	5D5
F206P	127	96	31	103	104	100
D208G	75	69	39	95	71	100
H209Y	94	90	49	84	43	100
P210S	100	79	18	105	89	100
K223Q	198	112	96	19	127	100
人MET	149	134	96	77	115	100

[0525] 抗体结合表示为5D5结合的百分比。灰色格表示与5D5相比小于50%的抗体结合。

[0526] 表8. 使用细胞表面表达的突变MET构建体对测试的MET抗体鉴定的结合表位的总结

[0527]

抗体	结构域	SEMA 片段	嵌合片段残基 (AA)	线性表位	接触残基	表位组	HGF 阻 断
Hu9338	SEMA- $\alpha$	2	AA 84-122	BL 2 AA 99-113	N.D.	Bin 8	是
C8-H241	SEMA- $\alpha$	2-3	AA 163-224	BL 2 AA 119-133 BL 3 AA 209-233	BL 3 K223	组 7	是
36C4	SEMA- $\alpha$	2-3	AA 84 - 224	BL 2: 129-143	BL 3 H209	组 8	是
Hu9006	SEMA- $\alpha$	3	AA 163-224	N.D.	N.D.	组 6	是
5882	SEMA- $\alpha$	3	AA 163-224	N.D.	BL 3 F206, D208, H209, P210	组 9	否
5D5	SEMA- $\alpha$	5	AA 313-371	N.D.	N.D.	组 4	是
224G11	IPT1	N.A.	AA 562-652	N.D.	N.D.	组 1	是

[0528] 缩写:AA:氨基酸序列.N.A:不适用.N.D:未确定.BL:片段(blade)。

[0529] 实施例8:嵌合和人源化抗MET抗体的亲和力测量

[0530] 该实施例证明抗MET抗体9006和9338的人源化变体具有与其嵌合对应物相当的亲和力,表明人源化抗体具有嵌合抗体的完全功能活性。此外,人源化抗MET抗体显示与人和食蟹猴MET ECD相当的结合。

[0531] 方法

[0532] 在Octet QK384Bio-Layer Interferometry (BLI) 生物传感器 (Fortebio,USA) 或 XPR-36表面等离子体共振 (SPR) 生物传感器 (Bio-Rad,USA) 上进行纯化的人源化和嵌合9006和9338变体的动力学结合分析。

[0533] His标记的人或食蟹猴MET ECD抗原购自Sinobiological,中国。如先前所述(Canziani et al.,Anal Biochem 325 (2):301-307 (2004)),通过在溶液中固定抗MET抗体

并保持单价MET抗原,在单价抗原条件下测量结合动力学。应用最低可能抗MET抗体密度以防止非特异性结合和质量传输限制 (mass transport limitation)。为了在Octet系统上测量抗体动力学,将1.5μg/ml浓度的抗体捕获在抗人Fc感测器 (Fortebio,USA) 上,并测试对系列稀释(两倍七次)的人MET ECD抗原 (100nM) 的结合。以1000rpm的板旋转速度进行测量,并且通过暴露于含有1%BSA和0.001%吐温20的10mM甘氨酸:HCl缓冲液 (pH1.5) 或PBS缓冲液三次之间短暂的5秒间隔再生和重复使用。对于在Bio-Rad XPR-36仪器上进行的表面等离子体共振实验,将抗MET抗体调整为0.25-0.5μg/ml浓度,并在通过固定单克隆抗人Fc抗体 (Biacore,Denmark) 产生的抗人IgG Fc表面上固定。在25nM至1.56nM的2倍浓度范围测试抗MET抗体与人或食蟹猴MET ECD的结合,然后用3M MgCl<sub>2</sub>再生缓冲液 (Biacore,Denmark) 再生表面。记录的结合反应适用于简单的Langmuir 1:1结合模型,用于使用双参考结合率 (kon或ka),解离率 (koff或kd) 和亲和力 (KD) 常数。

[0534] 结果

[0535] 使用Octet生物传感器的动力学测量显示,具有3个反向突变的9006的人源化变体 (Hu9006) 和没有反向突变的9338的人源化变体 (Hu9338) 与嵌合亲本抗体相比,对人MET抗原具有改善的亲和力。

[0536] 表9.通过Bio-Layer Interferometry (BLI) 测量的嵌合和人源化MET抗体对人MET ECD的结合动力学

[0537]	抗体	MET ECD	kon (M-1 s-1)		kon 误差	koff (s-1)		koff 误差	KD (M)
	9006	人	5.4E+04	±	4.4E+02	1.2E-04	±	2.2E-06	2.2E-09
[0538]	hu9006	人	6.2E+04	±	6.8E+02	7.6E-05	±	3.1E-06	1.2E-09
	9338	人	1.9E+05	±	2.7E+03	1.1E-04	±	4.0E-06	6.0E-10
	hu9338	人	1.0E+05	±	2.0E+03	2.7E-05	±	3.6E-06	2.6E-10

[0539] 使用Bio-Rad XPR36SPR仪器的动力学测量表明,Hu9006和Hu9338以PM范围内的亲和力识别人和食蟹猴MET ECD两者 (表10)。

[0540] 表10.通过表面等离子体共振 (SPR) 测量的人源化MET抗体与人或食蟹猴MET ECD的结合动力学。

[0541]

抗体	MET ECD	kon (M-1 s-1)		kon Error	koff (s-1)		koff Error	KD (M)
hu9006	人	1.9E+05	±	1.2E+03	1.1E-05	±	2.3E-07	5.5E-11
hu9006	食蟹猴	1.8E+05	±	1.5E+03	1.6E-05	±	2.9E-07	8.6E-11
hu9338	人	4.7E+05	±	1.9E+02	6.3E-06	±	3.7E-07	1.4E-11
hu9338	食蟹猴	7.4E+05	±	2.2E+03	5.4E-05	±	3.6E-07	7.4E-11

[0542] 实施例9:使用抗MET抗体对MET的降解

[0543] 本实施例证明了抗MET抗体9006和9338单独和组合诱导MET降解。两种抗体的组合比单独的抗体诱导MET受体的更有效的降解。

[0544] 方法

[0545] 为了研究由个体抗MET抗体9006和9338,9006和9338的混合物以及C8-H241类似物诱导的MET受体降解的水平(参见表4),用抗体处理24或48小时的SNU5,EBC1和MKN45细胞的细胞裂解物进行Western印迹或Simple Western分析。简言之,细胞在T-75培养瓶中生长,当50%汇合时,除去培养基,洗涤细胞并使用20μg/ml总抗体浓度的C8-H241,9006,9338,9338+9006或阴性对照抗体(针对非哺乳动物靶标的人IgG1)在37℃的湿润培养箱中在37℃处理24或48小时。使用标准RIPA缓冲液制备全细胞裂解物。使用BCA测定确定总蛋白浓度,并通过在Sally仪器(ProteinSimple)上的Simple Western自动免疫测定或通过使用针对MET的初级检测抗体的Western印记分析来分析1-10μg蛋白。将抗β-激动蛋白的抗体用作加载对照用于Western印记分析。

[0546] 结果

[0547] Western印迹研究的结果(图3)显示在所有测试的细胞系中使用个体抗体(特别是9006)的治处理诱导MET的一些降解。然而,在所有测试的细胞系中,与个体抗体(9006或9338)相比,抗MET抗体混合物9338+9006诱导增强的MET受体降解。在三个细胞系SNU 5,EBC和MKN45中,通过Simple Western分析比较24小时后或使用9006+9338或C8-H241处理的细胞MET受体水平。图4所示的结果证明了在所有三种细胞系中用9006+9338处理后增强的MET降解。

[0548] 实施例10:使用抗MET抗体对MET磷酸化和下游信号传导的抑制

[0549] 本实施例证明抗MET抗体9006和9338对MET磷酸化和下游信号传导(通过pERK2和pAKT的水平确定)具有差异和细胞系依赖性效果。抗MET抗体混合物9006+9338诱导对MET磷酸化和下游信号传导的有效抑制。

[0550] 方法

[0551] 为了研究由抗MET抗体9006和9338以及抗MET抗体混合物9006+9338诱导的MET磷酸化和下游信号传导的抑制水平,对用抗体处理24小时的MKN45和EBC-1细胞的全细胞裂解物进行Simple Western分析。细胞在6孔板中生长。当50%汇合时,除去培养基,并将细胞在



1xPBS中洗涤并用20 $\mu$ g/ml总抗体浓度(9006,9338,9006+9338或阴性对照抗体Synagis®)在湿润培养箱中在37℃处理24小时。使用标准RIPA缓冲液制备全细胞裂解物。使用BCA测定确定总蛋白浓度,并使用Sally仪器(自动化基于大小的免疫测定系统,ProteinSimple)和通过使用针对磷酸化MET(Tyr1234/1235和Tyr1349),磷酸化ERK2(pERK2)和磷酸化AKT(pAKT)的一抗分析约1mg/ml蛋白。使用针对 $\beta$ 肌动蛋白的抗体作为加载对照(数据未显示)。

#### [0552] 结果

[0553] MET(图5)和ERK和AKT(图6)的磷酸化水平的Simple Western分析结果显示,在测试的细胞系中用9006或9338单独的处理诱导对磷酸化的差异和细胞系依赖性效果。然而,在MKN45和EBC-1细胞两者中,与使用单克隆抗MET抗体9006或9338的处理相比,抗MET抗体混合物9006+9338诱导了MET磷酸化和下游信号传导的有效抑制。

#### [0554] 实施例11:嵌合抗MET抗体在原代内皮细胞中的抗增殖效果

[0555] 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)是适用于评估敏感血管模型中的生物学效应的原代内皮细胞。显示抗MET抗体9006和9338以及抗体混合物9006+9338能够在MET配体HGF不存在和存在下抑制HUVEC的生长。

#### [0556] 材料和方法

[0557] 将真皮成纤维细胞解冻并在接种培养基中接种于96孔板中。在室温下沉降成纤维细胞后,将GFP标记的HUVEC小瓶解冻。将重悬于接种培养基中的HUVEC加入到成纤维细胞悬液的顶部,并在Incucyte仪器(Essen Bioscience)中在37℃和5%CO<sub>2</sub>下孵育过夜。孵育过夜后,除去来自共培养细胞的培养基,并使用生长培养基代替24小时。第二天,制备测定培养基,并将不同的配体/抗体混合物组合并混合到测定培养基中。除去生长培养基并用含有抗体/配体的不同组合的测定培养基代替。每两至三天将培养基交换为含有抗体/配体混合物的新鲜测定培养基。每四小时记录GFP-HUVEC的图像。使用Incucyte软件分析几个细胞参数,包括细胞数量,细胞网络长度和网络分支点数。

#### [0558] 结果

[0559] 图7-11显示抗体9006和9338抗体,与不显示任何抑制作用的不相关抗体对照相反,特异性抑制原代内皮细胞增殖的效力。抗体混合物9006+9338表现出对HUVEC增殖的更好的抑制,特别是当培养基中存在HGF时。

#### [0560] 实施例12:嵌合和人源化抗MET抗体的体外比较

[0561] 本实施例描述了嵌合9006,嵌合9338和嵌合9338+9006与人源化变体即人源化9006(Hu9006),人源化9338(Hu9338)和人源化9338+9006(Hu9338+Hu9006)的体外比较。评估单克隆抗体和混合物它们抑制几种癌细胞系生长的能力:Okajima,EBC1,MKN45,HCC827R1\_cet#3,HCC827R1\_cet#1和KatoII。

#### [0562] 方法

[0563] 9006,9338,9338+9006(两种组分的1:1混合物),Hu9006,Hu9338和Hu9338+Hu9006(两种组分的1:1混合物)连同阴性对照抗体(Synagis®)在补充有2%FBS和1%P/S的RPMI 1640Glutamax培养基中稀释至100 $\mu$ g/ml的最终总抗体浓度,得到在含有最高抗体浓度的孔中终浓度为25 $\mu$ g/ml。然后进行抗体的两倍连续稀释,产生多达17种不同的浓度。相关数量的细胞(Okajima:1000个细胞/孔,EBC1:750个细胞/孔,MKN45:500个细胞/孔,HCC827R1\_

cet#3:500个细胞/孔,HCC827R1\_cet#1:500个细胞/孔;KatoII:750个细胞/孔)加入到384孔板中的实验孔中,并在加湿培养箱中在37℃与抗体孵育4天。随后将WST-1试剂添加至板并在37℃下孵育1小时。使用ELISA读数器在450nm和620nm(参考波长)测量吸光度。从450nm的吸光度减去620nm处的吸光度,并且如实施例2所述以未处理对照的百分比计算代谢活性细胞的量(MAC)。

[0564] 结果

[0565] 图12和13描绘了嵌合和人源化9006和9338抗体以及嵌合和人源化9006+9338抗体混合物对细胞系HCC827R1\_cet#3(12A),HCC827R1\_cet#1(12B),MKN45(12C),EBC-1(13A),KatoII(13B)和Okajima(13C)的滴定的存活力结果。从图中可以看出Hu9006,Hu9338和Hu9338+Hu9006具有与其嵌合体相当的抗增殖效果。

[0566] 实施例13:人源化9338+9006和13-MET+28-MET的体外比较

[0567] 本实施例描述了人源化9338+9006(Hu9338+Hu9006),13-MET,28-MET和13-MET+28-MET的体外测试(见表4)。评估单克隆抗体和混合物抑制四种癌细胞系的生长的能力:EBC1,MKN45,SNU5和KatoII。

[0568] 方法

[0569] 如上文所述,测试了抗体Hu9338+Hu9006(两种组分的1:1混合物),13-MET,28-MET和13-MET+28-MET(两种组分的1:1混合物)以及阴性对照抗体(Synagis®)在EBC1(500个细胞/孔),MKN45(750个细胞/孔),SNU5(750个细胞/孔)和KatoII(750个细胞/孔)中的抗代谢效果。

[0570] 结果

[0571] Hu9338+Hu9006,13-MET,28-MET和13-MET+28-MET抗体对细胞系EBC1,MKN45,SNU5和KatoII的滴定的存活力结果示于图14中。显然,取决于测试的细胞系,抗MET抗体具有不同的功效和效力水平。然而,在测试的所有细胞系中相比于13-MET,28-MET和13-MET+28-MET,Hu9338和Hu9006的组合显示出对代谢活性更好的抑制。

[0572] 实施例14:嵌合9006+9338抗体混合物在人EBC-1肿瘤异种移植模型中的体内效力

[0573] 本实施例证明了9006+9338抗体混合物在人MET扩增的非小细胞肺癌细胞系EBC-1的异种移植中的体内效力。

[0574] 方法

[0575] 将 $5 \times 10^6$ 个EBC-1细胞皮下接种到8-9周龄的雌性无胸腺裸鼠的侧腹中。通过卡尺在两个维度上每周测量3次肿瘤,并根据以下公式计算肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ):(宽度) $^2 \times$ 长度 $\times 0.5$ 。在平均肿瘤大小为 $120\text{mm}^3$ 时,小鼠随机分组并开始处理。通过腹膜内注射媒介物缓冲液(10mM柠檬酸钠,150mM氯化钠,pH 6.0),单克隆抗体9006,单克隆抗体9338,或单克隆抗体9006+9338的1:1混合物,每周处理小鼠三次共十次处理,随后是观察期。所有的抗体处理以50mg/kg总抗体浓度施用。因此,9006和9338处理的动物分别给予50mg/kg的9006或9338,而用9006+9338处理的动物给予含有25mg/kg每种抗体的混合物。

[0576] 结果

[0577] 在接种后第10天,平均肿瘤大小为 $120\text{mm}^3$ ,将小鼠随机分成4组,每组8只动物并开始处理。如图15所示,与媒介物对照相比,使用单克隆抗体9338的处理不影响动物的肿瘤生长。相比之下,9006处理导致肿瘤生长延迟,而9006+9338处理在处理期间诱导生长稳定,并

且优于所有其他处理方案。在处理周期期间由于肿瘤过度生长(outgrowth)或肿瘤相关的溃疡,用媒介物或9006或9338单独处理的组的研究被关闭,而9006+9338组中的动物完成处理并在处理结束后观察两至三周。

[0578] 实施例15:增加剂量的嵌合9006+9338抗体混合物在人EBC-1肿瘤异种移植模型中的体内效力

[0579] 本实施例证明了增加剂量的9006+9338抗体混合物在人MET扩增的非小细胞肺癌细胞系EBC-1的异种移植中的体内效力。

[0580] 方法

[0581] 将 $5 \times 10^6$ 个EBC-1细胞皮下接种到8-9周龄的雌性无胸腺裸鼠的侧腹。通过卡尺在两个维度上每周测量3次肿瘤,根据以下公式计算肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ): (宽度) $^2 \times$ 长度 $\times 0.5$ 。在平均肿瘤大小为 $150\text{mm}^3$ ,将小鼠随机分组并开始处理。通过腹膜内注射媒介物缓冲液(10mM柠檬酸钠,150mM氯化钠,pH 6.0)或单克隆抗体9006+9338的1:1混合物,每周处理小鼠三次,共十次处理,随后是观察期。以50,25,5或1mg/kg总抗体浓度每次注射剂量施用9006+9338的1:1混合物。

[0582] 结果

[0583] 在接种后第11天,平均肿瘤大小为 $120\text{mm}^3$ ,将小鼠随机分成5组,每组10只动物,并开始处理。如图16所示,与媒介物对照处理的动物相比,用最低浓度的9006+9338(1mg/kg)处理的动物的肿瘤生长不受影响。用5mg/kg 9006+9338处理导致在较晚时间点的肿瘤生长延迟,而用25或50mg/kg 9006+9338的处理诱导了与生长稳定相当的强肿瘤抑制水平。

[0584] 实施例16:嵌合9006+9338抗体混合物在人MKN-45肿瘤异种移植模型中的体内效力

[0585] 本实施例证明了9006+9338抗体混合物在人MET扩增的胃癌细胞系MKN-45的异种移植中的体内效力。

[0586] 方法

[0587] 将 $5 \times 10^6$ 个MKN-45细胞皮下接种到8-9周龄的雌性无胸腺裸鼠的侧腹。通过卡尺在两个维度上每周测量3次肿瘤,根据以下公式计算肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ): (宽度) $^2 \times$ 长度 $\times 0.5$ 。在平均肿瘤大小为 $80\text{mm}^3$ 时,将小鼠随机分组并开始处理。通过腹膜内注射媒介物缓冲液(10mM柠檬酸钠,150mM氯化钠,pH 6.0),单克隆抗体9006,单克隆抗体9338,或单克隆抗体9006+9338的1:1混合物,每周处理小鼠三次,共十次处理,随后是观察期。所有抗体处理以50mg/kg总抗体浓度施用。因此,9006和9338处理的动物分别给予50mg/kg的9006或9338,而用9006+9338处理的动物给予含有25mg/kg每种抗体的混合物。

[0588] 结果

[0589] 在接种后第10天,平均肿瘤大小为 $80\text{mm}^3$ ,将小鼠随机分成4组,每组8只动物,并开始处理。如图17所示,与用媒介物对照处理的动物相比,使用单克隆抗体9006或9338单独处理的动物中的肿瘤生长被轻微抑制。相比之下,使用9006+9338处理在处理期间诱导生长稳定,并且优于该模型中的所有其他处理。在处理期间由于肿瘤过度生长或肿瘤相关的溃疡,用媒介物或9006单独处理组的研究关闭,而9338和9006+9338组中的动物完成处理。9006+9338组在处理结束后观察2周,且大部分时间内保持生长稳定。

[0590] 实施例17:嵌合9006+9338抗体混合物在人SNU5肿瘤异种移植模型中的体内效力

[0591] 本实施例证明9006+9338抗体混合物在人MET扩增的胃癌细胞系SNU5的异种移植中的体内效力。

[0592] 方法

[0593] 将 $1 \times 10^7$ 个SNU5细胞皮下接种到8-9周龄的雌性无胸腺裸鼠的侧腹。通过卡尺在两个维度上每周测量3次肿瘤,根据以下公式计算肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ):  $(\text{宽度})^2 \times \text{长度} \times 0.5$ 。在平均肿瘤大小为 $165 \text{mm}^3$ 时,将小鼠随机分组并开始处理。通过腹膜内注射媒介物缓冲液(10mM柠檬酸钠,150mM氯化钠,pH6.0),单克隆抗体9006,单克隆抗体9338,或单克隆抗体9006+9338的1:1混合物,每周处理小鼠三次,共十次处理,随后是观察期。所有抗体处理以50mg/kg总抗体浓度施用。因此,9006和9338处理的动物分别给予50mg/kg的9006或9338,而用9006+9338处理的动物给予含有25mg/kg每种抗体的混合物。

[0594] 结果

[0595] 在接种后第15天,平均肿瘤大小为 $165 \text{mm}^3$ ,将小鼠随机分成四组,每组8只动物,并开始处理。如图18所示,与用媒介物对照处理的动物相比,用单克隆抗体9006或9338或9006+9338抗体混合物处理的动物中观察到肿瘤消退。用9006或9006+9338处理优于用9338处理,并且在9006和9006+9338处理组中在处理结束后肿瘤消退保持超过50天。

[0596] 实施例18:嵌合9006+9338抗体混合物在人肝细胞癌患者来源的异种移植模型中的体效力

[0597] 本实施例证明了9006+9338抗体混合物在人肝细胞癌(HCC)患者来源的异种移植模型(LI1037)中的体内效力。

[0598] 方法

[0599] 模型LI1037的肿瘤来源源自肝癌患者肿瘤,其然后皮下保留在裸鼠中。将肿瘤切成 $3 \text{mm}^3$ 片段,且每个片段皮下植入每只小鼠的一侧前侧腹。当肿瘤达到 $220 \text{mm}^3$ 平均体积时,将动物随机分入处理组。通过腹膜内注射媒介物缓冲液(10mM柠檬酸钠,150mM氯化钠,pH6.0),或单克隆抗体9006+9338的1:1混合物,每周处理小鼠三次,共十次处理,随后是观察期。所有抗体处理以50mg/kg总抗体浓度施用。因此,用9006+9338处理的动物给予含有25mg/kg每种抗体的混合物。

[0600] 结果

[0601] 在接种后第21天,平均肿瘤大小为 $220 \text{mm}^3$ ,将小鼠随机分成两组,每组四只动物,并开始处理。如图19所示,与用媒介物对照处理的动物相比,用9006+9338抗体混合物处理的动物观察到肿瘤生长抑制。

[0602] 实施例19:嵌合和人源化抗体混合物在人EBC-1肿瘤异种移植模型中的体内比较

[0603] 在本实施例中,在人MET扩增的非小细胞肺癌细胞系EBC-1的异种移植中比较了嵌合9006+9338和人源化Hu9006+Hu9338抗体混合物的体内效力。

[0604] 方法

[0605] 将 $5 \times 10^6$ 个EBC-1细胞皮下接种到8-9周龄雌性无胸腺裸鼠的侧腹。通过卡尺在两个维度上每周测量3次肿瘤,根据以下公式计算肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ):  $(\text{宽度})^2 \times \text{长度} \times 0.5$ 。在接种后20天,在平均肿瘤大小为约 $130 \text{mm}^3$ 时,将小鼠随机分为三组,每组10只动物,并开始处理。通过每周三次总共十次腹膜内注射媒介物缓冲液,嵌合9006+9338的1:1混合物或人源化9006+9338(Hu9006+Hu9338)的1:1混合物处理小鼠,随后是观察期。所有抗体处理以

50mg/kg总抗体浓度施用。因此,使用9006+9338和Hu9006+Hu9338处理的动物给予含有25mg/kg每种抗体的混合物。

[0606] 结果

[0607] 如图20所示,与用媒介物对照处理的动物相比,使用9006+9338和Hu9006+Hu9338处理的动物中观察到肿瘤消退。Hu9006+Hu9338和9006+9338的肿瘤抑制效果似乎高度相似。

[0608] 实施例20:人OE33肿瘤异种移植模型中嵌合和人源化抗体混合物的体内比较

[0609] 在本实施例中,在人MET扩增食管胃癌细胞系OE33的异种移植中比较嵌合9006+9338和人源化Hu9006+Hu9338抗体混合物的体内效力。

[0610] 方法

[0611] 将OE33肿瘤从先前建立的肿瘤连续移植。肿瘤在研究期间已传代八次。将测量约1mm<sup>3</sup>的肿瘤片段皮下移植到8-9周龄雌性无胸腺裸鼠的侧腹。通过卡尺在两个维度上每周测量3次肿瘤,根据以下公式计算肿瘤体积(mm<sup>3</sup>): (宽度)<sup>2</sup>×长度×0.5。在接种后第30天,平均肿瘤大小为200mm<sup>3</sup>时,将小鼠随机分组到三组,每组七只动物,并开始处理。通过腹膜内注射媒介物缓冲液,嵌合9006+9338的1:1混合物或人源化9006+9338 (Hu9006+Hu9338) 的1:1混合物处理小鼠,每周处理小鼠三次,共十次处理,随后是观察期。所有抗体处理以30mg/kg总抗体浓度施用。因此,使用9006+9338和Hu9006+Hu9338处理的动物给予含有15mg/kg每种抗体的混合物。

[0612] 结果

[0613] 如图21所示,与媒介物对照处理的动物相比,用9006+9338和Hu9006+Hu9338处理的动物中观察到肿瘤消退,并且生长曲线高度相似。

[0614] 实施例21:人肿瘤异种移植模型中单克隆抗体C8-H241和Hu9006+Hu9338抗体混合物的体内比较

[0615] 在该实施例中,在人MET扩增的非小细胞肺癌细胞系EBC-1和人MET扩增的胃癌细胞系Hs746T(其还含有MET外显子14缺失)的异种移植中比较了Hu9006+Hu9338抗体混合物和比较单克隆抗体C8-H241(参见表4)的体内效力。

[0616] 方法

[0617] 将 $5 \times 10^6$ 个EBC-1细胞或 $3.7 \times 10^6$ 个Hs746T细胞皮下接种到雌性无胸腺小鼠的侧腹。通过卡尺在两个维度上每周测量3次肿瘤,根据以下公式计算肿瘤体积(mm<sup>3</sup>): (宽度)<sup>2</sup>×长度×0.5。对于EBC-1平均肿瘤大小为140mm<sup>3</sup>,而对于Hs746T为120mm<sup>3</sup>,将小鼠随机分组并开始处理。

[0618] EBC-1的处理方案:通过每周三次总共十次腹膜内注射媒介物缓冲液,单克隆抗体C8-H241,或单克隆抗体Hu9006+Hu9338的1:1混合物处理小鼠,随后是观察期。在观察21天后,C8-H241组的剩余小鼠用Hu9006+Hu9338每周三次再处理,直到肿瘤细胞接种后第139天研究终止。

[0619] Hs746T的处理方案:通过每周三次总共十次腹膜内注射媒介物缓冲液,单克隆抗体C8-H241,单克隆抗体Hu9006,单克隆抗体Hu9338,或单克隆抗体Hu9006+Hu9338的1:1混合物处理小鼠。在一周观察期后,Hu9006,Hu9338和C8-H241组的剩余小鼠用Hu9006+Hu9338的单次剂量再处理,并观察9天。

[0620] 所有抗体治疗以50mg/kg总抗体浓度给药。因此,C8-H241,Hu9006和Hu9338处理的动物给予50mg/kg抗体,而用Hu9006+Hu9338处理的动物给予含有25mg/kg每种抗体的混合物。

[0621] 结果

[0622] EBC-1:在接种后第15天,平均肿瘤大小为140mm<sup>3</sup>,将小鼠随机分为三组,每组10只动物,并开始处理。如图22中所示,与用媒介物对照处理的动物相比,用C8-H241处理的小鼠中观察到受限的反应。相比之下,使用Hu9006+Hu9338的处理诱导肿瘤消退。在最后一次给药21天后,平均肿瘤体积为500mm<sup>3</sup>,C8-H241处理组中的剩余小鼠用Hu9006+Hu9338再处理。图22还显示,在二次治疗时小鼠对肿瘤消退响应。

[0623] Hs746T:在接种后第35天,平均肿瘤大小为120mm<sup>3</sup>,将小鼠随机分成5组,每组8只动物,并开始处理。如图23中所示,与用媒介物对照处理的动物相比,在使用C8-H241,Hu9006或Hu9338处理的小鼠中观察到有限的初始抑制反应,但在治疗周期的大约一半肿瘤开始重新生长。相比之下,使用Hu9006+Hu9338的处理在所有8只小鼠中均诱导肿瘤消退和完全的肿瘤消除。在最后一次给药后九天,C8-H241,Hu9006和Hu9338处理组中剩余的小鼠用单次剂量的Hu9006+Hu9338再处理。图23还显示,在二次治疗时小鼠对肿瘤消退响应。

