



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101516394 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 30

(21) 申请号 200780035523. 8

(22) 申请日 2007. 09. 27

(30) 优先权数据

06/08514 2006. 09. 28 FR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 03. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2007/060243 2007. 09. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/046724 EN 2008. 04. 24

(73) 专利权人 皮埃尔法布雷医药公司

地址 法国布洛尼比扬古

(72) 发明人 L·哥彻 A·茹阿诺

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司

公司 11314

代理人 程伟

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006. 01)

C07K 16/00 (2006. 01)

C07K 16/30 (2006. 01)

(56) 对比文件

EP 0214640 A2, 1987. 03. 18, 说明书第 11-19 页.

US 5503984 A, 1996. 04. 02, 说明书第 14 页.
Vermeersch Williams C., et al..

Subtractive Immunization Techniques for the Production of Monoclonal Antibodies to Rare Antigens. 《Biotechniques》. 1992, 第 12 卷 (第 6 期),

审查员 孙谦

权利要求书3页 说明书27页

序列表24页 附图8页

(54) 发明名称

制备抗耐药性抗原的活性抗体的方法、所述方法获得的抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及来自对至少一种抗肿瘤化合物耐药的肿瘤的磨碎组织匀浆和 / 或悬浮液和 / 或细胞裂解液在免疫接种和体外制备针对肿瘤抗原的抗体或其功能片段之一中的用途, 该肿瘤抗原在所述耐药肿瘤表面特异性表达并可能参与形成所述耐药肿瘤的耐药性。更特别地, 本发明涉及通过方法所获得的这样的抗体, 例如抗体 1A6、1A9、2E11、3C11 和 3G7, 以及其用于治疗癌症的用途。

1. 一种用于制备针对耐药肿瘤表面表达的肿瘤抗原,但不针对耐药肿瘤的原生肿瘤的表面表达的抗原的抗体或抗体的一个功能片段的方法,其中该方法包含下述步骤:

i) 以来自耐药肿瘤的磨碎的组织匀浆和 / 或悬浮液和 / 或细胞裂解液直接免疫接种动物,

ii) 将来自所述免疫动物的脾细胞与骨髓瘤细胞融合以获得杂交瘤,和

iii) 利用鉴别性免疫组织化学选择分泌特异性识别在耐药肿瘤的肿瘤细胞表面表达且其表达由抗肿瘤治疗诱导的抗原而不识别产生耐药肿瘤的原生肿瘤的抗体的杂交瘤,

其中所述来自对至少一种抗肿瘤化合物耐药的肿瘤的磨碎的组织匀浆和 / 或悬浮液和 / 或细胞裂解液已经预先利用包含下述步骤的方法制备:

a) 选择全部或部分的原生肿瘤,并将其移植入动物体内;

b) 以至少一种抗肿瘤化合物处理部分该移植动物;

c) 自步骤 a) 中接受移植但未接受处理的动物体内取出全部或部分的原生肿瘤;

d) 自步骤 b) 中接受处理的动物体内取出全部或部分耐药肿瘤;

e) 制备鉴别选择分别来自步骤 c) 和 d) 中取出的全部或部分肿瘤的抗体的手段;和

f) 制备步骤 d) 中取出的全部或部分耐药肿瘤的磨碎的组织匀浆和 / 或细胞裂解液;

且

其中所述方法在步骤 i) 前包括额外的使用免疫抑制化合物进行的耐受步骤。

2. 一种用于制备针对耐药肿瘤表面表达的肿瘤抗原,但不针对耐药肿瘤的原生肿瘤的表面表达的抗原的抗体或抗体的一个功能片段的方法,其中该方法包含下述步骤:

i) 以来自耐药肿瘤的磨碎的组织匀浆和 / 或悬浮液和 / 或细胞裂解液直接免疫接种动物,

ii) 将来自所述免疫动物的脾细胞与骨髓瘤细胞融合以获得杂交瘤,和

iii) 利用鉴别性免疫组织化学选择分泌特异性识别在耐药肿瘤的肿瘤细胞表面表达且其表达由抗肿瘤治疗诱导的抗原而不识别产生耐药肿瘤的原生肿瘤的抗体的杂交瘤,

其中所述来自对至少一种抗肿瘤化合物耐药的肿瘤的磨碎的组织匀浆和 / 或悬浮液和 / 或细胞裂解液已经预先利用包含下述步骤的方法制备:

a) 选择肿瘤细胞系,并将其移植入动物体内;

b) 以至少一种抗肿瘤化合物处理部分该移植动物;

c) 自步骤 a) 中接受移植但未接受处理的动物体内取出全部或部分的原生肿瘤;

d) 自步骤 b) 中接受处理的动物体内取出全部或部分耐药肿瘤;

e) 制备鉴别选择分别来自步骤 c) 和 d) 中取出的全部或部分肿瘤的抗体的手段;和

f) 制备步骤 d) 中取出的全部或部分耐药肿瘤的磨碎的组织匀浆和 / 或细胞裂解液;

且

其中所述方法在步骤 i) 前包括额外的使用免疫抑制化合物进行的耐受步骤。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述免疫接种通过腹腔注射和 / 或皮下注射和 / 或静脉注射和 / 或脾内注射进行。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述耐药肿瘤通过将肿瘤细胞系和 / 或全部或部分人的肿瘤移植到动物体内,然后对动物使用期望其诱导原生肿瘤产生耐药性的抗肿瘤化合物而诱导产生。

5. 根据权利要求 1 的方法,其特征在于所述原生肿瘤选自任何明确对治疗耐药的肿瘤。

6. 根据权利要求 5 的方法,其特征在于所述原生肿瘤选自肺、结肠、前列腺、乳腺和卵巢肿瘤细胞系和 / 或原生肿瘤。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述至少一种抗肿瘤化合物是化学疗法制剂。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述至少一种抗肿瘤化合物选自化学分子。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在于所述至少一种化学分子选自激素疗法制剂。

10. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在于所述化学分子是酪氨酸激酶抑制剂或抗体。

11. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述至少一种抗肿瘤化合物为单克隆抗体。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,其特征在于所述抗体是单克隆抗体,并且该抗体选自针对生长因子受体的抗体或该抗体的功能片段,其中生长因子受体和配基结合或配基构象发生独立性变化或生长因子受体与其它膜蛋白发生同源或异源二聚作用后,导致血管形成。

13. 根据权利要求 11 所述的方法,其特征在于所述抗体是单克隆抗体,并且该抗体选自针对膜受体的抗体或该抗体的功能片段,其中膜受体和配基结合或配基构象发生独立性变化或膜受体与其它膜蛋白发生同源或异源二聚作用后,导致血管形成。

14. 根据权利要求 11 所述的方法,其特征在于所述抗体是单克隆抗体,并且该抗体选自针对具有分解细胞外基质的活性和 / 或化学趋化活性的可溶性分子的抗体或该抗体的功能片段。

15. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述至少一种抗肿瘤化合物为两种不同特性的抗肿瘤化合物的组合。

16. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述至少一种抗肿瘤化合物为具有不同作用机制的两种抗肿瘤化合物的组合。

17. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述至少一种抗肿瘤化合物为靶蛋白不同的两种抗肿瘤化合物的组合。

18. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述至少一种抗肿瘤化合物为三种不同特性的抗肿瘤化合物的组合。

19. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述至少一种抗肿瘤化合物为具有不同作用机制的三种抗肿瘤化合物的组合。

20. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述至少一种抗肿瘤化合物为靶蛋白不同的三种抗肿瘤化合物的组合。

21. 根据权利要求 15 或 18 的方法,其特征在于所述抗肿瘤化合物的组合为单克隆抗体或其功能片段的组合。

22. 根据权利要求 21 的方法,其特征在于所述单克隆抗体或其功能片段的组合为选

自如下的抗体的组合：抗-IGF-IR、抗-EGFR、抗-Her/2neu、抗-VEGF、抗-VEGFR、抗-CXCR、抗-cMET 或抗-RON 的抗体。

23. 根据权利要求 22 的方法，其特征在于所述组合为抗-IGF-IR 抗体、抗-EGFR 抗体和抗-Her/2neu 抗体的组合。

24. 根据权利要求 23 的方法，其特征在于所述组合为专利申请 W003/059951 中所述的单克隆抗体 7C10、以编号 HB-8508 保藏于 ATCC 的杂交瘤产生的单克隆抗体 225、和作为 herceptin 在商业上可获得的单克隆抗体 h4D5 的组合。

25. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于选择分泌不识别原生肿瘤细胞抗体的杂交瘤的步骤 iii) 是通过在分泌识别原生肿瘤的抗原的抗体的杂交瘤和分泌识别耐药肿瘤的抗原的抗体的杂交瘤之间进行鉴别筛选而完成。

26. 一种制备和选择针对至少一种抗肿瘤化合物耐药的肿瘤表面表达的肿瘤抗原的抗体或该抗体的一个功能片段的方法，其特征在于该方法包含：

a) 根据权利要求 1 的一种制备抗体或该抗体的一个功能片段的方法，所述抗体针对所述在耐药肿瘤表面特异性表达的肿瘤抗原，所述肿瘤抗原在形成耐药肿瘤的原生肿瘤细胞表面不表达；

b) 使步骤 a) 中获得的抗体于体外与对抗肿瘤化合物耐药的肿瘤相接触；和

c) 如果证实了所述抗体对于肿瘤对抗肿瘤化合物的耐药性的抑制性效应，选择该抗体。

27. 根据权利要求 1 所述的方法，其用于制备单克隆抗体。

28. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述功能片段选自 Fv、Fab、(Fab')₂、Fab'、scFv、scFv-Fc 片段和双体。

制备抗耐药性抗原的活性抗体的方法、所述方法获得的抗体及其用途

[0001] 本发明涉及制备用于治疗 and / 或诊断目的的特别的单克隆抗体的新型方法。更特别的是,本发明的目的在于制备针对在原发肿瘤的肿瘤细胞表面缺失而在这些原发肿瘤的抗肿瘤治疗之后将出现的肿瘤抗原,以及也可能参与形成肿瘤对于抗肿瘤治疗的耐药性的抗原的抗体。本发明还包含这些抗体以及这些抗体用作耐药肿瘤的预防性和 / 或治疗性治疗的药物的用途。本发明最后包含含有这种可与抗癌制剂联合使用的抗体的组合物及其预防和 / 或治疗某些癌症的用途。

[0002] 抗体的发现和更特别的制备抗体的方法的发展构成在治疗性治疗或诊断和更特别的在癌症范围内的变革。的确,首次,这种新的工具因其抗体本身的识别特性提供靶向治疗的可能性。这最后十年的主要挑战由开发制备抗体的方法构成,在第一阶段是多克隆抗体,单克隆抗体或甚至是抗体片段或类似结构。

[0003] 直到今天,为了能够制备用于治疗性和 / 或诊断性目的的抗体,本领域技术人员已开发出一些技术。

[0004] 最早的抗体为多克隆抗体,即免疫的动物血清中包含不同来源的抗体群体。为了做到这一点,几种动物(小鼠、大鼠、家兔、山羊等)通过注射给定天然或合成抗原,与一种或多种佐剂,如 Freund 佐剂和氢氧化铝而免疫接种,佐剂的目的在于促进和增强免疫反应。然后采集这些动物的血,并回收既含有能或多或少有效识别抗原的几种表位的抗体(多克隆抗体)也含有动物的其它抗体的血清或抗血清。例如通过亲和层析纯化法将获得的抗体进行纯化。

[0005] 第一个发展存在于根据 KOHLER 和 MIELSTEIN(1975) 所述的技术从杂交瘤中制备单克隆抗体。该技术使预定抗原的特异性单克隆抗体得以产生,并由 B 淋巴细胞克隆与骨髓瘤细胞融合以获得称为杂交瘤的细胞。这种杂交瘤不仅具有永生化的特征而且还可以永久性产生单克隆的并因此是单一特异性的抗体。

[0006] 也描述过其它基于同一原理的技术,如三源杂交瘤技术或甚至依旧是 KOZBOR 等人(1983)描述的杂交瘤技术。

[0007] 这些一开始用于制备鼠抗体的技术已进展到可以制备人源化或人的嵌合抗体。今天所有这些技术已被本领域技术人员所熟知。

[0008] 通过使用基因修饰的小鼠,所谓“异种小鼠”(专利 US 5,814,318 和 US 5,939,598 所述)的技术可获得人抗体。

[0009] 还开发出其它新方法用于制备人单克隆抗体和更特别地制备抗体片段,如使用 RIDDER 等人(1995)所述的噬菌体库或文库的技术或所谓的“噬菌体显示”技术,其基于抽提来自外周血的人类细胞的 mRNA,构建包含各种区的序列的 cDNA 库或文库,并将 cDNA 插入噬菌体中以产生各种如片段、优选 Fab 片段的抗体区。

[0010] 尽管这些方法不同,但都有相同的特征,即,用已知抗原免疫接种或在文库或库的范围内用该同一已知和限定的抗原筛选这些库。

[0011] 本发明区别于上述方法的是,不再用已知和限定抗原而是直接用全部或部分肿瘤

抗原。更特别的是,本发明指向直接使用肿瘤的裂解物和 / 或悬浮物和 / 或磨碎细胞匀浆。在治疗癌症中,数年来已观察到一些数量的患者在首次接受治疗性治疗之后已经发展出完全的和良好的反应之后,易于复发。更加特别的是,已知肿瘤能够修饰其基因型和 / 或其表型以抵抗作用于它们的不同治疗。

[0012] 这种现象存在于放射治疗、化学治疗和用单克隆抗体的治疗。

[0013] 历史上,治疗癌症的第一个化学治疗化合物是 20 世纪 40 年代进行的临床试验。这些化合物主要是半衰期短的制剂,如皮质激素、抗叶酸素或者甚至是长春花生物碱。然而,甚至达到完全缓解时,后者一般不能持续一年以上而出现系统性复发,复发与肿瘤对用于治疗化学治疗化合物的耐药有关 (Lehnert M., Eur. J. Cancer, 1996, 32A :912-920)。

[0014] 对该这种现象的反应,通过使用各种抗肿瘤化合物进行所谓的“联合”治疗受到关注。通过同时或先后使用不同化合物,实际上获得了较好的结果。事实上,说到使用不同的抗肿瘤化合物,每种具有细胞毒活性但作用机制不同,对于化合物耐药的肿瘤细胞可依旧对至少一种所用的其它化合物敏感。

[0015] 然而,尽管使用不同抗肿瘤化合物或制剂,肿瘤的耐药在化学疗法治疗领域内仍然是主要问题。联合使用有延迟耐药现象出现的效果,但不能使其消失。对化学疗法药物的耐药,与最初治疗有关的耐药或出现在良好的最初反应之后的复发之时的耐药,实际上出现在所有所谓的“可治疗的”癌症上。

