



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101977937 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 16

(21) 申请号 200980110217. 5

(22) 申请日 2009. 01. 22

(30) 优先权数据

61/022, 779 2008. 01. 22 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 09. 21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/000376 2009. 01. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02009/094148 EN 2009. 07. 30

(83) 生物保藏信息

PTA-8815 2007. 12. 04

PTA-8816 2007. 12. 04

PTA-8817 2007. 12. 04

PTA-8813 2007. 12. 04

PTA-8814 2007. 12. 04

(71) 申请人 拜奥根 IDEC 马萨诸塞公司

地址 美国马萨诸塞

(72) 发明人 H·休特 V·贝利 E·加伯

C·加弗 S·米克拉斯

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

权利要求书 18 页 说明书 100 页 序列表 74 页
附图 24 页

(54) 发明名称

RON 抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及结合 RON(receptor d' origine nantais, MST1R) 的抗体及其用途,特别是在癌症的诊断和治疗中的用途。提供了抑制 RON 介导的促存活和肿瘤增殖途径的特异性抗体、及其变体、片段和衍生物。还提供了阻断配体 MSP 与 RON 结合能力的特异性抗体、以及这些抗体的片段、变体和衍生物。本发明还包括编码上述抗体或其片段、变体或衍生物的多核苷酸、以及含有这些多核苷酸的载体和宿主细胞。本发明还包括使用本发明的抗体来诊断和治疗癌症的方法。

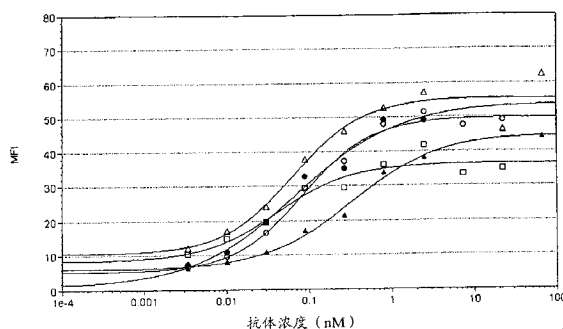


图1 抗体结合SW480细胞的代表性FACS结合曲线

1. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段特异性地结合至与选自由 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的参考单克隆 Fab 抗体片段或选自由 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的参考单克隆抗体相同的 RON 表位。

2. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段竞争性地抑制选自由 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的参考单克隆 Fab 抗体片段或选自由 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的参考单克隆抗体与 RON 结合。

3. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段包含与选自由 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的单克隆 Fab 抗体片段或选自由 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的参考单克隆抗体的抗原结合结构域相同的抗原结合结构域。

4. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的重链可变区 (VH) 包含与选自由以下组成的组的参考氨基酸序列至少 90% 相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:145。

5. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的轻链可变区 (VL) 包含与选自由以下组成的组的参考氨基酸序列至少 90% 相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:140 和 SEQ ID NO:150。

6. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VH 包含除了 20 个或更少的保守性氨基酸取代以外与选自由以下组成的组的参考氨基酸序列相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:145。

7. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VL 包含除了 20 个或更少的保守性氨基酸取代以外与选自由以下组成的组的参考氨基酸序列相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:140 和 SEQ ID NO:150。

8. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VH 包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:145。

9. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VL 包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:89、SEQ ID

NO:99、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:140 和 SEQ ID NO:150。

10. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VH 和 VL 分别包含与选自由以下组成的组的参考氨基酸序列至少 90% 相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:19;SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:29;SEQ ID NO:34 和 SEQ ID NO:39;SEQ ID NO:44 和 SEQ ID NO:49;SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:59;SEQ ID NO:64 和 SEQ ID NO:69;SEQ ID NO:74 和 SEQ ID NO:79;SEQ ID NO:84 和 SEQ ID NO:89;SEQ ID NO:94 和 SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:115 和 SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:125 和 SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:140、以及 SEQ ID NO:145 和 SEQ ID NO:150。

11. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VH 和 VL 各自除了 20 个或更少的保守性氨基酸取代以外,分别包含与选自由以下组成的组的参考氨基酸序列相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:19;SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:29;SEQ ID NO:34 和 SEQ ID NO:39;SEQ ID NO:44 和 SEQ ID NO:49;SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:59;SEQ ID NO:64 和 SEQ ID NO:69;SEQ ID NO:74 和 SEQ ID NO:79;SEQ ID NO:84 和 SEQ ID NO:89;SEQ ID NO:94 和 SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:115 和 SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:125 和 SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:140、以及 SEQ ID NO:145 和 SEQ ID NO:150。

12. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VH 和 VL 分别包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:19;SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:29;SEQ ID NO:34 和 SEQ ID NO:39;SEQ ID NO:44 和 SEQ ID NO:49;SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:59;SEQ ID NO:64 和 SEQ ID NO:69;SEQ ID NO:74 和 SEQ ID NO:79;SEQ ID NO:84 和 SEQ ID NO:89;SEQ ID NO:94 和 SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:115 和 SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:125 和 SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:140、以及 SEQ ID NO:145 和 SEQ ID NO:150。

13. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VH 包含除了两个或更少的氨基酸取代以外与选自由以下组成的组的参考重链互补决定区 -1 (VH-CDR1) 氨基酸序列相同的 Kabat VH-CDR1 氨基酸序列:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:136 和 SEQ ID NO:146。

14. 根据权利要求 13 所述的抗体或其片段,其中所述 VH-CDR1 氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:136 和 SEQ ID NO:146。

15. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VH 包含除了四个或更少的氨基酸取代以外与选自由以下组成的组的参考重链互补决定区 -2 (VH-CDR2) 氨基酸序列相同的 Kabat VH-CDR2 氨基酸序列:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:137 和 SEQ

ID NO:147。

16. 根据权利要求 15 所述的抗体或其片段,其中所述 VH-CDR2 氨基酸序列选自自由以下组成的组:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:137 和 SEQ ID NO:147。

17. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VH 包含除了四个或更少的氨基酸取代以外与选自自由以下组成的组的参考重链互补决定区-3(VH-CDR3) 氨基酸序列相同的 KabatVH-CDR3 氨基酸序列:SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:138 和 SEQ ID NO:148。

18. 根据权利要求 17 所述的抗体或其片段,其中所述 VH-CDR3 氨基酸序列选自自由以下组成的组:SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:138 和 SEQ ID NO:148。

19. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VL 包含除了四个或更少的氨基酸取代以外与选自自由以下组成的组的参考轻链互补决定区-1(VL-CDR1) 氨基酸序列相同的 KabatVL-CDR1 氨基酸序列:SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:141 和 SEQ ID NO:151。

20. 根据权利要求 19 所述的抗体或其片段,其中所述 VL-CDR1 氨基酸序列选自自由以下组成的组:SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:141 和 SEQ ID NO:151。

21. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VL 包含除了两个或更少的氨基酸取代以外与选自自由以下组成的组的参考轻链互补决定区-2(VL-CDR2) 氨基酸序列相同的 KabatVL-CDR2 氨基酸序列:SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:142 和 SEQ ID NO:152。

22. 根据权利要求 21 所述的抗体或其片段,其中所述 VL-CDR2 氨基酸序列选自自由以下组成的组:SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:142 和 SEQ ID NO:152。

23. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VL 包含除了四个或更少的氨基酸取代以外与选自自由以下组成的组的参考轻链互补决定区-3(VL-CDR3) 氨基酸序列相同的 KabatVL-CDR3 氨基酸序列:SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:

82、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:143 和 SEQ ID NO:153。

24. 根据权利要求 23 所述的抗体或其片段,其中所述 VL-CDR3 氨基酸序列选自自由以下组成的组:SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:143 和 SEQ ID NO:153。

25. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中除了在所述 VH-CDR 中的至少一个上的一个、二个、三个或四个氨基酸取代以外,所述抗体或其片段的 VH 包含选自自由以下组成的组的 VH-CDR1、VH-CDR2 和 VH-CDR3 氨基酸序列:SEQ ID NO:5、6 和 7;SEQ ID NO:15、16 和 17;SEQ ID NO:25、26 和 27;SEQ ID NO:35、36 和 37;SEQ ID NO:45、46 和 47;SEQ ID NO:55、56 和 57;SEQ ID NO:65、66 和 67;SEQ ID NO:75、76 和 77;SEQ ID NO:85、86 和 87;SEQ ID NO:95、96 和 97;SEQ ID NO:116、117 和 118;SEQ ID NO:126、127 和 128;SEQ ID NO:136、137 和 138;以及 SEQ ID NO:146、147 和 148。

26. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VH 包含选自自由以下组成的组的 VH-CDR1、VH-CDR2 和 VH-CDR3 氨基酸序列:SEQ ID NO:5、6 和 7;SEQ ID NO:15、16 和 17;SEQ ID NO:25、26 和 27;SEQ ID NO:35、36 和 37;SEQ ID NO:45、46 和 47;SEQ ID NO:55、56 和 57;SEQ ID NO:65、66 和 67;SEQ ID NO:75、76 和 77;SEQ ID NO:85、86 和 87;SEQ ID NO:95、96 和 97;SEQ ID NO:116、117 和 118;SEQ ID NO:126、127 和 128;SEQ ID NO:136、137 和 138;以及 SEQ ID NO:146、147 和 148。

27. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中除了在所述 VL-CDR 中的至少一个上的一个、二个、三个或四个氨基酸取代以外,所述抗体或其片段的 VL 包含选自自由以下组成的组的 VL-CDR1、VL-CDR2 和 VL-CDR3 氨基酸序列:SEQ ID NO:10、11 和 12;SEQ ID NO:20、21 和 22;SEQ ID NO:30、31 和 32;SEQ ID NO:40、41 和 42;SEQ ID NO:50、51 和 52;SEQ ID NO:60、61 和 62;SEQ ID NO:70、71 和 72;SEQ ID NO:80、81 和 82;SEQ ID NO:90、91 和 92;SEQ ID NO:100、101 和 102;SEQ ID NO:121、122 和 123;SEQ ID NO:131、132 和 133;SEQ ID NO:141、142 和 143;以及 SEQ ID NO:151、152 和 153。

28. 一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VL 包含选自自由以下组成的组的 VL-CDR1、VL-CDR2 和 VL-CDR3 氨基酸序列:SEQ ID NO:10、11 和 12;SEQ ID NO:20、21 和 22;SEQ ID NO:30、31 和 32;SEQ ID NO:40、41 和 42;SEQ ID NO:50、51 和 52;SEQ ID NO:60、61 和 62;SEQ ID NO:70、71 和 72;SEQ ID NO:80、81 和 82;SEQ ID NO:90、91 和 92;SEQ ID NO:100、101 和 102;SEQ ID NO:121、122 和 123;SEQ ID NO:131、132 和 133;SEQ ID NO:141、142 和 143;以及 SEQ ID NO:151、152 和 153。

29. 根据权利要求 1 至 28 中任一项所述的抗体或其片段,其中除了五个或更少的氨基酸取代以外,所述 VH 构架区是人类的。

30. 根据权利要求 1 至 29 中任一项所述的抗体或其片段,其中除了五个或更少的氨基酸取代以外,所述 VL 构架区是人类的。

31. 根据权利要求 1 至 30 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段结合至线性表位。

32. 根据权利要求 1 至 30 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段结合至非

线性构象表位。

33. 根据权利要求 1 至 32 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段是多价的,并包含至少两条重链和至少两条轻链。