[0624] 实施例22:在四种人患者衍生的异种移植模型中单克隆抗体C8-H241和Hu9006+Hu9338抗体混合物的体内比较

[0625] 在本实施例中,在四种人MET扩增的非小细胞肺癌(NSCLC)患者衍生的异种移植中比较了Hu9006+Hu9338抗体混合物和比较单克隆抗体C8-H241(参见表4)的体内效力。

[0626] 方法

[0627] 每只小鼠在侧腹皮下接种来自模型LXFA0526,LU0858,LU1901或LU2503的原代NSCLC组织片段(直径2-3mm)用于肿瘤发生。通过卡尺在两个维度上每周测量两次肿瘤,根据以下公式计算肿瘤体积(mm<sup>3</sup>):(宽度)<sup>2</sup>×长度×0.5。

[0628] 当平均肿瘤大小达到100-200mm<sup>3</sup>时,将小鼠随机分为三组(每组n=5至8只小鼠)并开始处理。每周三次总共十次腹膜内注射C8-H241单克隆抗体,Hu9006+Hu9338抗体混合物(以相等比率混合的单个单克隆抗体)或媒介物缓冲液对照处理小鼠,随后是长达三周的观察期。

[0629] 所有抗体处理以50mg/kg总抗体浓度给药。因此,C8-H241处理的动物给予50mg/kg抗体,而用Hu9006+Hu9338处理的动物给予含有25mg/kg每种抗体的混合物。

[0630] 结果

[0631] 如图24中所示,在C8-H241处理的4种模型中观察到不同的反应。相比之下,Hu9006+Hu9338处理在所有4种模型中诱导肿瘤消退,与C8-H241相比具有优越的效力和/或延迟的进展时间。C8-H241先前被报道在不同的MET扩增的原代MET扩增异种移植NSCLC模型(LXFA-1647)中非常有效(Liu et al.Clin Cancer Res.20:6059-6070(2014))。

[0632] 实施例23:在人肿瘤异种移植模型中,Hu9006+Hu9338抗体混合物的均衡和偏态比率组成的体内比较

[0633] 在本实施例中,在人MET扩增的非小细胞肺癌细胞系EBC-1的异种移植中比较由不同比率的两种抗体Hu9006和Hu9338组成的混合物的体内效力。

[0634] 方法

[0635] 将 $5 \times 10^6$ 个EBC-1细胞皮下接种到8-9周龄的雌性无胸腺裸鼠的侧腹。通过卡尺在两个维度上每周测量两次肿瘤并根据以下公式计算以 $\text{mm}^3$ 计的肿瘤体积： $(\text{宽度})^2 \times \text{长度} \times 0.5$ 。在接种后第13天，在平均肿瘤大小为 $150\text{mm}^3$ ，将小鼠随机分为三组，每组10只动物，并开始处理。每周三次总共十次腹膜内注射媒介物缓冲液，单克隆抗体Hu9006+9338的1:1, 1:2或2:1偏态比率混合物处理小鼠，然后是观察期。抗体处理以50mg/kg给药，或者对于偏态比率混合物，10mg/kg总抗体浓度如下：1:1比率给药的动物使用含有25mg/kg的每种抗体的混合物给药。1:2比率给药的动物使用含有3mg/kg Hu9006和7mg/kg Hu9338的混合物以总剂量10mg/kg给药，或者使用含有17mg/kg Hu9006和33mg/kg Hu9338的换何物以总剂量50mg/kg给药。类似的，2:1比率给药的动物使用含有7mg/kg Hu9006和3mg/kg Hu9338的混合物以总剂量10mg/kg给药，或者使用含有33mg/kg Hu9006和17mg/kg Hu9338的换何物以总剂量50mg/kg给药。

[0636] 结果

[0637] 如图25所示，以均衡和偏态比率和两种剂量的Hu9006+Hu9338处理诱导肿瘤消退。对于所有测试的抗体处理，肿瘤消退的水平似乎相似，表明Hu9006+Hu9338在均衡和偏态的单一抗体组合物下产生强健且一致的肿瘤生长抑制。

[0638] 表11:SEQ ID NO图表

SEQ ID NO	序列
1	人 MET 同种型 1 氨基酸序列
2	人 MET 同种型 2 氨基酸序列
3	鸡 MET 氨基酸序列
4	鼠 MET 氨基酸序列
5	嵌合 9006 重链可变结构域核酸序列
6	嵌合 9006 重链可变结构域氨基酸序列
7	嵌合 9006 轻链可变结构域核酸序列
8	嵌合 9006 轻链可变结构域氨基酸序列
9	嵌合 9338 重链可变结构域核酸序列
10	嵌合 9338 重链可变结构域氨基酸序列
11	嵌合 9338 轻链可变结构域核酸序列
12	嵌合 9338 轻链可变结构域氨基酸序列
[0639] 13	人源化 9006 重链可变结构域核酸序列
14	人源化 9006 重链可变结构域氨基酸序列
15	人源化 9006 轻链可变结构域核酸序列
16	人源化 9006 轻链可变结构域氨基酸序列
17	人源化 9338 重链可变结构域核酸序列
18	人源化 9338 重链可变结构域氨基酸序列
19	人源化 9338 轻链可变结构域核酸序列
20	人源化 9338 轻链可变结构域氨基酸序列
21	9006 重链 CDR1 氨基酸序列
22	9006 重链 CDR2 氨基酸序列
23	9006 重链 CDR3 氨基酸序列
24	9006 轻链 CDR1 氨基酸序列
25	9006 轻链 CDR2 氨基酸序列
26	9006 轻链 CDR3 氨基酸序列
27	9338 重链 CDR1 氨基酸序列
28	9338 重链 CDR2 氨基酸序列
29	9338 重链 CDR3 氨基酸序列
30	9338 轻链 CDR1 氨基酸序列
31	9338 轻链 CDR2 氨基酸序列
[0640] 32	9338 轻链 CDR3 氨基酸序列
33	人源化 9006 轻链氨基酸序列
34	人源化 9006 重链氨基酸序列
35	人源化 9338 轻链氨基酸序列
36	人源化 9338 重链氨基酸序列

[0641] 序列表

[0642] SEQ ID NO:1 (人MET同种型1氨基酸序列) :

[0643] MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVILHEHHIFLGATNY  
IYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFPQCDCSSKANLSGGVWKDNINMALVVDITYDDQLISCGSVNRGTCQRHVF  
PHNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHPHLSISVRRLKETK  
DGFMTLDQSYIDVLPEFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDQTFHTRIIRFCSINSLHSYMEMPLECIL  
TEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSKPGAQLARQIGASLNDLILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPKIYVNDFFNKI



VNKNVRLQHFYGPNEHCFNRTLNRSSGCEARRDEYRTEFTALQRVDLFMGQFSEVLLTSISTFIKGLTIAN  
LGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLDSHPVSPEVIVEHTLNQNGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLS  
APPFVQCGWCHDKCVRSEECLSGTWTQQICLPAIYKVPNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNE  
SCTLTLESTMTLTKCTVGPAMNKHFNMSIIISNGHGTQYSTFSYVDPVITSISPKYGPMAGGTLLTLTGNYLNSG  
NSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEFAVKLKIDLANRETSIFSYPREDPIVEIHPTKSFISGGSTITG  
VGKNLNSVSVPRMVINVHEAGRNFVACQHRNSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIYVHNP  
VFKPFEPVMISMGNEVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGKSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSLNIEWKQAIS  
STVLGKVIVQPDQNFGLIAGVVSISTALLLLGGFFLWLKKRKQIKDLGSELVRYDARVHTPHLDRLVSARSVSPTT  
EMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGSCRQVQYPLTDMSPILTSQSDISSPLLQNTVHIDLSALNPELVQAVQHVV  
IGPSSLI VHFNEVIGRGHFGCVYHGTLLDNDGKKIHCAVKSLNRITDIGEVSQFLTEGIIMKDFSHPNVLSLLGICL  
RSEGSPLVVLPMKHGDLRNFIRNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYASKKFVHRDLAARNCMLDEKFTVKVADFG  
LARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESQTQKFTTKSDVWSFGVLLWELMTRGAPPYPDVNTFDITVYLLQGRR  
LLQPEYCPDPLYEVMKLCWHPKAEMRPSFSELVSRISAI FSTFIGEHYVHV NATYVNVKCVAPYPSLLSSEDNADDE  
VDTRPASFWETS

[0644] SEQ ID NO:2 (人MET同种型2氨基酸序列):

[0645] MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVILHEHHIFLGATNY  
IYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFCQDCSSKANLSGGVWKDNINMALVVDYDDQLISCGSVNRGTCQRHVF  
PHNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHLHSISVRRLKETK  
DGMFLTDQSYIDVLEPFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDATFHTRIIRFCSINSLHSYMEMPLECIL  
TEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSKPGAQLARQIGASLNDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPKIYVNDFFNKI  
VNKNVRLQHFYGPNEHCFNRTLNRSSGCEARRDEYRTEFTALQRVDLFMGQFSEVLLTSISTFIKGLTIAN  
LGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLDSHPVSPEVIVEHTLNQNGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLS  
APPFVQCGWCHDKCVRSEECLSGTWTQQICLPAIYKVPNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNE  
SCTLTLESTMTLTKCTVGPAMNKHFNMSIIISNGHGTQYSTFSYVDPVITSISPKYGPMAGGTLLTLTGNYLNSG  
NSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEFAVKLKIDLANRETSIFSYPREDPIVEIHPTKSFISTWWKEPL  
NIVSFLFCFASGGSTITGVGNLNSVSVPRMVINVHEAGRNFVACQHRNSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFF  
MLDGILSKYFDLIYVHNPVFKPFEPVMISMGNEVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGKSCENIHLHSEAVLCTVPN  
DLLKLNSLNIEWKQAISSTVLGKVIVQPDQNFGLIAGVVSISTALLLLGGFFLWLKKRKQIKDLGSELVRYDARV  
HTPHLDRLVSARSVSPTTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGSCRQVQYPLTDMSPILTSQSDISSPLLQNTVH  
IDLSALNPELVQAVQHVVIGPSSLI VHFNEVIGRGHFGCVYHGTLLDNDGKKIHCAVKSLNRITDIGEVSQFLTEGI  
IMKDFSHPNVLSLLGICLRSEGSPLVVLPMKHGDLRNFIRNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYASKKFVHRDLA  
ARNCMLDEKFTVKVADFG LARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESQTQKFTTKSDVWSFGVLLWELMTRGAPP  
YPDVNTFDITVYLLQGRRLQPEYCPDPLYEVMKLCWHPKAEMRPSFSELVSRISAI FSTFIGEHYVHV NATYVNVK  
CVAPYPSLLSSEDNADDEVDTRPASFWETS

[0646] SEQ ID NO:3 (鸡MET氨基酸序列):

[0647] MKPVTAYPSGIILFLFALLQRSHGCKEAAKKSEMNLNVKYDLPNFITETPIQNVVLYKHHVYIGAVNK  
IYVLNETLQNISVYKTGPILSPGCAPCEDCKDKANLSNSVWKDNVNMALLLETYYDDQLISCGSVSGGVCHRHIIP  
PDNPADIESEVHC MYSPQVDGEADNCPDCVVS TLGTVLVTEKDRFVNFFVGNTMTSAFQPPHVLHSISVRRLKETQ  
DGFELTDQSYIDILPQFRDSYPIKYVHAFEDHDFVYFLTVQRESLDSQTFHTRIIRFCTLDSEMRSYMEMPLECIF

TEKRRKRSIRKEVFNILQAAYVSKPGAALAHMGLGLIDDLILYGVFAQTNPQIPQEPNRSACVAVSVRTINEFFNKI  
VDKQNMKCLQHFYKSKYCLNRAFNRNASYCRAQDDEYRLEVTTPLQRVDLFGQFNNILLTSISVFTKGNLTIAN  
LGTSEGRFMQIVVSRSEPTAPHVSFQLDSHAVSPQVVVEQSAAADGYTLVVTGKKITKVPLNGPGCHHFQSCSQCLL  
APAFMRCGWCGQQCLRAPECNGGTWTQETCLPRVYEILPSSAPLEGGTKLTLGWDGFGSKNNRFELRNTVVHIGGQ  
ICALEAKSSNKNLECTAPAAKNASFNISSSVSVGHGKTLFNTFSYVNPITISISPTYGPKSGGTLLTIAGKYLNSG  
KSRRIFFVGEKPCSLKSTSESSVECYTPAQRIQYRVRVGDGAIRDAKGYFTYREDPVVLKIHPAKSFLSGGSTIT  
AQGINLNSVCFPRMVITVPKLGMNFSVACSHRSSSEIICCTTPSLKAFNLQPPFVTKVFFIFDGVSSLYDFDYVNN  
PVFKHFEKPVLISSRNPVLEIKGNHIDSEAVKGEVLKVGKNSCENLLQSETILCTVPSDLLKSNSELNIEWKQEV  
LSTVIGKVLIRQDQNFQGLIAGVVSTSVLIYIFLVFFLWRRKKKQIKDLGSDLVRYDGRVHTPHLDRLVSARSVSPT  
TEMVSSESVDYRSTFLEDQFPMSQNGSCRPAQYPHSDLSPILSSGSDLASPLLQTNVHIDISALNPDLVKEVQHV  
VIGADSLMVHFSEVIGRGHFGCVSHGTLDDNDGRKIHCAVKSLENRITDLEEAQFLKEGIIMKDFTHPNVLSLLGIC  
LPNEGSPLVVLPMKHGDLRNFIRNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYLASKKFVHRDLAARNCMLDEKFTVKVADF  
GLARDVYKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESQTQKFTTKSDVWSFGVLLWELMTRGAPPYPDVNSFDITVYLLQGR  
RLLQPEYCPDPLYEVMLKCWHPKPEMRPAFSELVSKISTIFSTFIGEHYVHVNATYVNVKCVAPYPSLLSSQDNTDM  
DVDT

[0648] SEQ ID NO:4 (鼠MET氨基酸序列) :

[0649] MKAPTVLAPGILVLLSLVQRSHGECKEALVKSEMNVMKYQLPNFTAETPIQNVVLHGHHIYLGATNY  
IYVLNDKDLQKVSEFKTGVPVLEHPDCLPCRDCSSKANSSGGVWKDNINMALLVDYDDQLISCGSVNRGTCQRHVL  
PPDNSADIQSEVHCMFSPEEESGQCPDCVVSALGAKVLLSEKDRFINFFVGNTINSSYPGYSLSHSISVRRLKETQD  
GFKFLTDQSYIDVLPFQDSYPIKYIHAFESNHFYFLTVQKETLDAQTFHTRIIRFCSVDSGLHSYMEMPLECILT  
EKRRKRSTREEVFNILQAAYVSKPGANLAKQIGASPSDDILFGVFAQSKPDSAEPVNRSAVCAFPKIYVNDFFNKIV  
NKNNVRLQHFYGPNEHCFNRTLLRNSSGCEARSDEYRTEFTTALQRVDLFGRLNQVLLTSISTFIKGLDTIANL  
GTSEGRFMQVVLRSHTALTPHVNFLDSDHPVSPEVIVEHPSNQNGYTLVVTGKKITKIPLNGLGCGHFQSCSQCLSA  
PYFIQCGWCHNQCVRFDECPSGTWTQEICLPAVYKVFPTSAPLEGGTVLTICGWDGFRKNNKFDLRKTKVLLGNES  
CTTLTSESTNTLCTVGPAMSEHFNVSVIISNSRETTQYSAFSYVDPVITSISPRYGPQAGGTLLTLTGKYLNSGN  
SRHISIGGKTCTLKSVSDSILECYTPAQTTSDFFPVKLKIDLANRETSSFSYREDPVVYIEHPTKSFISGGSTITGI  
GKTLNSVSLPKLVIDVHEVGVNYTVACQHRSNSEIICCTTPSLKQLGLQLPLKTKAFFLLDGILSKHFDLTYVHNPV  
FEPFEKPMISIGNENVVEIKGNIDPEAVKGEVLKVGKNSCESLHWHSGAVLCTVPSDLLKSNSELNIEWKQAVSS  
TVLGKVIQPDQNFAGLIIGAVSISVVVLLSGLFLWMRKRKHDLGSELVRYDARVHTPHLDRLVSARSVSPTTEM  
VSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGACRQVQYPLTDLSPILTSGSDISSPLLQNTVHIDLSALNPDLVQAVQHVVIG  
PSSLIVHFNEVIGRGHFGCVYHGTLDDNDGKKIHCAVKSLENRITDIEEVSQFLTEGIIMKDFSHPNVLSLLGICLRS  
EGSPLVVLPMKHGDLRNFIRNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYLASKKFVHRDLAARNCMLDEKFTVKVADFGLA  
RDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESQTQKFTTKSDVWSFGVLLWELMTRGAPPYPDVNTFDITVYLLQGRLL  
QPEYCPDALYEVMLKCWHPKAEMRPSFSELVSRISIFSTFIGEHYVHVNATYVNVKCVAPYPSLLPSQDNIDGEGN  
T

[0650] SEQ ID NO:5 (嵌合9006重链可变结构域核酸序列) :

[0651] CAGATCCATTTGGGGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAG  
GCTTCTGGGTATACCTTCACAACTTTAGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTAAAGTGGATGGG  
CTGGATAAACACCTACACTGGAGAGCCAAACATATGTTGATGACTTGAAGGGACGTTTGCCTTCTCTTTGAAACCT

CTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACATGGCTACATATTTCTGTGCAAGGAAAGGG  
ATTGCGAGGGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCGAGT

[0652] SEQ ID NO:6 (嵌合9006重链可变结构域氨基酸序列) :

[0653] QIHLGQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTNFRMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYVDDLKGRFA  
FSLETSASTAYLQINNLIKNEDEMATYFCARKGIARAMDYWGQGSVTVSS

[0654] SEQ ID NO:7 (嵌合9006轻链可变结构域核酸序列) :

[0655] AACATTGTGATGACACAGTCTCCATCTCCCTGAGTGTGTGCAGCAGGAGAGATGGTCACTATGAGTTGT  
AAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAGACAGTGGAAATCAAAAGAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCC  
TCCTCAACTTTTGATCTTCGGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGAA  
CCGATTTCACTCTTACCGTCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATCATAGTTAT  
CCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

[0656] SEQ ID NO:8 (嵌合9006轻链可变结构域氨基酸) :

[0657] NIVMTQSPSSLSVSAGEMVTMSCKSSQSLDSGNQKNYLAWYQQKPGQPPQLLIFGASTRESGVPDRFT  
GSGSGTDFLTIVSSVQAEDLAVYYCQNDHSYPYTFGGGTKLEIK

[0658] SEQ ID NO:9 (嵌合9338重链可变结构域核酸序列) :

[0659] CAGGTCCAACCTGCAACAGCCTGGGGCTGAACTGGCAAAACCTGGGGCCTCAGTGAGGATGTCCTGCAAG  
GCTTCTGGCTACACCTTTACTAGTTACTGGATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGG  
ATACATTAATCCTAGCAGTGGTCATATTGAGAACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGCAGACAAAT  
CCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATTTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGACGG  
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCGAGT

[0660] SEQ ID NO:10 (嵌合9338重链可变结构域氨基酸序列) :

[0661] QVQLQQPGAELAKPGASVRMSCKASGYFTTSYWMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSSGHIENNQKFKDKA  
TLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYYCARGRFAYWGQGLTVSSSEQ ID NO:11 (嵌合9338轻链可变结  
构域核酸序列) :

[0662] GATATTGTGATGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCTGGGGAGAAGGTCACCTTGACCTGC  
AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTCCGGCTACTTGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAACTCTGGAT  
TTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCA  
CAGTCAACAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCTCTTATTTCTGCCATCAGTGGAGTAGTTACCCATTACGTTTCGGC  
TCGGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0663] SEQ ID NO:12 (嵌合9338轻链可变结构域氨基酸序列) :

[0664] DIVMTQSPAIMASAPGEKVTLTCSASSSVSSGYLYWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSG  
TSYSLTVNSMEAEDAASYFCHQWSSYPFTFGSGTKLELK

[0665] SEQ ID NO:13 (人源化9006重链可变结构域核酸序列) :

[0666] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGATCCGAGCTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAG  
GCTTCCGGCTACACCTTTACCAACTTCCGGATGAACTGGGTCAAGCAGGCCCCAGGCCAGGGCCTGAAATGGATGGG  
CTGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCACCTACGTGGACGACCTGAAGGGCAGATTTCGTGTTCTCCCTGGACACCT  
CCGTGTCCACCGCCTACCTGCAGATCTCCAGCCTGAAGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGAAGGGA  
ATGCCAGAGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCGTGACAGTCTCGAGT

[0667] SEQ ID NO:14 (人源化9006重链可变结构域氨基酸序列) :

[0668] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYFTNFRMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYVDDLKGRFV  
FSLDTSVSTAYLQISSSLKAEDTAVYYCARKGIARAMDYWGQGTTVTSS

[0669] SEQ ID NO:15 (人源化9006轻链可变结构域核酸序列) :

[0670] GACATCGTGATGACCCAGTCCCCGACTCTCTGGCCGTGTCTCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGC  
AAGTCCTCCCAGTCCCTGCTGGACTCCGGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCC  
TCCCAAGCTGCTGATCTTTGGCGCTCCACCCGGGAATCTGGCGTGCCCGATAGATTCTCCGGCTCCGGCTCTGGCA  
CCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGAACGACCACTCTAC  
CCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG

[0671] SEQ ID NO:16 (人源化9006轻链可变结构域氨基酸序列) :

[0672] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLDSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIFGASTRESGVPDRFS  
GSGSGTDFLTITSSSLQAEDVAVYYCQNDHSYPYTFGQGTKLEIK

[0673] SEQ ID NO:17 (人源化9338重链可变结构域核酸序列) :

[0674] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTGAAGAAACCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAG  
GCCTCCGGCTACACCTTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGG  
CTACATCAACCCCTCCAGCGGCCACATCGAGAACAACCAGAAATTCAAGGACCGCGTGACCATCACCGCCGACAAGT  
CCACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGTCTCCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGGCAGA  
TTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCTCGTGACAGTCTCGAGT

[0675] SEQ ID NO:18 (人源化9338重链可变结构域氨基酸序列) :

[0676] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTFSYWMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSGHIENNQKFKDRV  
TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRFAYWGQGLTVSSSEQ ID NO:19 (人源化9338轻链可变  
结构域核酸序列) :

[0677] GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCACCCTGTCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCTACCCTGTCTGCTGC  
TCCGCCTCCTCCTCTGTGTCTCCGGCTACCTGTACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTCGGCTGCTGAT  
CTACTCTACCTCCAACCTGGCCTCCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGA  
CCATCTCCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCACCAGTGGTCCAGCTACCCCTTACCTTTGGC  
TCCGGCACCAAGCTGGAAATCAAG

[0678] SEQ ID NO:20 (人源化9338轻链可变结构域氨基酸序列) :

[0679] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSSGYLYWYQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSG  
TDFLTITSSLEPEDFAVYYCHQWSSYPFTFGSGTKLEIK

[0680] SEQ ID NO:21 (9006重链CDR1氨基酸序列) :

[0681] GYTFTNFR

[0682] SEQ ID NO:22 (9006重链CDR2氨基酸序列) :

[0683] INTYTGEF

[0684] SEQ ID NO:23 (9006重链CDR3氨基酸序列) :

[0685] ARKGIARAMDY

[0686] SEQ ID NO:24 (9006轻链CDR1氨基酸序列) :

[0687] QSLDSGNQKNY

[0688] SEQ ID NO:25 (9006轻链CDR2氨基酸序列) :

[0689] GAS

[0690] SEQ ID NO:26 (9006轻链CDR3氨基酸序列):  
[0691] QNDHSYPYT  
[0692] SEQ ID NO:27 (9338重链CDR1氨基酸序列):  
[0693] GYTFTSYW  
[0694] SEQ ID NO:28 (9338重链CDR2氨基酸序列):  
[0695] INPSSGHI  
[0696] SEQ ID NO:29 (9338重链CDR3氨基酸序列):  
[0697] ARGRFAY  
[0698] SEQ ID NO:30 (9338轻链CDR1氨基酸序列):  
[0699] SSVSSGY  
[0700] SEQ ID NO:31 (9338轻链CDR2氨基酸序列):  
[0701] STS  
[0702] SEQ ID NO:32 (9338轻链CDR3氨基酸序列):  
[0703] HQWSSYPFT  
[0704] SEQ ID NO:33 (人源化9006轻链氨基酸序列):  
[0705] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLDSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIFGASTRESGVPDRFS  
GSGSGTDFLTITSSSLQAEDVAVYYCQNDHSYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY  
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
[0706] SEQ ID NO:34 (人源化9006重链氨基酸序列):  
[0707] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTFTNFRMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYVDDLKGRFV  
FSLDTSVSTAYLQISSSLKAEDTAVYYCARKGIARAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD  
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
[0708] SEQ ID NO:35 (人源化9338轻链氨基酸序列):  
[0709] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASASSVSSGYLYWYQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSG  
TDFLTITSSLEPEDFAVYYCHQWSSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK  
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
[0710] SEQ ID NO:36 (人源化9338重链氨基酸序列):  
[0711] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYFTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSGHIENNQKFKDRVT  
ITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY  
FPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC  
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0001] 序列表  
 [0002] <110> 西福根有限公司  
 [0003] <120> 抗MET抗体和组合物  
 [0004] <130> 110285-0051-W01  
 [0005] <140>  
 [0006] <141>  
 [0007] <150> 62/051,190  
 [0008] <151> 2014-09-16  
 [0009] <160> 39  
 [0010] <170> PatentIn version 3.5  
 [0011] <210> 1  
 [0012] <211> 1390  
 [0013] <212> PRT  
 [0014] <213> 人类  
 [0015] <400> 1  
 [0016] Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe  
 [0017] 1 5 10 15  
 [0018] Thr Leu Val Gln Arg Ser Asn Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys  
 [0019] 20 25 30  
 [0020] Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala  
 [0021] 35 40 45  
 [0022] Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu  
 [0023] 50 55 60  
 [0024] Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys  
 [0025] 65 70 75 80  
 [0026] Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe  
 [0027] 85 90 95  
 [0028] Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp  
 [0029] 100 105 110  
 [0030] Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp  
 [0031] 115 120 125  
 [0032] Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His  
 [0033] 130 135 140  
 [0034] Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys  
 [0035] 145 150 155 160  
 [0036] Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val  
 [0037] 165 170 175  
 [0038] Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe

[0039]		180		185		190
[0040]	Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp					
[0041]		195		200		205
[0042]	His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp					
[0043]		210		215		220
[0044]	Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu					
[0045]		225		230		235
[0046]	Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn					
[0047]		245		250		255
[0048]	Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln					
[0049]		260		265		270
[0050]	Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu					
[0051]		275		280		285
[0052]	His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg					
[0053]		290		295		300
[0054]	Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala					
[0055]		305		310		315
[0056]	Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser					
[0057]		325		330		335
[0058]	Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp					
[0059]		340		345		350
[0060]	Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys					
[0061]		355		360		365
[0062]	Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg					
[0063]		370		375		380
[0064]	Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg					
[0065]		385		390		395
[0066]	Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr					
[0067]		405		410		415
[0068]	Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly					
[0069]		420		425		430
[0070]	Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly					
[0071]		435		440		445
[0072]	Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln					
[0073]		450		455		460
[0074]	Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu					
[0075]		465		470		475
[0076]	Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu					
[0077]		485		490		495