[0016] 作为例子,要提及专利申请 WO 2005/077385, WO 2004/026293 或者甚至是 WO 2004/110497,这些专利申请很好地解释了寻找控制耐药现象的新方法,所有这些申请基于额外注射新型一般化学分子的原理。

[0017] 已证明其它在最初对治疗敏感的肿瘤获得耐药性的机制。最广泛认可的假设提示这种耐药现象可能是肿瘤细胞的基因型发生了自发的和随机进行的体细胞突变的积聚的结果 (Cancer Chemotherapy and Biotherapy :Principles and practice, Chabner & Lango editors, 1996, chapter 1)。

[0018] 另一已知的和描述过的耐药现象,称为“MDR”(多重药物耐药),基于肿瘤细胞在使用致死量浓度的大量的药理上、化学上、或甚至是结构上不同的细胞毒性化合物而依旧存活的能力。这些显示出“MDR”的细胞其胞内细胞毒性化合物的积聚因为通过转运蛋白将所述化合物排出而减少。这些蛋白质,称为“多重药物转运蛋白”,是能够将多种毒性分子从细胞排出的膜蛋白。这些“多重药物转运蛋白”属于其活性利用 ATP 水解释放的能量的转运蛋白的“ATP 结合盒 (ABC) 超家族”。已揭示几种解释这种“MDR”的几种机制。参与如与依赖于 ATP 的排出机制相关的耐药的最已知和证明最多的基因是 MDR1 基因。

[0019] 与化学疗法治疗诱导的这些耐药现象同时发生的,用单克隆抗体治疗后出现诱导性耐药也被描述。这种耐药可与宿主的本性,与药理学原因或别的原因相关。它对于实际所患肿瘤是本质性的。

[0020] 首先,第一次使用鼠抗体相关抗体,结果是抗体抗所述鼠抗体的应答,所谓的 HAMA(人抗小鼠抗体)应答。这种与宿主相关的耐药形式通过不再使用鼠类而是使用人或人源化抗体而得到部分解决。

[0021] 使用这种人或人源化抗体的不同试验证明了肿瘤可对免疫治疗耐药的新现象。这些新机制主要基于肿瘤上诱导性突变,在靶抗原的剪切(或脱落)或甚至是丧失表达之后

受体的组成型激活。

[0022] 由于在此后的实施例 1 中这是明显的,例如申请人进行的研究表明,用抗-IGF-IR、EGFR 和 Her/2neu 三联疗法,可能显著地抑制裸鼠体内 A549 细胞肿瘤的生长直至肿瘤完全消失,这种现象出现在 90%受治动物身上。尽管多重疗法比单一疗法或双重疗法明显有效,但是似乎是那些被完全抑制的肿瘤尽管继续治疗,仍然逐渐再度出现:这些肿瘤形成对多重治疗的耐药。

[0023] 根据以上观察,申请人首次考虑直接使用这种耐药肿瘤制备抗体,优先是能够识别抗原的治疗性和/或诊断性单克隆抗体,这些抗原在对抗肿瘤治疗耐药的肿瘤的肿瘤细胞表面的表达可被诱导,并且这些抗原在原发(未经治疗)肿瘤的肿瘤细胞表面不表达,这些抗原也可参与肿瘤对抗肿瘤治疗的耐药。

[0024] 根据第一方面,所以本发明的目标是将对至少一种抗肿瘤化合物耐药的肿瘤的粉碎的组织匀浆和/或悬浮液和/或细胞裂解液用于免疫接种并制备在体外直接抗在所述耐药肿瘤的肿瘤细胞表面表达的肿瘤抗原的抗体或其功能片段之一,该肿瘤抗原优选在耐药肿瘤的原发肿瘤的肿瘤细胞表面不表达,该肿瘤抗原可能参与所述肿瘤对抗肿瘤化合物的耐药。

[0025] 术语“粉碎的组织匀浆”或“细胞匀浆”是指来自肿瘤(接受治疗的出现肿瘤复发的患者的异种移植物、正位移植物(orthotopic graft)、同系移植物、手术标本或细胞培养物)的通过机械分离获得的,如通过例如“Potter”型超声粉碎机,Ultraturax®型粉碎机等分离获得的细胞和/或细胞碎片的混合物。

[0026] 术语“悬浮液”或“细胞悬浮液”是指在治疗存在或缺失的情况下体外培养后获得的和通过酶溶液或非酶分离溶液将细胞从支持物上分离下来的细胞的悬浮液。

[0027] 术语“裂解液”或“细胞裂解液”是指通过酶分离而获得的细胞和/或细胞碎片的混合物,该细胞和/或细胞碎片来自肿瘤(接受治疗的出现肿瘤复发的患者的异种移植物、正位移植物(orthotopic graft)、同系移植物、手术标本或细胞培养物)。

[0028] 术语“耐药肿瘤”是指对应用的治疗没有反应或不再发生反应的肿瘤。如上所述,在化学疗法、放射疗法、激素疗法治疗之后还是甚至特别是使用抗体之后,可观察到这种耐药性,这些治疗方法可单独应用或者联合应用。至今为止,关于这种耐药能力的根本原因的各种机制是已知或未知的。最终,这种耐药性通过初始应用的治疗的有效性的下降或丧失而表现出来。

[0029] 当然,已知的和所述的“逃逸”现象是本发明寻求控制的耐药现象的一部分。

[0030] 术语原发肿瘤(或原生肿瘤)是指指定的来自耐药肿瘤的肿瘤,不对原发肿瘤进行任何与耐药肿瘤相反的治疗。

[0031] 肿瘤抗原是指特别是那些在肿瘤细胞表面表达的抗原,无论它们是来自于原发肿瘤还是来自于耐药肿瘤,该肿瘤抗原在健康细胞表面不表达。这些肿瘤抗原一般而言是抗体可特异性结合的天然大分子(可合成)。特别地,肿瘤抗原可是多肽、多糖、碳水化合物、核酸、脂类、半抗原或任何其它在肿瘤细胞表面天然存在的化合物。

[0032] 最终,本文中术语“抗体”或“免疫球蛋白”在最广义范围内可互换使用并包含单克隆抗体(例如整个或完整单克隆抗体),多克隆抗体、多价抗体、多特异性抗体(例如表现出目的生物学活性的双特异性抗体)。嵌合抗体或人源化抗体也包含在这个指定中。

[0033] 更加特别的是,这种分子为包含通过二硫键连接在一起的两条重链(H)和两条轻链(L)的糖蛋白。每条重链由重链可变区(或结构域)(HCVR或VH)和重链恒定区构成。重链的恒定区包含三个结构域CH1、CH2和CH3。每条轻链由轻链可变区(或结构域)(LCVR或VL)和轻链恒定区构成。重链恒定区包含LC结构域。VH和VL区可细分成称为CDR(互补性决定区)的高变区,称为构架区(FR)的多个保守区插入其中。每个VH和VL由三个CDR和四个FR构成,从氨基末端至羧基末端以下列顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的不同细胞(例如效应细胞)和首次成分(C1q)或标准补体系统。

[0034] 它们还可能包含某些就免疫球蛋白(IgG、IgE、gM、IgA等)的类型或来源而言表现出所期望的亲合力和特异性的抗体片段(更加详细描述术语)。

[0035] 作为规则,制备特别是鼠源的单克隆抗体或其功能片段可参照特别是“抗体”手册所述的技术(Harlow和Lane, Antibodies :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988)或参照Kohler et Milstein(Nature, 256 :495-497, 1975)所述的杂交瘤的制备技术。

[0036] 根据本发明,在寻求制备的抗体之中,优选上述限定的抗体和所谓的“活性”抗体,即具有针对抵抗治疗的肿瘤细胞的抗肿瘤活性的抗体。

[0037] 根据本发明和发明的特定方面,在寻求制备的抗体之中,优选上述限定的抗体和那些还能够表现出针对具有攻击表型的肿瘤抗原的抗肿瘤活性,具有攻击表型的肿瘤天然(治疗前)表达这些抗体针对的抗原。

[0038] 在第一具体实施方式中,根据本发明的用途的特征在于所述耐药肿瘤通过对即将或已经接受治疗性处置的患者进行活检和/或手术的方式直接获得,该治疗性处置采用所述至少能够诱导耐药的或者对于该化合物肿瘤对其的耐药性确定的抗肿瘤化合物。

[0039] 在该具体实施方式中,对每个患者的治疗可这样来考虑:抗体是根据本发明用来自实际患者的全部或部分耐药肿瘤进行免疫接种所诱导的免疫应答产生的。可因此而考虑对患者的体外订制性治疗。

[0040] 在第二具体实施方式中,根据本发明的用途的特征在于所述耐药肿瘤是通过将肿瘤细胞系和/或全部或部分人体肿瘤移植到动物体内而后通过给药尤其是通过注射至少一种抗肿瘤化合物(期望该化合物诱导或确定耐药性)对动物进行治疗而诱导产生。

[0041] 更特别的是,所述至少一种抗肿瘤化合物选自化学疗法制剂如化学分子或甚至是治疗性抗体或甚至是放射疗法制剂。

[0042] 一般地,在本说明书的全部内容中,“抗肿瘤制剂”或“抗癌治疗剂”是指单独用于对患者的给药时,能够治疗或预防患者癌症进展的物质。

[0043] 作为这种制剂的非限制性的例子,可提及所谓的“细胞毒”制剂,如“烷化”剂、抗代谢剂、抗肿瘤的抗生素、有丝分裂抑制剂、染色质功能抑制剂、抗血管生成剂、抗雌激素剂、抗雄激素剂或免疫调节剂。

[0044] 这些制剂作为例子在2006版VIDAL中,专指癌症学和血液病学相关化合物中“细胞毒制剂”栏提及,这些在这份资料中作为参考提及的细胞毒化合物在本文中提及作为优选的细胞毒制剂。

[0045] “烷化剂”是指任何在细胞内可与任何分子共价偶联或使任何分子烷基化的物质,其中任何分子优选核苷酸(如DNA)。作为这种烷化剂的例子,可提及氮芥类,如双氯乙基甲胺、苯丁酸氮芥、苯丙氨酸氮芥、盐酸盐、溴丙哌嗪、松龙苯芥、磷酸氢二钠或磷雌氮芥;oxazaphosphorine类,如环磷酰胺、六甲密胺、氯乙环磷酰胺、磺基磷酰胺(sulfofosfamide)或异磷酰胺;氮丙啶或氮杂环丙烷类,如三胺硫磷、三亚乙基二胺或六甲密胺;亚硝基脲类如氯乙亚硝脲、链脲霉素、福替目丁(fotemustine)或环己亚硝脲;烷基磺酸盐类如二甲磺酸丁酯(busulfan)、丁四醇磺酯(treosulfan)或英丙舒凡(improsulfan);三氮烯类如二甲三氮咪唑酰胺;或甚至铂合成物如顺铂、奥克赛铂或碳铂。

[0046] “抗代谢剂”是指通过干预某些活性,尤其是通过干预DNA合成活性而阻断生长和/或细胞代谢的物质。作为抗代谢剂的例子,甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、氟尿嘧啶脱氧核苷、5-氟脱氧尿嘧啶、卡培他滨(capecitabine)、阿糖胞苷、氟达拉滨(fludarabine)、胞嘧啶阿糖胞苷(cytosine arabinoside)、6-巯基嘌呤(6-MP)、6-硫代鸟嘌呤(6-TG)、2-氯脱氧腺苷、5-氮杂胞苷、2,2-二氟脱氧胞嘧啶核苷、2-氯脱氧腺苷、脱氧助间型霉素(deoxycoformycine)和喷司他丁(pentostatin)。

[0047] “抗肿瘤抗生素”是指可阻止或抑制DNA、RNA和/或蛋白质合成的化合物。这种抗肿瘤抗生素的例子包含阿霉素、柔红霉素、去甲氧柔红霉素、戊柔比星(valrubicin)、米托蒽醌、更生霉素、光辉霉素、丝裂霉素C、博来霉素和甲基苄肼。

[0048] “有丝分裂抑制剂”阻止细胞周期和有丝分裂的正常推进。一般的微管抑制剂或“taxoids”,如紫杉醇和紫杉萜,能够抑制有丝分裂。长春药属类生物碱类如长春碱、长春新碱、长春花碱酰胺和长春瑞滨,也能抑制有丝分裂。

[0049] “染色质功能抑制剂”或“拓扑异构酶抑制剂”是指抑制染色质建模蛋白(the chromatin-modeling protein),如拓扑异构酶I和II的正常功能的物质。这种抑制剂的例子包含,拓扑异构酶I的抑制剂有喜树碱及其衍生物如依立替康(irinotecan)或托泊替康(topotecan),拓扑异构酶I的抑制剂有鬼臼乙叉甙(etoposide)、磷酸鬼臼乙叉甙和鬼臼噻吩甙。

[0050] “抗血管生成剂”是指任何抑制血管生长的药物、化合物、物质或制剂。抗血管生成剂的例子包含,无任何限制,丙亚胺、马马司他、巴马司他、普淋司他、坦诺司他、伊洛马司他、CGS-27023A、溴氯哌啶酮、COL-3、新伐司他、BMS-275291、沙立度胺、CDC 501、DMXAA、L-651582、角鲨胺、内皮他丁、SU5416、SU6668、 α -干扰素、EMD121974、白细胞介素-12、IM862、血管抑素、vitaxin。

[0051] “抗雌激素”或“抗雌激素制剂”是指任何减少、拮抗或抑制雌激素的活性的物质。这类制剂的例子有他莫昔芬、托瑞米芬、雷洛昔芬、屈洛昔芬、爱多昔芬(iodoxyfene)、阿那托唑、来曲唑和依西美坦。

[0052] “抗雄激素”或“抗雄激素制剂”是指任何减少、拮抗或抑制雄激素活性的物质。抗雄激素剂的例子有缓退瘤、尼鲁米特、比卡鲁胺、螺内酯、醋酸环丙氯地孕酮、非那司提和甲氰咪胍。

[0053] 免疫调节剂是刺激免疫系统的物质。这种免疫调节剂的例子包含下列与5-氟尿嘧啶联合应用的和其它类型免疫调节剂:干扰素、白细胞介素类如阿地白介素、OCT-43、

地尼白介素毒素连接物 (denileukindiflitox) 或白介素 -2、肿瘤坏死因子如他索纳明 (tasonermin) 或如蘑菇多糖、西佐喃 (sizofiran)、罗喹美克 (roquinimex)、匹多莫德 (pidotimod)、甲氧聚乙二醇琥珀酰胺腺甙脱氨酶 (pegademase) 胸腺喷丁、多聚肌苷酸：多聚胞苷酸 (poly I:C) 或左旋咪唑。