34. 根据权利要求 1 至 33 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段是多特异性的。

35. 根据权利要求 34 所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段是双特异性的。

36. 根据权利要求 1 至 35 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段是双特异性的。

37. 根据权利要求 1 至 36 中任一项所述的抗体或其片段,其中所述重链和轻链可变结构域是鼠的。

38. 根据权利要求 37 所述的抗体或其片段,其中所述重链和轻链可变结构域来自选自由 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的单克隆抗体。

39. 根据权利要求 1 至 36 中任一项所述的抗体或其片段,其中所述重链和轻链可变结构域是完全人类的。

40. 根据权利要求 39 所述的抗体或其片段,其中所述重链和轻链可变结构域来自选自由 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的单克隆 Fab 抗体片段。

41. 根据权利要求 1 至 36 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段是人源化的。

42. 根据权利要求 1 至 36 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段是嵌合的。

43. 根据权利要求 1 至 36 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段是灵长源化的。

44. 根据权利要求 1 至 36 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段是完全人类的。

45. 根据权利要求 1 至 44 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段是 Fab 片段。

46. 根据权利要求 1 至 44 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段是 Fab' 片段。

47. 根据权利要求 1 至 44 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段是 F(ab)2 片段。

48. 根据权利要求 1 至 44 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段是 Fv 片段。

49. 根据权利要求 1 至 44 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段是单链抗体。

50. 根据权利要求 1 至 46 和 49 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段包含选自人类 κ 恒定区和人类 λ 恒定区组成的组的轻链恒定区。

51. 根据权利要求 1 至 46 和 49 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段包含重链恒定区或其片段。

52. 根据权利要求 51 所述的抗体或其片段,其中所述重链恒定区或其片段选自人类

IgG4、IgG4agly、IgG1 和 IgG1agly 组成的组。

53. 根据权利要求 1 至 52 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段以小于所述参考单克隆抗体的解离常数(KD)的KD所表征的亲合力特异性地结合至 RON 多肽或其片段、或 RON 变体多肽。

54. 根据权利要求 1 至 53 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段以解离常数(KD)所表征的亲合力特异性地结合至 RON 多肽或其片段、或 RON 变体多肽,其中所述解离常数(KD)不大于 $5 \times 10^{-2}M$ 、 $10^{-2}M$ 、 $5 \times 10^{-3}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $5 \times 10^{-4}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $5 \times 10^{-5}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $5 \times 10^{-6}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-7}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $5 \times 10^{-9}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $5 \times 10^{-10}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $5 \times 10^{-11}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $5 \times 10^{-13}M$ 、 $10^{-13}M$ 、 $5 \times 10^{-14}M$ 、 $10^{-14}M$ 、 $5 \times 10^{-15}M$ 或 $10^{-15}M$ 。

55. 根据权利要求 1 至 54 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段相对于鼠 RON 多肽或其片段优先地结合至人类 RON 多肽或其片段。

56. 根据权利要求 1 至 55 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段结合至细胞表面上表达的 RON。

57. 根据权利要求 56 所述的抗体或其片段,其中所述细胞是恶性细胞、赘生性细胞、肿瘤细胞、转移性细胞或肿瘤相关巨噬细胞。

58. 根据权利要求 1 至 57 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段阻断 MSP 与 RON 结合。

59. 根据权利要求 1 至 58 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段抑制 MSP 依赖性 RON 活化。

60. 根据权利要求 1 至 59 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段抑制非 MSP 依赖性 RON 活化。

61. 根据权利要求 1 至 60 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段抑制 RON 介导的 RAS/MAPK 信号传导途径的活化。

62. 根据权利要求 1 至 61 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段抑制 RON 介导的 ERK 或 AKT 的磷酸化。

63. 根据权利要求 1 至 62 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段抑制 RON 介导的细胞增殖。

64. 根据权利要求 1 至 63 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段抑制肿瘤细胞生长、肿瘤细胞侵入或肿瘤细胞转移。