[0078]	Asn	Gln	Asn	Gly	Tyr	Thr	Leu	Val	Ile	Thr	Gly	Lys	Lys	Ile	Thr	Lys
[0079]				500					505					510		
[0080]	Ile	Pro	Leu	Asn	Gly	Leu	Gly	Cys	Arg	His	Phe	Gln	Ser	Cys	Ser	Gln
[0081]			515					520					525			
[0082]	Cys	Leu	Ser	Ala	Pro	Pro	Phe	Val	Gln	Cys	Gly	Trp	Cys	His	Asp	Lys
[0083]		530					535					540				
[0084]	Cys	Val	Arg	Ser	Glu	Glu	Cys	Leu	Ser	Gly	Thr	Trp	Thr	Gln	Gln	Ile
[0085]	545					550				555						560
[0086]	Cys	Leu	Pro	Ala	Ile	Tyr	Lys	Val	Phe	Pro	Asn	Ser	Ala	Pro	Leu	Glu
[0087]				565					570					575		
[0088]	Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Ile	Cys	Gly	Trp	Asp	Phe	Gly	Phe	Arg	Arg
[0089]				580					585					590		
[0090]	Asn	Asn	Lys	Phe	Asp	Leu	Lys	Lys	Thr	Arg	Val	Leu	Leu	Gly	Asn	Glu
[0091]			595					600						605		
[0092]	Ser	Cys	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Glu	Ser	Thr	Met	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys
[0093]		610					615					620				
[0094]	Thr	Val	Gly	Pro	Ala	Met	Asn	Lys	His	Phe	Asn	Met	Ser	Ile	Ile	Ile
[0095]	625					630				635						640
[0096]	Ser	Asn	Gly	His	Gly	Thr	Thr	Gln	Tyr	Ser	Thr	Phe	Ser	Tyr	Val	Asp
[0097]				645					650					655		
[0098]	Pro	Val	Ile	Thr	Ser	Ile	Ser	Pro	Lys	Tyr	Gly	Pro	Met	Ala	Gly	Gly
[0099]				660					665					670		
[0100]	Thr	Leu	Leu	Thr	Leu	Thr	Gly	Asn	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly	Asn	Ser	Arg
[0101]			675					680						685		
[0102]	His	Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Lys	Thr	Cys	Thr	Leu	Lys	Ser	Val	Ser	Asn
[0103]		690					695						700			
[0104]	Ser	Ile	Leu	Glu	Cys	Tyr	Thr	Pro	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Thr	Glu	Phe
[0105]	705					710				715						720
[0106]	Ala	Val	Lys	Leu	Lys	Ile	Asp	Leu	Ala	Asn	Arg	Glu	Thr	Ser	Ile	Phe
[0107]				725					730					735		
[0108]	Ser	Tyr	Arg	Glu	Asp	Pro	Ile	Val	Tyr	Glu	Ile	His	Pro	Thr	Lys	Ser
[0109]				740					745					750		
[0110]	Phe	Ile	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Ile	Thr	Gly	Val	Gly	Lys	Asn	Leu	Asn
[0111]			755					760					765			
[0112]	Ser	Val	Ser	Val	Pro	Arg	Met	Val	Ile	Asn	Val	His	Glu	Ala	Gly	Arg
[0113]		770					775					780				
[0114]	Asn	Phe	Thr	Val	Ala	Cys	Gln	His	Arg	Ser	Asn	Ser	Glu	Ile	Ile	Cys
[0115]	785					790				795						800
[0116]	Cys	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Gln	Gln	Leu	Asn	Leu	Gln	Leu	Pro	Leu	Lys



[0117]		805		810		815
[0118]	Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp					
[0119]		820		825		830
[0120]	Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val					
[0121]		835		840		845
[0122]	Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp					
[0123]		850		855		860
[0124]	Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys					
[0125]	865		870		875	880
[0126]	Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val					
[0127]		885		890		895
[0128]	Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys					
[0129]		900		905		910
[0130]	Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp					
[0131]		915		920		925
[0132]	Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser Thr Ala					
[0133]		930		935		940
[0134]	Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg Lys Gln					
[0135]	945		950		955	960
[0136]	Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg Val His					
[0137]		965		970		975
[0138]	Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser Pro Thr					
[0139]		980		985		990
[0140]	Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala Thr Phe Pro					
[0141]		995		1000		1005
[0142]	Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg Gln					
[0143]		1010		1015		1020
[0144]	Val Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu Thr Ser Gly					
[0145]		1025		1030		1035
[0146]	Asp Ser Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val His Ile					
[0147]		1040		1045		1050
[0148]	Asp Leu Ser Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala Val Gln His					
[0149]		1055		1060		1065
[0150]	Val Val Ile Gly Pro Ser Ser Leu Ile Val His Phe Asn Glu Val					
[0151]		1070		1075		1080
[0152]	Ile Gly Arg Gly His Phe Gly Cys Val Tyr His Gly Thr Leu Leu					
[0153]		1085		1090		1095
[0154]	Asp Asn Asp Gly Lys Lys Ile His Cys Ala Val Lys Ser Leu Asn					
[0155]		1100		1105		1110

[0156]	Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu Val Ser Gln Phe Leu Thr Glu Gly		
[0157]	1115	1120	1125
[0158]	Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val Leu Ser Leu Leu		
[0159]	1130	1135	1140
[0160]	Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser Pro Leu Val Val Leu Pro		
[0161]	1145	1150	1155
[0162]	Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile Arg Asn Glu Thr		
[0163]	1160	1165	1170
[0164]	His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe Gly Leu Gln Val		
[0165]	1175	1180	1185
[0166]	Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe Val His Arg		
[0167]	1190	1195	1200
[0168]	Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys Phe Thr Val		
[0169]	1205	1210	1215
[0170]	Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr Asp Lys Glu		
[0171]	1220	1225	1230
[0172]	Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val Lys		
[0173]	1235	1240	1245
[0174]	Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr Lys		
[0175]	1250	1255	1260
[0176]	Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr		
[0177]	1265	1270	1275
[0178]	Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe Asp Ile Thr		
[0179]	1280	1285	1290
[0180]	Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr Cys		
[0181]	1295	1300	1305
[0182]	Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp His Pro Lys		
[0183]	1310	1315	1320
[0184]	Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser		
[0185]	1325	1330	1335
[0186]	Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val His Val Asn		
[0187]	1340	1345	1350
[0188]	Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr Pro Ser Leu		
[0189]	1355	1360	1365
[0190]	Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val Asp Thr Arg Pro		
[0191]	1370	1375	1380
[0192]	Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser		
[0193]	1385	1390	
[0194]	<210> 2		

[0195]	<211> 1408															
[0196]	<212> PRT															
[0197]	<213> 人类															
[0198]	<400> 2															
[0199]	Met	Lys	Ala	Pro	Ala	Val	Leu	Ala	Pro	Gly	Ile	Leu	Val	Leu	Leu	Phe
[0200]	1				5					10					15	
[0201]	Thr	Leu	Val	Gln	Arg	Ser	Asn	Gly	Glu	Cys	Lys	Glu	Ala	Leu	Ala	Lys
[0202]				20					25					30		
[0203]	Ser	Glu	Met	Asn	Val	Asn	Met	Lys	Tyr	Gln	Leu	Pro	Asn	Phe	Thr	Ala
[0204]			35					40					45			
[0205]	Glu	Thr	Pro	Ile	Gln	Asn	Val	Ile	Leu	His	Glu	His	His	Ile	Phe	Leu
[0206]		50					55					60				
[0207]	Gly	Ala	Thr	Asn	Tyr	Ile	Tyr	Val	Leu	Asn	Glu	Glu	Asp	Leu	Gln	Lys
[0208]	65					70					75					80
[0209]	Val	Ala	Glu	Tyr	Lys	Thr	Gly	Pro	Val	Leu	Glu	His	Pro	Asp	Cys	Phe
[0210]					85					90					95	
[0211]	Pro	Cys	Gln	Asp	Cys	Ser	Ser	Lys	Ala	Asn	Leu	Ser	Gly	Gly	Val	Trp
[0212]				100					105						110	
[0213]	Lys	Asp	Asn	Ile	Asn	Met	Ala	Leu	Val	Val	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Asp
[0214]			115					120					125			
[0215]	Gln	Leu	Ile	Ser	Cys	Gly	Ser	Val	Asn	Arg	Gly	Thr	Cys	Gln	Arg	His
[0216]		130					135					140				
[0217]	Val	Phe	Pro	His	Asn	His	Thr	Ala	Asp	Ile	Gln	Ser	Glu	Val	His	Cys
[0218]	145					150				155						160
[0219]	Ile	Phe	Ser	Pro	Gln	Ile	Glu	Glu	Pro	Ser	Gln	Cys	Pro	Asp	Cys	Val
[0220]					165				170					175		
[0221]	Val	Ser	Ala	Leu	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Ser	Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe
[0222]				180					185					190		
[0223]	Ile	Asn	Phe	Phe	Val	Gly	Asn	Thr	Ile	Asn	Ser	Ser	Tyr	Phe	Pro	Asp
[0224]			195					200					205			
[0225]	His	Pro	Leu	His	Ser	Ile	Ser	Val	Arg	Arg	Leu	Lys	Glu	Thr	Lys	Asp
[0226]		210					215					220				
[0227]	Gly	Phe	Met	Phe	Leu	Thr	Asp	Gln	Ser	Tyr	Ile	Asp	Val	Leu	Pro	Glu
[0228]	225					230				235					240	
[0229]	Phe	Arg	Asp	Ser	Tyr	Pro	Ile	Lys	Tyr	Val	His	Ala	Phe	Glu	Ser	Asn
[0230]					245				250					255		
[0231]	Asn	Phe	Ile	Tyr	Phe	Leu	Thr	Val	Gln	Arg	Glu	Thr	Leu	Asp	Ala	Gln
[0232]				260					265					270		
[0233]	Thr	Phe	His	Thr	Arg	Ile	Ile	Arg	Phe	Cys	Ser	Ile	Asn	Ser	Gly	Leu

[0234]	275	280	285
[0235]	His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg		
[0236]	290	295	300
[0237]	Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala		
[0238]	305	310	315
[0239]	Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser		
[0240]	325	330	335
[0241]	Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp		
[0242]	340	345	350
[0243]	Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys		
[0244]	355	360	365
[0245]	Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg		
[0246]	370	375	380
[0247]	Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg		
[0248]	385	390	395
[0249]	Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr		
[0250]	405	410	415
[0251]	Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly		
[0252]	420	425	430
[0253]	Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly		
[0254]	435	440	445
[0255]	Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln		
[0256]	450	455	460
[0257]	Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu		
[0258]	465	470	475
[0259]	Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu		
[0260]	485	490	495
[0261]	Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys		
[0262]	500	505	510
[0263]	Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln		
[0264]	515	520	525
[0265]	Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys		
[0266]	530	535	540
[0267]	Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile		
[0268]	545	550	555
[0269]	Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu		
[0270]	565	570	575
[0271]	Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg		
[0272]	580	585	590

[0273]	Asn	Asn	Lys	Phe	Asp	Leu	Lys	Lys	Thr	Arg	Val	Leu	Leu	Gly	Asn	Glu
[0274]			595					600					605			
[0275]	Ser	Cys	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Glu	Ser	Thr	Met	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys
[0276]			610					615					620			
[0277]	Thr	Val	Gly	Pro	Ala	Met	Asn	Lys	His	Phe	Asn	Met	Ser	Ile	Ile	Ile
[0278]	625							630				635				640
[0279]	Ser	Asn	Gly	His	Gly	Thr	Thr	Gln	Tyr	Ser	Thr	Phe	Ser	Tyr	Val	Asp
[0280]					645					650					655	
[0281]	Pro	Val	Ile	Thr	Ser	Ile	Ser	Pro	Lys	Tyr	Gly	Pro	Met	Ala	Gly	Gly
[0282]				660					665					670		
[0283]	Thr	Leu	Leu	Thr	Leu	Thr	Gly	Asn	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly	Asn	Ser	Arg
[0284]			675					680					685			
[0285]	His	Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Lys	Thr	Cys	Thr	Leu	Lys	Ser	Val	Ser	Asn
[0286]			690					695					700			
[0287]	Ser	Ile	Leu	Glu	Cys	Tyr	Thr	Pro	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Thr	Glu	Phe
[0288]	705						710				715					720
[0289]	Ala	Val	Lys	Leu	Lys	Ile	Asp	Leu	Ala	Asn	Arg	Glu	Thr	Ser	Ile	Phe
[0290]				725						730					735	
[0291]	Ser	Tyr	Arg	Glu	Asp	Pro	Ile	Val	Tyr	Glu	Ile	His	Pro	Thr	Lys	Ser
[0292]			740							745				750		
[0293]	Phe	Ile	Ser	Thr	Trp	Trp	Lys	Glu	Pro	Leu	Asn	Ile	Val	Ser	Phe	Leu
[0294]			755					760					765			
[0295]	Phe	Cys	Phe	Ala	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Ile	Thr	Gly	Val	Gly	Lys	Asn
[0296]			770					775					780			
[0297]	Leu	Asn	Ser	Val	Ser	Val	Pro	Arg	Met	Val	Ile	Asn	Val	His	Glu	Ala
[0298]	785						790				795					800
[0299]	Gly	Arg	Asn	Phe	Thr	Val	Ala	Cys	Gln	His	Arg	Ser	Asn	Ser	Glu	Ile
[0300]				805						810					815	
[0301]	Ile	Cys	Cys	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Gln	Gln	Leu	Asn	Leu	Gln	Leu	Pro
[0302]				820						825				830		
[0303]	Leu	Lys	Thr	Lys	Ala	Phe	Phe	Met	Leu	Asp	Gly	Ile	Leu	Ser	Lys	Tyr
[0304]			835					840					845			
[0305]	Phe	Asp	Leu	Ile	Tyr	Val	His	Asn	Pro	Val	Phe	Lys	Pro	Phe	Glu	Lys
[0306]			850					855				860				
[0307]	Pro	Val	Met	Ile	Ser	Met	Gly	Asn	Glu	Asn	Val	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly
[0308]	865						870				875					880
[0309]	Asn	Asp	Ile	Asp	Pro	Glu	Ala	Val	Lys	Gly	Glu	Val	Leu	Lys	Val	Gly
[0310]				885						890					895	
[0311]	Asn	Lys	Ser	Cys	Glu	Asn	Ile	His	Leu	His	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Cys

[0312]	900	905	910
[0313]	Thr Val Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu		
[0314]	915	920	925
[0315]	Trp Lys Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln		
[0316]	930	935	940
[0317]	Pro Asp Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser		
[0318]	945	950	955
[0319]	Thr Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg		
[0320]	965	970	975
[0321]	Lys Gln Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg		
[0322]	980	985	990
[0323]	Val His Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser		
[0324]	995	1000	1005
[0325]	Pro Thr Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala		
[0326]	1010	1015	1020
[0327]	Thr Phe Pro Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser		
[0328]	1025	1030	1035
[0329]	Cys Arg Gln Val Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu		
[0330]	1040	1045	1050
[0331]	Thr Ser Gly Asp Ser Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr		
[0332]	1055	1060	1065
[0333]	Val His Ile Asp Leu Ser Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala		
[0334]	1070	1075	1080
[0335]	Val Gln His Val Val Ile Gly Pro Ser Ser Leu Ile Val His Phe		
[0336]	1085	1090	1095
[0337]	Asn Glu Val Ile Gly Arg Gly His Phe Gly Cys Val Tyr His Gly		
[0338]	1100	1105	1110
[0339]	Thr Leu Leu Asp Asn Asp Gly Lys Lys Ile His Cys Ala Val Lys		
[0340]	1115	1120	1125
[0341]	Ser Leu Asn Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu Val Ser Gln Phe Leu		
[0342]	1130	1135	1140
[0343]	Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val Leu		
[0344]	1145	1150	1155
[0345]	Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser Pro Leu Val		
[0346]	1160	1165	1170
[0347]	Val Leu Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile Arg		
[0348]	1175	1180	1185
[0349]	Asn Glu Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe Gly		
[0350]	1190	1195	1200

[0351]	Leu Gln Val Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe		
[0352]	1205	1210	1215
[0353]	Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys		
[0354]	1220	1225	1230
[0355]	Phe Thr Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr		
[0356]	1235	1240	1245
[0357]	Asp Lys Glu Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu		
[0358]	1250	1255	1260
[0359]	Pro Val Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe		
[0360]	1265	1270	1275
[0361]	Thr Thr Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu		
[0362]	1280	1285	1290
[0363]	Leu Met Thr Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe		
[0364]	1295	1300	1305
[0365]	Asp Ile Thr Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro		
[0366]	1310	1315	1320
[0367]	Glu Tyr Cys Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp		
[0368]	1325	1330	1335
[0369]	His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser		
[0370]	1340	1345	1350
[0371]	Arg Ile Ser Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val		
[0372]	1355	1360	1365
[0373]	His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr		
[0374]	1370	1375	1380
[0375]	Pro Ser Leu Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val Asp		
[0376]	1385	1390	1395
[0377]	Thr Arg Pro Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser		
[0378]	1400	1405	
[0379]	<210> 3		
[0380]	<211> 1382		
[0381]	<212> PRT		
[0382]	<213> 原鸡		
[0383]	<400> 3		
[0384]	Met Lys Pro Val Thr Ala Tyr Pro Ser Gly Ile Ile Leu Phe Leu Phe		
[0385]	1	5	10
[0386]	Ala Leu Leu Gln Arg Ser His Gly Gln Cys Lys Glu Ala Ala Lys Lys		
[0387]	20	25	30
[0388]	Ser Glu Met Asn Leu Asn Val Lys Tyr Asp Leu Pro Asn Phe Ile Thr		
[0389]	35	40	45

[0390]	Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Val Leu Tyr Lys His His Val Tyr Ile
[0391]	50 55 60
[0392]	Gly Ala Val Asn Lys Ile Tyr Val Leu Asn Glu Thr Leu Gln Asn Ile
[0393]	65 70 75 80
[0394]	Ser Val Tyr Lys Thr Gly Pro Ile Leu Glu Ser Pro Gly Cys Ala Pro
[0395]	85 90 95
[0396]	Cys Glu Asp Cys Lys Asp Lys Ala Asn Leu Ser Asn Ser Val Trp Lys
[0397]	100 105 110
[0398]	Asp Asn Val Asn Met Ala Leu Leu Leu Glu Thr Tyr Tyr Asp Asp Gln
[0399]	115 120 125
[0400]	Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Ser Gly Gly Val Cys His Arg His Ile
[0401]	130 135 140
[0402]	Ile Pro Pro Asp Asn Pro Ala Asp Ile Glu Ser Glu Val His Cys Met
[0403]	145 150 155 160
[0404]	Tyr Ser Pro Gln Val Asp Gly Glu Ala Asp Asn Cys Pro Asp Cys Val
[0405]	165 170 175
[0406]	Val Ser Thr Leu Gly Thr Lys Val Leu Val Thr Glu Lys Asp Arg Phe
[0407]	180 185 190
[0408]	Val Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Met Thr Ser Ala Phe Gln Pro Pro
[0409]	195 200 205
[0410]	His Val Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Gln Asp
[0411]	210 215 220
[0412]	Gly Phe Glu Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Ile Leu Pro Gln
[0413]	225 230 235 240
[0414]	Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu His Asp
[0415]	245 250 255
[0416]	His Phe Val Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Ser Leu Asp Ser Gln
[0417]	260 265 270
[0418]	Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Thr Leu Asp Ser Glu Met
[0419]	275 280 285
[0420]	Arg Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Phe Thr Glu Lys Arg
[0421]	290 295 300
[0422]	Arg Lys Arg Ser Ile Arg Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
[0423]	305 310 315 320
[0424]	Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Ala Leu Ala His Glu Met Gly Leu Gly
[0425]	325 330 335
[0426]	Leu Ile Asp Asp Ile Leu Tyr Gly Val Phe Ala Gln Thr Asn Gln Ile
[0427]	340 345 350
[0428]	Pro Gln Glu Pro Thr Asn Arg Ser Ala Val Cys Ala Val Ser Val Arg



[0429]	355	360	365
[0430]	Thr Ile Asn Glu Phe Phe Asn Lys Ile Val Asp Lys Gln Asn Met Lys		
[0431]	370	375	380
[0432]	Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Lys Asp Ser Lys Tyr Cys Leu Asn Arg		
[0433]	385	390	395
[0434]	Ala Phe Ser Arg Asn Ala Ser Tyr Cys Arg Ala Gln Asp Asp Glu Tyr		
[0435]	405	410	415
[0436]	Arg Leu Glu Val Thr Thr Pro Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly		
[0437]	420	425	430
[0438]	Gln Phe Asn Asn Ile Leu Leu Thr Ser Ile Ser Val Phe Thr Lys Gly		
[0439]	435	440	445
[0440]	Asn Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln		
[0441]	450	455	460
[0442]	Ile Val Val Ser Arg Ser Glu Pro Thr Ala Pro His Val Ser Phe Gln		
[0443]	465	470	475
[0444]	Leu Asp Ser His Ala Val Ser Pro Gln Val Val Val Glu Gln Ser Ala		
[0445]	485	490	495
[0446]	Ala Ala Asp Gly Tyr Thr Leu Val Val Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys		
[0447]	500	505	510
[0448]	Val Pro Leu Asn Gly Pro Gly Cys His His Phe Gln Ser Cys Ser Gln		
[0449]	515	520	525
[0450]	Cys Leu Leu Ala Pro Ala Phe Met Arg Cys Gly Trp Cys Gly Gln Gln		
[0451]	530	535	540
[0452]	Cys Leu Arg Ala Pro Glu Cys Asn Gly Gly Thr Trp Thr Gln Glu Thr		
[0453]	545	550	555
[0454]	Cys Leu Pro Arg Val Tyr Glu Ile Leu Pro Ser Ser Ala Pro Leu Glu		
[0455]	565	570	575
[0456]	Gly Gly Thr Lys Leu Thr Leu Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Ser Lys		
[0457]	580	585	590
[0458]	Asn Asn Arg Phe Glu Leu Arg Asn Thr Val Val His Ile Gly Gly Gln		
[0459]	595	600	605
[0460]	Ile Cys Ala Leu Glu Ala Lys Ser Ser Asn Lys Asn Lys Leu Glu Cys		
[0461]	610	615	620
[0462]	Thr Ala Pro Ala Ala Lys Asn Ala Ser Phe Asn Ile Ser Ser Ser Val		
[0463]	625	630	635
[0464]	Ser Val Gly His Gly Lys Thr Leu Phe Asn Thr Phe Ser Tyr Val Asn		
[0465]	645	650	655
[0466]	Pro Ile Ile Thr Ser Ile Ser Pro Thr Tyr Gly Pro Lys Ser Gly Gly		
[0467]	660	665	670

[0468]	Thr	Leu	Leu	Thr	Ile	Ala	Gly	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly	Lys	Ser	Arg
[0469]				675					680						685	
[0470]	Arg	Ile	Phe	Val	Gly	Glu	Lys	Pro	Cys	Ser	Leu	Lys	Ser	Thr	Ser	Glu
[0471]			690					695						700		
[0472]	Ser	Ser	Val	Glu	Cys	Tyr	Thr	Pro	Ala	Gln	Arg	Ile	Pro	Gln	Glu	Tyr
[0473]	705						710				715					720
[0474]	Arg	Val	Arg	Val	Gly	Ile	Asp	Gly	Ala	Ile	Arg	Asp	Ala	Lys	Gly	Tyr
[0475]					725					730					735	
[0476]	Phe	Thr	Tyr	Arg	Glu	Asp	Pro	Val	Val	Leu	Lys	Ile	His	Pro	Ala	Lys
[0477]				740					745					750		
[0478]	Ser	Phe	Leu	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Ile	Thr	Ala	Gln	Gly	Ile	Asn	Leu
[0479]			755					760					765			
[0480]	Asn	Ser	Val	Cys	Phe	Pro	Arg	Met	Val	Ile	Thr	Val	Pro	Lys	Leu	Gly
[0481]		770					775				780					
[0482]	Met	Asn	Phe	Ser	Val	Ala	Cys	Ser	His	Arg	Ser	Ser	Ser	Glu	Ile	Ile
[0483]	785					790				795						800
[0484]	Cys	Cys	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Lys	Ala	Phe	Asn	Leu	Gln	Pro	Pro	Phe
[0485]					805					810					815	
[0486]	Val	Thr	Lys	Val	Phe	Phe	Ile	Phe	Asp	Gly	Val	Ser	Ser	Leu	Tyr	Phe
[0487]				820					825					830		
[0488]	Asp	Phe	Asp	Tyr	Val	Asn	Asn	Pro	Val	Phe	Lys	His	Phe	Glu	Lys	Pro
[0489]			835					840					845			
[0490]	Val	Leu	Ile	Ser	Arg	Ser	Asn	Pro	Asn	Val	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Asn
[0491]		850					855				860					
[0492]	His	Ile	Asp	Ser	Glu	Ala	Val	Lys	Gly	Glu	Val	Leu	Lys	Val	Gly	Asn
[0493]	865					870				875						880
[0494]	Lys	Ser	Cys	Glu	Asn	Leu	Leu	Leu	Gln	Ser	Glu	Thr	Ile	Leu	Cys	Thr
[0495]					885				890					895		
[0496]	Val	Pro	Ser	Asp	Leu	Leu	Lys	Ser	Asn	Ser	Glu	Leu	Asn	Ile	Glu	Trp
[0497]				900					905					910		
[0498]	Lys	Gln	Glu	Val	Leu	Ser	Thr	Val	Ile	Gly	Lys	Val	Leu	Ile	Arg	Gln
[0499]			915						920				925			
[0500]	Asp	Gln	Asn	Phe	Thr	Gly	Leu	Ile	Ala	Gly	Val	Val	Ser	Thr	Ser	Val
[0501]		930					935						940			
[0502]	Leu	Ile	Tyr	Ile	Phe	Leu	Val	Phe	Phe	Leu	Trp	Arg	Arg	Lys	Lys	Lys
[0503]	945					950				955						960
[0504]	Gln	Ile	Lys	Asp	Leu	Gly	Ser	Asp	Leu	Val	Arg	Tyr	Asp	Gly	Arg	Val
[0505]					965				970					975		
[0506]	His	Thr	Pro	His	Leu	Asp	Arg	Leu	Val	Ser	Ala	Arg	Ser	Val	Ser	Pro

[0507]		980		985		990
[0508]	Thr Thr Glu Met Val Ser Ser Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ser Thr Phe					
[0509]		995		1000		1005
[0510]	Leu Glu Asp Gln Phe Pro Ser Met Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg					
[0511]		1010		1015		1020
[0512]	Pro Ala Gln Tyr Pro His Ser Asp Leu Ser Pro Ile Leu Ser Ser					
[0513]		1025		1030		1035
[0514]	Gly Asp Ser Asp Leu Ala Ser Pro Leu Leu Gln Thr Asn Val His					
[0515]		1040		1045		1050
[0516]	Ile Asp Ile Ser Ala Leu Asn Pro Asp Leu Val Lys Glu Val Gln					
[0517]		1055		1060		1065
[0518]	His Val Val Ile Gly Ala Asp Ser Leu Met Val His Phe Ser Glu					
[0519]		1070		1075		1080
[0520]	Val Ile Gly Arg Gly His Phe Gly Cys Val Ser His Gly Thr Leu					
[0521]		1085		1090		1095
[0522]	Leu Asp Asn Asp Gly Arg Lys Ile His Cys Ala Val Lys Ser Leu					
[0523]		1100		1105		1110
[0524]	Asn Arg Ile Thr Asp Leu Glu Glu Val Ala Gln Phe Leu Lys Glu					
[0525]		1115		1120		1125
[0526]	Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Thr His Pro Asn Val Leu Ser Leu					
[0527]		1130		1135		1140
[0528]	Leu Gly Ile Cys Leu Pro Asn Glu Gly Ser Pro Leu Val Val Leu					
[0529]		1145		1150		1155
[0530]	Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile Arg Asn Glu					
[0531]		1160		1165		1170
[0532]	Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe Gly Leu Gln					
[0533]		1175		1180		1185
[0534]	Val Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe Val His					
[0535]		1190		1195		1200
[0536]	Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys Phe Thr					
[0537]		1205		1210		1215
[0538]	Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Val Tyr Asp Lys					
[0539]		1220		1225		1230
[0540]	Glu Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val					
[0541]		1235		1240		1245
[0542]	Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr					
[0543]		1250		1255		1260
[0544]	Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met					
[0545]		1265		1270		1275