[0054] 对于更多细节，本领域技术人员可参考 Association Française des Enseignants de Chimie Thérapeutique 编辑的名为“traité de chimie thérapeutique, Vol. 6, Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers, édition TEC & DOC, 2003”的手册。

[0055] 作为抗肿瘤制剂，还可提及放射疗法制剂、激素疗法制剂或以小分子为靶的治疗剂如酪氨酸激酶抑制剂。最后，根据优选具体实施方式，抗体属于根据本发明可使用的抗肿瘤制剂的一部分。更特别地，可提及下列抗体作为非限制性实施例：抗 EGFR 抗体如西妥昔单抗 (cetuximab) (C225 或爱必妥 (erbitux))、matuzumab、huR3、HuMax-EGFR 或 panitumab；抗 VEGF 抗体如贝伐单抗 (bevacizumab) (Avastin) 或 2C3；抗 IGF-IR 抗体，如 7C10、h7C10、hEM164、ABX-IGF-IR、Mab 39、1H7 或 4G11；抗 HER2 抗体，如曲妥单抗 (trastuzumab) (Herceptin) 或 pertuzumab；抗 CD20 抗体，如 comberituximab、ibritumomab 或托西莫单抗 (tositumomab)；抗 CD33 抗体如吉姆单抗 (gemtuzumab) 或林妥珠单抗 (lintuzumab)；抗 CD22 抗体例如依帕珠单抗 (epratuzumab)；抗 CD52 抗体例如 alemtuzumab；抗 EpCAM 抗体，如依决可单抗 (edrecolomab)、Ch 17-1A 或 IGN-101；抗 -CTP21 或 16 抗体，如 Xactin；抗 DNA 抗原抗体，如 ¹³¹I-Cotara TNT-1；抗 MUC1 抗体，如 pemtumomab 或 R1150；抗 MUC18 抗体，如 ABX-MA1；抗 GD3 抗体，如米妥莫单抗 (mitumomab)；抗 CEA 抗体，如 CeaVac 或 labetuzumab；抗 CA125 抗体，如 OvaRex；抗 HLA-DR 抗体，如 apolizumab；抗 -CTLA4 抗体，如 MDX-010；抗 PSMA 抗体，如 MDX-070、¹¹¹In & ⁹⁰Y-J591、¹⁷⁷Lu J591、J591-DM1；抗 Lewis Y 抗体，如 IGN311；抗血管生成抗体，如 AS1405 和 ⁹⁰YmuBC1；抗 -Trail-R1 抗体，如 TRAIL R1 单抗或 TRAIL R2 单抗；或者甚至除上述抗体外任何针对酪氨酸激酶受体的抗体，或针对 RON、cMET、CXCR 2、CXCR4、Ephrin 类型的受体等，对于使用如酪氨酸激酶抑制剂的小化学分子的靶向治疗是同样的。

[0056] 当然，该列表绝不限制仅是提及迄今为止在用的或研究中的抗体的目的。

[0057] 根据本发明的特定具体实施方式，应注意所述耐药肿瘤是对几种治疗方法或抗肿瘤制剂抵抗，其中后者可具有各种特性。

[0058] 更加特别的是，根据本发明的用途的特征在于所述至少一种抗肿瘤化合物由至少两种，优选至少三种具有不同特性和 / 或不同作用机制和 / 或靶蛋白不同的化合物构成。

[0059] 作用机制不同是指例如抗肿瘤制剂能改变细胞的不同生物学功能，如改变血管生成、DNA 合成或甚至是有丝分裂的功能。

[0060] 靶蛋白不同更加特别是指当抗肿瘤制剂是能够结合具有不同特性的蛋白或受体时的情况。

[0061] 相当明显地，可注意仅抗体彼此联合应用，或者仅化学疗法制剂彼此联合应用或这两种家族的化合物彼此联合应用或与放射疗法、激素疗法治疗或使用如上所述的小化学分子的靶向治疗联合应用。

[0062] 尽管优选，全部抗肿瘤化合物都具有不同的作用机制或靶点也还是不需要的。

[0063] 根据第二方面,本发明的目标是体外制备抗体或其中一个功能片段的方法,该抗体或其中一个功能片段针对在对至少一种抗肿瘤化合物耐药的肿瘤细胞表面表达的肿瘤抗原,所述肿瘤抗原优选在相应原发肿瘤(未经治疗)的肿瘤细胞表面不表达,并且所述肿瘤抗原可能参与所述对抗肿瘤治疗耐药的肿瘤的耐药性的形成,该方法包含由直接用耐药肿瘤的磨碎的组织匀浆和/或悬浮液和/或细胞裂解液免疫接种动物构成的步骤和由选择识别耐药肿瘤而不识别形成耐药肿瘤的原发肿瘤的抗体构成的步骤。

[0064] 根据本发明所述方法的特定方面,描述了体外制备抗体或其中一个功能片段的方法,该抗体或其中一个功能片段针对在肿瘤细胞表面表达的可能参与所述肿瘤的耐药性的形成的肿瘤抗原,该方法构成如下:用来自原发肿瘤(尚未接受任何治疗的肿瘤)的磨碎的组织匀浆和/或悬浮液和/或细胞裂解液为动物进行免疫接种之后,无论动物耐受或不耐受,均用来自耐药肿瘤的磨碎的组织匀浆和/或悬浮液和/或细胞裂解液为动物进行免疫接种,其中所述耐药肿瘤对所述至少一种抗肿瘤化合物(肿瘤对其的耐药是确定的或期望诱导耐药性的抗肿瘤化合物)耐药。这种用环磷酰胺类型的免疫抑制剂进行的耐受的目的是在以诱导耐药性为目的的抗肿瘤治疗应用于动物或人之前或在与人类有关的治疗范围内去除针对所有出现的表面抗原的免疫应答。因此,给药后的免疫应答,特别是注射耐药肿瘤的制剂之后的免疫应答,将集中在治疗诱导的表面结构上并潜在地参与肿瘤耐药性的形成。通过随后用来自原发肿瘤的肿瘤细胞接种动物后形成的血清滴度的消失评价耐受的效率。

[0065] 然后,对根据上述方法接种的小鼠的脾脏取样并根据本领域技术人员已知的标准方法将脾细胞与骨髓瘤细胞融合。

[0066] 细胞融合之后,在预先制备好的带有(未治疗的)“原发肿瘤”切片和耐药肿瘤(用抗肿瘤制剂单处理或多处理)切片的载玻片上通过“鉴别性免疫组织化学”筛选获得的杂交瘤。仅将产生识别耐药肿瘤而不识别原发肿瘤的抗体的杂交瘤选择出来,克隆并冷冻以产生抗体并测试其抗肿瘤活性。该方法的全部内容如下文的图2和3所示。应注意这种方法也可用于寻找和鉴定细胞内耐药分子。

[0067] 根据本发明,上文限定的抗体优选是可根据本领域技术人员所熟知的标准方法获得的特异性,特别是鼠的,嵌合或人源化单克隆抗体。

[0068] 一般地,制备单克隆抗体或其功能片段,尤其是鼠源抗体可参考特别是手册“抗体”(Harlow 和 Lane, *Antibodies :A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp.726,1988)中所描述的技术或参考 Kohler 和 Milstein(*Nature*, 256 :495-497,1975)描述的由杂交瘤制备抗体的技术。

[0069] 根据本发明的抗体也包括嵌合抗体或人源化抗体。

[0070] 嵌合抗体是指包含来自特定物种抗体的天然变异(轻链和重链)区联合所述特定物种(小鼠、马、家兔、犬、牛、雌鸟等)异源的物种的抗体的恒定轻链和重链区的抗体。

[0071] 根据本发明的抗体或其嵌合型片段可用基因重组技术制备。例如,嵌合抗体可通过克隆化包括根据本发明的非人的,尤其是鼠的单克隆抗体的启动子和可变区的编码序列和人抗体恒定区序列的重组 DNA 而制备。例如,这种重组基因编码的本发明的嵌合抗体是小鼠-人构建体,这种抗体的特异性由来自鼠 DNA 的可变区决定;其同种型由来自人 DNA 的恒定区所决定。嵌合抗体的制备方法可参考例如 Verhoeven 等人的文献(*BioEssays*, 8 :

74,1988), Morrison 等人 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :6851-6855,1984) 或美国专利 4,816,567。

[0072] 人源化抗体是指包含源自非人起源的 CDR 区和源自一种或多种人的抗体的抗体的其它部分。此外,构架区 (FR) 的一些残基可被置换以保留结合亲和力 (Jones 等人, Nature,321 :522-525,1986 ;Verhoeyen 等人, Science,239 :1534-1536,1988 ;Riechmann 等人, Nature,332 :323-327,1988)。

[0073] 根据本发明的人源化抗体或其片段可通过本领域技术人员所知的技术制备 (例如文献 Singer 等人, J. Immun. 150 :2844-2857,1992 ;Mountain 等人, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10 :1-142,1992 ;或 Bebbington 等人, Bio/Technology, 10 :169-175,1992 中所述的技术)。

[0074] 其它人源化技术也是本领域技术人员所知的,如例如 PDL 所述的“CDR 移植”技术,是专利 EP 0 451 261、EP 0 682 040、EP 0 939 127、EP 0 566 647 或者 US 5,530,101、US 6,180,370、US 5,585,089 和 US5,693,761 的主题。专利 US 5,639,641 或者 US 6,054,297、US 5,886,152 和 US 5,877,293 也提及了该技术。

[0075] 根据本发明的抗体的功能片段,如 Fv、scFv (对于单一链是 sc)、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fc 片段或双体,或任何半衰期经过化学修饰延长的抗体片段,这些化学修饰如增加多(烷基)乙二醇如聚乙烯乙二醇“PEG 化”或通过使其进入溶酶体中。一般地,所述片段至少有一个来源抗体的特征性 CDR,并一般能表现出甚至来源抗体的部分活性。

[0076] 优选地,所述功能片段构成自或包含其来源抗体的重链或轻链可变链的部分序列,所述部分序列足以保留与其来源抗体相同的结合特异性和足够的亲和力,其长度优选至少等于其来源抗体序列长度的 1/100,更优选至少 1/10。

[0077] 这种功能片段最少包括其来源抗体序列的 5 个氨基酸,优选 10、15、25、50 和 100 个连续氨基酸。

[0078] 优选地,这些抗体片段是 Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、F(ab')、scFv-Fc 型或双体一般具有与其来源抗体相同的结合特异性。根据本发明,本发明所述的抗体片段可获自如前所述的抗体通过如酶切消化(如胃蛋白酶或番木瓜蛋白酶)和/或通过化学还原打开二硫键的方法获得的片段。另一种方式,本发明包含的抗体片段可通过本领域技术人员所熟知的基因重组技术获得或这通过多肽合成技术,即通过如 Applied Biosystems 等提供的自动化多肽合成仪的方式获得。

[0079] 更优选的是,本发明包含抗体,或其根据本发明的功能片段,尤其是通过基因重组或化学合成获得的嵌合或人源化抗体及其片段。

[0080] 根据本发明所述的方法的优选具体实施方式,所述免疫接种通过腹腔和/或皮下和/或静脉和/或脾下注射进行。每种免疫接种的方式可互换,选择一种方式而不是另一种方式是根据所用的动物和本领域技术人员的知识和实践。

[0081] 更特别的是,根据第一具体实施方式,产生的肿瘤是直接通过对正在接受或已接受用至少一种能诱导耐药性的或对其的耐药性已确定的抗肿瘤化合物的治疗性处置的患者区活检和/或手术而获得。

[0082] 根据第二具体实施方式,耐药肿瘤通过将肿瘤细胞系和/或全部或部分人的肿瘤移植到动物身上,并为该动物注射至少一种期望其诱导耐药性或确定对其的耐药性明确的

抗肿瘤化合物而诱导产生。

[0083] 无论上述优选的具体实施方式,本发明所述的方法的特征在于所述活性抗体或其中一个功能片段是单克隆抗体。

[0084] 更特别的是,所述单克隆抗体或其中一个功能片段是选自 IgG、IgA、IgM、IgD 或 IgE 的免疫球蛋白。

[0085] 甚至更优选的是,所述单克隆抗体或其中一个功能片段是 γ 1、 γ 2 或 γ 4 同种型 IgG。

[0086] 然而,应理解根据本发明,IgG1 和 IgG2 型免疫球蛋白因其诱导效应细胞功能的特性而是优选的。

[0087] 一般地,本领域技术人员将意识到效应子功能包含,结合 C1q、CDC(补体依赖的细胞毒活性),结合 Fc 受体、ADCC(抗体依赖的细胞的细胞毒活性)和吞噬作用作为非穷举性例子。

[0088] 更加特别的是,本发明所述的优选的效应子功能是 ADCC 和 CDC。

[0089] 一般地,本发明所指的功能片段选自片段 Fv、Fab、(Fab')₂、Fab'、scFv、scFv-Fc 和双体,或任何半衰期延长的片段,如 PEG 化的片段。

[0090] 以更加特异性但绝不限制性的方式,本发明所述的方法至少包含下列步骤:

[0091] i) 用来自耐药肿瘤的磨碎的组织匀浆和/或悬浮液和/或细胞裂解液直接免疫动物;

[0092] ii) 将步骤 i) 中免疫过的动物的脾细胞与骨髓瘤细胞融合以获得杂交瘤;和

[0093] iii) 通过鉴别选择方法选出分泌特异性识别耐药肿瘤的肿瘤细胞表面表达的通过抗肿瘤治疗诱导产生的抗原的抗体的杂交瘤。

[0094] “鉴别选择法”是指任何基于可鉴定诱导型抗原的方法的选择方法,诱导型抗原相对于那些在耐药性产生之前就已存在于细胞上的抗原而言,是对治疗产生耐药性的抗原。

[0095] 能够进行这种“鉴别选择法”的技术的非限制性的例子有在冰冻切片或石蜡包埋切片上进行免疫组织化学的方法或“蛋白质芯片”或“基因芯片”的方法。

[0096] 更特别的是,优选使用所谓的“组织芯片”技术。包含“组织芯片”技术,将冰冻或石蜡包埋的组织块,新的组织块包含数十至数百这些组织的核心,以致能在将这些用于“组织芯片”的组织块切片后固定包含数十至数百组织切片的显微镜玻片。

[0097] 根据优选具体实施方式,本发明所述的方法在上述步骤 i) 之前进一步包含下列步骤:

[0098] a) 选择肿瘤细胞系和/或全部或部分所谓“原发”肿瘤,并将其移植到动物体内;

[0099] b) 用至少一种抗肿瘤化合物治疗部分接受移植的动物;

[0100] c) 使步骤 a) 中接受移植的未经治疗的动物的全部或部分“原发”肿瘤恢复;