65. 根据权利要求 1 至 64 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段诱导凋亡。

66. 根据权利要求 1 至 65 中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段还包含与其融合的异源性多肽。

67. 根据权利要求 1 至 66 中任一项所述的抗体或其片段,其中所述抗体契合于选自由以下组成的组的剂:细胞毒性剂、治疗剂、细胞抑制剂、生物毒素、前体药物、肽、蛋白、酶、病毒、脂质、生物反应调节剂、药物剂、淋巴因子、异源性抗体或其片段、可检测标记、聚乙二醇(PEG)、和两种或两种以上任何所述剂的组合。

68. 根据权利要求 67 所述的抗体或其片段,其中所述细胞毒性剂选自由以下组成的组:放射性核素、生物毒素、酶促活性的毒素、细胞抑制性或细胞毒性治疗剂、前体药物、免

疫活性的配体、生物反应调节剂、或者两种或两种以上任何所述细胞毒性剂的组合。

69. 根据权利要求 68 所述的抗体或其片段,其中所述可检测标记选自以下组成的组:酶、荧光标记、化学发光标记、生物发光标记、放射性标记、或者两种或两种以上任何所述可检测标记的组合。

70. 一种组合物,所述组合物包含权利要求 1 至 69 中任一项所述抗体或其片段和载体。

71. 一种分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸包含编码抗体 VH 多肽的核酸,其中所述 VH 多肽的氨基酸序列与选自以下组成的组的参考氨基酸序列至少 90% 相同:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:145;并且其中包含所述 VH 多肽的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。

72. 根据权利要求 71 所述的多核苷酸,其中所述 VH 多肽的氨基酸序列选自以下组成的组:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:145。

73. 根据权利要求 71 或 72 所述的多核苷酸,其中编码所述 VH 多肽的核苷酸序列被优化以增加所述 VH 多肽的表达而不改变其氨基酸序列。

74. 根据权利要求 73 所述的多核苷酸,其中所述优化包括识别和移除剪接供体位点和剪接受体位点。

75. 根据权利要求 73 或 74 所述的多核苷酸,其中所述优化包括表达所述多核苷酸细胞的密码子使用的优化。

76. 根据权利要求 71 至 75 中任一项所述的多核苷酸,其中所述核酸包含选自以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:134 和 SEQ ID NO:144。

77. 一种分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸包含编码抗体 VL 多肽的核酸,其中所述 VL 多肽的氨基酸序列与选自以下组成的组的参考氨基酸序列至少 90% 相同:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:140 和 SEQ ID NO:150;并且其中包含所述 VL 多肽的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。

78. 根据权利要求 77 所述的多核苷酸,其中所述 VL 多肽的氨基酸序列选自以下组成的组:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:140 和 SEQ ID NO:150。

79. 根据权利要求 77 或 78 所述的多核苷酸,其中编码所述 VL 多肽的核苷酸序列被优化以增加所述 VL 多肽的表达而不改变其氨基酸序列。

80. 根据权利要求 79 所述的多核苷酸,其中所述优化包括识别和移除剪接供体位点和剪接受体位点。

81. 根据权利要求 79 或 80 所述的多核苷酸, 其中所述优化包括表达所述多核苷酸细胞的密码子使用的优化。

82. 根据权利要求 77 至 81 中任一项所述的多核苷酸, 其中所述核酸包含选自以下组成的组的核苷酸序列: SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 78、SEQ ID NO: 88、SEQ ID NO: 98、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 129、SEQ ID NO: 139 和 SEQ ID NO: 149。

83. 一种分离的多核苷酸, 所述分离的多核苷酸包含编码抗体 VH 多肽的核酸, 其中所述 VH 多肽的氨基酸序列除了 20 个或更少的保守性氨基酸取代以外与选自以下组成的组的参考氨基酸序列相同: SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 125、SEQ ID NO: 135 和 SEQ ID NO: 145; 并且其中包含所述 VH 多肽的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。