[0546]	Thr Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Ser Phe Asp Ile
[0547]	1280 1285 1290
[0548]	Thr Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr
[0549]	1295 1300 1305
[0550]	Cys Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp His Pro
[0551]	1310 1315 1320
[0552]	Lys Pro Glu Met Arg Pro Ala Phe Ser Glu Leu Val Ser Lys Ile
[0553]	1325 1330 1335
[0554]	Ser Thr Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val His Val
[0555]	1340 1345 1350
[0556]	Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr Pro Ser
[0557]	1355 1360 1365
[0558]	Leu Leu Ser Ser Gln Asp Asn Thr Asp Met Asp Val Asp Thr
[0559]	1370 1375 1380
[0560]	<210> 4
[0561]	<211> 1379
[0562]	<212> PRT
[0563]	<213> 小家鼠
[0564]	<400> 4
[0565]	Met Lys Ala Pro Thr Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Leu
[0566]	1 5 10 15
[0567]	Ser Leu Val Gln Arg Ser His Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Val Lys
[0568]	20 25 30
[0569]	Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
[0570]	35 40 45
[0571]	Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Val Leu His Gly His His Ile Tyr Leu
[0572]	50 55 60
[0573]	Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Asp Lys Asp Leu Gln Lys
[0574]	65 70 75 80
[0575]	Val Ser Glu Phe Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Leu
[0576]	85 90 95
[0577]	Pro Cys Arg Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Ser Ser Gly Gly Val Trp
[0578]	100 105 110
[0579]	Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Leu Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
[0580]	115 120 125
[0581]	Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
[0582]	130 135 140
[0583]	Val Leu Pro Pro Asp Asn Ser Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
[0584]	145 150 155 160

[0585]	Met	Phe	Ser	Pro	Glu	Glu	Glu	Ser	Gly	Gln	Cys	Pro	Asp	Cys	Val	Val
[0586]					165				170						175	
[0587]	Ser	Ala	Leu	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Leu	Ser	Glu	Lys	Asp	Arg	Phe	Ile
[0588]					180				185						190	
[0589]	Asn	Phe	Phe	Val	Gly	Asn	Thr	Ile	Asn	Ser	Ser	Tyr	Pro	Pro	Gly	Tyr
[0590]					195				200						205	
[0591]	Ser	Leu	His	Ser	Ile	Ser	Val	Arg	Arg	Leu	Lys	Glu	Thr	Gln	Asp	Gly
[0592]					210				215						220	
[0593]	Phe	Lys	Phe	Leu	Thr	Asp	Gln	Ser	Tyr	Ile	Asp	Val	Leu	Pro	Glu	Phe
[0594]					225				230						235	
[0595]	Gln	Asp	Ser	Tyr	Pro	Ile	Lys	Tyr	Ile	His	Ala	Phe	Glu	Ser	Asn	His
[0596]					245				250						255	
[0597]	Phe	Ile	Tyr	Phe	Leu	Thr	Val	Gln	Lys	Glu	Thr	Leu	Asp	Ala	Gln	Thr
[0598]					260				265						270	
[0599]	Phe	His	Thr	Arg	Ile	Ile	Arg	Phe	Cys	Ser	Val	Asp	Ser	Gly	Leu	His
[0600]					275				280						285	
[0601]	Ser	Tyr	Met	Glu	Met	Pro	Leu	Glu	Cys	Ile	Leu	Thr	Glu	Lys	Arg	Arg
[0602]					290				295						300	
[0603]	Lys	Arg	Ser	Thr	Arg	Glu	Glu	Val	Phe	Asn	Ile	Leu	Gln	Ala	Ala	Tyr
[0604]					305				310						315	
[0605]	Val	Ser	Lys	Pro	Gly	Ala	Asn	Leu	Ala	Lys	Gln	Ile	Gly	Ala	Ser	Pro
[0606]					325				330						335	
[0607]	Ser	Asp	Asp	Ile	Leu	Phe	Gly	Val	Phe	Ala	Gln	Ser	Lys	Pro	Asp	Ser
[0608]					340				345						350	
[0609]	Ala	Glu	Pro	Val	Asn	Arg	Ser	Ala	Val	Cys	Ala	Phe	Pro	Ile	Lys	Tyr
[0610]					355				360						365	
[0611]	Val	Asn	Asp	Phe	Phe	Asn	Lys	Ile	Val	Asn	Lys	Asn	Asn	Val	Arg	Cys
[0612]					370				375						380	
[0613]	Leu	Gln	His	Phe	Tyr	Gly	Pro	Asn	His	Glu	His	Cys	Phe	Asn	Arg	Thr
[0614]					385				390						395	
[0615]	Leu	Leu	Arg	Asn	Ser	Ser	Gly	Cys	Glu	Ala	Arg	Ser	Asp	Glu	Tyr	Arg
[0616]					405				410						415	
[0617]	Thr	Glu	Phe	Thr	Thr	Ala	Leu	Gln	Arg	Val	Asp	Leu	Phe	Met	Gly	Arg
[0618]					420				425						430	
[0619]	Leu	Asn	Gln	Val	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Phe	Ile	Lys	Gly	Asp
[0620]					435				440						445	
[0621]	Leu	Thr	Ile	Ala	Asn	Leu	Gly	Thr	Ser	Glu	Gly	Arg	Phe	Met	Gln	Val
[0622]					450				455						460	
[0623]	Val	Leu	Ser	Arg	Thr	Ala	His	Leu	Thr	Pro	His	Val	Asn	Phe	Leu	Leu

[0624]	465	470	475	480
[0625]	Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Pro Ser Asn			
[0626]		485	490	495
[0627]	Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Val Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys Ile			
[0628]		500	505	510
[0629]	Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Gly His Phe Gln Ser Cys Ser Gln Cys			
[0630]		515	520	525
[0631]	Leu Ser Ala Pro Tyr Phe Ile Gln Cys Gly Trp Cys His Asn Gln Cys			
[0632]		530	535	540
[0633]	Val Arg Phe Asp Glu Cys Pro Ser Gly Thr Trp Thr Gln Glu Ile Cys			
[0634]	545	550	555	560
[0635]	Leu Pro Ala Val Tyr Lys Val Phe Pro Thr Ser Ala Pro Leu Glu Gly			
[0636]		565	570	575
[0637]	Gly Thr Val Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Lys Asn			
[0638]		580	585	590
[0639]	Asn Lys Phe Asp Leu Arg Lys Thr Lys Val Leu Leu Gly Asn Glu Ser			
[0640]		595	600	605
[0641]	Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Thr Asn Thr Leu Lys Cys Thr			
[0642]		610	615	620
[0643]	Val Gly Pro Ala Met Ser Glu His Phe Asn Val Ser Val Ile Ile Ser			
[0644]	625	630	635	640
[0645]	Asn Ser Arg Glu Thr Thr Gln Tyr Ser Ala Phe Ser Tyr Val Asp Pro			
[0646]		645	650	655
[0647]	Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Arg Tyr Gly Pro Gln Ala Gly Gly Thr			
[0648]		660	665	670
[0649]	Leu Leu Thr Leu Thr Gly Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg His			
[0650]		675	680	685
[0651]	Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asp Ser			
[0652]		690	695	700
[0653]	Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Thr Ser Asp Glu Phe Pro			
[0654]	705	710	715	720
[0655]	Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ser Phe Ser			
[0656]		725	730	735
[0657]	Tyr Arg Glu Asp Pro Val Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser Phe			
[0658]		740	745	750
[0659]	Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Ile Gly Lys Thr Leu Asn Ser			
[0660]		755	760	765
[0661]	Val Ser Leu Pro Lys Leu Val Ile Asp Val His Glu Val Gly Val Asn			
[0662]		770	775	780

[0663]	Tyr	Thr	Val	Ala	Cys	Gln	His	Arg	Ser	Asn	Ser	Glu	Ile	Ile	Cys	Cys
[0664]	785					790				795					800	
[0665]	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Lys	Gln	Leu	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Leu	Lys	Thr
[0666]					805				810						815	
[0667]	Lys	Ala	Phe	Phe	Leu	Leu	Asp	Gly	Ile	Leu	Ser	Lys	His	Phe	Asp	Leu
[0668]					820				825						830	
[0669]	Thr	Tyr	Val	His	Asn	Pro	Val	Phe	Glu	Pro	Phe	Glu	Lys	Pro	Val	Met
[0670]					835				840						845	
[0671]	Ile	Ser	Ile	Gly	Asn	Glu	Asn	Val	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Asn	Asn	Ile
[0672]		850					855					860				
[0673]	Asp	Pro	Glu	Ala	Val	Lys	Gly	Glu	Val	Leu	Lys	Val	Gly	Asn	Gln	Ser
[0674]	865					870					875					880
[0675]	Cys	Glu	Ser	Leu	His	Trp	His	Ser	Gly	Ala	Val	Leu	Cys	Thr	Val	Pro
[0676]					885					890						895
[0677]	Ser	Asp	Leu	Leu	Lys	Leu	Asn	Ser	Glu	Leu	Asn	Ile	Glu	Trp	Lys	Gln
[0678]					900					905						910
[0679]	Ala	Val	Ser	Ser	Thr	Val	Leu	Gly	Lys	Val	Ile	Val	Gln	Pro	Asp	Gln
[0680]					915					920						925
[0681]	Asn	Phe	Ala	Gly	Leu	Ile	Ile	Gly	Ala	Val	Ser	Ile	Ser	Val	Val	Val
[0682]		930						935								940
[0683]	Leu	Leu	Leu	Ser	Gly	Leu	Phe	Leu	Trp	Met	Arg	Lys	Arg	Lys	His	Lys
[0684]	945					950					955					960
[0685]	Asp	Leu	Gly	Ser	Glu	Leu	Val	Arg	Tyr	Asp	Ala	Arg	Val	His	Thr	Pro
[0686]					965					970						975
[0687]	His	Leu	Asp	Arg	Leu	Val	Ser	Ala	Arg	Ser	Val	Ser	Pro	Thr	Thr	Glu
[0688]					980					985						990
[0689]	Met	Val	Ser	Asn	Glu	Ser	Val	Asp	Tyr	Arg	Ala	Thr	Phe	Pro	Glu	Asp
[0690]					995					1000						1005
[0691]	Gln	Phe	Pro	Asn	Ser	Ser	Gln	Asn	Gly	Ala	Cys	Arg	Gln	Val	Gln	
[0692]		1010								1015						1020
[0693]	Tyr	Pro	Leu	Thr	Asp	Leu	Ser	Pro	Ile	Leu	Thr	Ser	Gly	Asp	Ser	
[0694]		1025								1030						1035
[0695]	Asp	Ile	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Asn	Thr	Val	His	Ile	Asp	Leu	
[0696]		1040								1045						1050
[0697]	Ser	Ala	Leu	Asn	Pro	Glu	Leu	Val	Gln	Ala	Val	Gln	His	Val	Val	
[0698]		1055								1060						1065
[0699]	Ile	Gly	Pro	Ser	Ser	Leu	Ile	Val	His	Phe	Asn	Glu	Val	Ile	Gly	
[0700]		1070								1075						1080
[0701]	Arg	Gly	His	Phe	Gly	Cys	Val	Tyr	His	Gly	Thr	Leu	Leu	Asp	Asn	

[0702]	1085	1090	1095
[0703]	Asp Gly Lys Lys Ile His	Cys Ala Val Lys Ser	Leu Asn Arg Ile
[0704]	1100	1105	1110
[0705]	Thr Asp Ile Glu Glu Val	Ser Gln Phe Leu Thr	Glu Gly Ile Ile
[0706]	1115	1120	1125
[0707]	Met Lys Asp Phe Ser His	Pro Asn Val Leu Ser	Leu Leu Gly Ile
[0708]	1130	1135	1140
[0709]	Cys Leu Arg Ser Glu Gly	Ser Pro Leu Val Val	Leu Pro Tyr Met
[0710]	1145	1150	1155
[0711]	Lys His Gly Asp Leu Arg	Asn Phe Ile Arg Asn	Glu Thr His Asn
[0712]	1160	1165	1170
[0713]	Pro Thr Val Lys Asp Leu	Ile Gly Phe Gly Leu	Gln Val Ala Lys
[0714]	1175	1180	1185
[0715]	Gly Met Lys Tyr Leu Ala	Ser Lys Lys Phe Val	His Arg Asp Leu
[0716]	1190	1195	1200
[0717]	Ala Ala Arg Asn Cys Met	Leu Asp Glu Lys Phe	Thr Val Lys Val
[0718]	1205	1210	1215
[0719]	Ala Asp Phe Gly Leu Ala	Arg Asp Met Tyr Asp	Lys Glu Tyr Tyr
[0720]	1220	1225	1230
[0721]	Ser Val His Asn Lys Thr	Gly Ala Lys Leu Pro	Val Lys Trp Met
[0722]	1235	1240	1245
[0723]	Ala Leu Glu Ser Leu Gln	Thr Gln Lys Phe Thr	Thr Lys Ser Asp
[0724]	1250	1255	1260
[0725]	Val Trp Ser Phe Gly Val	Leu Leu Trp Glu Leu	Met Thr Arg Gly
[0726]	1265	1270	1275
[0727]	Ala Pro Pro Tyr Pro Asp	Val Asn Thr Phe Asp	Ile Thr Ile Tyr
[0728]	1280	1285	1290
[0729]	Leu Leu Gln Gly Arg Arg	Leu Leu Gln Pro Glu	Tyr Cys Pro Asp
[0730]	1295	1300	1305
[0731]	Ala Leu Tyr Glu Val Met	Leu Lys Cys Trp His	Pro Lys Ala Glu
[0732]	1310	1315	1320
[0733]	Met Arg Pro Ser Phe Ser	Glu Leu Val Ser Arg	Ile Ser Ser Ile
[0734]	1325	1330	1335
[0735]	Phe Ser Thr Phe Ile Gly	Glu His Tyr Val His	Val Asn Ala Thr
[0736]	1340	1345	1350
[0737]	Tyr Val Asn Val Lys Cys	Val Ala Pro Tyr Pro	Ser Leu Leu Pro
[0738]	1355	1360	1365
[0739]	Ser Gln Asp Asn Ile Asp	Gly Glu Gly Asn Thr	
[0740]	1370	1375	



[0741]	<210> 5
[0742]	<211> 354
[0743]	<212> DNA
[0744]	<213> 人工序列
[0745]	<220>
[0746]	<221> 来源
[0747]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多核苷酸"
[0748]	<400> 5
[0749]	cagatccatt tggggcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
[0750]	tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca aactttagaa tgaactgggt gaagcaggct 120
[0751]	ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct acactggaga gccaacatat 180
[0752]	gttgatgact tgaaggagc gtttgccttc tctttgaaa cctctgccag cactgcctat 240
[0753]	ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac atggctacat atttctgtgc aaggaaaggg 300
[0754]	attgcgaggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc gagt 354
[0755]	<210> 6
[0756]	<211> 118
[0757]	<212> PRT
[0758]	<213> 人工序列
[0759]	<220>
[0760]	<221> 来源
[0761]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"
[0762]	<400> 6
[0763]	Gln Ile His Leu Gly Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
[0764]	1 5 10 15
[0765]	Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe
[0766]	20 25 30
[0767]	Arg Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
[0768]	35 40 45
[0769]	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Val Asp Asp Leu
[0770]	50 55 60
[0771]	Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
[0772]	65 70 75 80
[0773]	Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys
[0774]	85 90 95
[0775]	Ala Arg Lys Gly Ile Ala Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[0776]	100 105 110
[0777]	Ser Val Thr Val Ser Ser
[0778]	115
[0779]	<210> 7

[0780]	<211> 339
[0781]	<212> DNA
[0782]	<213> 人工序列
[0783]	<220>
[0784]	<221> 来源
[0785]	<223> /注释="人工序列的描述: 合成多核苷酸"
[0786]	<400> 7
[0787]	aacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgagtgtgt cagcaggaga gatggtcact 60
[0788]	atgagttgta agtccagtca gagtctgtta gacagtggaa atcaaaagaa ctacttggcc 120
[0789]	tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct caacttttga tcttcggggc atccactagg 180
[0790]	gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaaccgattt cactcttacc 240
[0791]	gtcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga tcatagttat 300
[0792]	ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaa 339
[0793]	<210> 8
[0794]	<211> 113
[0795]	<212> PRT
[0796]	<213> 人工序列
[0797]	<220>
[0798]	<221> 来源
[0799]	<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"
[0800]	<400> 8
[0801]	Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Ala Gly
[0802]	1 5 10 15
[0803]	Glu Met Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
[0804]	20 25 30
[0805]	Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0806]	35 40 45
[0807]	Pro Pro Gln Leu Leu Ile Phe Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[0808]	50 55 60
[0809]	Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0810]	65 70 75 80
[0811]	Val Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
[0812]	85 90 95
[0813]	Asp His Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[0814]	100 105 110
[0815]	Lys
[0816]	<210> 9
[0817]	<211> 342
[0818]	<212> DNA

[0819] <213> 人工序列  
 [0820] <220>  
 [0821] <221> 来源  
 [0822] <223> /注释="人工序列的描述: 合成多核苷酸"  
 [0823] <400> 9  
 [0824] caggtccaac tgcaacagcc tggggctgaa ctggcaaaac ctggggcctc agtgaggatg 60  
 [0825] tcctgcaagg cttctggcta cacctttact agttactgga tgcactgggt aaaacagagg 120  
 [0826] cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gcagtgggtca tattgagaac 180  
 [0827] aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 [0828] atgcaactga gcagcctgac atttgaggac tctgcagtct attactgtgc aagaggacgg 300  
 [0829] tttgcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctcga gt 342  
 [0830] <210> 10  
 [0831] <211> 114  
 [0832] <212> PRT  
 [0833] <213> 人工序列  
 [0834] <220>  
 [0835] <221> 来源  
 [0836] <223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"  
 [0837] <400> 10  
 [0838] Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala  
 [0839] 1 5 10 15  
 [0840] Ser Val Arg Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 [0841] 20 25 30  
 [0842] Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 [0843] 35 40 45  
 [0844] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly His Ile Glu Asn Asn Gln Lys Phe  
 [0845] 50 55 60  
 [0846] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 [0847] 65 70 75 80  
 [0848] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0849] 85 90 95  
 [0850] Ala Arg Gly Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 [0851] 100 105 110  
 [0852] Ser Ser  
 [0853] <210> 11  
 [0854] <211> 324  
 [0855] <212> DNA  
 [0856] <213> 人工序列  
 [0857] <220>

[0858] <221> 来源  
 [0859] <223> /注释="人工序列的描述：合成多核苷酸"  
 [0860] <400> 11  
 [0861] gatattgtga tgaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctcctgggga gaaggtcacc 60  
 [0862] ttgacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tccggctact tgtactggta ccagcagaag 120  
 [0863] ccaggatcct cccccaact ctggatttat agcacatcca acctggcttc tggagtcctc 180  
 [0864] gctcgcttca gtggcagtggt gtctgggacc tcttactctc tcacagtcaa cagcatggag 240  
 [0865] gctgaagatg ctgcctctta tttctgccat cagtggagta gttacccatt cacgttcggc 300  
 [0866] tcggggacca agctggagct gaaa 324  
 [0867] <210> 12  
 [0868] <211> 108  
 [0869] <212> PRT  
 [0870] <213> 人工序列  
 [0871] <220>  
 [0872] <221> 来源  
 [0873] <223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"  
 [0874] <400> 12  
 [0875] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 [0876] 1 5 10 15  
 [0877] Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Gly  
 [0878] 20 25 30  
 [0879] Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp  
 [0880] 35 40 45  
 [0881] Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser  
 [0882] 50 55 60  
 [0883] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Val Asn Ser Met Glu  
 [0884] 65 70 75 80  
 [0885] Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro  
 [0886] 85 90 95  
 [0887] Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 [0888] 100 105  
 [0889] <210> 13  
 [0890] <211> 354  
 [0891] <212> DNA  
 [0892] <213> 人工序列  
 [0893] <220>  
 [0894] <221> 来源  
 [0895] <223> /注释="人工序列的描述：合成多核苷酸"  
 [0896] <400> 13

[0897] caggtgcagc tgggtgcagtc tggatccgag ctgaagaaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60  
 [0898] tcctgcaagg cttccggcta cacctttacc aacttccgga tgaactgggt caagcaggcc 120  
 [0899] ccaggccagg gcctgaaatg gatgggctgg atcaacacct acaccggcga gcccacctac 180  
 [0900] gtggacgacc tgaagggcag attcgtgttc tccctggaca cctccgtgtc caccgcctac 240  
 [0901] ctgcagatct ccagcctgaa ggccgaggat accgccgtgt actactgcgc ccggaaggga 300  
 [0902] atgccagag ccatggatta ttggggccag ggcaccaccg tgacagtctc gagt 354  
 [0903] <210> 14  
 [0904] <211> 118  
 [0905] <212> PRT  
 [0906] <213> 人工序列  
 [0907] <220>  
 [0908] <221> 来源  
 [0909] <223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"  
 [0910] <400> 14  
 [0911] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0912] 1 5 10 15  
 [0913] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe  
 [0914] 20 25 30  
 [0915] Arg Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met  
 [0916] 35 40 45  
 [0917] Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Val Asp Asp Leu  
 [0918] 50 55 60  
 [0919] Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr  
 [0920] 65 70 75 80  
 [0921] Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0922] 85 90 95  
 [0923] Ala Arg Lys Gly Ile Ala Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 [0924] 100 105 110  
 [0925] Thr Val Thr Val Ser Ser  
 [0926] 115  
 [0927] <210> 15  
 [0928] <211> 339  
 [0929] <212> DNA  
 [0930] <213> 人工序列  
 [0931] <220>  
 [0932] <221> 来源  
 [0933] <223> /注释="人工序列的描述：合成多核苷酸"  
 [0934] <400> 15  
 [0935] gacatcgtga tgaccagtc ccccgactct ctggccgtgt ctctgggcga gagagccacc 60

[0936] atcaactgca agtcctccca gtcctgctg gactccggca accagaagaa ctacctggcc 120  
 [0937] tggtatcagc agaagccccg ccagcctccc aagctgctga tctttggcgc ctccacccgg 180  
 [0938] gaatctggcg tgcccgatag attctccggc tccggctctg gcaccgactt taccctgacc 240  
 [0939] atcagctccc tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gccagaacga ccactcctac 300  
 [0940] ccctacacct tcggccaggg caccaagctg gaaatcaag 339  
 [0941] <210> 16  
 [0942] <211> 113  
 [0943] <212> PRT  
 [0944] <213> 人工序列  
 [0945] <220>  
 [0946] <221> 来源  
 [0947] <223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"  
 [0948] <400> 16  
 [0949] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [0950] 1 5 10 15  
 [0951] Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 [0952] 20 25 30  
 [0953] Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 [0954] 35 40 45  
 [0955] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 [0956] 50 55 60  
 [0957] Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 [0958] 65 70 75 80  
 [0959] Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn  
 [0960] 85 90 95  
 [0961] Asp His Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 [0962] 100 105 110  
 [0963] Lys  
 [0964] <210> 17  
 [0965] <211> 342  
 [0966] <212> DNA  
 [0967] <213> 人工序列  
 [0968] <220>  
 [0969] <221> 来源  
 [0970] <223> /注释="人工序列的描述：合成多核苷酸"  
 [0971] <400> 17  
 [0972] caggtgcagc tggtgcagtc tggcgctgaa gtgaagaaac ccggtcctc cgtgaaggtg 60  
 [0973] tcttgcaagg cctccggcta cacctttacc agctactgga tgcactgggt gcgacaggcc 120  
 [0974] cctggacagg gcctggaatg gatgggctac atcaaccct ccagcggcca catcgagaac 180

[0975] aaccagaaat tcaaggaccg cgtgaccatc accgccgaca agtccacctc caccgcctac 240  
 [0976] atggaactgt cctccctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcaga 300  
 [0977] ttgcctact ggggccaggg caccctcgtg acagtctcga gt 342  
 [0978] <210> 18  
 [0979] <211> 114  
 [0980] <212> PRT  
 [0981] <213> 人工序列  
 [0982] <220>  
 [0983] <221> 来源  
 [0984] <223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"  
 [0985] <400> 18  
 [0986] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 [0987] 1 5 10 15  
 [0988] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 [0989] 20 25 30  
 [0990] Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [0991] 35 40 45  
 [0992] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly His Ile Glu Asn Asn Gln Lys Phe  
 [0993] 50 55 60  
 [0994] Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 [0995] 65 70 75 80  
 [0996] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0997] 85 90 95  
 [0998] Ala Arg Gly Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 [0999] 100 105 110  
 [1000] Ser Ser  
 [1001] <210> 19  
 [1002] <211> 324  
 [1003] <212> DNA  
 [1004] <213> 人工序列  
 [1005] <220>  
 [1006] <221> 来源  
 [1007] <223> /注释="人工序列的描述：合成多核苷酸"  
 [1008] <400> 19  
 [1009] gagatcgtgc tgaccagtc tectgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagctacc 60  
 [1010] ctgtctctgct ccgcctcttc ctctgtgtcc tccggetacc tgtactggta tcagcagaag 120  
 [1011] cccggccagg cccctcggtc gctgatctac tctacctcca acctggcctc cggcattcct 180  
 [1012] gccagattct ccggtctctg ctctggcacc gactttaccc tgaccatctc cagcctggaa 240  
 [1013] cccgaggact tcgccgtgta ctactgccac cagtgggtcca gctaccctt cacctttggc 300

[1014] tccggcacca agctggaaat caag 324  
 [1015] <210> 20  
 [1016] <211> 108  
 [1017] <212> PRT  
 [1018] <213> 人工序列  
 [1019] <220>  
 [1020] <221> 来源  
 [1021] <223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"  
 [1022] <400> 20  
 [1023] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 [1024] 1 5 10 15  
 [1025] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Gly  
 [1026] 20 25 30  
 [1027] Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 [1028] 35 40 45  
 [1029] Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser  
 [1030] 50 55 60  
 [1031] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu  
 [1032] 65 70 75 80  
 [1033] Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro  
 [1034] 85 90 95  
 [1035] Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [1036] 100 105  
 [1037] <210> 21  
 [1038] <211> 8  
 [1039] <212> PRT  
 [1040] <213> 人工序列  
 [1041] <220>  
 [1042] <221> 来源  
 [1043] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
 [1044] <400> 21  
 [1045] Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe Arg  
 [1046] 1 5  
 [1047] <210> 22  
 [1048] <211> 8  
 [1049] <212> PRT  
 [1050] <213> 人工序列  
 [1051] <220>  
 [1052] <221> 来源



- [1053] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
[1054] <400> 22  
[1055] Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro  
[1056] 1 5  
[1057] <210> 23  
[1058] <211> 11  
[1059] <212> PRT  
[1060] <213> 人工序列  
[1061] <220>  
[1062] <221> 来源  
[1063] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
[1064] <400> 23  
[1065] Ala Arg Lys Gly Ile Ala Arg Ala Met Asp Tyr  
[1066] 1 5 10  
[1067] <210> 24  
[1068] <211> 12  
[1069] <212> PRT  
[1070] <213> 人工序列  
[1071] <220>  
[1072] <221> 来源  
[1073] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
[1074] <400> 24  
[1075] Gln Ser Leu Leu Asp Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr  
[1076] 1 5 10  
[1077] <210> 25  
[1078] <211> 3  
[1079] <212> PRT  
[1080] <213> 人工序列  
[1081] <220>  
[1082] <221> 来源  
[1083] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
[1084] <400> 25  
[1085] Gly Ala Ser  
[1086] 1  
[1087] <210> 26  
[1088] <211> 9  
[1089] <212> PRT  
[1090] <213> 人工序列  
[1091] <220>

[1092] <221> 来源  
[1093] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
[1094] <400> 26  
[1095] Gln Asn Asp His Ser Tyr Pro Tyr Thr  
[1096] 1 5  
[1097] <210> 27  
[1098] <211> 8  
[1099] <212> PRT  
[1100] <213> 人工序列  
[1101] <220>  
[1102] <221> 来源  
[1103] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
[1104] <400> 27  
[1105] Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp  
[1106] 1 5  
[1107] <210> 28  
[1108] <211> 8  
[1109] <212> PRT  
[1110] <213> 人工序列  
[1111] <220>  
[1112] <221> 来源  
[1113] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
[1114] <400> 28  
[1115] Ile Asn Pro Ser Ser Gly His Ile  
[1116] 1 5  
[1117] <210> 29  
[1118] <211> 7  
[1119] <212> PRT  
[1120] <213> 人工序列  
[1121] <220>  
[1122] <221> 来源  
[1123] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
[1124] <400> 29  
[1125] Ala Arg Gly Arg Phe Ala Tyr  
[1126] 1 5  
[1127] <210> 30  
[1128] <211> 7  
[1129] <212> PRT  
[1130] <213> 人工序列