[0101] d) 使步骤 b) 中接受移植的接受治疗的动物的全部或部分耐药肿瘤恢复;

[0102] e) 制备来自分别在步骤 c) 和 d) 中完全或部分恢复的肿瘤的抗体的鉴别选择法的手段;和

[0103] f) 制备来自步骤 d) 中完全或部分恢复的耐药肿瘤的磨碎的组织匀浆和/或细胞裂解液。

[0104] 在本发明说明书中,应理解术语“原发肿瘤”和“原生肿瘤”是等同的,并不区别使

用。

[0105] 根据本发明的具体实施方式,所述肿瘤细胞系和 / 或所谓的“原发”肿瘤选自来自肺部的,而且以非限制性方式,选自结肠、前列腺、乳腺、卵巢的肿瘤细胞 (A549),或任何治疗的耐药性明确的肿瘤。

[0106] 此外,根据本发明所用的抗肿瘤化合物选自化学疗法试剂、放射疗法试剂、化学分子或抗体,这些不同化合物的全部在本说明中上述部分定义。

[0107] 根据本发明的具体实施方式,所述至少一种抗肿瘤化合物为单克隆抗体,所述单克隆抗体更优选选自针对生长因子受体、血管生成相关分子,或细胞迁移现象相关趋化因子和整合素的抗体或其功能片段。

[0108] “生长因子受体”是指任何与配基结合或配基构象发生独立性变化,或与其它膜蛋白发生同源或异源二聚作用后介导增殖反应的跨膜蛋白。“血管生成相关分子”是指任何与配基结合或配基构象发生独立性变化,或与其它膜蛋白发生同源或异源二聚作用后导致血管形成的膜蛋白受体。

[0109] “细胞迁移现象相关趋化因子和整合素”是指任何能够具有分解细胞外基质的活性和 / 或化学 - 趋化活性的可溶性分子。

[0110] 根据本发明的另一具体实施方式,该方法的特征在于所述至少一种抗肿瘤化合物为至少两种优选至少三种特性不同和 / 或具有不同的作用机制和 / 或靶点蛋白质不同的抗肿瘤化合物的联合使用。

[0111] 优选地,所述抗肿瘤化合物的联合使用是单克隆抗体或其功能片段的联合。

[0112] 更优选地,所述单克隆抗体或其功能片段的联合是选自抗 -IGF-IR、抗 -EGFR、抗 -Her/2neu、抗 -VEGF、抗 -VEGFR、抗 -CXCR、抗 -cMET、抗 -RON、Ephrin、抗体等的抗体的联合。

[0113] 根据具体实施方式,作为非限制性举例,本发明所述的方法的特征在于所述联合是抗 -IGF-IR 抗体、抗 -EGFR 抗体和抗 -Her/2neu 抗体的联合,所述提及的抗体优选分别构成自单克隆抗体 7C10、225 和 h4D5。

[0114] 单克隆抗体 7C10 为专利申请 WO 03/059951 (于 2003 年 1 月 20 日提交) 中所述的抗体,将这些内容在此引入以供参考。

[0115] 单克隆抗体 225 为 ATCC 保藏的编号为 (HB-8508) 的杂交瘤产生的抗体。

[0116] 单克隆抗体 h4D5 为可购得的 herceptin,例如从 ICR (Institut Claudius Regaud) 购得。

[0117] 根据更优选具体实施方式,本发明所述的方法的特征在于通过未治疗的所谓“原发”肿瘤组织和耐药肿瘤组织和 / 或诱导形成耐药的肿瘤组织之间进行鉴别筛选来进行 iii) 的选择分泌不识别所谓“原发”肿瘤细胞抗原的抗体的杂交瘤的步骤。

[0118] “鉴别筛选”是指通过相对于在形成治疗耐受之前出现在细胞上的抗原而言对治疗产生耐受可筛选出诱导抗原。优选地,鉴别筛选通过实施上述步骤 e) 的方法而进行。

[0119] 最后,本发明所述的最后一个具体实施方式包含在步骤 i) 之前额外的耐受步骤。

[0120] “耐受”是指通过使用如环磷酰胺的免疫抑制性化合物诱导免疫反应的出现。实际上,所述耐受步骤可构成自:

[0121] - 用来源于步骤 c) 的所谓原发肿瘤获得的磨碎的组织匀浆和 / 或悬浮液和 / 或细

胞裂解液给药,尤其是通过为动物注射的方式给药;和

[0122] - 用免疫抑制剂处置这些动物以消除通过上述注射步骤激活的 B 细胞并因此抑制任何潜在抗所述所谓原发肿瘤的应答。

[0123] 当然,任何相似的方法或操作,或可获得相同结果的手段,应视为与本发明等同或包含在本发明中。“免疫抑制剂”是指任何能够减少免疫系统细胞数目的物质。作为非限制性实施例,可提及环磷酰胺。

[0124] 在另一方面,本发明涉及体外制备和选择能够抑制肿瘤对抗肿瘤化合物产生耐药的抗体或其其中一个功能片段的方法或体外制备和选择针对在对至少一种抗肿瘤化合物耐药的肿瘤表面表达的肿瘤抗原的抗体或其其中一个功能片段的方法,所述肿瘤抗原参与所述肿瘤对抗肿瘤化合物耐药性的形成,该方法的特征包含:

[0125] a) 体外制备本发明所述的抗体或其其中一个功能片段的方法,所述抗体针对在耐药肿瘤表面特异性表达的所述肿瘤抗原,所述肿瘤抗原在形成耐药肿瘤的原发肿瘤表面不表达;

[0126] b) 将在步骤 a) 中获得的抗体在体外或体内与对抗肿瘤化合物耐药的肿瘤接触;和

[0127] c) 如果证明了所述抗体对肿瘤对抗肿瘤化合物的耐药性的抑制性效应,选择该抗体。

[0128] 根据另一具体实施方式,为了明确抗肿瘤治疗诱导抗原的表达是否参与耐药现象的形成,可进行体外或体内试验。根据优选具体实施方式,这个步骤可构成自体外或体内试验根据本发明的抗体对耐药性肿瘤并观察耐药肿瘤的耐药抑制活性是否形成。

[0129] 在另一方面,本发明涉及体外制备或选择能够表现出抗肿瘤活性,尤其是抑制表达抗体针对的抗原的肿瘤细胞的增殖的抗体或其其中一个功能片段的方法,其特征在于该方法包含:

[0130] a) 体外制备抗体或其其中一个功能片段的方法,根据本发明,所述抗体针对所述在耐药肿瘤表面特异性表达的肿瘤抗原,所述肿瘤抗原在产生耐药肿瘤的原发肿瘤表面不表达;

[0131] b) 使步骤 a) 中获得的抗体在体外或体内与其细胞表达所述肿瘤抗原的肿瘤接触,优选与步骤 a) 中使用的所述耐药肿瘤接触或与具有浸润表型的肿瘤接触;和

[0132] c) 如果证实所述抗体在该肿瘤上的抗肿瘤效应,尤其是抑制该肿瘤细胞增殖增殖的效应,选择该抗体。

[0133] 在上文中的方法的步骤 b) 中,应理解其细胞表面表达所述肿瘤抗原的肿瘤不必是对已用作制备所述抗体的抗肿瘤化合物耐药的肿瘤。任何肿瘤,尤其是浸润表型的肿瘤,其肿瘤细胞表达所述抗体识别的肿瘤抗原可用于步骤 b) 中。

[0134] 本发明还明显地涉及使用上述方法制备治疗性和/或诊断性单克隆抗体。本发明还包括本领域技术人员为了符合特定标准或而开发该方法的部分应用或本发明说明书进行别的相当简单的改动。根据本发明的第三方面关注通过实施上述本发明所述的方法而获得的单克隆抗体或其其中一个功能片段。

[0135] 本发明在至今没有描述过具有这种特性的抗体的意义上是革新性的,通过这种方法获得的这种抗体更加具有革新性。

[0136] 优选地,本发明所述的所述功能片段选自 Fv、scFv、Fab、(Fab')₂、Fab'、scFv-Fc 片段或双体,或任何半衰期通过化学修饰,尤其是通 PEG 化,或通过使其进入溶酶体内而延长的功能片段。当然,绝不限于该列表,或应将本领域技术人员所知的任何其它类型的片段视为本发明的一部分。

[0137] 作为本发明的示例性例子,下文将描述通过实施本发明所述的方法获得的 5 种抗体。这些命名为 1A6、1A9、2E11、3C11 和 3G7 的抗体可以是鼠抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

[0138] 根据第一具体实施方式,本发明涉及单克隆抗体或其其中一个功能片段,其特征在于包含:

[0139] - 包含序列 SEQ ID No. 1、2 和 3,或优化比对后与序列 SEQ ID No. 1、2 和 3 至少 80% 相同的序列的 CDR 区的轻链;和

[0140] - 包含序列 SEQ ID No. 4、5 和 6,或优化比对后与序列 SEQ ID No. 4、5 和 6 至少 80% 相同的序列的 CDR 区的重链。

[0141] 本说明书中,术语“多肽”“多肽序列”跟随抗体化合物或其序列的肽和蛋白质可互换。

[0142] 此处应理解本发明与天然形式的抗体无关,即不是从天然环境中提取这些抗体,但是可能从天然来源通过纯化分离或获得,或其它通过基因重组获得的抗体,或通过化学合成,并且这些抗体可包括下文将描述的非天然氨基酸。

[0143] CDR 区或 CDR 是指 Kabat 等人 (Kabat 等人, Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., U. S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, 和后来的版本) 定义的免疫球蛋白的重链和轻链的高度可变区。该抗体有 3 个重链 CDR 和 3 个轻链 CDR。本文所用的术语“CDR”的目的在于指取决于具体情况,这些区域中一个或数个,或全部 CDR 区包含形成抗体结合其识别的抗原或表型的亲合力的多数氨基酸残基。

[0144] 两个核酸序列或氨基酸序列之间的“同一性百分数”在本发明的意义上讲是指两个在最佳排列(优化比对)后获得的比较序列之间核酸或相同的氨基酸的百分数,该百分数纯粹通过统计学计算得出,并且两个序列间的区别是随机分布并且遍布其全长。两条核苷酸序列或蛋白质序列之间的序列比较一般通过比较以优化方式将其排列后的这些序列而进行,所述比较可通过比较片段或通过“比较窗口”进行。进行比较的序列的优化比对可通过 Smith 和 Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2 : 482] 的局部同源性算法,通过 Needleman et Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48 : 443] 的局部同源性算法,通过 Pearson 和 Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 2444] 的相似性查找法,通过使用这些算法的计算机软件包 (GAP, BESTFIT, FASTA 和 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, 或用比较软件包 BLAST N 或 BLAST P) 进行和人工进行。

[0145] 确定两条核苷酸或蛋白质序列之间的同一性百分数是通过比较这两条以比较的核苷酸或蛋白质序列可包含相对于两条序列之间进行优化比对的参照序列添加或删除了核苷酸或氨基酸的优化方式排列的序列。通过确定两个序列之间核苷酸或氨基酸残基相同的位置的数目,将这个数目除以比较窗口中的位置总数目,然后将所得结果乘以 100 来获得同一性百分数。

[0146] 例如,可以使用 BLAST 程序“BLAST 2 序列”(Tatusova 等人, " Blast2 sequences-a new tool for comparing protein and nucleotide sequences ", FEMS Microbiol.Lett.174:247-250), 该程序在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html> 站点可以找到,使用设定好的缺省参数(尤其是参数“开放空位罚分(open gap penalty):5,和延伸空位罚分(extension gap penalty):2,选择矩阵,例如程序设置的“BLOSUM 62”矩阵)两条进行比较的序列之间的同一性百分数可直接通过程序计算出来。还可能使用另一种程序如“ALIGN”或“Megalign”(DNASTAR)软件包。

[0147] 每一条至少与参照氨基酸序列有 80%,优选有 85%、90%、95%和 98%的同一性的氨基酸序列,相对于参照序列而言,这些序列中优选具有某种修饰的序列,尤其是删除、添加或取代至少一个氨基酸,平末端或粘末端。就一个或多个连续或不连续氨基酸的取代而言,优选那些以等价氨基酸替换被取代氨基酸的取代。术语“等价氨基酸”本文是指能够被其中一个具有基本机构的氨基酸取代而没有使其相应的抗体的生物学活性发生实质上的变化的任何氨基酸。下面将限定“等价氨基酸”,尤其是在实施例限定“等价氨基酸”。

[0148] 这些等价氨基酸可通过根据其与它们被取代的氨基酸的结构同源性,或者根据被管理的不同抗体之间生物学活性的比较测试的结果而确定。

[0149] 作为非限制性实施例,表 1 重复了能够进行取代而未导致其相应修饰抗体的生物学活性发生多余变化的可能性,同一条件下可天然地关注倒转取代。

[0150] 表 1

[0151]

原始残基	取代残基
Ala(A)	Val, Gly, Pro
Arg(R)	Lys, His
Asn(N)	Gln
Asp(D)	Glu
Cys(C)	Ser
Gln(Q)	Asn
Glu(G)	Asp
Gly(G)	Ala
His(H)	Arg
Ile(I)	Leu
Leu(L)	Ile, Val, Met

Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

[0152] 优选地,上述抗体被命名为是 1A6 抗体,并包含重链序列和轻链序列,其中重链序列包含 SEQ ID No. 7,轻链序列包含序列 SEQ ID No. 8。

[0153] 更特别的是,本发明还涉及能够分泌上述抗体 1A6 的鼠杂交瘤 (1A6)。在本说明书中,无论是指鼠杂交瘤还是这一杂交瘤产生的其它抗体都无区别地使用同一编号。

[0154] 这种鼠杂交瘤由 2006 年 5 月 31 日保藏在 CNCM(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes), Institut Pasteur, Paris (France), 保藏号为 No. I-3612 的杂交瘤构成。在六个短 CDR 序列中,重链 (CDRH3) 的第三个 CDR 的大小变异较大(变异较大主要由于排列基因的机制造成的)。它可短至 2 个氨基酸,也可长至 26 个氨基酸。功能上,CDRH3 在决定抗体的特异性上发挥不同的作用 (Segal 等人,PNAS, 71 :4298-4302, 1974 ; Amit 等人, Science, 233 :747-753, 1986 ; Chothia 等人, J. Mol. Biol, 196 :901-917, 1987 ; Chothia 等人, Nature, 342 :877-883, 1989 ; Caton 等人, J. Immunol, 144 :1965-1968, 1990 ; Sharon 等人, PNAS, 87 :4814-4817, 1990 ; Sharon 等人, J. Immunol, 144 :4863-4869, 1990 ; Kabat 等人, J. Immunol, 147 :1709-1719, 1991)。