[1131] <220>  
 [1132] <221> 来源  
 [1133] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
 [1134] <400> 30  
 [1135] Ser Ser Val Ser Ser Gly Tyr  
 [1136] 1 5  
 [1137] <210> 31  
 [1138] <211> 3  
 [1139] <212> PRT  
 [1140] <213> 人工序列  
 [1141] <220>  
 [1142] <221> 来源  
 [1143] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
 [1144] <400> 31  
 [1145] Ser Thr Ser  
 [1146] 1  
 [1147] <210> 32  
 [1148] <211> 9  
 [1149] <212> PRT  
 [1150] <213> 人工序列  
 [1151] <220>  
 [1152] <221> 来源  
 [1153] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
 [1154] <400> 32  
 [1155] His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Phe Thr  
 [1156] 1 5  
 [1157] <210> 33  
 [1158] <211> 220  
 [1159] <212> PRT  
 [1160] <213> 人工序列  
 [1161] <220>  
 [1162] <221> 来源  
 [1163] <223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"  
 [1164] <400> 33  
 [1165] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [1166] 1 5 10 15  
 [1167] Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 [1168] 20 25 30  
 [1169] Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

[1170]	35	40	45
[1171]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val		
[1172]	50	55	60
[1173]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
[1174]	65	70	75
[1175]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn		
[1176]	85	90	95
[1177]	Asp His Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
[1178]	100	105	110
[1179]	Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
[1180]	115	120	125
[1181]	Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		
[1182]	130	135	140
[1183]	Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
[1184]	145	150	155
[1185]	Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
[1186]	165	170	175
[1187]	Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
[1188]	180	185	190
[1189]	Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
[1190]	195	200	205
[1191]	Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[1192]	210	215	220
[1193]	<210> 34		
[1194]	<211> 447		
[1195]	<212> PRT		
[1196]	<213> 人工序列		
[1197]	<220>		
[1198]	<221> 来源		
[1199]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"		
[1200]	<400> 34		
[1201]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala		
[1202]	1	5	10
[1203]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe		
[1204]	20	25	30
[1205]	Arg Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met		
[1206]	35	40	45
[1207]	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Val Asp Asp Leu		
[1208]	50	55	60

[1209]	Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
[1210]	65 70 75 80
[1211]	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1212]	85 90 95
[1213]	Ala Arg Lys Gly Ile Ala Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[1214]	100 105 110
[1215]	Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
[1216]	115 120 125
[1217]	Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
[1218]	130 135 140
[1219]	Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
[1220]	145 150 155 160
[1221]	Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
[1222]	165 170 175
[1223]	Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
[1224]	180 185 190
[1225]	Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
[1226]	195 200 205
[1227]	Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
[1228]	210 215 220
[1229]	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
[1230]	225 230 235 240
[1231]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
[1232]	245 250 255
[1233]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
[1234]	260 265 270
[1235]	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[1236]	275 280 285
[1237]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[1238]	290 295 300
[1239]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[1240]	305 310 315 320
[1241]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
[1242]	325 330 335
[1243]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[1244]	340 345 350
[1245]	Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[1246]	355 360 365
[1247]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

[1248]	370	375	380
[1249]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
[1250]	385	390	395 400
[1251]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
[1252]	405	410	415
[1253]	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
[1254]	420	425	430
[1255]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[1256]	435	440	445
[1257]	<210> 35		
[1258]	<211> 215		
[1259]	<212> PRT		
[1260]	<213> 人工序列		
[1261]	<220>		
[1262]	<221> 来源		
[1263]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"		
[1264]	<400> 35		
[1265]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[1266]	1 5 10 15		
[1267]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Gly		
[1268]	20 25 30		
[1269]	Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
[1270]	35 40 45		
[1271]	Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser		
[1272]	50 55 60		
[1273]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu		
[1274]	65 70 75 80		
[1275]	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro		
[1276]	85 90 95		
[1277]	Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala		
[1278]	100 105 110		
[1279]	Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser		
[1280]	115 120 125		
[1281]	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu		
[1282]	130 135 140		
[1283]	Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Ala Asn Leu Gln Ser Gly Asn Ser		
[1284]	145 150 155 160		
[1285]	Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		
[1286]	165 170 175		

[1287]	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
[1288]	180 185 190
[1289]	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
[1290]	195 200 205
[1291]	Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1292]	210 215
[1293]	<210> 36
[1294]	<211> 443
[1295]	<212> PRT
[1296]	<213> 人工序列
[1297]	<220>
[1298]	<221> 来源
[1299]	<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"
[1300]	<400> 36
[1301]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[1302]	1 5 10 15
[1303]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[1304]	20 25 30
[1305]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[1306]	35 40 45
[1307]	Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly His Ile Glu Asn Asn Gln Lys Phe
[1308]	50 55 60
[1309]	Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[1310]	65 70 75 80
[1311]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1312]	85 90 95
[1313]	Ala Arg Gly Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
[1314]	100 105 110
[1315]	Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
[1316]	115 120 125
[1317]	Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
[1318]	130 135 140
[1319]	Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
[1320]	145 150 155 160
[1321]	Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
[1322]	165 170 175
[1323]	Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
[1324]	180 185 190
[1325]	Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val

[1326]	195	200	205
[1327]	Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro		
[1328]	210	215	220
[1329]	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
[1330]	225	230	235
[1331]	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
[1332]	245	250	255
[1333]	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
[1334]	260	265	270
[1335]	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
[1336]	275	280	285
[1337]	Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
[1338]	290	295	300
[1339]	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
[1340]	305	310	315
[1341]	Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
[1342]	325	330	335
[1343]	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
[1344]	340	345	350
[1345]	Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
[1346]	355	360	365
[1347]	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
[1348]	370	375	380
[1349]	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
[1350]	385	390	395
[1351]	Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln		
[1352]	405	410	415
[1353]	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
[1354]	420	425	430
[1355]	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[1356]	435	440	
[1357]	<210> 37		
[1358]	<211> 19		
[1359]	<212> PRT		
[1360]	<213> 人工序列		
[1361]	<220>		
[1362]	<221> 来源		
[1363]	<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"		
[1364]	<400> 37		



[1365]	Ser Thr Trp Trp Lys Glu Pro Leu Asn Ile Val Ser Phe Leu Phe Cys
[1366]	1 5 10 15
[1367]	Phe Ala Ser
[1368]	<210> 38
[1369]	<211> 15
[1370]	<212> PRT
[1371]	<213> 人工序列
[1372]	<220>
[1373]	<221> 来源
[1374]	<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
[1375]	<400> 38
[1376]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[1377]	1 5 10 15
[1378]	<210> 39
[1379]	<211> 14
[1380]	<212> PRT
[1381]	<213> 人工序列
[1382]	<220>
[1383]	<221> 来源
[1384]	<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"
[1385]	<400> 39
[1386]	Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
[1387]	1 5 10

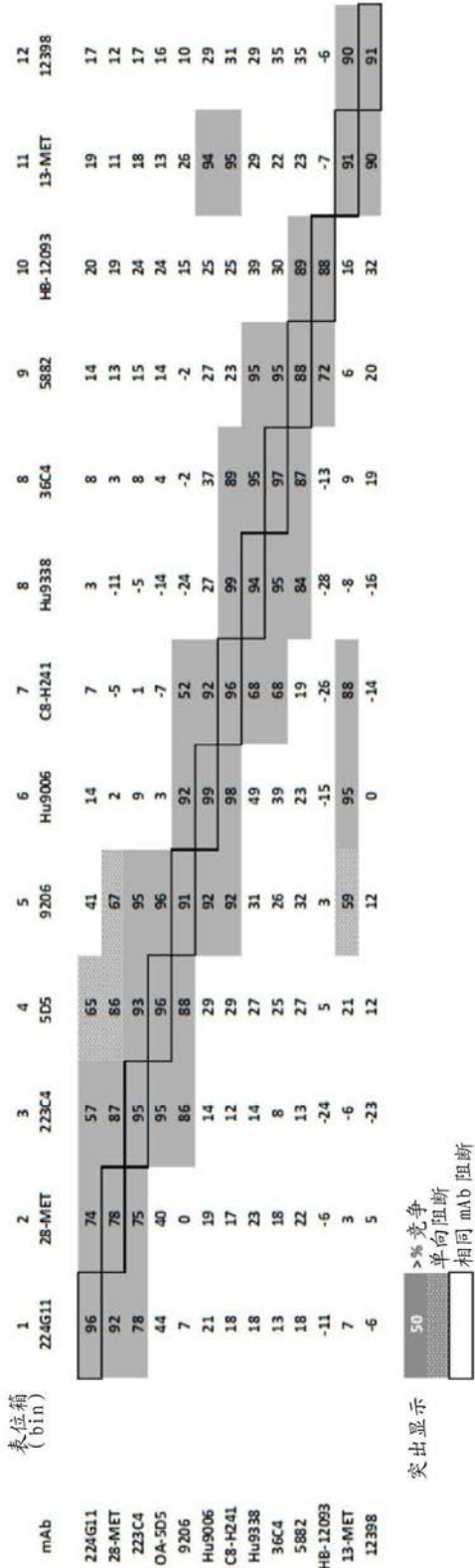


图1

构建体概述																	结合结果										
MET 构建体		SEMA α					SEMA β					PSI-IPT4					抗体										
		AA 1	25	84	163	234	308	431	480	516	563	657	742	837	933	986	Hu9006	Hu938	5882	C8-H241	3C4	5D5	224G11	Anti-SV5	Cetuximab		
人 MET		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			+	+	+	+	+	+	+	+	+		
鸡 MET		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			-	-	-	-	-	-	-	-	+		
小鼠 MET		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			-	-	-	-	-	-	-	-	+		
嵌合构建体																											
鸡 SEMA α		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
鸡 SEMA β		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
鸡 PSI 结构域		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
鸡 IPT1 结构域		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
鸡 IPT2 结构域		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
鸡 IPT3 结构域		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
鸡 IPT4 结构域		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
小鼠 Blade 1		AA 25-83	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
小鼠 Blade 1-2		AA 25-162	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI				+	+	+	(+)	+	+	+	+	+		
小鼠 Blade 1-3		AA 25-233	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI					-	-	-	-	+	+	+	+	+		
小鼠 Blade 1-4		AA 25-295	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI						-	-	-	-	+	+	+	+	+		
小鼠 Blade 1-5		AA 25-430	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI							-	-	-	-	-	+	+	+	+		
小鼠 Blade 1-6		AA 25-479	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI								-	-	-	-	-	-	+	+	+		
小鼠 Blade 1-7		AA 25-513	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI									-	-	-	-	-	-	+	+	+		
小鼠 PSI-IPT4		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			+	+	+	+	+	+	+	+	+		
小鼠 blade 7-IPT4		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			+	+	+	+	+	+	+	+	+		
小鼠 Blade 6-IPT4		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			+	+	+	+	+	+	+	+	+		
小鼠 Blade 5b		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			+	+	+	+	+	+	+	+	+		
小鼠 blade 5a		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			+	+	+	+	+	+	+	+	+		
小鼠 blade 4		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			+	+	+	+	+	+	+	+	+		
小鼠 blade 3		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			+	+	+	+	+	+	+	+	+		
小鼠 blade 2		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			+	+	+	+	+	+	+	+	+		
LS1		AA 25-122	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI			+	+	+	+	+	+	+	N.D.	+		
LS2		AA 25-224	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI					-	-	-	-	+	N.D.	+	+	+		
LS3		AA 25-312	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI						-	-	-	-	+	N.D.	+	+	+		
LS4		AA 25-371	Blade 5/6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI							-	-	-	-	-	N.D.	+	+	+		
LS5		AA 25-473	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	IPT3	IPT4	SV5-GPI								-	-	-	-	-	N.D.	+	+	+		
L113		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	AA 735-764	SV5-GPI				+	+	+	+	+	+	+	N.D.	+		
L114		Blade 1	Blade 2	Blade 3	Blade 4	Blade 5	Blade 6	Blade 7	PSI	IPT1	IPT3	AA 775-862	SV5-GPI				+	+	+	+	+	+	+	N.D.	+		

图2

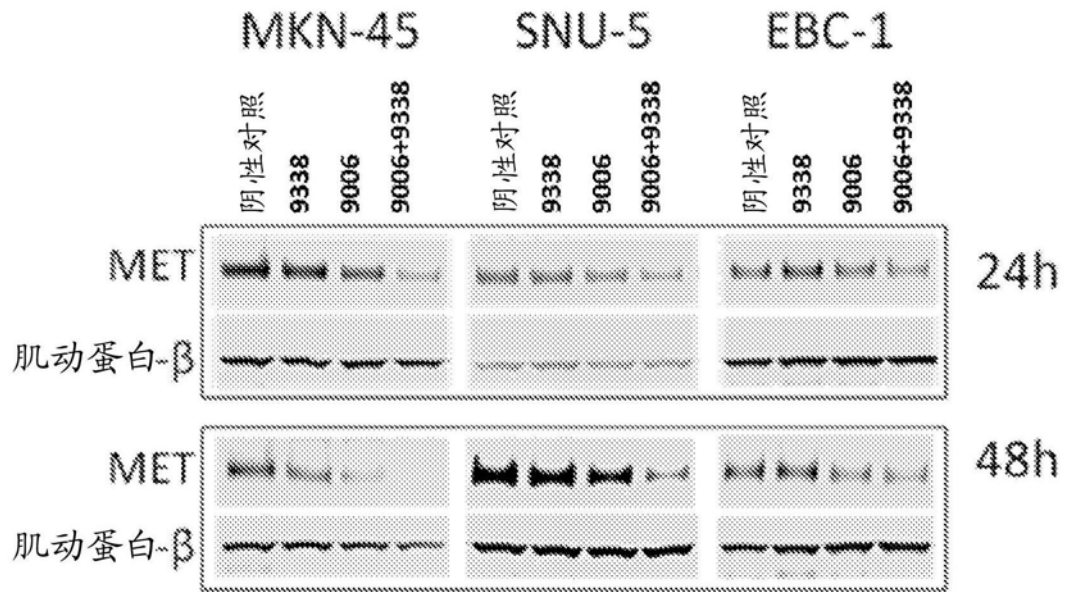


图3

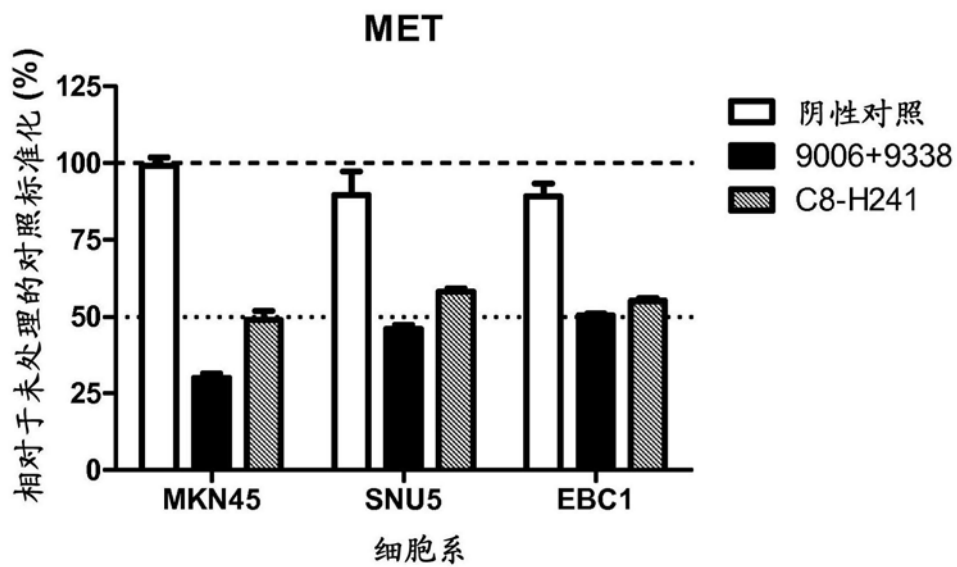
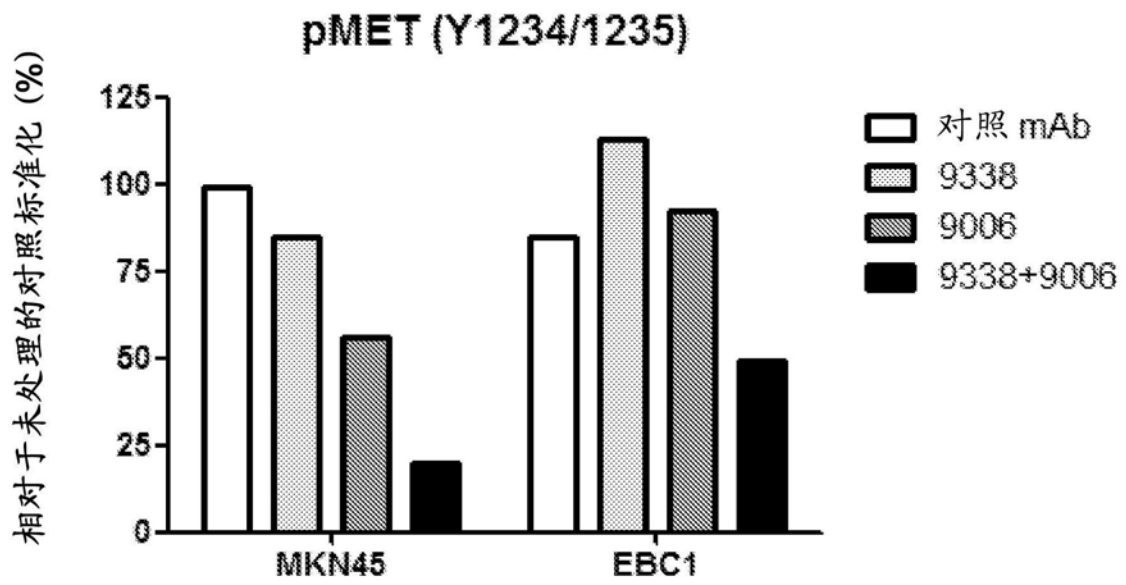


图4

A



B

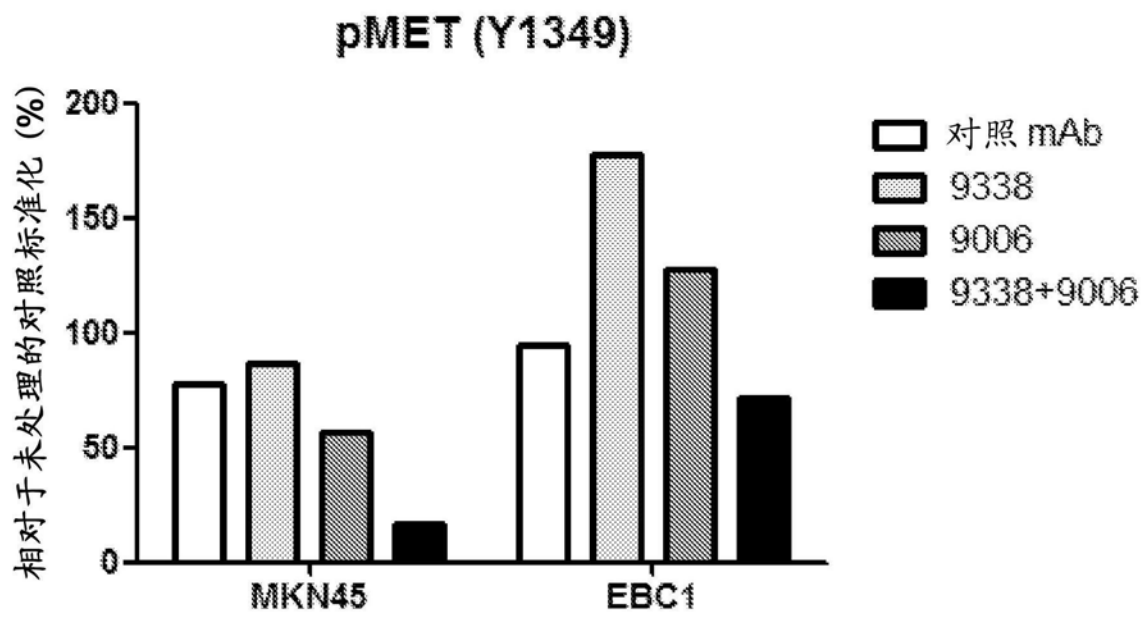
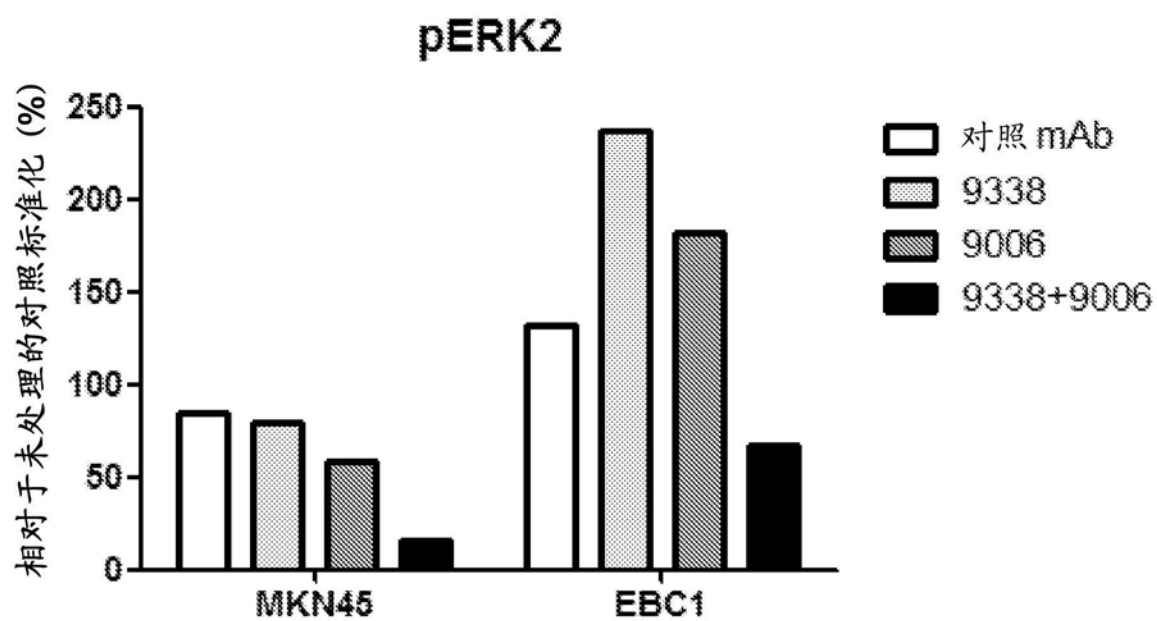