[0155] 已知 CDR 中仅有小百分数的氨基酸促进抗体结合位点的构建,然而这些残基应保持非常特异地三维立体构型。

[0156] 根据第二具体实施方式,本发明针对单克隆抗体或其其中一个功能片段,该单克隆抗体或其其中一个功能片段的特征在于它包含:

[0157] - 轻链,其包含的 CDR 区序列是 SEQ ID No. 9、10 和 11 序列或是优化比对后与序列 SEQ ID No. 9、10 和 11 具有至少 80% 同一性的序列;和

[0158] - 重链,其包含的 CDR 区序列是 SEQ ID No. 12、13 和 14 序列或是优化比对后与序列 SEQ ID No. 12、13 和 14 具有至少 80% 同一性的序列。

[0159] 根据更一具体实施方式,本发明所述的抗体被命名为 1A9,包含重链序列(该重链序列包含序列 SEQ ID No. 15)和轻链(该轻链序列包含序列 SEQ ID No. 16)。

[0160] 根据另一方面,要求保护能够分泌上文限定的抗体鼠杂交瘤 (1A9)。

[0161] 最后,根据本发明的优选具体实施方式,涵盖鼠杂交瘤 1A9,其于 2006 年 5 月 31 日保藏在 CNCM(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes), Institut Pasteur, Paris (France), 保藏号为 No. I-3613。

[0162] 根据第三具体实施方式,本发明针对根据本发明的方法客体获得的单克隆抗体或其一个功能片段,该单克隆抗体或其一个功能片段包含:

[0163] - 包含 CDR 区的轻链,其具有序列 SEQ ID No. 17、18 和 19 或优化比对后与序列 SEQ ID No. 17、18 和 19 具有至少 80% 同一性的序列;和

[0164] - 包含 CDR 区的重链,其中包含的 CDR 区序列是 SEQ ID No. 20、21 和 22 序列或是优化比对后与序列 SEQ ID No. 20、21 和 22 具有至少 80% 同一性的序列。

[0165] 优选地,本发明所述的抗体,命名为 2E11,包含序列 SEQ ID No. 23 的重链和包含序列 SEQ ID No. 24 的轻链。

[0166] 根据另一方面,本发明还包含能够分泌上述抗体的鼠杂交瘤 2E11。

[0167] 更加特别的是,所述鼠杂交瘤是于 2006 年 5 月 31 日保藏在 CNCM(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes), Institut Pasteur, Paris (France) 保藏号为 No. I-3615 的杂交瘤。

[0168] 根据第四具体实施方式,本发明针对通过上述方法获得的单克隆抗体或其一个功能片段,其包含:

[0169] - 轻链,其包含的 CDR 区的序列是 SEQ ID No. 25、26 和 27 的 CDR 区或优化比对后与序列 SEQ ID No. 25、26 和 27 具有至少 80% 同一性的序列;和

[0170] - 重链,其包含的 CDR 区序列是 SEQ ID No. 28、29 和 30 序列或是优化比对后与序列 SEQ ID No. 28、29 和 30 具有至少 80% 同一性的序列。

[0171] 更加特别的是,根据本发明所述的抗体,命名为 3C11,包含包含序列 SEQ ID No. 31 的重链序列和包含序列 SEQ ID No. 32 的轻链。

[0172] 根据另一方面,本发明还涉及能够分泌上述抗体的鼠杂交瘤 3C11。

[0173] 所述杂交瘤优选是于 2006 年 5 月 31 日保藏在 CNCM(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes), Institut Pasteur, Paris (France) 保藏号为 No. I-3614 的杂交瘤。

[0174] 最后,根据本发明的第五具体实施方式,后者涉及通过实施本发明所述的方法客体获得的单克隆抗体或其一个功能片段,其包含:

[0175] - 轻链,其包含的 CDR 区的序列是 SEQ ID No. 33、34 或 35 的 CDR 区或优化比对后与序列 SEQ ID No. 33、34 或 35 具有至少 80% 同一性的序列;和

[0176] - 重链,其包含的 CDR 区序列是 SEQ ID No. 36、37 和 38 序列或是优化比对后与序列 SEQ ID No. 36、37 和 38 具有至少 80% 同一性的序列。

[0177] 优选地,所述抗体(命名为 3G7)包含包含 SEQ ID No. 39 的重链和包含序列 SEQ ID No. 40 的轻链。

[0178] 根据本发明的另一方面,要求保护能够分泌如上抗体的鼠杂交瘤 3G7。

[0179] 所述杂交瘤优选是于 2006 年 5 月 31 日保藏在 CNCM(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes), Institut Pasteur, Paris (France) 保藏号为 No. I-3616 的鼠杂交瘤。为使其清楚,将其列于下表 2 中,本发明所述抗体与所述抗体 CDR 的各个氨基

酸序列之间的对应关系。

[0180] 表 2

抗体	重链	轻链	序列号
1A6		CDR1	1
		CDR2	2
		CDR3	3
	CDR1		4
	CDR2		5
	CDR3		6
1A9		CDR1	9
		CDR2	10
		CDR3	11
	CDR1		12
	CDR2		13
	CDR3		14
2E11		CDR1	17
		CDR2	18
		CDR3	19
	CDR1		20
	CDR2		21
	CDR3		22
3C11		CDR1	25
		CDR2	26
		CDR3	27
	CDR1		28
	CDR2		29
	CDR3		30
		CDR1	33
		CDR2	34

3G7		CDR3	35
	CDR1		36
	CDR2		37
	CDR3		38

[0182]

[0183] 下表 3 代表,本发明所述的这些相同抗体与其重链和轻链的各个氨基酸序列之间的对应关系。

[0184] 表 3

[0185]

抗体	重链	轻链	序列号
1A6	完整		7
		完整	8
1A9	完整		15
		完整	16
2E11	完整		23
		完整	24
3C11	完整		31
		完整	32
3G7	完整		39
		完整	40

[0186] 最后,下表 4 将本发明所述的每种抗体名称和 CNCM 的保藏号分组。

[0187]

杂交瘤	CNCM 保藏号
1A6	I-3612
1A9	I-3613
3C11	I-3614
2E11	I-3615
3G7	I-3616

[0188] 当然,将 1A6 抗体的上述全部修饰特性应用于本发明所述的其它抗体,并且更特别是应用于 1A9、2E11、3C11 和 3G7 抗体。

[0189] 与上述相似的方式也可应用于根据本发明所述的方法获得的任何抗体,同样尤其是全部所述特征、特性或修饰应被视为也可应用于本发明鉴定的抗体。

[0190] 更特别的是,特异的是,任何功能片段选自 Fv、Fab、(Fab')₂、Fab'、scFv、scFv-Fc 片段或双体,或任何半衰期延长的片段,如 PEG 化片段。

[0191] 优选的是,本发明所述的抗体优选为上述杂交瘤之一,即 I-3612、I-3613、I-3614、I-3615 或 I-3616 杂交瘤分泌的抗体或其一个功能片段。

[0192] 根据本发明的进一步具体实施方式,所述抗体是嵌合抗体并进一步包含源自不同于小鼠的其它物种的抗体的恒定轻链和重链区。

[0193] 优选的是,所述异种物种是人类。

[0194] 更有优选的是,根据本发明,所述嵌合抗体或其一个功能片段的特征在于源于人的抗体的轻链和重链恒定区分别是 κ 和 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 。

[0195] 最后,甚至更优选的是,所述抗体由人源化抗体组成并包含轻链和 / 或重链,其中所述轻链和 / 或重链的骨架片段 FR1-FR4 分别来源于人抗体的轻链和 / 或重链的骨架片段 FR1-FR4。

[0196] 在特定方面,本发明涉及嵌合抗体或其一个功能片段,根据本发明,该嵌合抗体或其一个功能片段的特征在于所述抗体进一步包含源于非小鼠的异种抗体的轻链和重链恒定区,非小鼠的异种抗体尤其是人的抗体,优选源于人的抗体的轻链和重链恒定区分别是 κ 和 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 。

[0197] 根据本发明的另一方面,所述分离的核苷酸的特征在于其选自下列核苷酸:

[0198] a) DNA 或 RNA 核酸,编码本发明所述的抗体或其一个功能片段;

[0199] b) 与上述 a) 的核酸互补的核酸;

[0200] c) 能够在强烈严格条件下与至少一个序列是 SEQ ID No. 41-46、49-54、57-62、65-70、73-78 或是优化比对后与序列 SEQ ID No. 41-46、49-54、57-62、65-70、73-78 具有至少 80% 同一性的序列的 CDR 杂交的具有至少 18 个核苷酸的核酸;和

[0201] d) 能够在强烈严格条件下与至少一个序列是 SEQ ID No. 48、56、64、72 或 80 的轻链和 / 或一个序列是 SEQ ID No. 47、55、63、71 或 79 的重链,或与优化比对后与序列 SEQ ID No. 47、48、55、56、63、64、71、72、79 或 80 具有至少 80% 同一性的序列杂交的具有至少 18 个核苷酸的核酸。术语“核酸”、核序列、核酸序列、多核苷酸、寡核苷酸、多核苷酸序列、核苷酸序列,这些在本发明说明书中不加区别地使用的术语,其目的是指修饰的或未修饰的核苷酸与可限定的核酸片段或核酸区(包括非天然核苷酸或者不包括非天然核苷酸)、双链 DNA、单链 DNA 和所述 DNA 的转录产物的特异性连接。

[0202] 此处还应理解为本发明不涉及天然环境即天然条件下的核酸序列。本发明涉及的核酸序列是已被分离和 / 或纯化的序列,即直接或间接取样的序列,例如通过拷贝取样的序列,这些序列周围的核苷酸已至少部分修饰过。本发明还指例如通过宿主细胞方式的基因重组获得的或通过化学合成获得的分离的核酸。

[0203] 优化比对后,与优选序列具有至少 80%, 优选 85%、90%、95% 和 98% 的同一性百分数的核序列是指相对于参照核序列而言,具有某些修饰的核序列,这些修饰如特别是缺失、平端、粘端、嵌合融合和 / 或尤其是点式取代(point-like substitution)。优选那些编码与参照序列编码的氨基酸相同的氨基酸的序列,这些序列涉及能够与优选参照序列在强烈严格条件(尤其是下文限定的条件)下发生特异性杂交的基因密码或互补序列的降解。

[0204] 强烈严格条件下的杂交是指选定的能使杂交在两条互补性 DNA 片段间进行的温度和离子强度条件。作为解释,为了限定上述多核苷酸片段的目的的杂交步骤的强烈严格性条件,优选是下列条件。

[0205] DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交以下列两步进行:(1) 于 42°C, 在含有 5xSSC(1xSSC 相当于 0.15M NaCl+0.015M 柠檬酸盐溶液)的磷酸盐缓冲液(20mM, pH 7.5)、50% 甲酰胺、7%

十二烷基磺酸钠 (SDS)、10xDenhardt's、5%硫酸葡聚糖和 1%鲑精 DNA 中预杂交 3 小时；
(2) 实际杂交进行 20 小时，其杂交温度条件取决于探针大小（即，对于 > 100 个核苷酸的探针是 42℃），接着用 2xSSC+2% SDS，在 20℃洗涤 20 分钟共洗涤两次，再用 0.1xSSC+0.1% SDS 于 20℃洗涤 20 分钟。最后，用 0.1xSSC+0.1% SDS 于 60℃洗涤一次 30 分钟，洗除 > 100 个核苷酸的探针。根据 Sambrook 等人 (1989, Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor) 的教程，上述大小确定的多核苷酸的强烈严格杂交条件对于本领域技术人员来讲也适用于大或小的寡核苷酸。

[0206] 为更清楚起见，本发明所述的抗体之间的对应关系，更特别是，抗体的 CDR 序列以及可变链与其核苷酸序列之间的对应关系还详见下表 5。

[0207] 表 5

[0208]

抗体	重链	轻链	序列编号
1A6		CDR1	41
		CDR2	42
		CDR3	43
	CDR1		44
	CDR2		45
	CDR3		46
1A9		CDR1	49
		CDR2	50
		CDR3	51
	CDR1		52
	CDR2		53
	CDR3		54
2E11		CDR1	57
		CDR2	58
		CDR3	59
	CDR1		60
	CDR2		61
	CDR3		62
3C11		CDR1	65
		CDR2	66
		CDR3	67
	CDR1		68
	CDR2		69
	CDR3		70
3G7		CDR1	73
		CDR2	74

[0209]

		CDR3	75
	CDR1		76
	CDR2		77
	CDR3		78
1A6	完整		47
		完整	48
1A9	完整		55
		完整	56
2E11	完整		63
		完整	64
3C11	完整		71
		完整	72
3G7	完整		79
		完整	80

[0210] 本发明还涉及包含本发明所述的核酸的载体。

[0211] 本发明尤其针对包含本发明所述的核酸序列的克隆和 / 或表达载体。

[0212] 根据本发明所述的载体优选包括能核酸序列在确定的宿主细胞内表达和 / 或分泌的元件。载体应包括启动子（起始和终止翻译的信号）和适合的转录调节区。它应能以稳定的方式在宿主细胞内保留，并可可能含有负责翻译后蛋白质的分泌的特定信号。本领域技术人员可根据所用的宿主细胞选择和优化不同元件。为了实现这一目的，可将本发明所述的核酸序列插入选定宿主体内的自我复制载体中或是选定宿主的整合载体。

[0213] 本领域技术人员可使用当前方法制备这种载体，而且所得克隆可通过标准方法，如通过脂质体转染法、电穿孔法、热休克法或化学方法引入合适的宿主体内。

[0214] 本发明所述的载体，例如是质粒或病毒来源的载体。可将这些载体转化宿主细胞以克隆和表达本发明所述的核酸序列。

[0215] 本发明还包含以本发明所述的载体转化的宿主细胞或包含本发明所述的载体的宿主细胞。

[0216] 宿主细胞可选自真核或原核系统，例如细菌细胞、酵母细胞或动物细胞，尤其是哺乳动物细胞。也可使用昆虫细胞或植物细胞。

[0217] 本发明还涉及除人以外的包含本发明所述的转化细胞的动物。

[0218] 另一方面，本发明的目标是制备本发明所述的抗体或其一个功能片段的方法，该方法的特征在于包含下列步骤：

[0219] a) 在合适的培养条件下在培养基中培养本发明所述的宿主细胞；和

[0220] b) 回收所述抗体或其一个功能片段，因此从培养基或所述培养细胞中制备得到。

[0221] 可在制备本发明所述的重组多肽的方法中使用转化细胞。制备本发明所述的重组

形式的多肽的方法（其特征不在于使用的本发明所述的载体和 / 或转化了载体的细胞）本身包含在本发明内。优选地，在可允许表达所述多肽和回收所述重组肽的条件下培养本发明所述的经载体转化的细胞。

[0222] 如上所述，宿主细胞可选自原核或真核系统。尤其是那些有可能使本发明所述的核酸易于分泌和鉴定的原核或真核系统。因此，可将本发明所述的带有这种序列的载体优选用于制备分泌型重组蛋白。的确，这些目的重组蛋白由于其存在于细胞培养上清液中而不是存在于宿主细胞内的事实而使其纯化过程更加容易。

[0223] 也可通过化学合成制备本发明所述的多肽。这种制备方法也是本发明的目标，本领域技术人员了解化学合成方法，例如使用固相合成技术的化学合成方法（尤其见于 Steward 等人, *Solid phase peptidessynthesis*, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd ed., (1984)）或使用在标准溶液中浓缩片段或合成的部分固相合成技术的化学合成方法。化学合成获得的多肽和可包括相应的非天然氨基酸的多肽也包含在本发明中。

[0224] 能够通过本发明所述的方法获得的抗体或其一个功能片段也包含在本发明中。双特异性或双功能抗体形成第二代单克隆抗体，其中在同一个分子中组合了两个不同的可变区 (Hollinger 和 Bohlen, 1999, *Cancer and metastasis rev.* 18 :411-419)。既在诊断又在治疗领域验证了它们的应用，因为它们募集新效应子功能的能力或靶向肿瘤细胞表面几个分子的能力。这些抗体可通过化学方法获得 (Glennie MJ 等人, 1987, *J. Immunol.* 139, 2367-2375 ;Repp R. 等人, 1995, *J. Hemat.* 377-382) 或体细胞 (Staerz U. D. 和 Bevan M. J., 1986, *PNAS* 83, 1453-1457 ;SureshM. R. 等人, 1986, *Method Enzymol.*, 121 :210-228) 也可优选通过遗传工程技术获得，遗传工程中可强制进行异二聚体化，其促进目标抗体的纯化方法 (Merchand 等人, 1998, *Nature Biotech.*, 16 :677-681)。

[0225] 这些双特异性抗体可构建为完整 IgG，作为双特异性 Fab' 2，作为 Fab' PEG 或作为二体或甚至是作为双特异性 scFv，但也可作为四价双特异性抗体或者是存在针对每个靶抗原的结合位点 (Park 等人, 2000, *MoI. Immunol.*, 37 (18) :1123-30) 或其片段（如上所述）

[0226] 除了由生产和使用双特异性抗体比制备两条特异性抗体更加低廉这一事实产生的经济效益外，使用这种双特异性抗体还具有治疗毒性减轻的益处。的确，使用双特异性抗体，有可能使全球循环抗体用量和可能因此引起的毒性反应下降。

[0227] 在本发明优选具体实施方式中，双特异性抗体是二价或四价抗体。

[0228] 实际中，使用四价双特异性抗体的好处是与二价抗体相比由于针对每个靶蛋白具有两个结合位点而具有更强的亲合力。

[0229] 与选择上述抗体的功能片段相似，所述第二种模式选自 Fv、Fab、(Fab')₂、Fab'、Fab' PEG、scFv、scFv-Fc 片段和二体或任何半衰期可能延长的形式。

[0230] 另一方面，本发明的目标是用作药物的本发明所述的抗体或其功能片段（优选上文限定的人源化抗体）。“抗体”在本说明书中的下文中，既指应用本发明上述方法获得的抗体也指选自己鉴定并命名的抗体 1A6、1A9、2E11、3C11 或 3G7。

[0231] 本发明还涉及药物组合物，其包含由本发明所述的抗体或其一个功能片段的化合物作为活性成分和优选加入药学上可接受的赋形剂和 / 或载体。

[0232] 更加特别的是，本发明涵盖组合物，其包含如上所述的或杂交瘤 I-3612、I-3613、I-3614、I-3615 或 I-3616 产生的抗体或其一个功能片段的化合物作为活性成分。

[0233] 根据另一具体实施方式,本发明还涉及上述药物组合物,该药物组合物进一步包含联合使用化学疗法制剂、放射疗法制剂或抗体的产物,该产物可使化学疗法制剂、放射疗法制剂或抗体同时使用、分开使用、或随时间延伸。“同时使用”是指使用两种包含在一个或相同药物剂型中的本发明所述的组合物的化合物。

[0234] “分开使用”是指在同一时间使用两种包含在不同药物剂型中的本发明所述的组合物的化合物。

[0235] “随时间延伸”是指连续使用两种每种包含在不同药物剂型中的本发明所述的组合物的化合物。化学疗法制剂是指任何出现在本发明说明书的上文中的定义或列表中列出的化合物。

[0236] 尤其是在优选的具体实施方式中,所述作为本发明所述的联合产物的组合物的特征在于所述细胞毒性制剂与所述抗体形成化学偶联以用于同时给药。

[0237] 尤其是在是优选的具体实施方式中,所述根据本发明的组合物的特征在于所述细胞毒性 / 细胞生长抑制性制剂选自抑制或稳定纺锤体的制剂,优选长春瑞滨 (vinorelbine) 和 / 或长春氟宁 (vinflunine)。

[0238] 为了易化所述细胞毒性制剂与所述本发明所述抗体之间的偶联,尤其可在两个偶联的化合物之间引入间隔分子,如多烯基乙二醇如聚乙烯乙二醇或甚至是氨基酸,或者在另一具体实施方式中,可使用所述细胞毒性制剂的活性衍生物,其中可引入能够与根据本发明所述的抗体反应的功能。这些偶联技术对本领域技术人员是熟知的,而且本发明说明书并未将其发展。

[0239] 本发明的另一方面还涉及特征在于至少一种所述抗体或其一个功能片段与细胞毒性和 / 或放射性元素结合的组合物。

[0240] 优选地,所述毒性是来自肠道细菌的毒素,尤其是来自假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的外毒素 A。

[0241] 与本发明所述的至少一种抗体或其一种功能片段结合的毒素或放射性元素是指任何手段所述毒素或所述放射性元素可结合至所述至少一种抗体,尤其通过化合物与共价偶联,引入或没有引入结合分子。另一种偶联形式可以是使用离子螯合剂以产生非共价性络合作用,如例如 EDTA、DOTA 或者甚至是 ^{99m}Tc 型化合物。

[0242] 同样优选的是,所述至少一种形成根据本发明所述的结合的抗体选自其功能片段,尤其是从其元件 Fc 如 scFv 片段上分离下来的片段。

[0243] 本发明进一步包含本发明所述的组合物用于制备药物的用途。

[0244] 本发明的目标还是上述抗体或甚至是通过本发明所述的和上述方法获得的抗体在用于制备旨在预防或治疗癌症的药物中的用途。

[0245] 本发明的目标还是上述抗体或甚至是通过本发明所述的和上述方法获得的抗体在用于制备旨在抑制肿瘤对患有在本专利预防和治疗的癌症范围内的癌症的患者接受抗肿瘤治疗后产生的耐药性的药物中的用途。

[0246] 优选地,所述癌症是耐药类型的癌症,其选自结肠、前列腺、乳腺、肺、卵巢或胰腺癌。

[0247] 根据本发明的另一具体实施方式,本发明还要求保护本发明所述的抗体或其一个功能片段在制备旨在将生物学活性化合物对耐药肿瘤和 / 或晚期肿瘤进行特异性靶向治

疗的药物中的用途。例如,标定的本发明所述的抗体或其一个功能片段包括所谓的免疫交联抗体,后者可例如与如过氧化物酶、碱性磷酸酶、 α -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖淀粉酶、碳酸酐酶、乙酰胆碱酯酶、溶菌酶、苹果酸脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶交联,或与如生物素、异羟洋地黄毒苷配基(digoxigenin)或5-溴脱氧尿嘧啶核苷的分子交联。荧光标记物也可与本发明所述的抗体或其一个功能片段偶联,而且这些荧光标记物尤其包括荧光素及其衍生物、荧光铬(fluorochromium)、若丹明(rhodamine)及其衍生物、GFP(绿色荧光蛋白)、丹酰、伞形酮(umbelliferone)等。在这种结合物内,可通过本领域技术人员所知方法制备本发明所述的抗体或其一个功能片段。后者可直接或经间隔基团或结合基团如多聚醛如戊二醛、乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DPTA)或者在如高碘酸(periodate)等偶联剂存在条件下与酶或荧光标记物偶联。包括荧光素型标记物的结合分子可通过与异硫氰酸盐(isothiocyanate)反应而制备。

[0248] 其它结合分子还包括化学发光标记物,如鲁米诺(luminol)和二环氧丙烷(dioxetane),生物发光标记物,如荧光素酶、荧光素或甚至放射活性标记物。

[0249] 生物活性化合物本文是指任何能够调节,尤其是能够抑制细胞活性,特别是抑制细胞的生长、增殖、基因转录或翻译的化合物。

[0250] 在本说明书中,药学上可接受的载体是指进入组合物的化合物或化合物的组合,其不引起二级反应而且使用它可使活性化合物的给药例如更容易、在机体中的半衰期更长和/或更有效,在溶液中的溶解性增加或者甚至更易于保存。这些药学上可接受的载体是熟知的且可根据所选化合物的本性和施用方法由本领域技术人员来进行改变。

[0251] 优选地,这些化合物可系统给药,特别是经静脉途径、经肌肉、真皮、腹膜内或皮下途径、或口服系统给药。更加优选的是,包含本发明所述的抗体的组合物将重复给药,使药物长期逐步分布。

[0252] 它们的给药、剂型和优化的盖仑学派形式(galenic form)可根据制定适合患者的治疗方案时通常考虑的条件而确定,这些条件如例如适合患者年龄或体重、她/他的疾病的严重程度、对治疗的耐受性和报导的二级反应。

[0253] 本发明的其它特征和优势将出现在发明内容后的实施例和包括标题的附图和附图说明中。

[0254] 最后,根据本发明的最后一方面,本发明涉及本发明所述的方法的用于鉴定新的参与形成耐药现象的治疗性和/或诊断性的细胞内或细胞外靶点的用途。

[0255] 最后,所述鉴定新的参与形成耐药现象的治疗性和/或诊断性的细胞内或细胞外靶点的方法的特征在于其由应用根据本发明的上述方法以获得单克隆抗体,和然后鉴定化合物,尤其是所述单克隆抗体识别的蛋白质组成。

[0256] 这种化合物,尤其是鉴定蛋白质的鉴定可通过本领域技术人员所知的任何技术进行,如例如通过细胞裂解液的免疫沉淀作用和/或免疫纯化作用,和通过与标准蛋白质组技术偶联的Western-blot技术的蛋白质鉴定技术。

[0257] 附图标题和其后的实施例旨在解释本发明而绝不限制其范围。

附图说明

[0258] 图1:图1说明了了h4D5、225和7C10三联疗法之后的肿瘤体积的时程,并表明对

该治疗的耐药性的出现。

[0259] 图 2:图 2 以第一示例性形式说明了本发明的具体实施方式的解释性线图。

[0260] 1:取样对照肿瘤、分成两部分。

[0261] 2:小鼠耐受性。制备免疫接种细胞:裂解、细胞悬浮液等。通过腹腔注射(i.p.)环磷酸胺或其它至耐受剂产生免疫耐受。

[0262] 3:筛选 IHC 玻片:将肿瘤冰冻或包埋。制备标记为“阴性对照玻片”的玻片。

[0263] 4:耐药肿瘤取样并分成两部分。

[0264] 5:制备免疫接种细胞:裂解、细胞悬浮液等。

[0265] 6:将肿瘤冰冻或包埋:制备标记为“试验玻片”的玻片。

[0266] 7:对照肿瘤取样。

[0267] 8:免疫接种小鼠:细胞的制备来自对照肿瘤。

[0268] 9:对照 IHC 玻片。

[0269] 10:通过注射免疫抑制剂产生免疫耐受。

[0270] 11:血清取样以核实缺乏抗原发细胞的免疫应答。

[0271] 12:取样耐药肿瘤。

[0272] 13:免疫接种耐受小鼠:细胞的制备来自耐药肿瘤。

[0273] 14:试验 IHC 玻片。

[0274] 15:取样标记为 IHC 肿瘤对耐药肿瘤的血清。

[0275] 16:杂交瘤的分泌:在对照肿瘤的玻片上不标记、在耐药肿瘤上阳性标记(在间质细胞玻片上不标记,在肿瘤细胞上标记)。

[0276] 图 3:图 3 也说明了但以简图形式解释本发明所述方法的具体实施方式。

[0277] 图 4:图 4 说明了以用于耐受和免疫接种的肿瘤制备的“组织芯片”类型的载玻片上本发明所述抗体的表达图谱。

[0278] 图 5:图 5 说明了在结肠异种移植物模型 HT29 中抗体 1A6 和 2E11 的抗肿瘤活性的数值。

[0279] 图 6:图 6 分别表明抗体 1A6、1A9、2E11、3C11 和 3G7 的重链和轻链序列。各个 CDR 有下划线,并字体加粗。

[0280] 图 7:图 7 说明了在胰腺异种移植物模型 BxPC3 中抗体 2E11 的抗肿瘤活性的数值。

[0281] 实施例 1:证明肿瘤细胞 A549 对抗-IGF-IR、抗 EGFR 和抗 Her/2neu 三联疗法产生耐药

[0282] 将 A549 细胞移植至小鼠体内。肿瘤植入后,一周两次,以含有每种下列抗体,即 h4D5(赫塞汀(herceptin)由 ICR(Institut Claude Regaud、service pharmacie、20-24、rue du Pont Saint-Pierre、31052 Toulouse 提供)、225(ATCC No. HB-8508) 和 7C10,各 300 μ g 的混合物处理小鼠。

[0283] 处理一星期后,在某些小鼠体内可观察到肿瘤生长减慢直至肿瘤完全消失。尽管全部肿瘤或部分肿瘤生长减慢,仍持续处理。

[0284] 接着,尽管持续进行治疗,仍观察到肿瘤复发,这表明肿瘤对三联疗法已经产生耐药。

[0285] 图 1 中显示了一个例子,其表明肿瘤在第 15 天前生长减慢,但从第 15 天起肿瘤复

发,这提示了耐药性的产生。

[0286] 实施例 2:制备针对参与对抗-IGF-IR、EGFR 和 Her/2neu 联合疗法耐药的耐药性形成的抗原的活性单克隆抗体

[0287] 将 A549 细胞移植入两批 10 只小鼠体内。第一批两周一次接受 PBS 注射。第二批分别联合使用直接抗 IGF-IR、EGFR 和 Her/2neu 受体的抗体 (7C10、225 和 h4D5) 处理。这种抗体的联合使用使肿瘤退化,导致 60% 的被处理动物的肿瘤消失。尽管效果明显,但所有动物均出现肿瘤复发。