图5

A



B

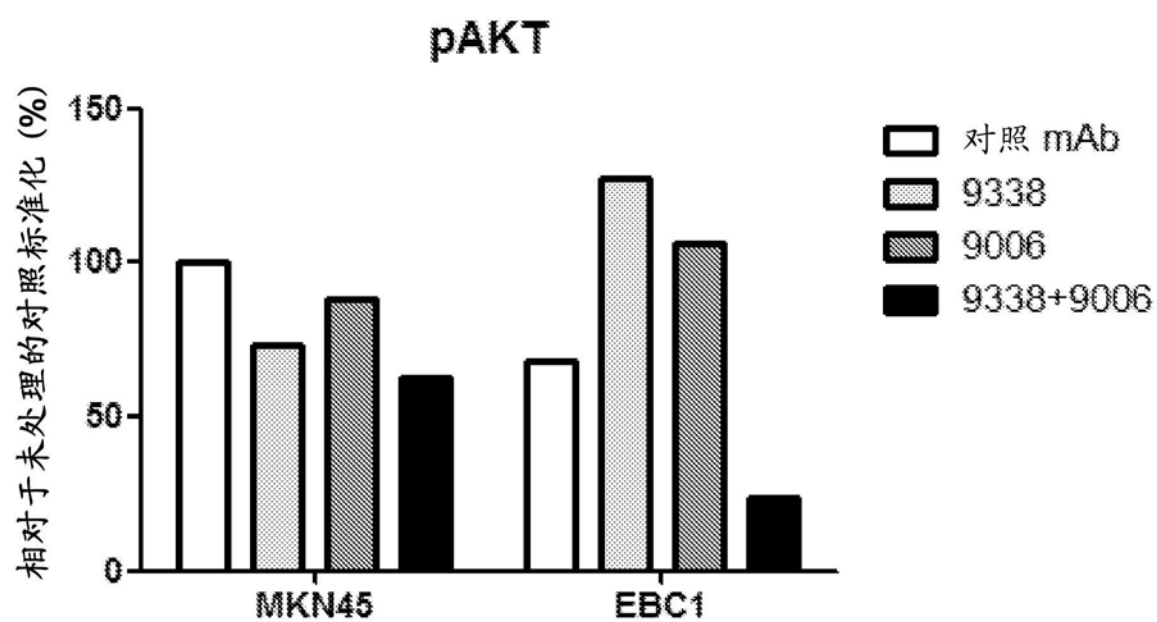


图6

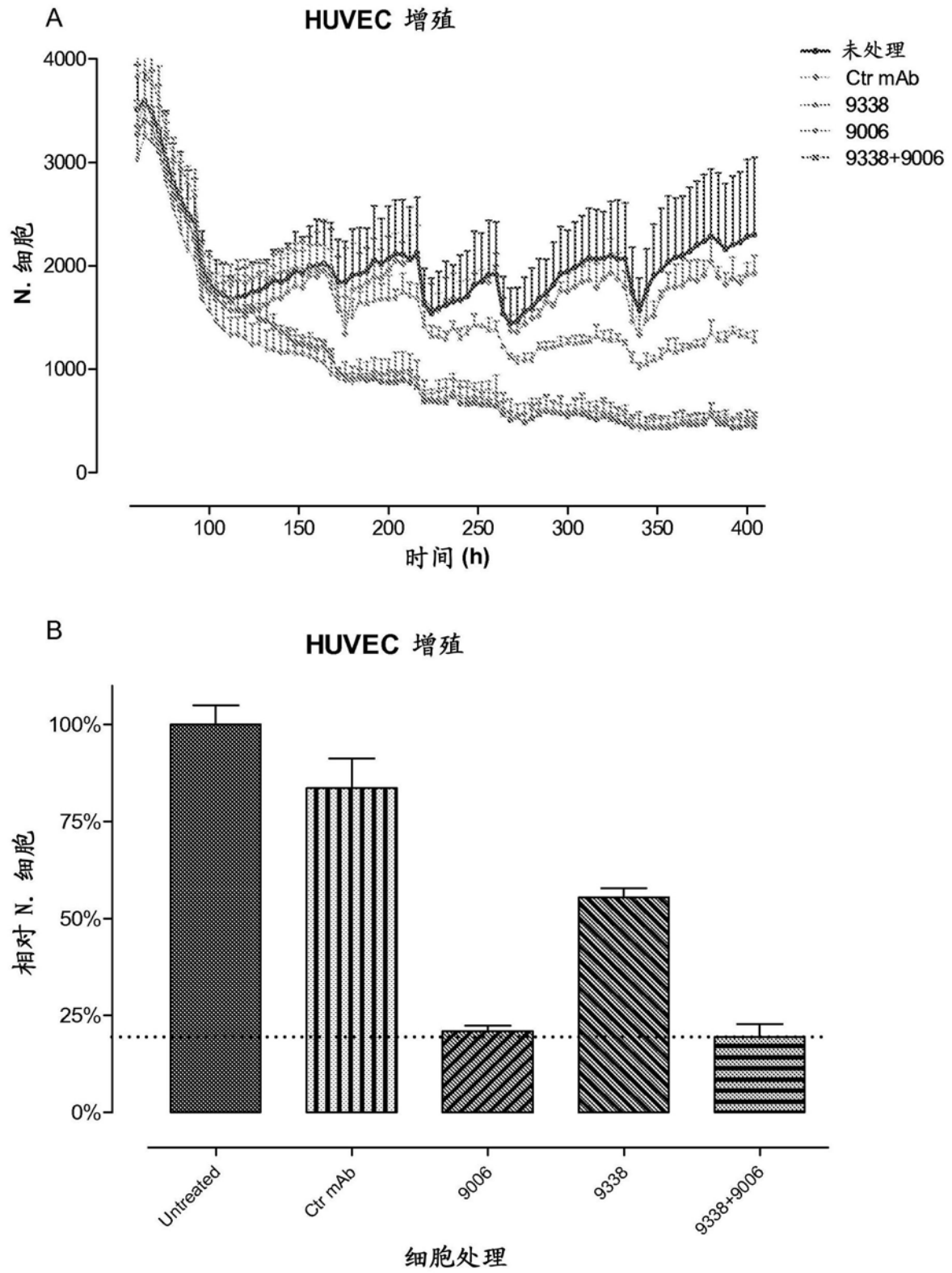


图7

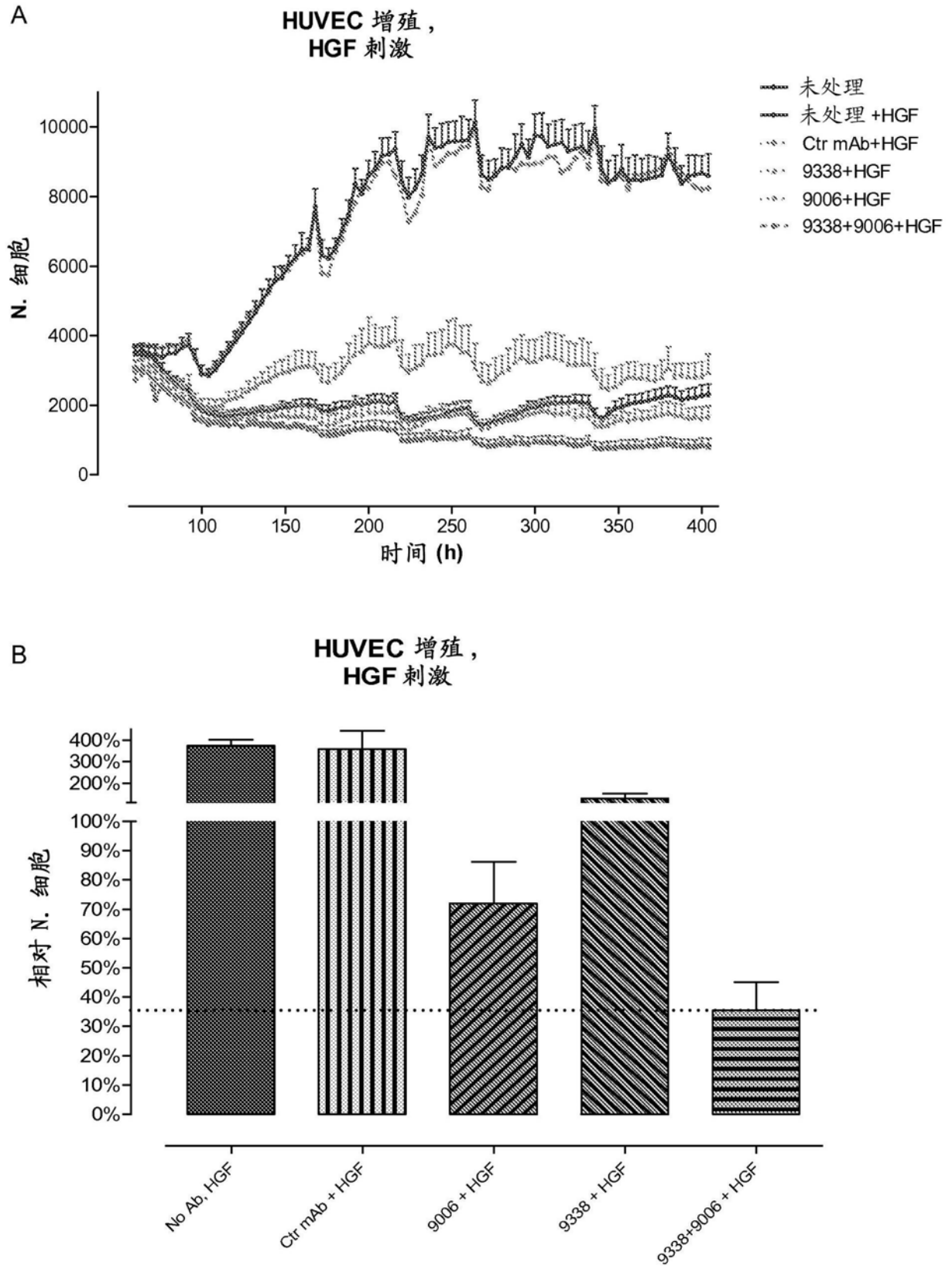


图8



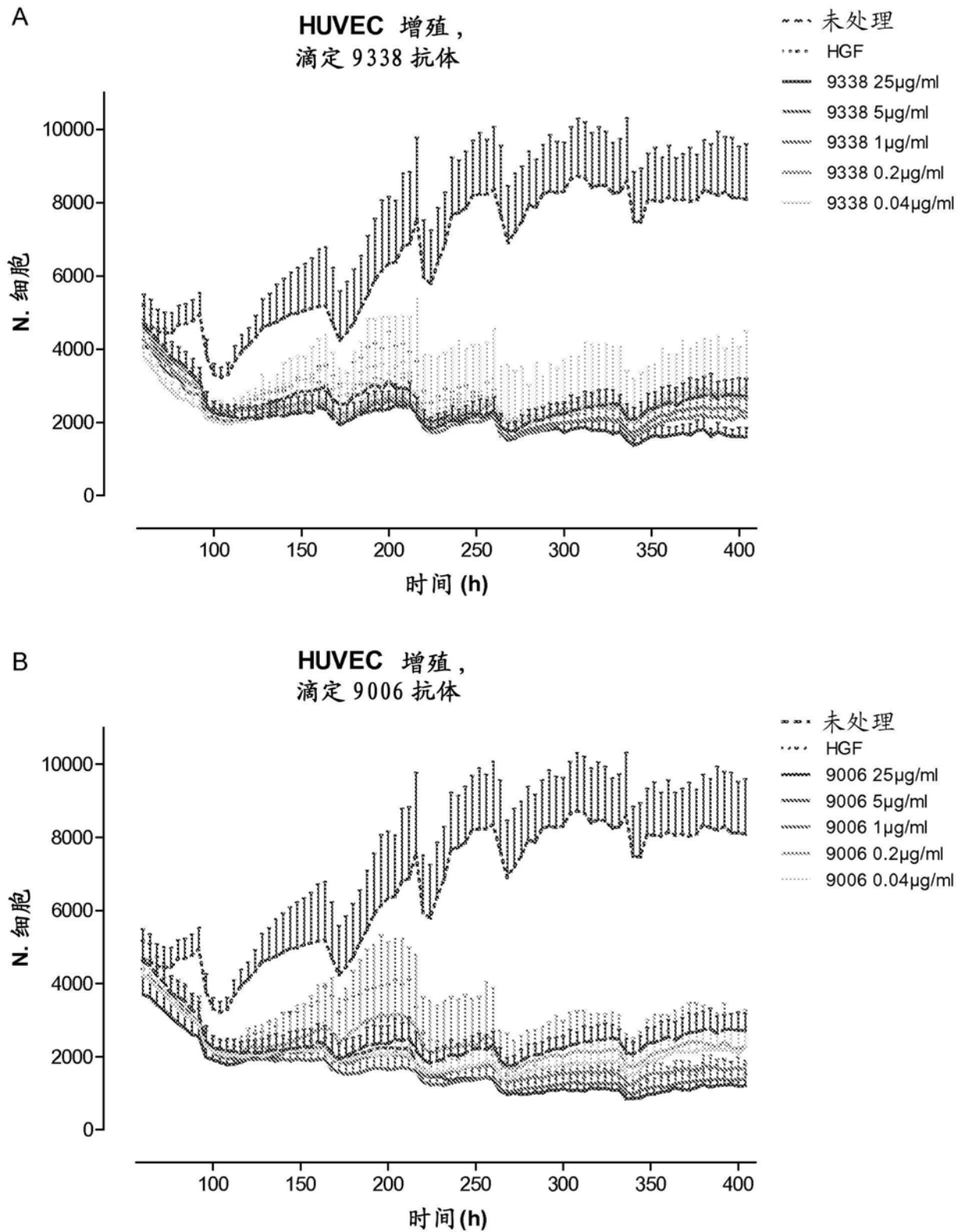


图9

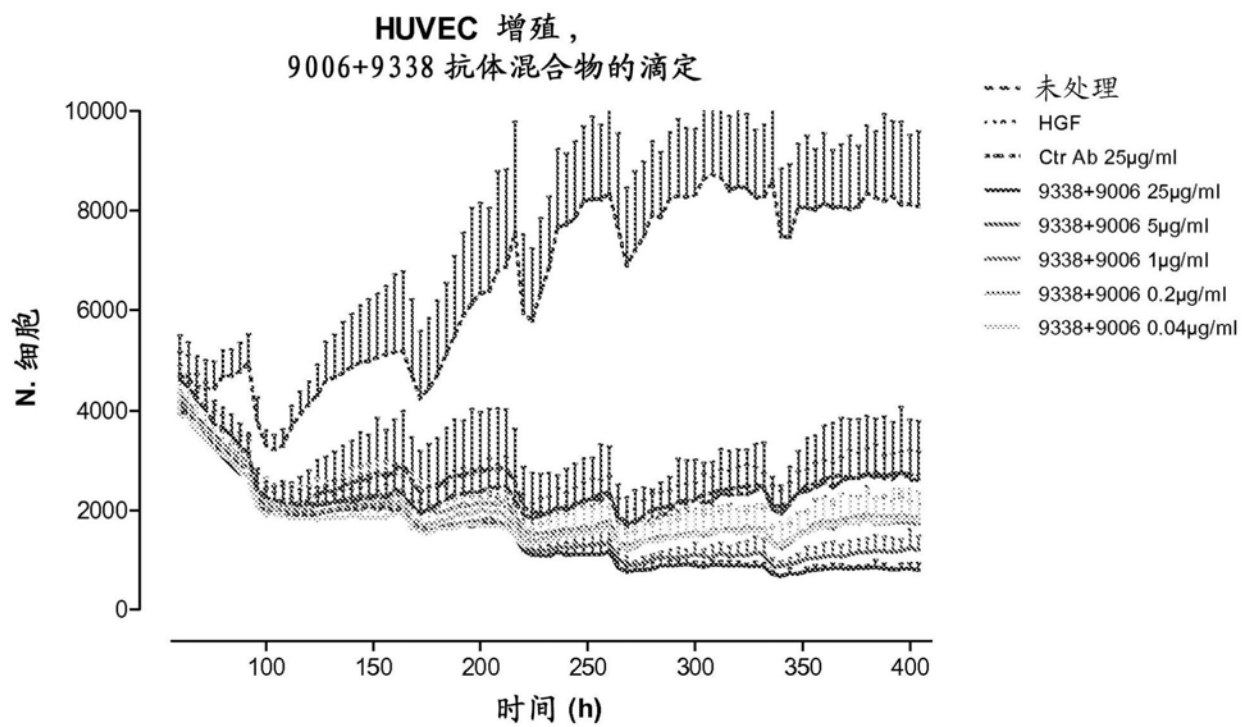


图10

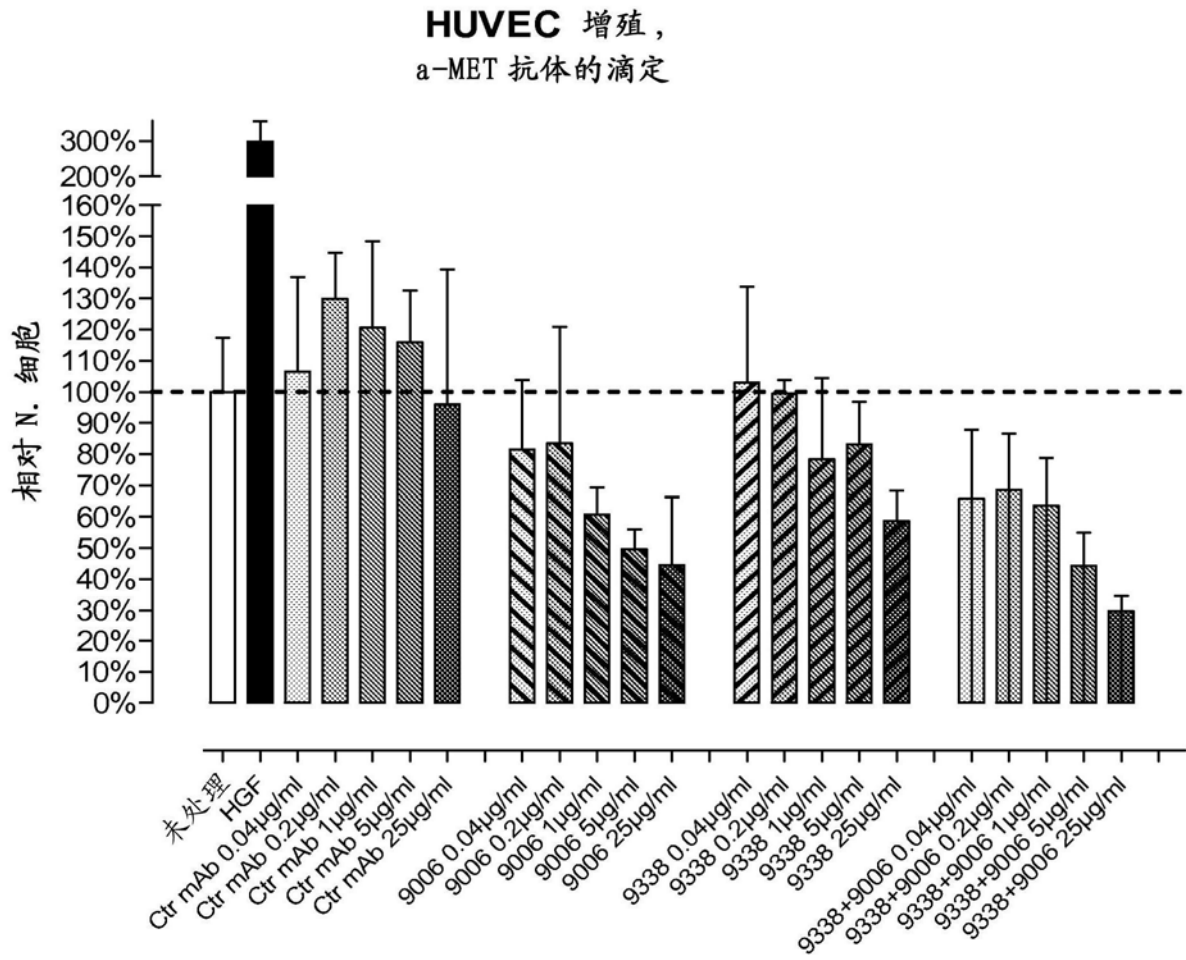


图11

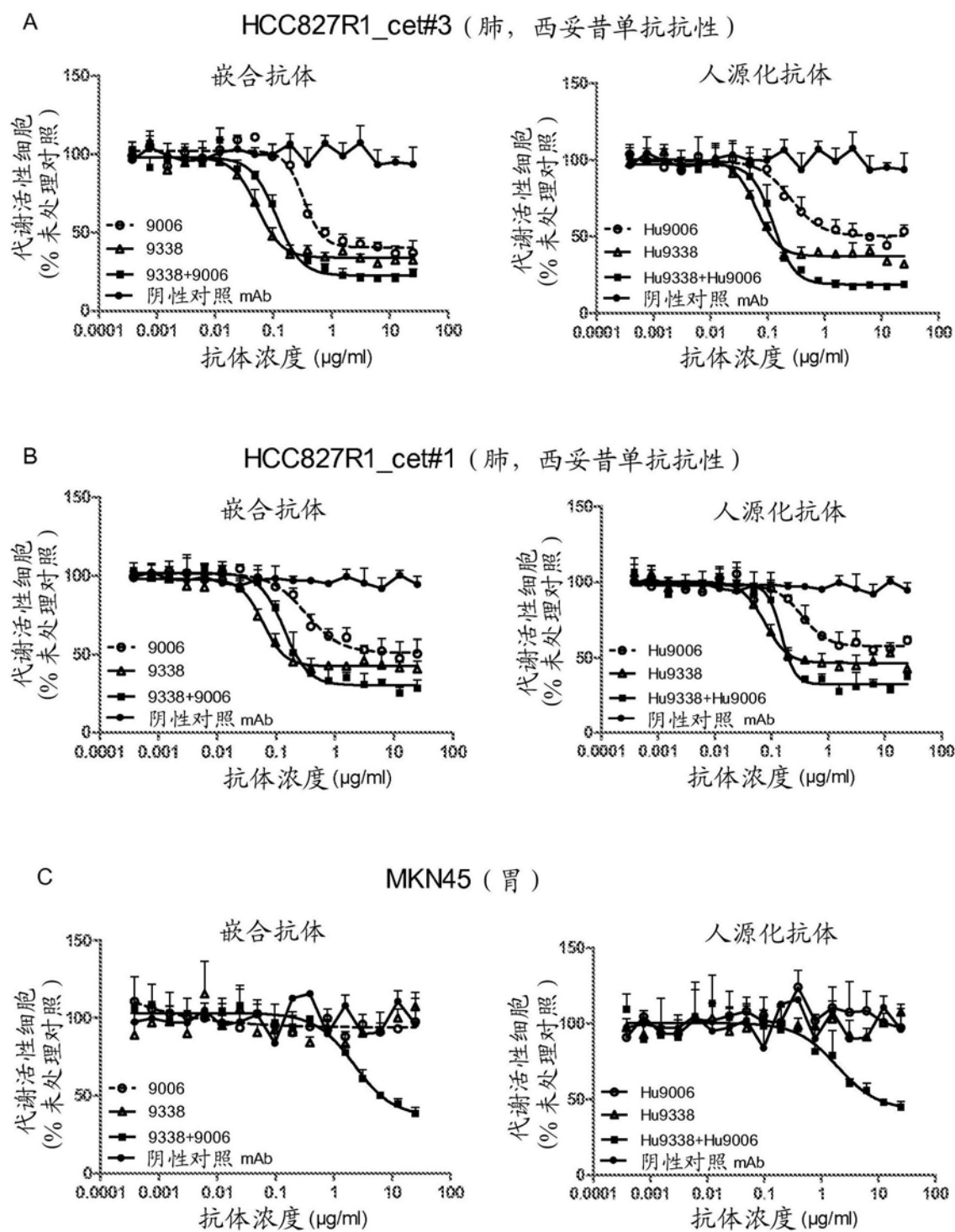


图12

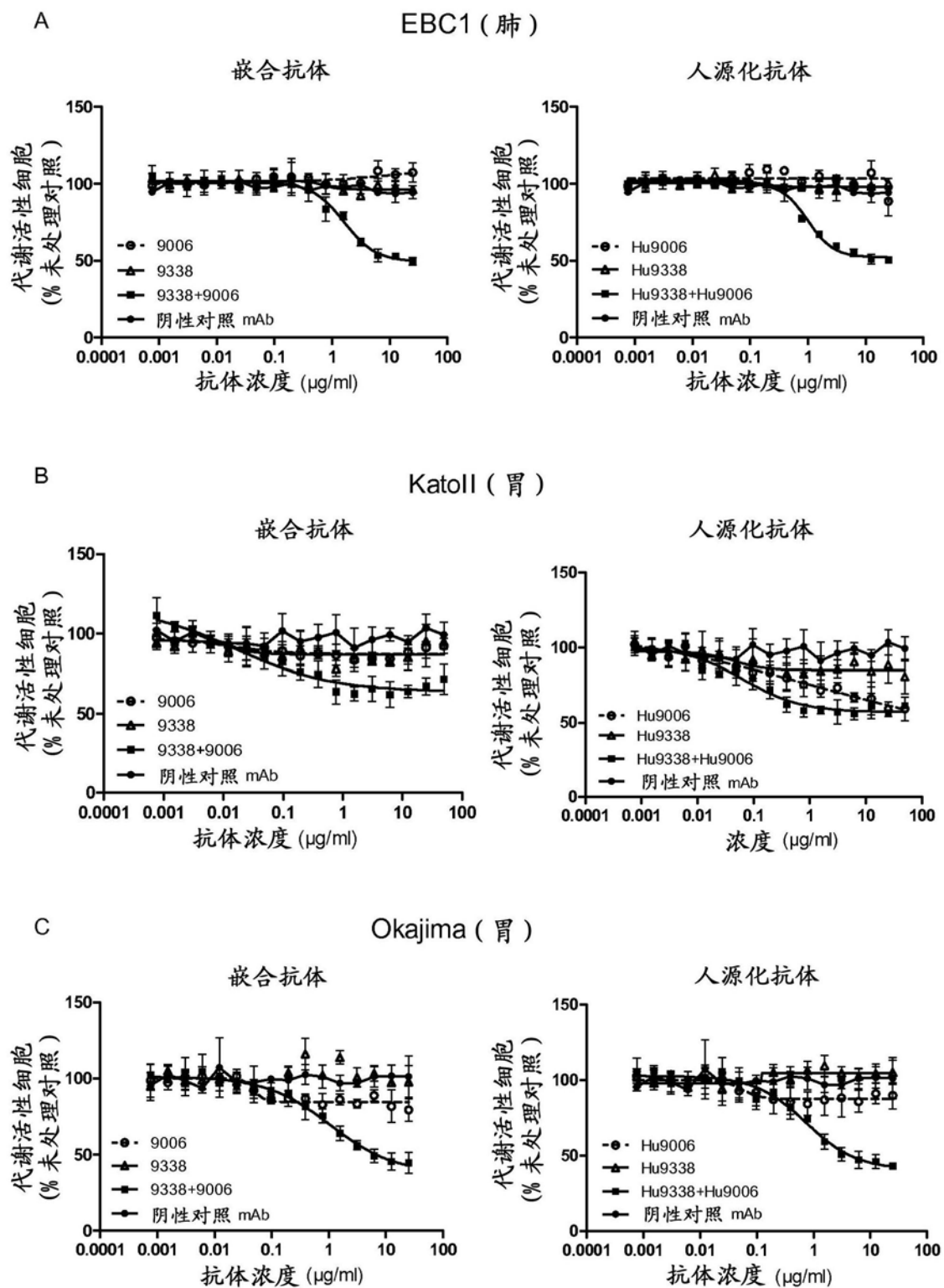


图13

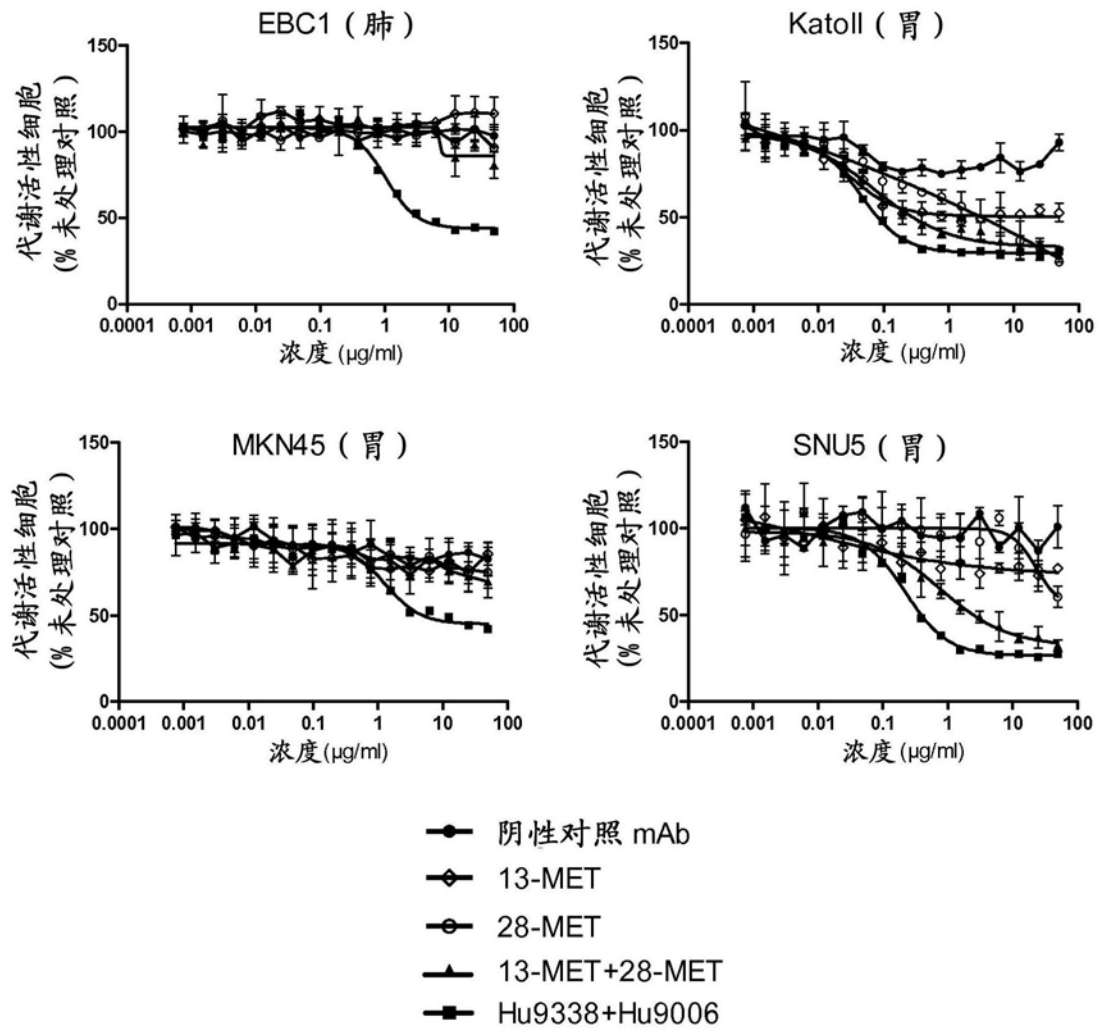


图14

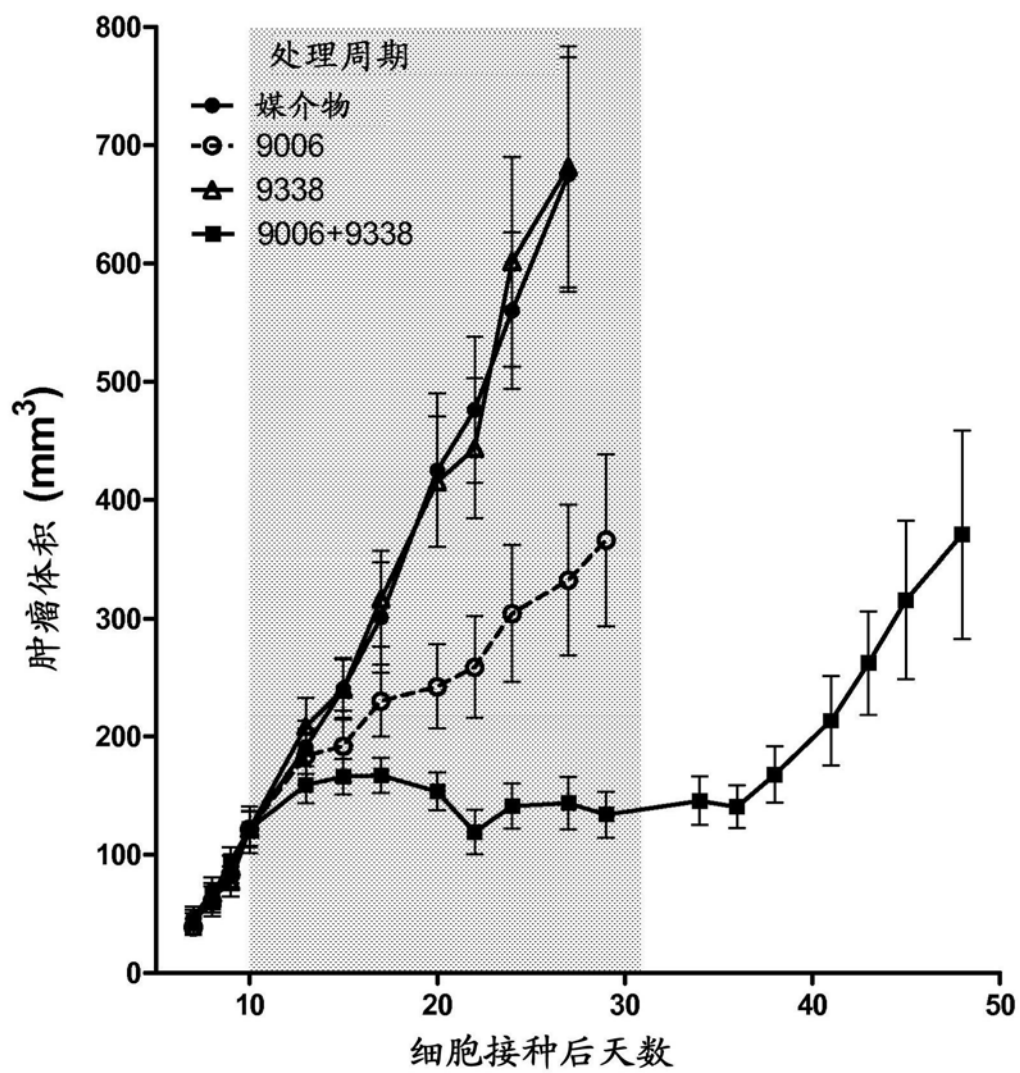


图15

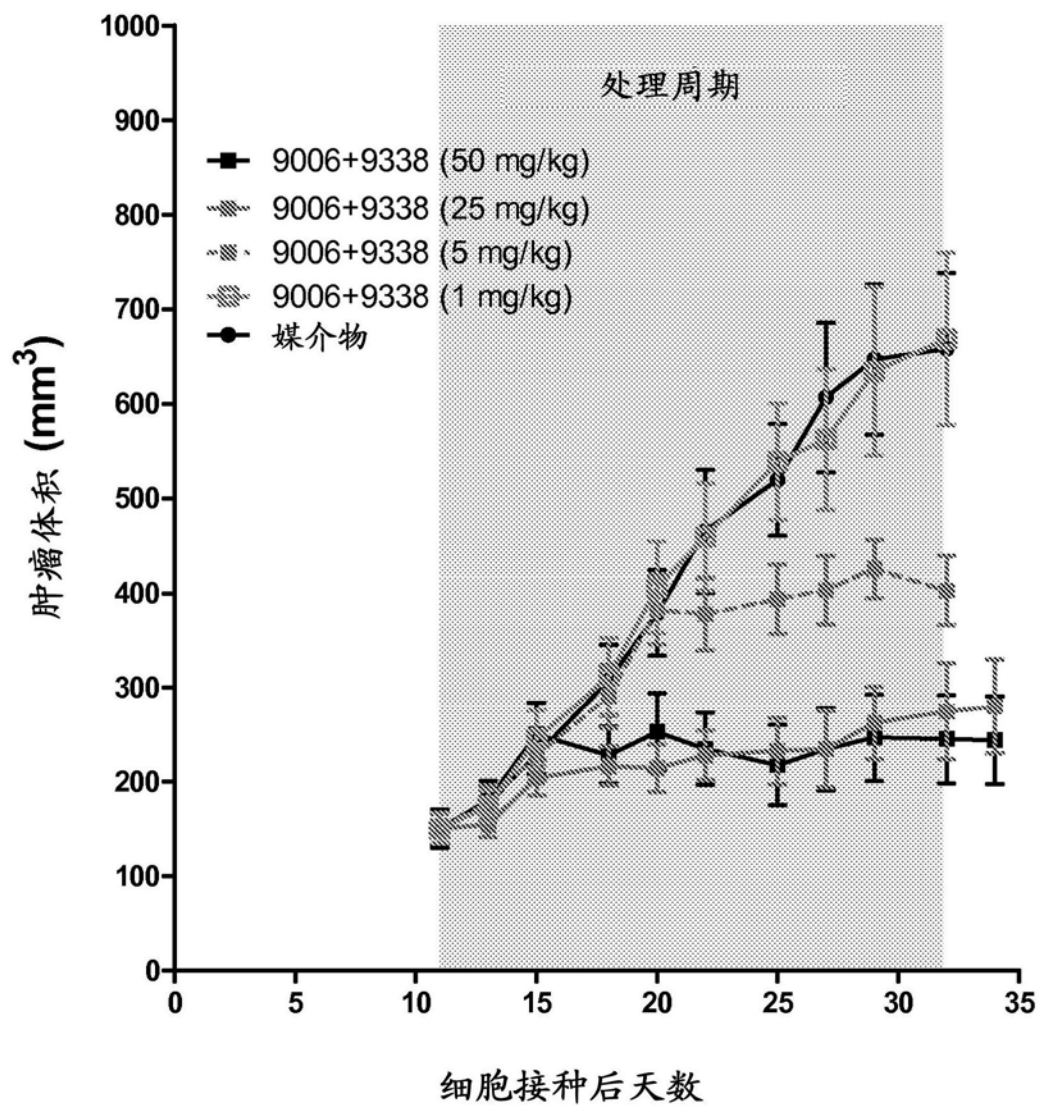


图16



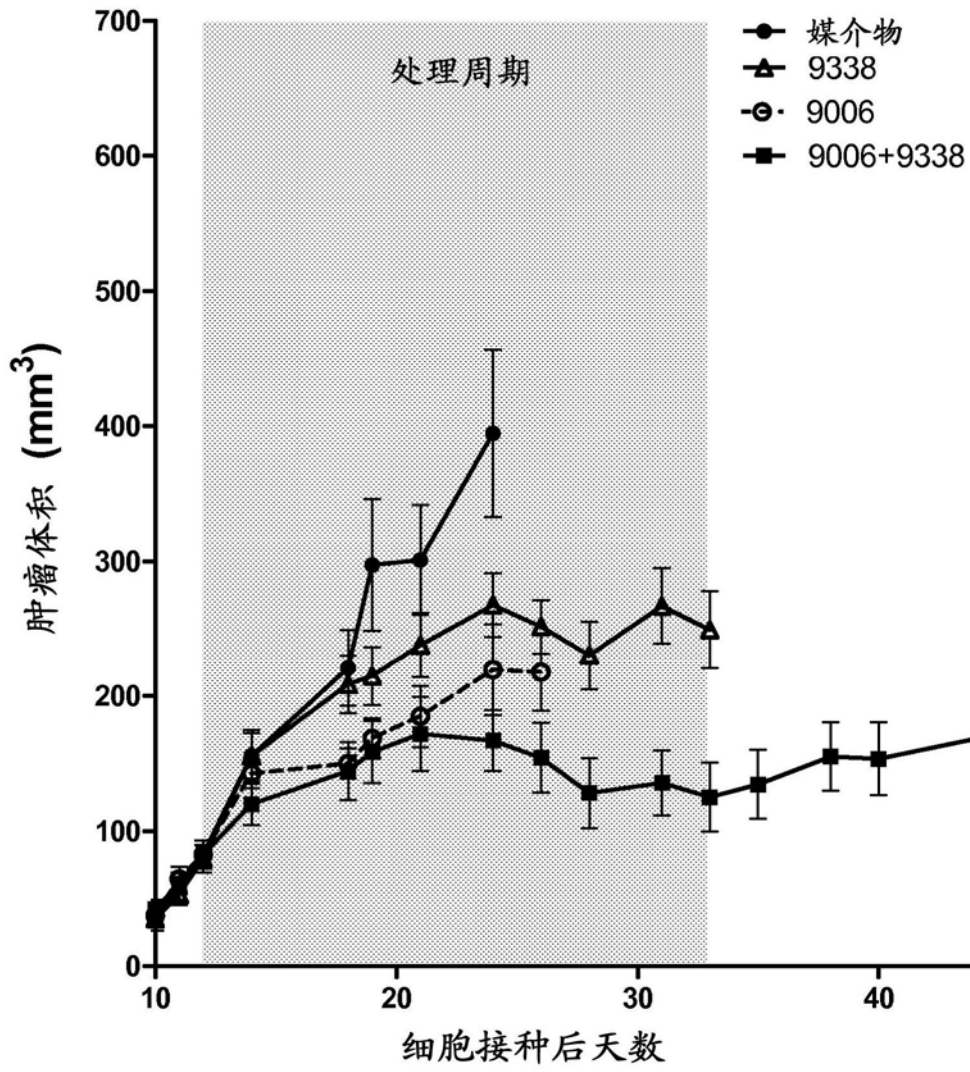


图17

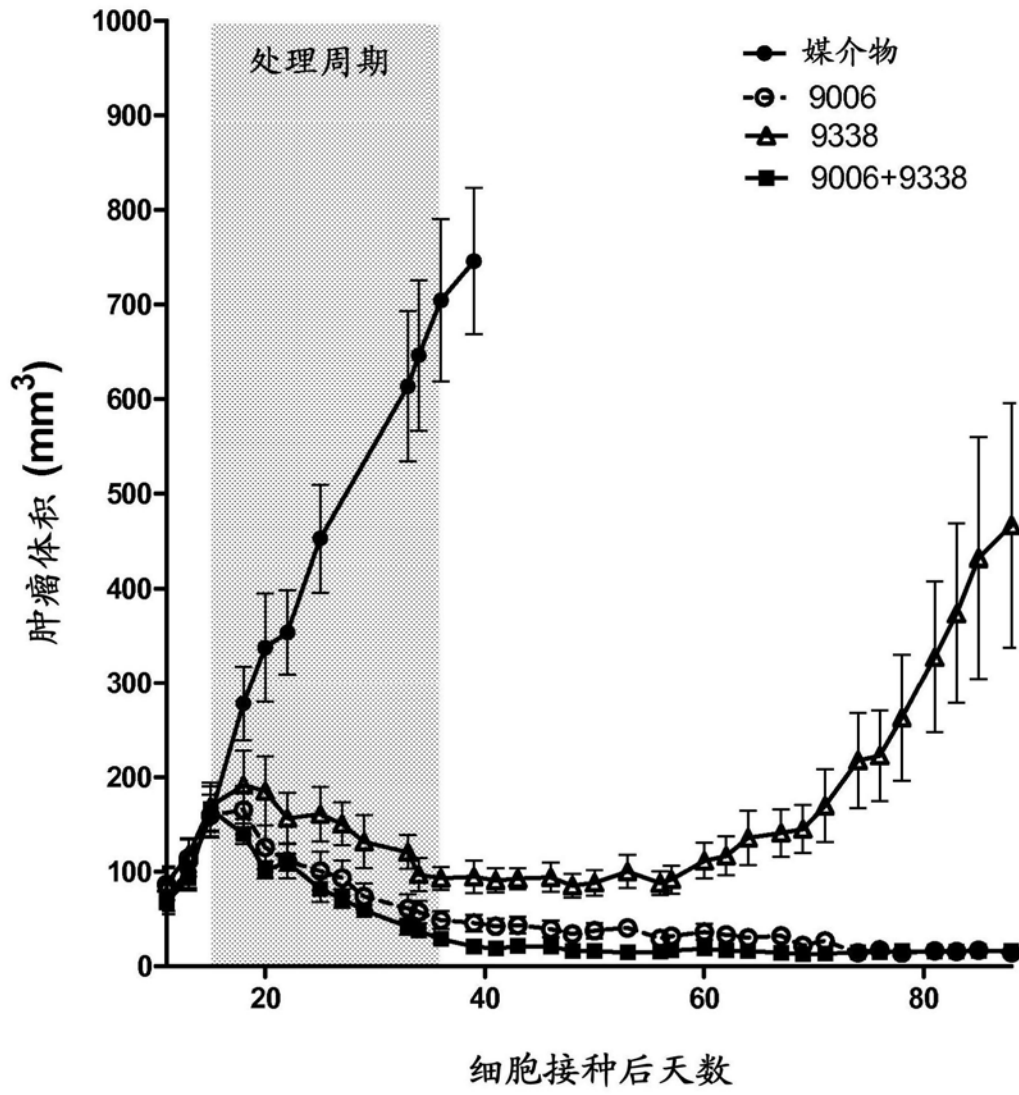


图18

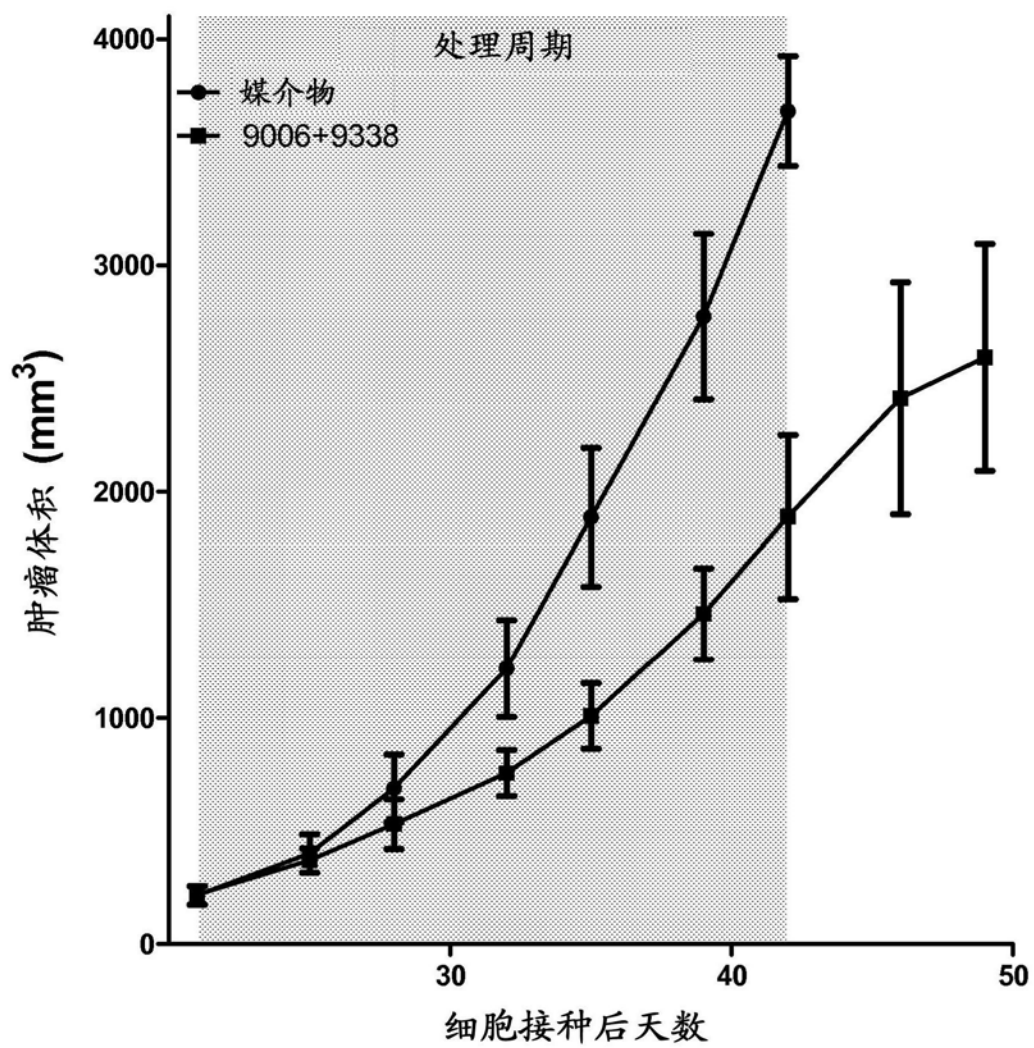


图19

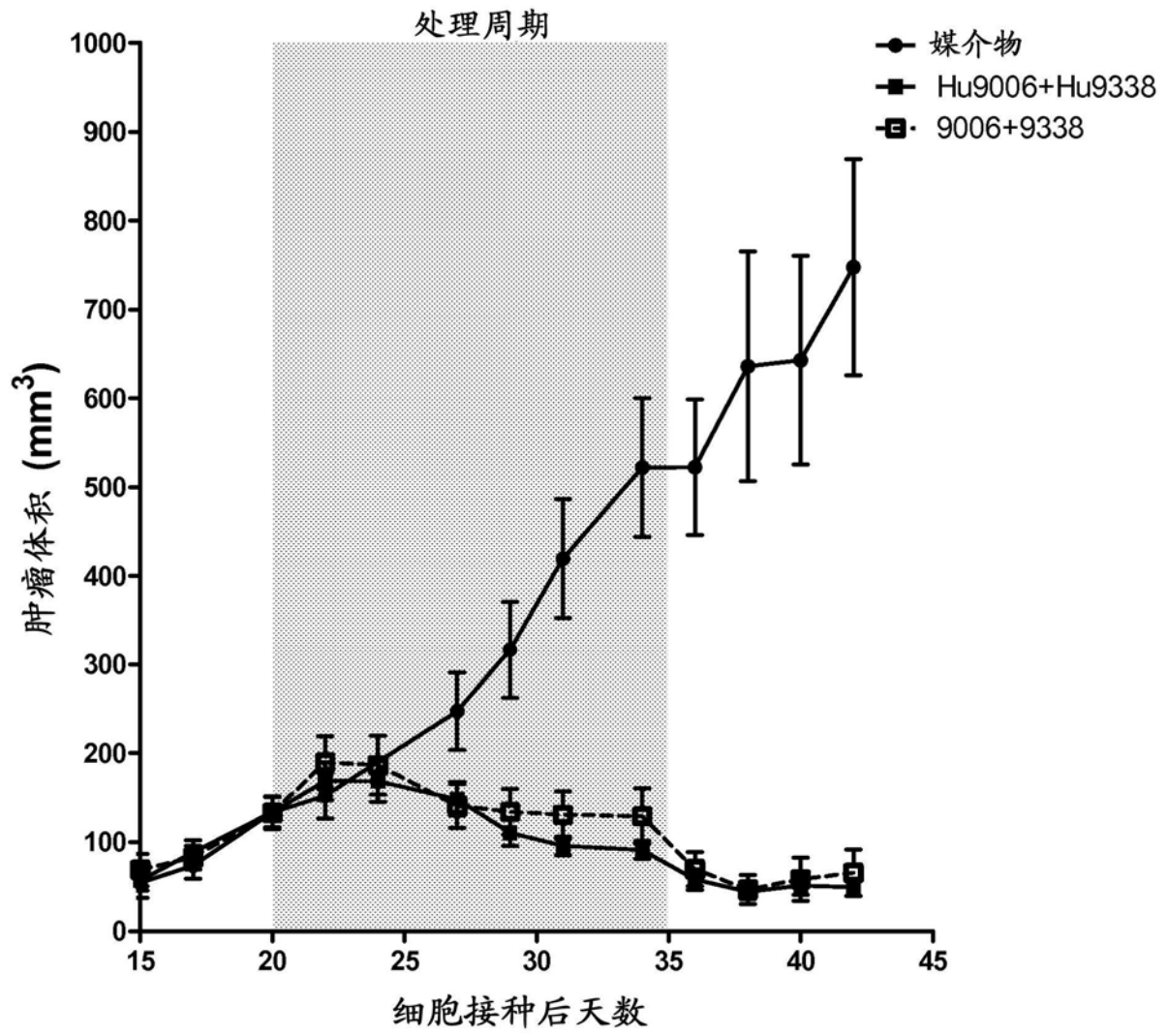


图20

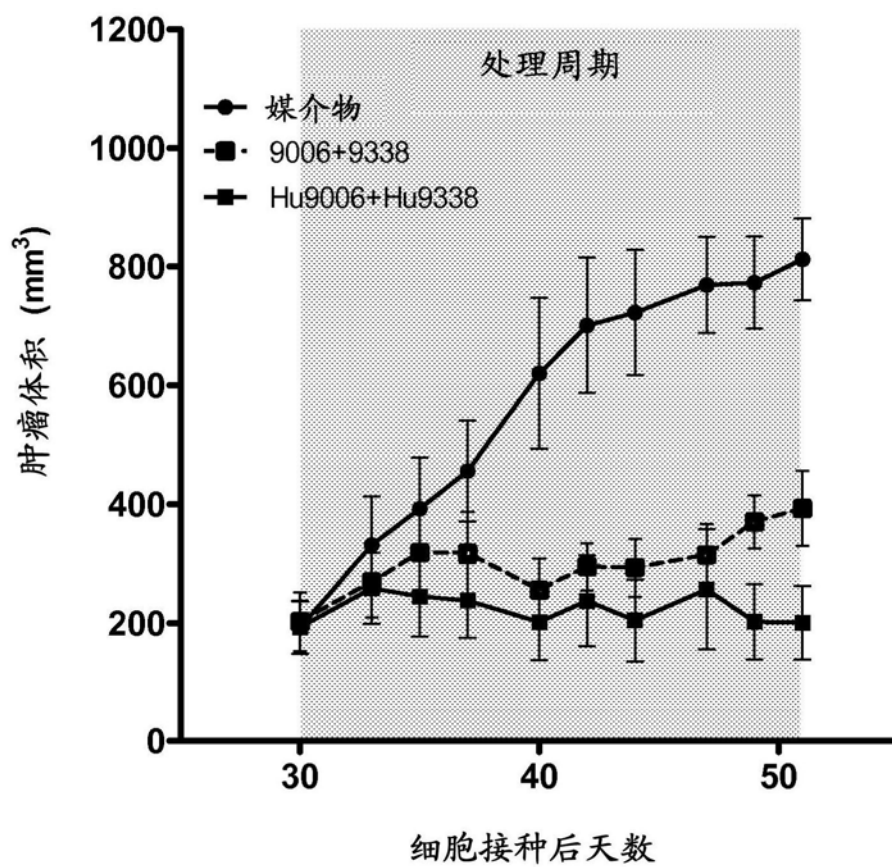


图21

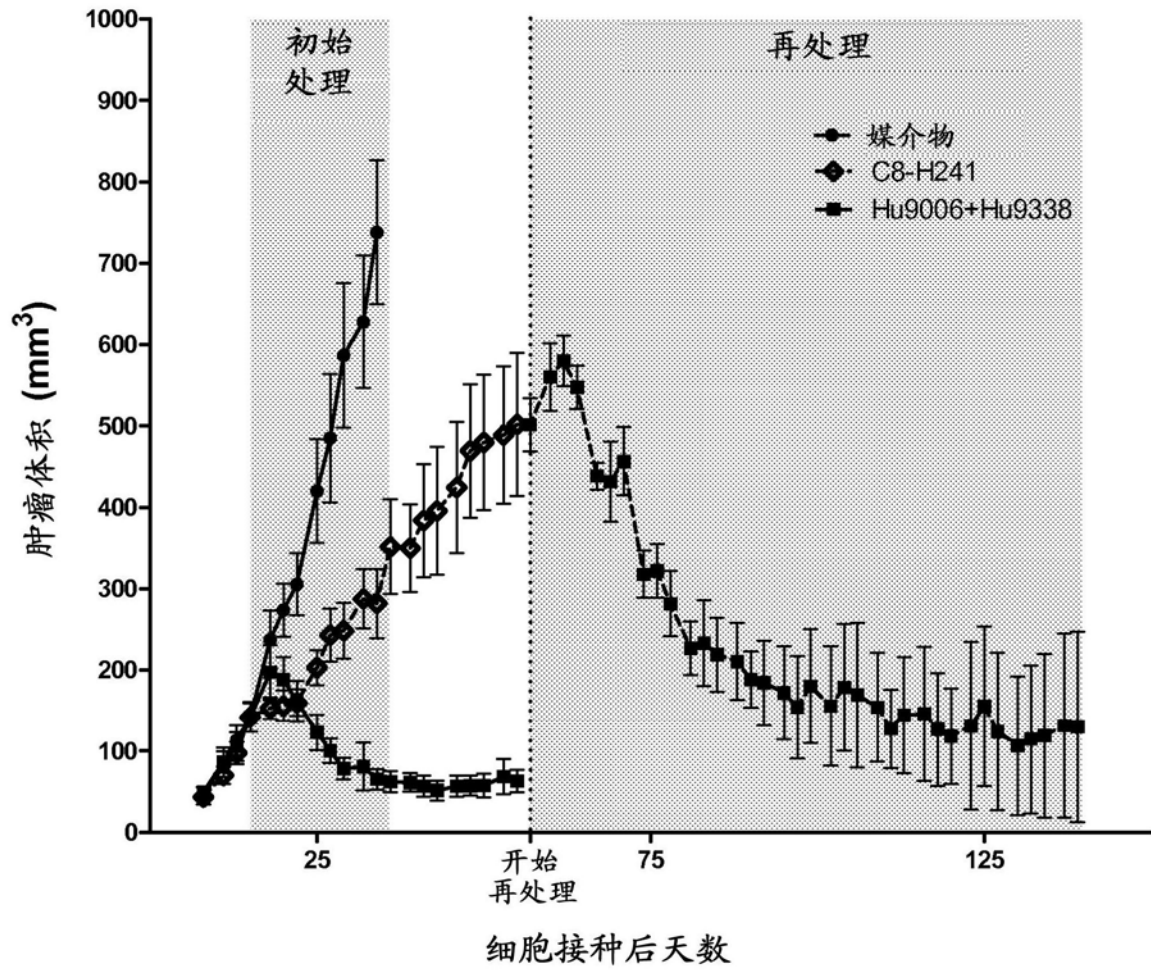


图22

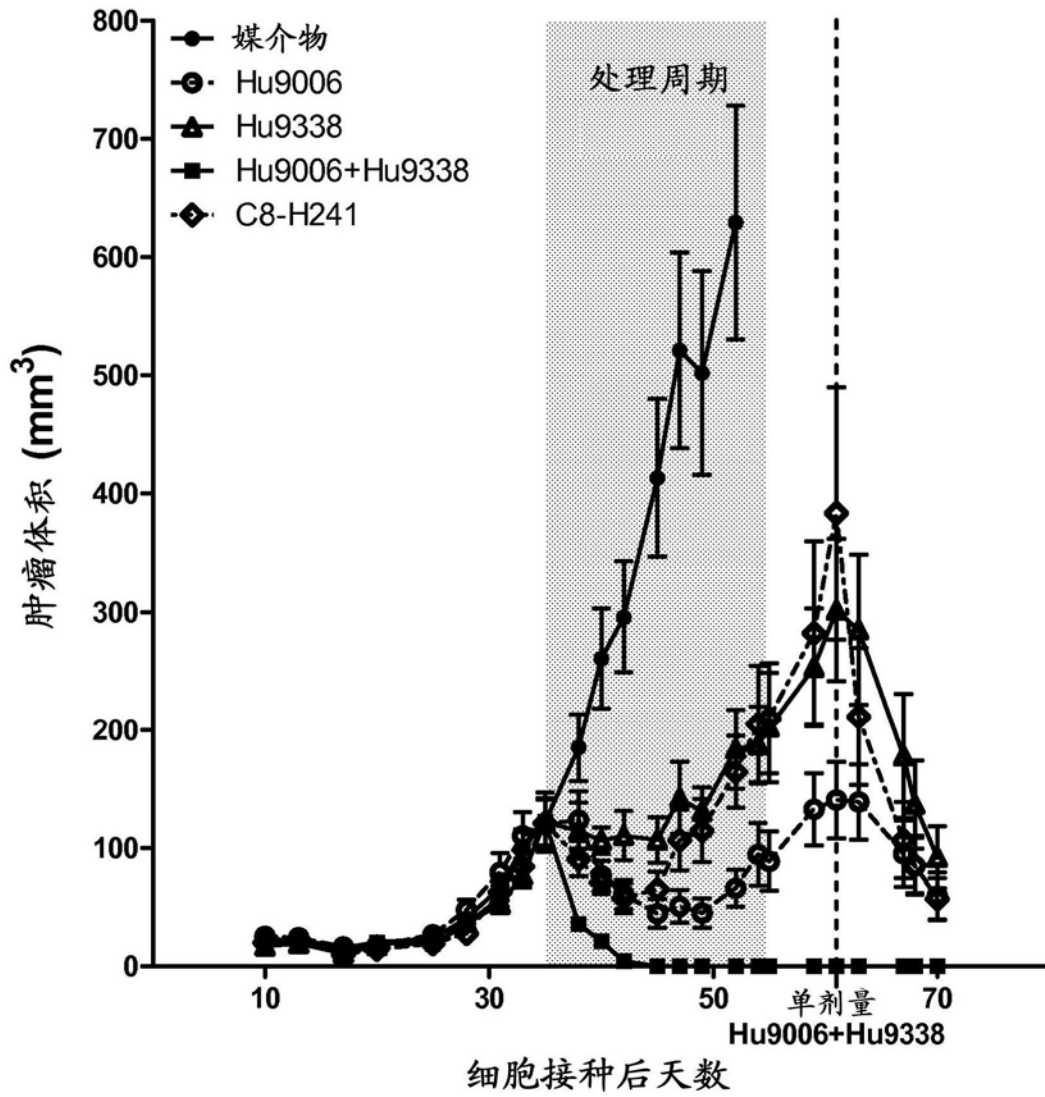


图23