[0288] 当以 PBS 处理的动物体内的 A549 肿瘤长至 100-200mm³ 时,将其切除。

[0289] 将这些肿瘤,每个分成两部分:一部分冰冻以制备“组织芯片”类型的免疫组织化学玻片,另一部分用于使 BALB/c 小鼠产生耐受。耐受通过腹腔注射磨碎的肿瘤细胞匀浆,接着使用环磷酰胺而进行,并为了完全消除直接抗未处理的“原生”A549 肿瘤的免疫应答。在肿瘤复发过程中,也在肿瘤达到 100 至 200mm³ 的体积时取样,然后将其分成两等份。一份冰冻用于制备 PBS 对照肿瘤的上述“组织芯片”类型的免疫组织化学玻片。将第二份制成磨碎的匀浆并将用于为之前以未处理的 A549 肿瘤使其耐受的小鼠进行免疫接种。所有这些小鼠均接受 3 次腹腔注射三联疗法耐药肿瘤的磨碎的匀浆,佐剂注射首次使用以完全弗氏 (Freund's) 佐剂注射,接着用不完全弗氏佐剂注射。

[0290] 然后进行细胞融合并用免疫组织化学的方法在之前制备的“组织芯片”型玻片上筛选从此融合产生的杂交瘤。

[0291] 将分泌识别耐药组织的,既不识别来自对照批 PBS 组织中的肿瘤组织,也不识别用于体内形成肿瘤组织的原发 A549 细胞的抗体的杂交瘤克隆和冰冻。抗体于是在腹水中产生,经纯化、并在体内在表达抗体识别的表面结构或抗原的细胞(这些细胞在经 FACSCAN 进行非排除性的分泌每种抗体的肿瘤细胞系组的分析之前进行选择)上进行检测之前进行免疫组织学再检测。

[0292] 图 4 表明固定抗体的图谱。

[0293] 下表 6 将这些抗体(以 FACSCAN 仪器进行组织学选择的抗体识别不同细胞系)识别的细胞分组。

[0294] 表 6

[0295]

杂交瘤	克隆	同种型	体内模型
1A6	C7	IgM k	MCF/Colo205
	D10		LnCap/HT29
1A9	E11	IgG1 k	HepG2/H69/LnCap
	F1		
2E11	A2	IgG1 k	HT29/BxPC3/H69
	B11		
2 E11	A8	IgG1 k	HT29/BxPC3/H69
	B9		
3C11	E8	IgM k	Colo205
	E9		
3G7	A7	IgM	DU145
	B2		

[0296] 实施例 3 :以结肠异种移植物模型制备的本分泌所述抗体 (更特别是 1A6 和 2E11) 抗肿瘤活性的评价

[0297] 将 5×10^6 HT29 细胞移植入“瑞士裸鼠”体内。移植 5 天后,测定肿瘤并根据同质肿瘤大小将鼠分成 3 批,每批 6 只。以 PBS (阴性对照) 或 0.5mg1A6 或 2E11 抗体一周 3 次处理小鼠 (初次注射剂量:1mg/只)。

[0298] 两周一次跟踪肿瘤体积,已知肿瘤体积根据下列公式: $(\pi/6) \times (l) \times (L) \times (e)$ 进行常规计算,其中 l = 测定宽度, L = 测定长度, e = 测定厚度。

[0299] 结果如图 5 所示。

[0300] 可将 HT29 细胞视为易于转移的表型的细胞。获得的结果证明,可能将直接抗肿瘤细胞抗原的抗体 (该肿瘤细胞抗原来自以抗肿瘤组合物 (见实施例 2) 处理并对其产生耐药的肿瘤) 用作治疗具有易于转移表型的肿瘤的抗肿瘤化合物。

[0301] 该实验获得的结果证实制备抗体的原始方法和自耐药诱导小鼠制备治疗用途的抗体的概念。该方法可与任何其它药物联合使用,后者包括化学疗法药物,单独或联合使用或与抗体或与酪氨酸激酶抑制剂或与蛋白水解酶抑制剂,以同样的方式接续使用。

[0302] 实施例 4 :抗体 2E11 自胰腺异种移植物模型 BxPC3 制备的本发明所述的抗体 2E11 的抗治疗活性的评价。

[0303] 将 10×10^6 BxPC3 细胞移植入无胸腺“裸”鼠体内。移植 5 天后,测定肿瘤,并将小鼠根据同质肿瘤的大小分成两批,每批 6 只。分别以 PBS (阴性对照) 或抗体 2E11 (1mg/次) 一周两次处理小鼠。一周两次跟踪肿瘤体积。

[0304] 结果如图 7 所示。

[0305] 该实验获得的结果证实抗体 2E11 的功能活性,还证实了自耐药诱导小鼠制备治疗用途的抗体的概念。

序列表

<110> 皮埃尔法布雷医药公司

L • 哥彻

A • 茹阿诺

<120> 制备抗耐药性抗原的活性抗体的方法、所述方法获得的抗体及其用途

<130>D24754

<150>FR 06/08514

<151>2006-09-28

<160>80

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>11

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>1

Arg Ala Arg Gln Asp Ile Arg Asn Phe Leu Asn

1

5

10

<210>2

<211>7

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>2

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser

1

5

<210>3

<211>9

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>3

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Phe Thr

1 5

<210>4

<211>6

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>4

Thr Glu Tyr Thr Leu His

1 5

<210>5

<211>17

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>5

Gly Ile Asp Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210>6

<211>8

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>6

Ser Asn Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210>7

<211>117

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>7

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

<210>8

<211>107

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Ser Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Arg Gln Asp Ile Arg Asn Phe
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Asp Gln

65	70	75	80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Phe			
	85	90	95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	

<210>9

<211>11

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>9

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

<210>10

<211>7

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>10

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp
1 5

<210>11

<211>9

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>11

Gln His Phe Trp Thr Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210>12

<211>6

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>12

Thr Asn Tyr Gly Met Asn

1 5

<210>13

<211>16

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>13

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

<210>14

<211>9

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>14

Gly Gly Tyr Tyr Arg Tyr Ala Ala Tyr

1 5

<210>15

<211>118

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>15

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gln Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

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

<210>16

<211>107

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>16

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

<210>17

<211>17

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>17

Lys Ala Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Ala

<210>18

<211>7

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>18

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210>19

<211>8

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>19

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr
1 5

<210>20

<211>5

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>20

Asp Thr Tyr Met His
1 5

<210>21

<211>17

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>21

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Ser Asp Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly

<210>22

<211>10

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>22

Gly Tyr Thr Asn Tyr Val Trp Phe Thr Tyr
 1 5 10

<210>23

<211>119

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>23

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

<210>24

<211>112

<212>PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400>24

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

<210>25

<211>11

<212>PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400>25

```
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1           5           10
```

<210>26

<211>7

<212>PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400>26

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210>27

<211>9

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>27

Gln Gln His Tyr Ser Asn Pro Arg Thr
1 5

<210>28

<211>6

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>28

Ser Ser Tyr Gly Val His
1 5

<210>29

<211>16

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>29

Val Ile Trp Val Gly Gly Thr Thr Asn Phe Lys Ser Ala Leu Met Ser
1 5 10 15

<210>30

<211>10

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>30

Glu Arg Pro Tyr Gly Asn Pro Leu Val Asp
1 5 10

<210>31

<211>118

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>31

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

<210>32

<211>107

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>32

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

<210>33

<211>16

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>33

Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210>34

<211>7

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>34

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210>35

<211>9

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>35

Phe Gln Ser Ser Arg Val Pro Tyr Thr
1 5

<210>36

<211>6

<212>PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400>36

Thr Asn Tyr Trp Leu Gly

1 5

<210>37

<211>17

<212>PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400>37

Asp Ile Phe Pro Gly Gly Ile Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Ile Lys

1 5 10 15

Gly

<210>38

<211>10

<212>PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400>38

Phe Asp Asp Phe Asp Pro Phe Phe Ala Ser

1 5 10

<210>39

<211>119

<212>PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400>39

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

<210>40

<211>112

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>40

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

<210>41	
<211>33	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400>41	
agggcaaggc aggacattcg caatTTTTTta aac	33
<210>42	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400>42	
tacacctcaa gattacactc a	21
<210>43	
<211>27	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400>43	
caacagggta atacgcttcc attcacg	27
<210>44	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400>44	
actgaataca ccttgcac	18
<210>45	
<211>51	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400>45	
ggtattgate ctaacaatgg tggtagctagc tataaccaga agttcaaggg c	51

<210>46

<211>24

<212>DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>46

tcgaacagtt actactttga ctac

24

<210>47

<211>351

<212>DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>47

gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgcaaga cttctggata cacattcact gaatacacct tgcactgggt gaagcagagc 120
 catggaaaga gccttgagtg gattggaggt attgataccta acaatgggtg tactagctat 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240
 atggagctcc gcagcctgac atctgaggat tctgcagtct atctctgtgc aagatcgaac 300
 agttactact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc a 351

<210>48

<211>321

<212>DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>48

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagcgtcacc 60
 atcagttgca gggcaaggca ggacattcgc aatTTTTTaa actggtatca gcagagacca 120
 gatggaactg ttaaactcct gatctactac acctcaagat tacactcagg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggaccaa 240
 gaagatgttg ccacttattt ttgccaacag ggtaatacgc ttccattcac gttcggctcg 300
 gggacaaagt tggaaataaa a 321

<210>49

<211>33

<212>DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>49	
cgagcaagtg ggaatattca caattattta gca	33
<210>50	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400>50	
aatgcaaaaa ccttagcaga t	21
<210>51	
<211>27	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400>51	
caacattttt ggactactcc gtacaca	27
<210>52	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400>52	
acaaactatg gaatgaac	18
<210>53	
<211>48	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400>53	
tggataaaca cctacactgg agagccaaca tatgctgatg acttcaag	48
<210>54	
<211>27	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	

<400>54

gggggctact ataggtacgc ggcttac

27

<210>55

<211>354

<212>DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>55

cagatccagt tgggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc	60
tcctgcaagg cttctgggca gaccttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcaggct	120
ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct acactggaga gccaacatat	180
gctgatgact tcaagggacg gtttgccttc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat	240
ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtgc aagagggggc	300
tactataggt acgcggctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgca	354

<210>56

<211>321

<212>DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>56

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc	60
atcacatgtc gagcaagtgg gaatattcac aattatttag catggtatca gcagaaacag	120
ggaaaatctc ctacagctcct ggtctataat gcaaaaacct tagcagatgg tgtgccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc aggaacacaa tattctctca agatcaacag cctgcagcct	240
gaagattttg ggtgttattt ctgtcaacat ttttggacta ctccgtacac attcggaggg	300
gggaccaaac tggaactaat a	321

<210>57

<211>51

<212>DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>57

aaagccagtc agagtctgct caacagtaga acccgaaaga actacttggc t	51
--	----

<210>58

<211>21	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400>58	
tgggcatcca ctagggaatc t	21
<210>59	
<211>24	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400>59	
aagcaatctt ataatctgta cacg	24
<210>60	
<211>15	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400>60	
gacacctata tgcac	15
<210>61	
<211>51	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400>61	
aggattgatc ctgcgaatgg aaatactaaa tctgacccga agttccaggg c	51
<210>62	
<211>30	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400>62	
ggatatacta actacgtttg gtttacttac	30

<210>63

<211>357

<212>DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400>63

gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag gttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg	60
tcctgcacag cttctggctt caacattaaa gacacctata tgcactgggt gaaacagagg	120
cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg attgatcctg cgaatggaaa tactaaatct	180
gacccgaagt tccagggcaa ggccattaaa acagcagaca catcctccaa cacagcctac	240
cttcagctca gtagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtac tagcggatat	300
actaactacg ttggttttac ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca	357

<210>64

<211>336

<212>DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400>64

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgg cagcaggaga gaaggtcact	60
atgagctgca aagccagtc gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct	120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg	180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cagtctcacc	240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg	300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa	336

<210>65

<211>33

<212>DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400>65

aaggccagtc aggatgtgag tactgctgtc gcc	33
--------------------------------------	----

<210>66

<211>21

<212>DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400>66	
tcggcctcct accgttacac t	21
<210>67	
<211>30	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400>67	
cagcaacatt atagtaatcc tcggacgttc	30
<210>68	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400>68	
tccagctatg gtgtacac	18
<210>69	
<211>48	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400>69	
gtaatatggg ttggtggaac cacaatttt aaatcggtc tcattgtc	48
<210>70	
<211>30	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400>70	
gagagaccct atggtaaccc ttggttgac	30
<210>71	
<211>354	
<212>DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	

<400>71

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc 60
 acttgcactg tctctgggtt ttattatcc agctatggtg tacactgggt tcgccagcct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagta atatgggttg gtggaaccac aaattttaaa 180
 tcggctctca tgtccagact gagcatcagc aaagacaact ccaagagcca agttttctta 240
 aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgccag agagagaccc 300
 tatggtaacc ctttggttga ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgca 354

<210>72

<211>321

<212>DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>72

gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
 atcacctgca aggccagtc ggatgtgagt actgctgtcg cctggtatca acagaaacca 120
 ggacaatctc ctactact gatttactcg gcatcctacc gttacactgg agtccctgat 180
 cgcttactg gcagtggatc tgggacggat ttactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240
 gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatagta atcctcggac gttcggtgga 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210>73

<211>48

<212>DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>73

agatctagtc agaccattgt acatagtaat ggaaacacct atttagaa 48

<210>74

<211>21

<212>DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>74

aaagtttcca accgattttc t 21

<210>75

<211>27

<212>DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>75

tttcaaagtt cacgtgttcc gtacacg

27

<210>76

<211>27

<212>DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>76

tttcaaagtt cacgtgttcc gtacacg

27

<210>77

<211>51

<212>DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>77

gatattttcc ctggaggtat ttatactaac tacaatgaga agatcaaggg c

51

<210>78

<211>30

<212>DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>78

tttcatgatt tcgacccctt ttttgccttc

30

<210>79

<211>357

<212>DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>79

caggtccagt tgcagcagtc tggacccgag ctggtaaggc ctgggacttc agtgaagata

60

tcctgcaagg cctctggcta caccttact aactactggc taggttgggt aaagcagagg

120

cctggacatg gacttgagtg gattggagat atttccctg gaggtattta tactaactac

180

aatgagaaga tcaagggcga ggccacactg actgccgaca catcctccag cactgcctac	240
ttgcagctca gtagcctgac atctgaggac tcttttgtct atttctgtgc aaggtttgat	300
gatttcgacc ccttttttgc ttcttggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca	357

<210>80

<211>336

<212>DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>80

gatgttttga tgacceaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc	60
atctcttgca gatctagtca gaccattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg	120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt	180
tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaatatc	240
agcagagtgg aggctgagga tctgggaatt tattactgct ttcaaagttc acgtgttccg	300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa	336