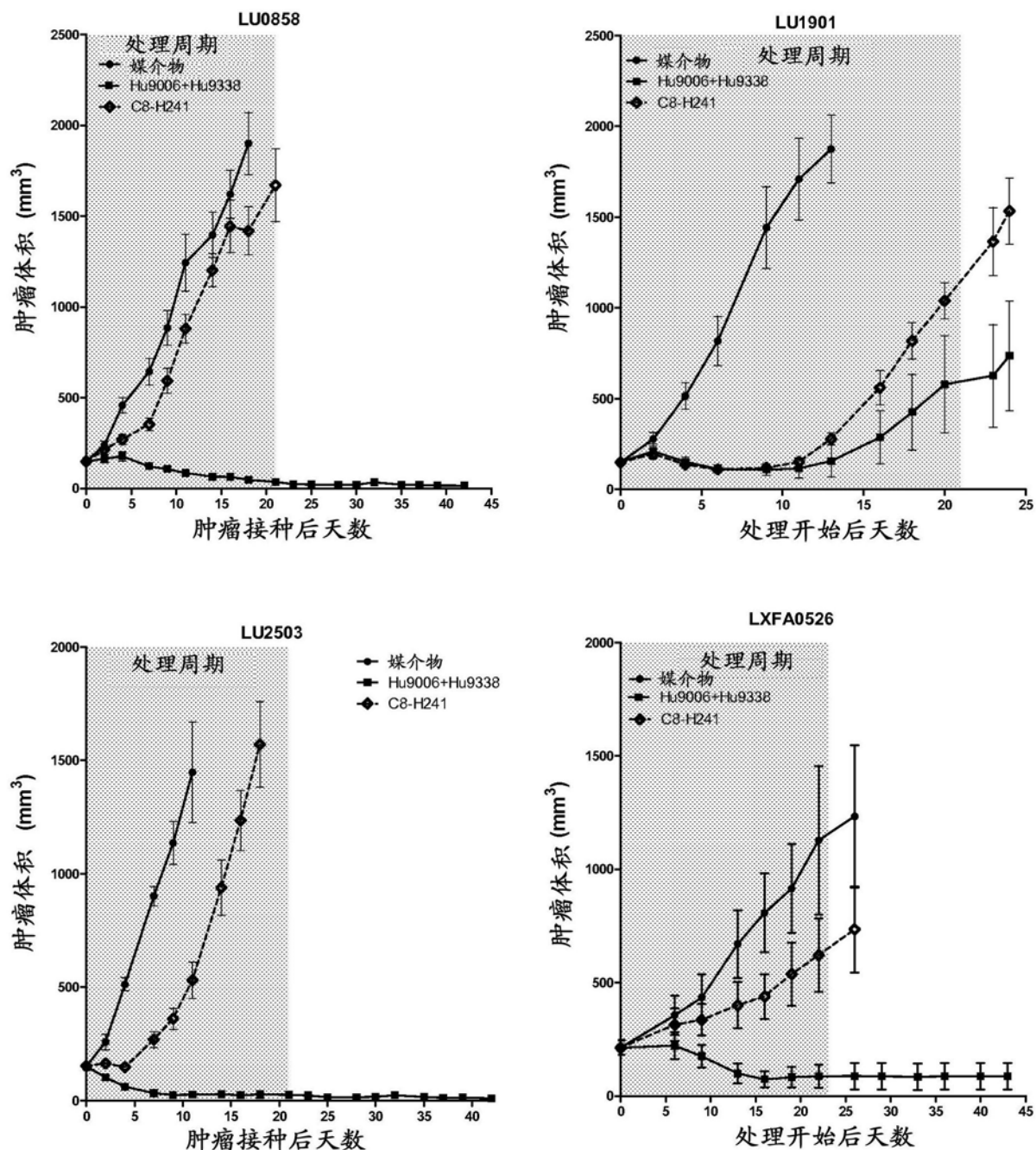


图24



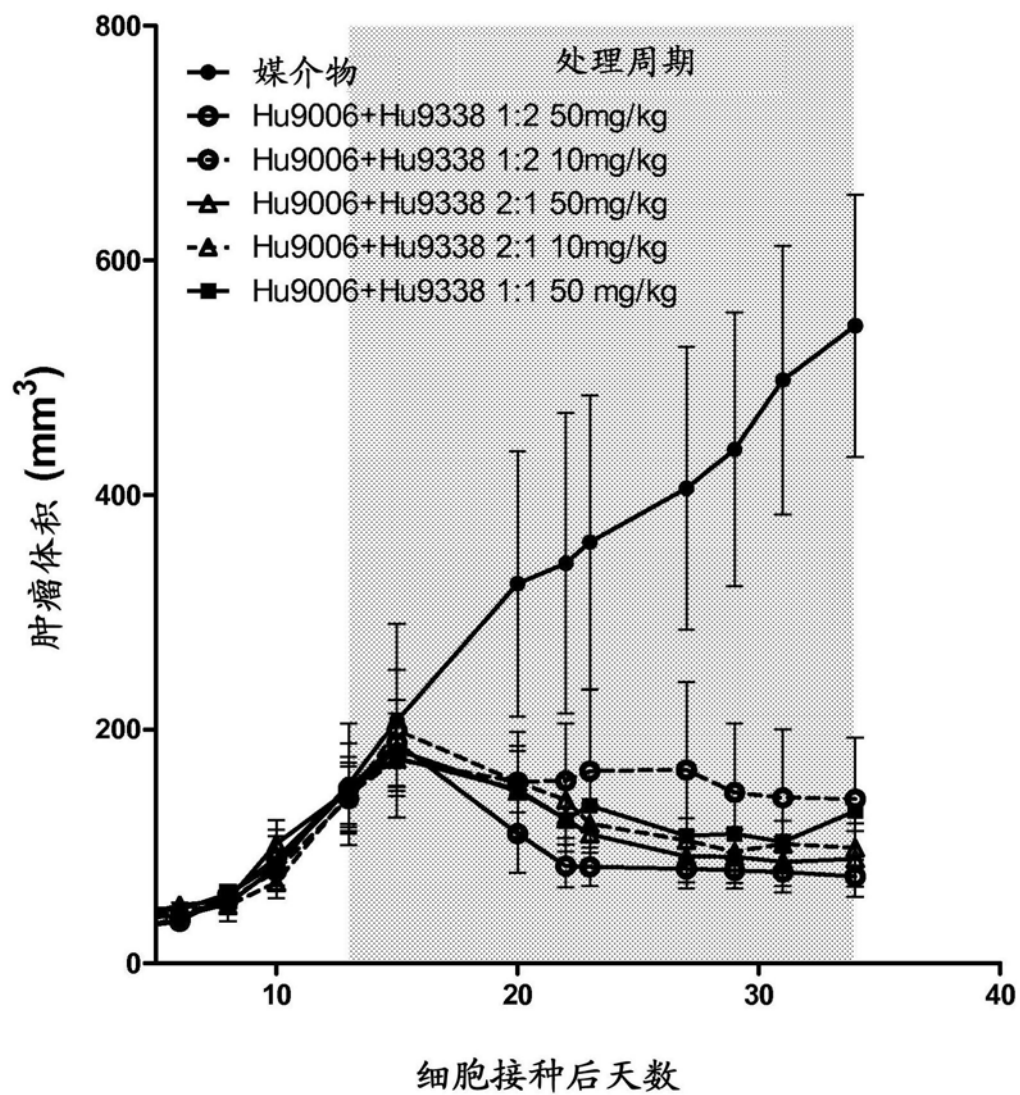


图25

## 嵌合 9006 VH + VL

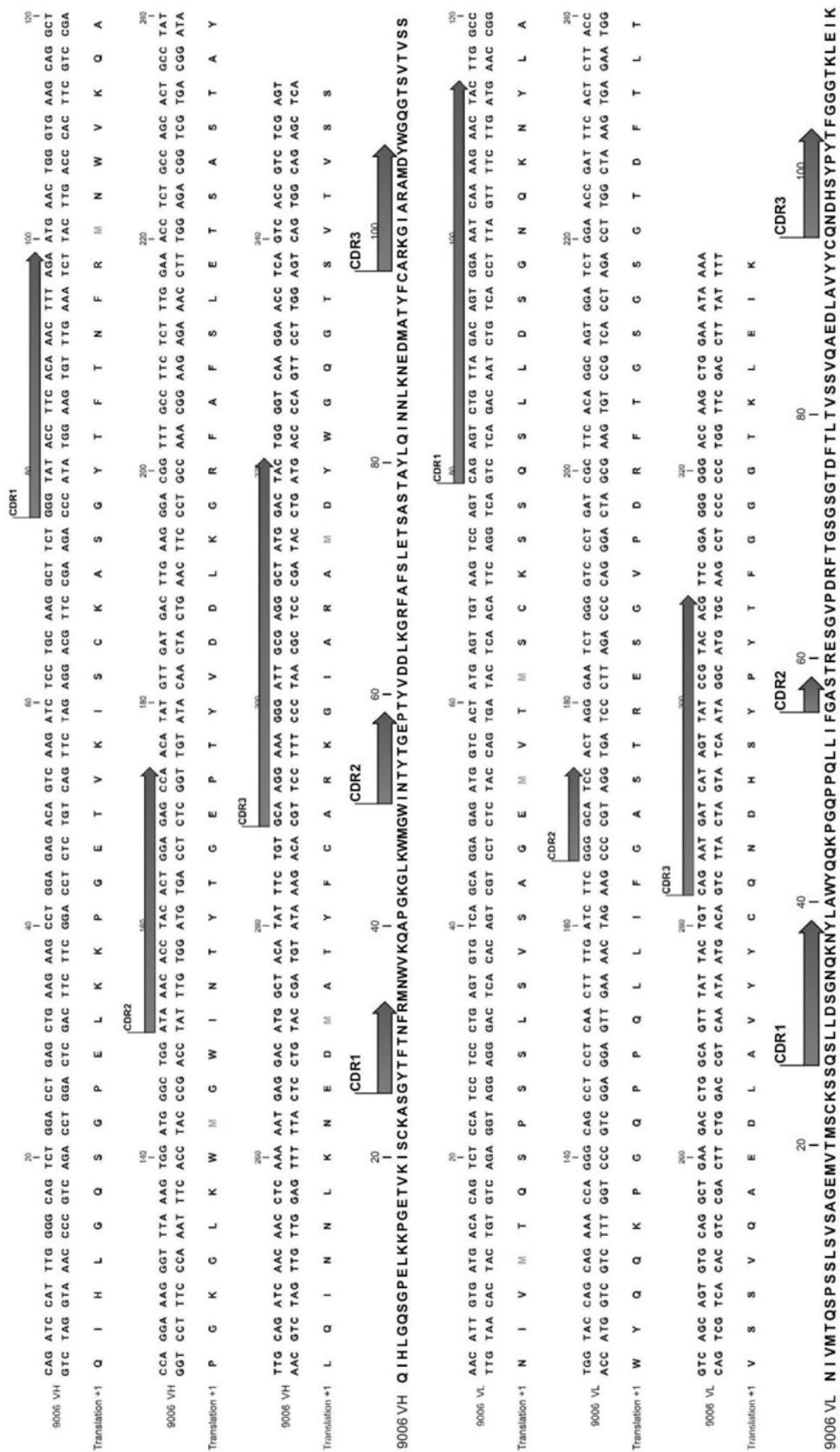


图26

嵌合 9338 VH + VL

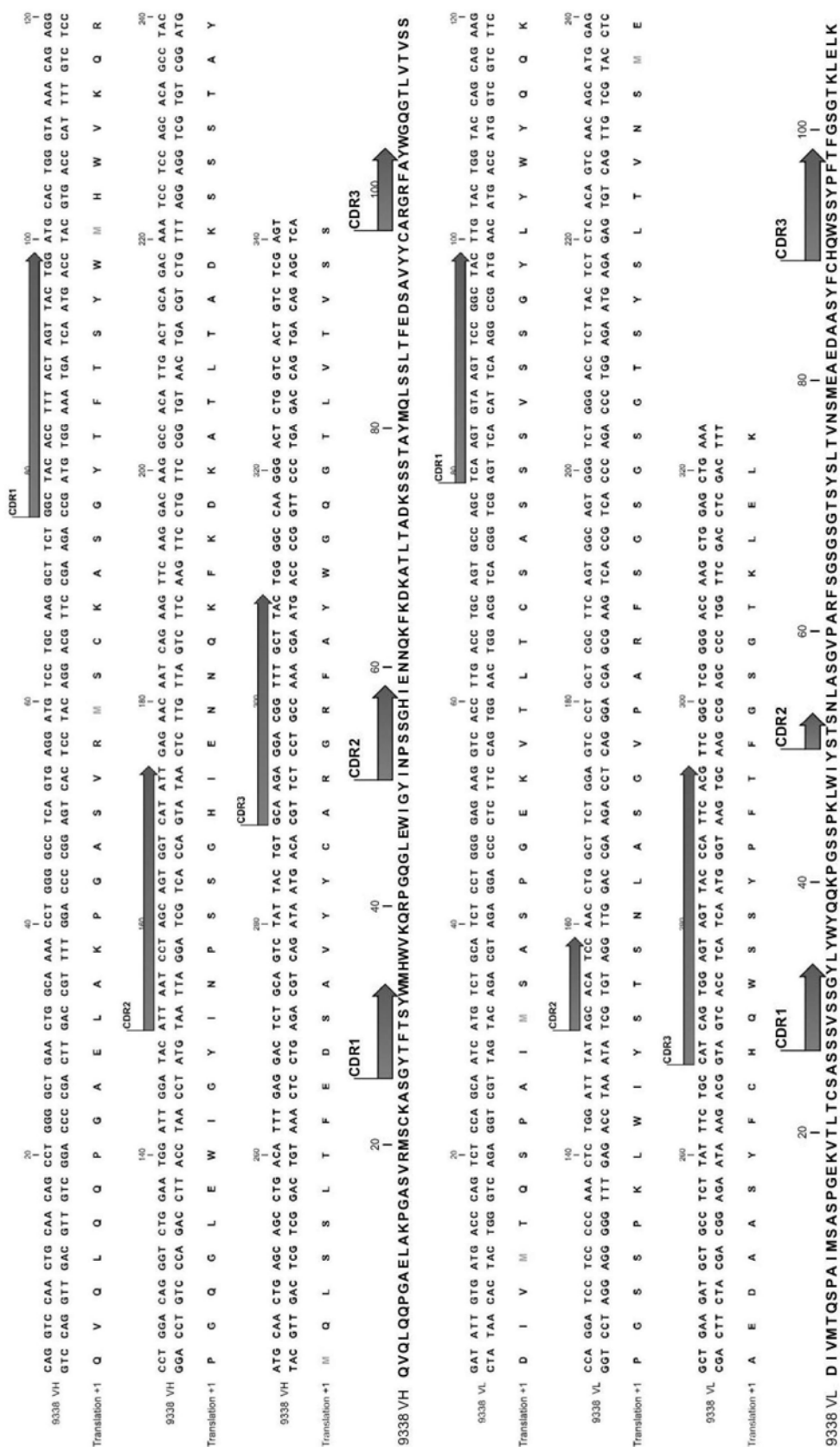


图27

## 人源化 9006 VH + VL

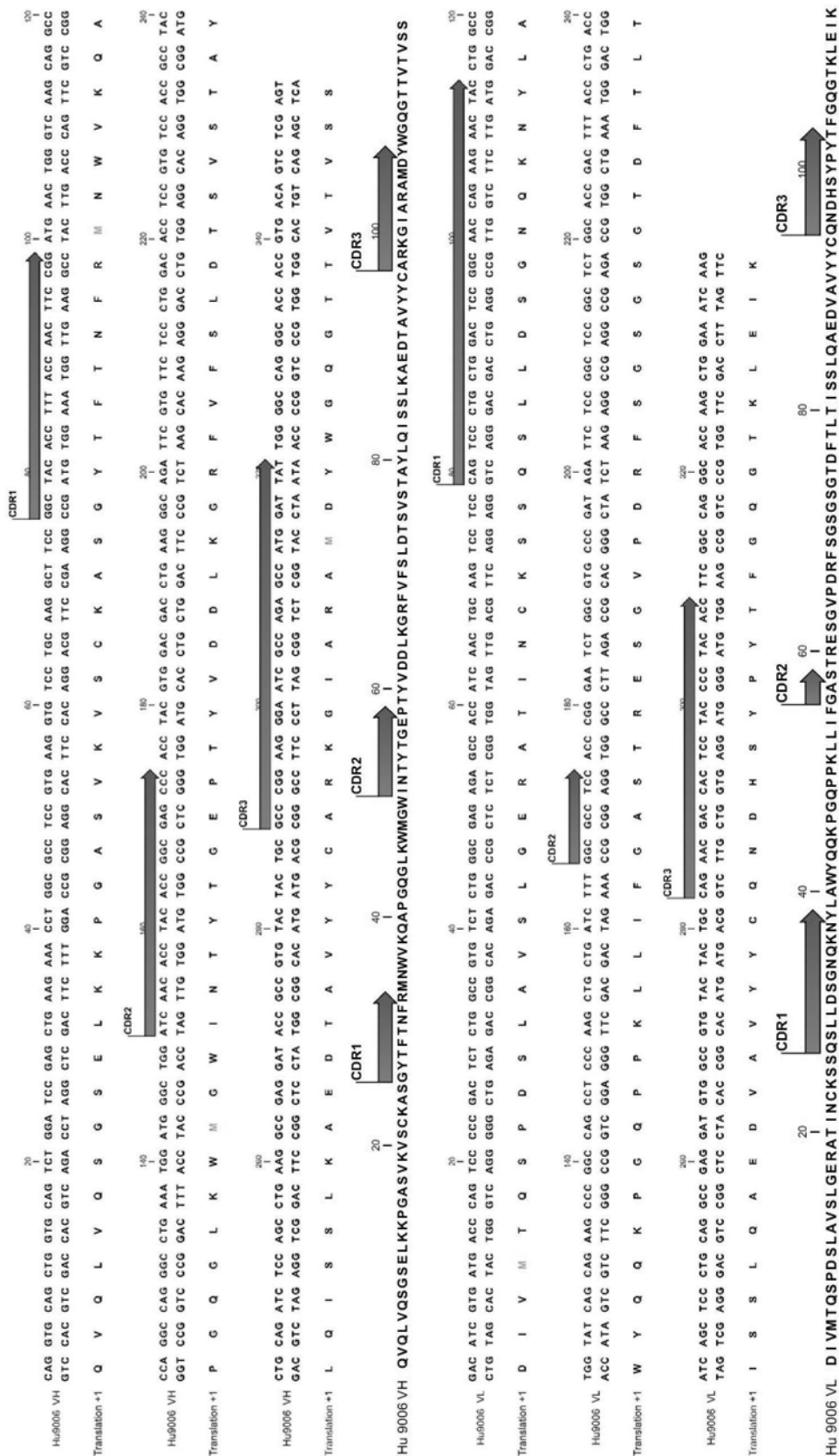


图28

# 人源化 9338 VH + VL

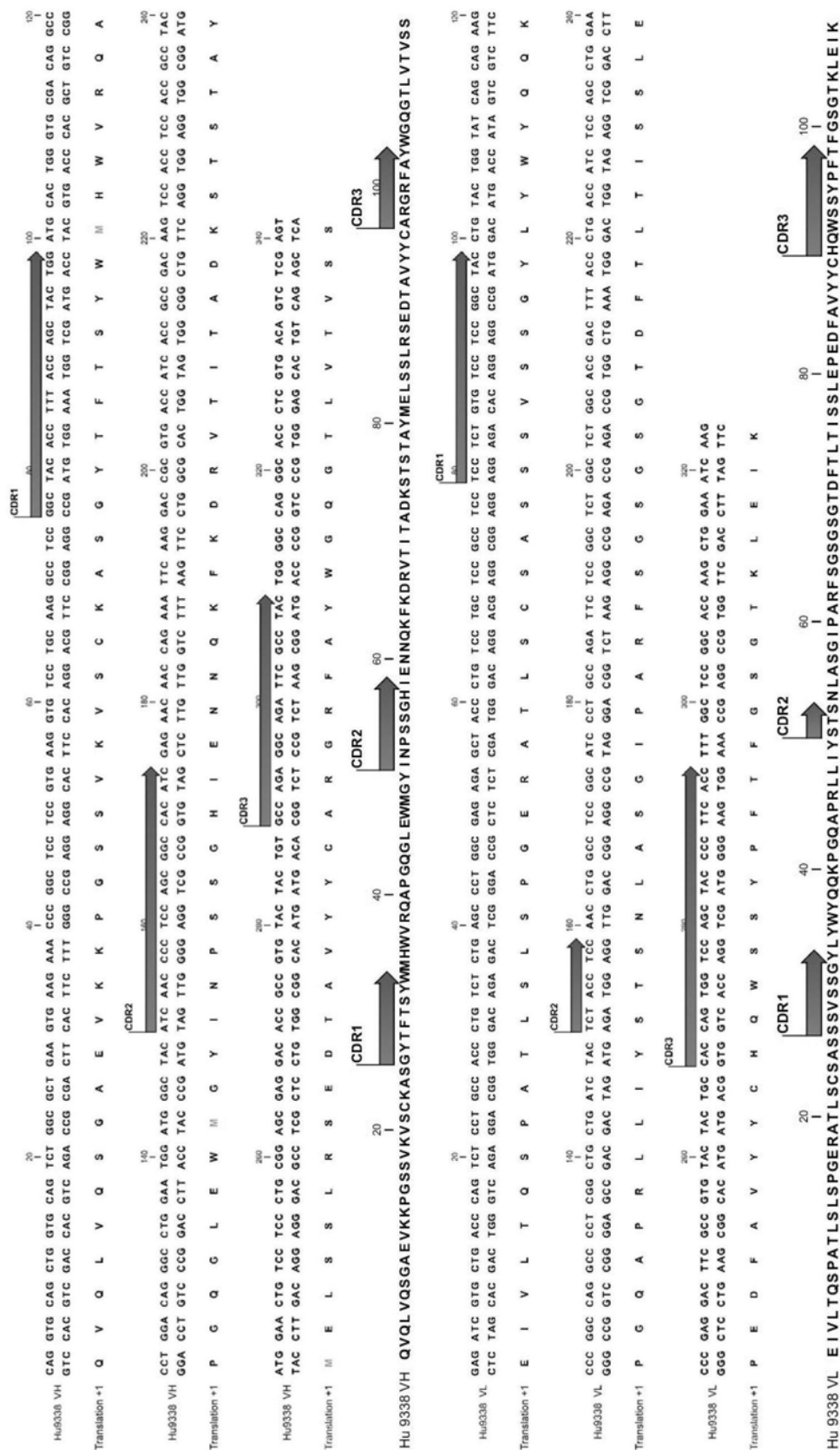


图29

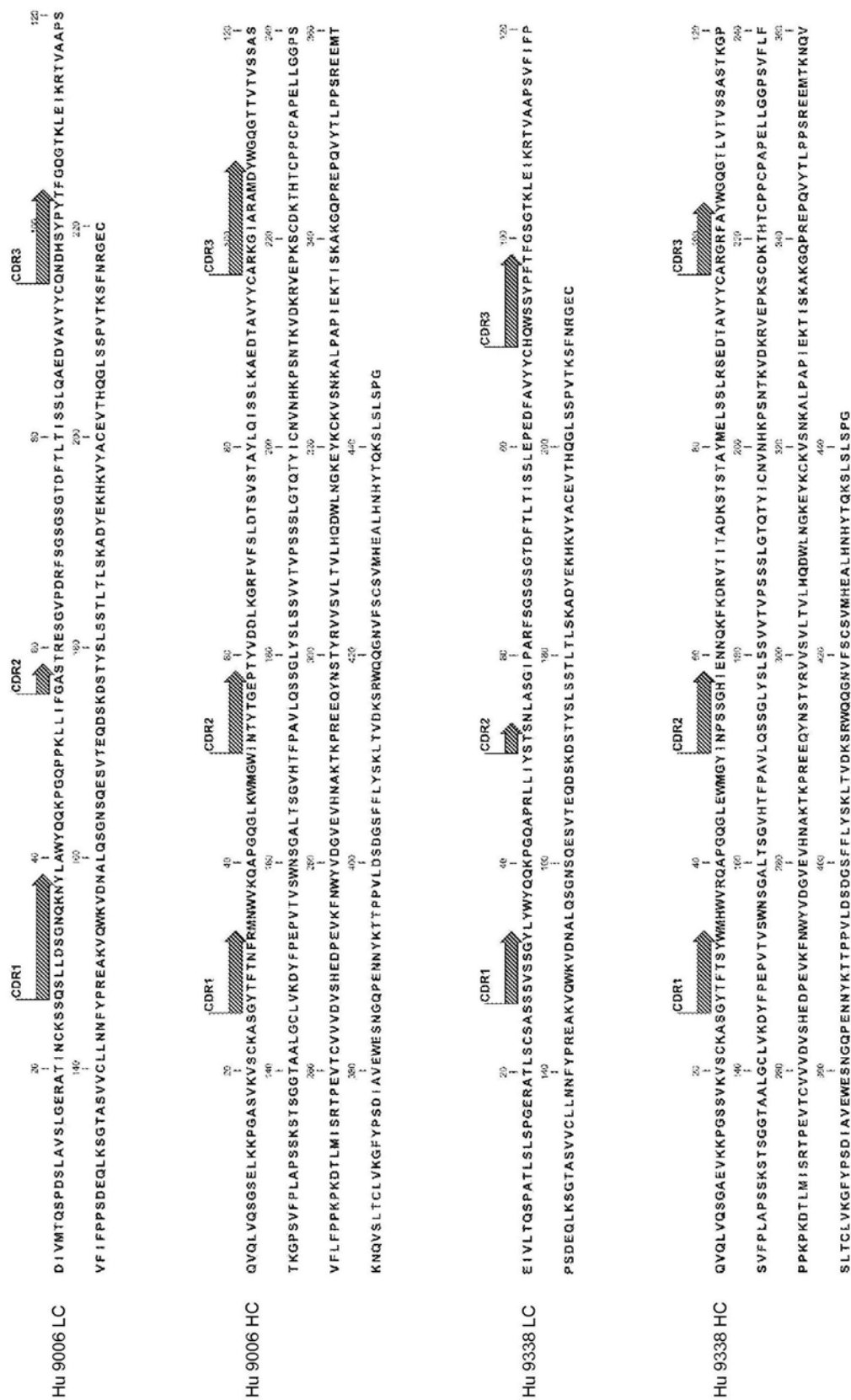


图30

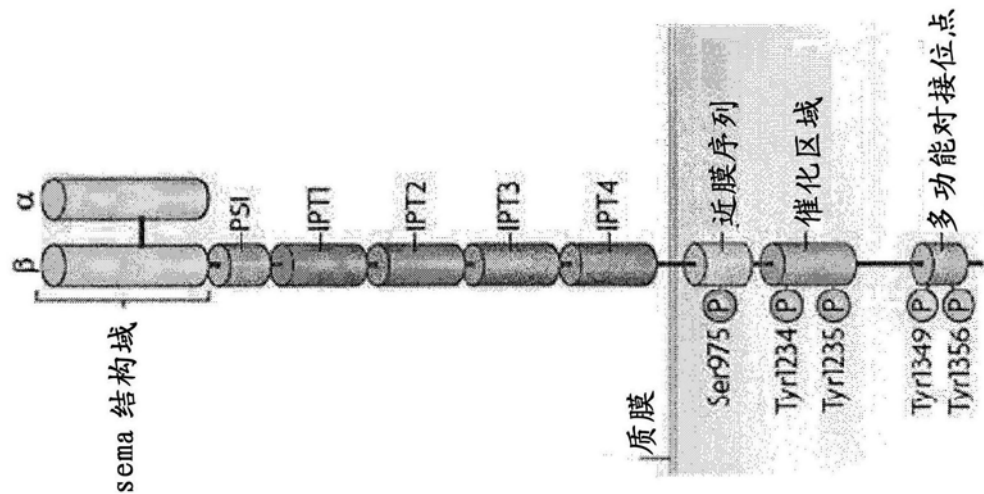


图31