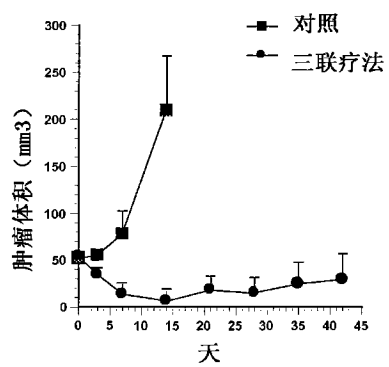


图 1

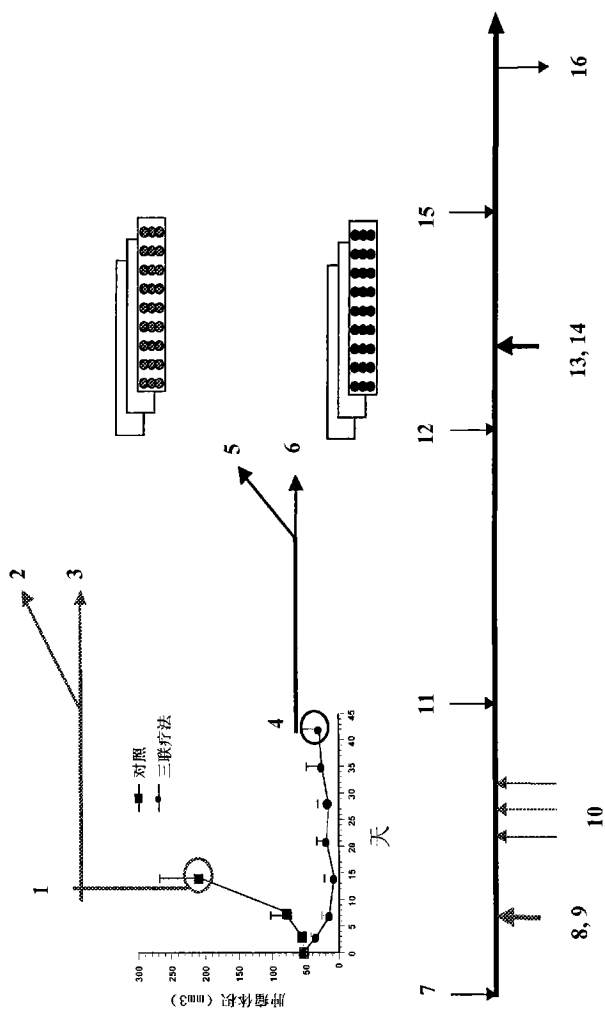


图 2

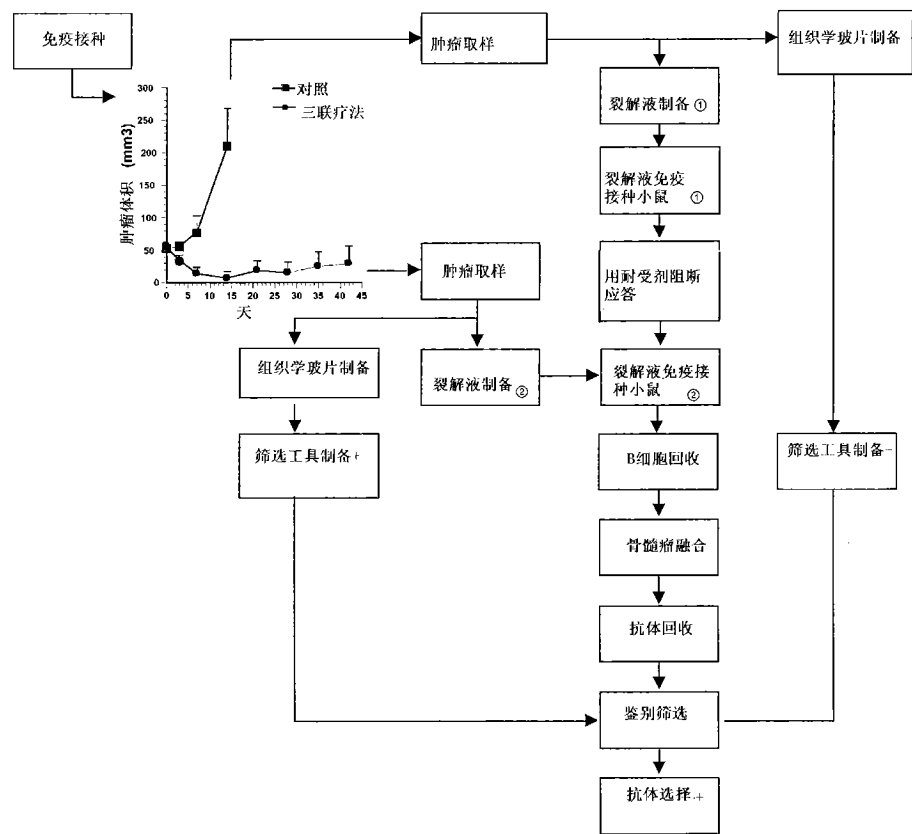


图 3

杂交瘤	克隆	# NH	同种型	活体模型		
1A6 D1	C7	1	IgM k	MCF7/Colo205		
	D10			LnCap/H129		
1A9C12	E11	2	IgG1 k	HepG2/H69/LnCap		
	F1					
2E11B4	A2	3	IgG1 k	HT29/BxPC3/H69		
	B11					
2E11E1	A8	4	IgG1 k	HT29/BxPC3/H69		
	B9					
3C11E9	E8	5	IgM k	Colo205		
	E9					
3G7E11	A7	6	IgM	DU145		
	B2					

图 4

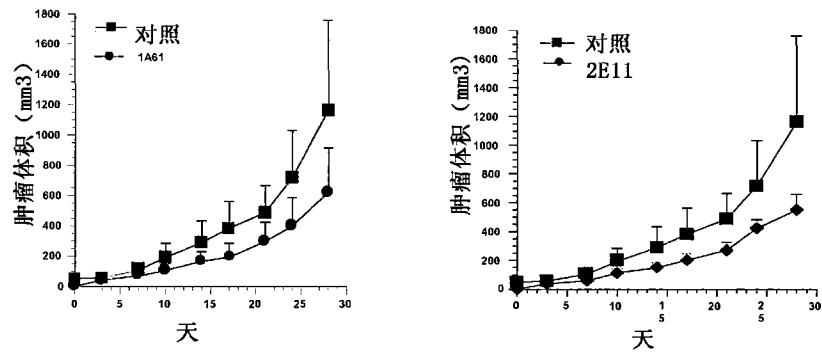


图 5

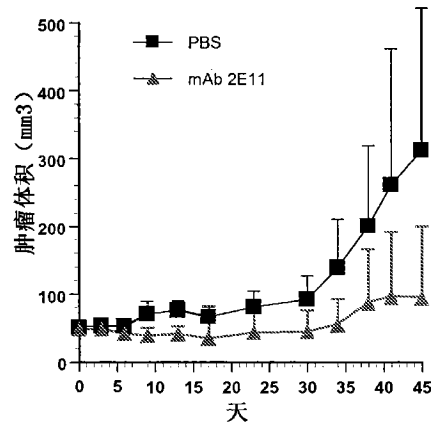


图 7

抗体 1A6

重链:

核苷酸序列

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATC
 CTGCAAGACTTCTGGATACACATTCTACTGAATACACCTTGCACTGGGTGAAGCAGAGCCATG
 CDR-1
 GAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGGTATTGATCCTAACAATGGTGGTACTAGCTATAACCAG
 CDR-2
AAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCT
 CCGCAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTCTATCTCTGTGCAAGATTCGAACAGTTACTACT
 CDR-3
TTGACTACTTGGGGCCAAGGCACCACCTCTCACAGTCTCCTCA

蛋白质序列 (单字母密码子)

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTLHWVKQSHGKSLEWIGGIDPNNGGTSYNQ
 CDR-1 CDR-2
KFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYLCARSNSYYFDYWGQGTTLTVSS
 CDR-3

轻链:

核苷酸序列

GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGCGTCACCAT
 CAGTTGCAGGGCAAGGCAGGACATTGCAATTTTTTAAACTGGTATCAGCAGAGACCAGATG
 CDR-1
 GAACTGTTAAACTCCTGATCTACTTACACCTCAAGATTACACTCAAGGAGTCCCATCAAGGTTT
 CDR-2
 AGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGACCAAGAAGATGT
 TGCCACTTATTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCATTACGTTCGGCTCGGGGACAAAGT
 CDR-3
 TGGAAATAAAA

蛋白质序列 (单字母密码子)

DIQMTQTSSLSASLGDSVTISCRARQDIRNFLNWWYQRPDGTVKLLIYYYTSRLHSGVPSRF
 CDR-1 CDR-2
 SGSGSGTDYSLTISNLDQEDVATYFCQOGNTLPFTFGSGTKLEIK
 CDR-3

图 6

抗体 1A9重链:

核苷酸序列:

CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTC
 CTGCAAGGCTTCTGGGCAGACCTTC**ACAAACTATGGAATGAAC**TGGGTGAAGCAGGCTCCAG
 CDR-1
 GAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGC**TGGATAAACACCTACACTGGAGAGCCAACATATGCTGAT**
 CDR-2
GACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGAT
 CAACAACCTCAAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAGAG**GGGGGCTACTATAGGT**
 CDR-3
ACGCGGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

蛋白质序列 (单字母密码子)

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGQTF**TNYGMN**WVKQAPGKGLKWMG**WINTYTG**EPYAD
 CDR-1 CDR-2
DFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLIKNEATATYFCAR**GGYRYAAY**WGQGLVTVSA
 CDR-3

轻链:

核苷酸序列:

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACCAT
 CACATGT**CGAGCAAGTGGGAATATTCA**CAATTATTTAGCA**TGGTATCAGCAGAAACAGGGAA**
 CDR-1
 AATCTCCTCAGCTCCTGGTCTAT**AATGCAAAAACCTTAGCAGAT**GGTGTGCCATCAAGGTTT
 CDR-2
 AGTGGCAGTGGATCAGGAACACAATATTTCTCTCAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTT
 TGGGTGTTATTTCTGT**CAACATTTTGGACTACTCCGTACACA**TTCCGAGGGGGGACCAAAC
 CDR-3
 TGGAACTAATA

蛋白质序列 (单字母密码子)

DIQMTQSFASLSASVGETVTITC**RASGNIHNYLA**WYQQKQKSPQLLVY**NAKTLAD**GVPSRF
 CDR-1 CDR-2
 SGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGCYFC**QHFWTTPYT**FGGGTKLELI
 CDR-3

图 6(续)

抗体 2E11

重链:

核苷酸序列:

GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGGTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTC
 CTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACCTGGGTGAAACAGAGGCCTG
 AACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAAGGATTGATCCTGCGAATGGAAATACTAAATCTGACCCG
 AAGTTCCAGGGCAAGGCCATTAAACAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTTCAGCT
 CAGTAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTACTAGCGGATATACTAACTACG
 TTTGGTTTACTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

蛋白质序列 (单字母密码子)

EVQLQQSGAEVVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKSDP
 KFGQKAIKTADTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCTSGYTNVWFETYWGQGLVTVSA

轻链:

核苷酸序列:

GACATTGTGATGTACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGGCAGCAGGAGAGAAGGTCATAT
 GAGCTGCAAGCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAACTACTTGGCTTGGT
 ACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAACTGCTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCT
 GGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTAGTCTCACCATCAGCAG
 TGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAGCAATCTTATAATCTGTACACGTTCTG
 GAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

蛋白质序列: (单字母密码子)

DIVMSQSPSSLAVAAGEKVTMSCKASQSLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES
 GVPDRFTGSGSGTDFSLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLYTFGGGTKLEIK

图 6(续)

抗体 3C11

重链:

核苷酸序列:

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCAC
 TTGCACTGTCTCTGGGTTTTTCATTATTCCAGCTATGGTGTACACTGGGTTCCGCAGCCTCCAG
 GAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGTGGTGAACCACAAATTTTAAATCGGCT
 CTCATGTCCAGACTGAGCATCAGCAAAGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAAATGAA
 CAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATGTACTACTGTGCCAGAGAGAGACCCCTATGGTAACC
 CTTTGGTTGACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

蛋白质序列 (单字母密码子)

QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLSSYGVHWRQPPGKLEWLGVIVVGGTTNFKSA
 LMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAMYYCARERPYNPLVDWGQGLVTVSA

轻链:

核苷酸序列:

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAGAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCAT
 CACCTGCAGGCCAGTCAGGATGTGAGTACTGCTGTGCGCTGGTATCAACAGAAACCAGGAC
 AATCTCCTAACTACTGATTTACTCGGCATCCTACCGTTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTC
 ACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACCTTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCT
 GGCAGTTTATTACTGTAGCAACATTATAGTAATCCTCGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGC
 TGGAAATCAAA

蛋白质序列 (单字母密码子)

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASRYRTGVPDRF
 TSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQOHYSNPRTFGGGTKLEIK

图 6(续)

抗体 3G7

重链:

核苷酸序列:

CAGGTCCAGTTGCAGCAGTCTGGACCCGAGCTGGTAAGGCCTGGGACTTCAGTGAAGATA
 TCCTGCAAGGCCTCTGGCTACACCTTCACTAACTACTGGCTAGGTTGGGTAAAGCAGAGGCC
 TGGACATGGACTTGAGTGGATTGGAGATATTTTCCCTGGAGGTATTTATACTAACTACAATG
 AGAAGATCAAGGGCGAGGCCACACTGACTGCCGACACATCCTCCAGCACTGCCTACTTGCAG
 CTCAGTAGCCTGACATCTGAGGACTCTTTTGTCTATTTCTGTGCAAGGTTTTGATGATTTTCTGA
 CCCCTTTTTCCTTCCGGGGCCAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

蛋白质序列: (单字母密码子)

QVQLQQSGPELVRPGTSVKISKASGYTFTNYWLGWVKQRPQHGLEWIGDIFPGGIYTNYNE
 KIKGEATLTADTSSSTAYLQLSSLTSEDSFVYFCARFDDFDPPFASWGQGLVTVSA

轻链:

核苷酸序列:

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCTGGAGATCAAGCCTCCAT
 CTCTTGCAGATCTAGTCAGACCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAAATGGTACC
 TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGG
 GTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAATATCAGCAGAGT
 GGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAAGTTTACGTTTCCGTACACGTTTCG
 GAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

蛋白质序列: (单字母密码子)

DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQTIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSG
 VPDRFSGSGSGTDFTLNISRVEAEDLGIYYCFQSSRPVPTFGGGTKLEIK

图 6(续)