84. 一种分离的多核苷酸, 所述分离的多核苷酸包含编码抗体 VL 多肽的核酸, 其中所述 VL 多肽的氨基酸序列除了 20 个或更少的保守性氨基酸取代以外与选自以下组成的组的参考氨基酸序列相同: SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 89、SEQ ID NO: 99、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 130、SEQ ID NO: 140 和 SEQ ID NO: 150; 并且其中包含所述 VL 多肽的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。

85. 一种分离的多核苷酸, 所述分离的多核苷酸包含编码 VH-CDR1 氨基酸序列的核酸, 其中所述 VH-CDR1 氨基酸序列除了两个或更少的氨基酸取代以外与选自以下组成的组的参考 VH-CDR1 氨基酸序列相同: SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 85、SEQ ID NO: 95、SEQ ID NO: 116、SEQ ID NO: 126、SEQ ID NO: 136 和 SEQ ID NO: 146; 并且其中包含所述 VH-CDR1 的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。

86. 根据权利要求 85 所述的多核苷酸或其片段, 其中所述 VH-CDR1 氨基酸序列选自以下组成的组: SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 85、SEQ ID NO: 95、SEQ ID NO: 116、SEQ ID NO: 126、SEQ ID NO: 136 和 SEQ ID NO: 146。

87. 一种分离的多核苷酸, 所述分离的多核苷酸包含编码 VH-CDR2 氨基酸序列的核酸, 其中除了四个或更少的氨基酸取代以外, 所述 VH-CDR2 氨基酸序列与选自以下组成的组的参考 VH-CDR2 氨基酸序列相同: SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 86、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 127、SEQ ID NO: 137 和 SEQ ID NO: 147; 并且其中包含所述 VH-CDR2 的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。

88. 根据权利要求 87 所述的多核苷酸或其片段, 其中所述 VH-CDR2 氨基酸序列选自以下组成的组: SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 86、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 127、SEQ ID NO: 137 和 SEQ ID NO: 147。

89. 一种分离的多核苷酸, 所述分离的多核苷酸包含编码 VH-CDR3 氨基酸序列的核酸,

其中所述 VH-CDR3 氨基酸序列除了四个或更少的氨基酸取代以外与选自以下组成的组的参考 VH-CDR3 氨基酸序列相同:SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:128;SEQ ID NO:138 和 SEQ ID NO:148;并且其中包含所述 VH-CDR3 的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。

90. 根据权利要求 89 所述的多核苷酸或其片段,其中所述 VH-CDR3 氨基酸序列选自以下组成的组:SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:128;SEQ ID NO:138 和 SEQ ID NO:148。

91. 一种分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸包含编码 VL-CDR1 氨基酸序列的核酸,其中所述 VL-CDR1 氨基酸序列除了四个或更少的氨基酸取代以外与选自以下组成的组的参考 VL-CDR1 氨基酸序列相同:SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:141 和 SEQ ID NO:151;并且其中包含所述 VL-CDR1 的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。

92. 根据权利要求 91 所述的多核苷酸或其片段,其中所述 VL-CDR1 氨基酸序列选自以下组成的组:SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:141 和 SEQ ID NO:151。

93. 一种分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸包含编码 VL-CDR2 氨基酸序列的核酸,其中所述 VL-CDR2 氨基酸序列除了两个或更少的氨基酸取代以外与选自以下组成的组的参考 VL-CDR2 氨基酸序列相同:SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:101;SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:142 和 SEQ ID NO:152;并且其中包含所述 VL-CDR2 的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。

94. 根据权利要求 93 所述的多核苷酸或其片段,其中所述 VL-CDR2 氨基酸序列选自以下组成的组:SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:101;SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:142 和 SEQ ID NO:152。

95. 一种分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸包含编码 VL-CDR3 氨基酸序列的核酸,其中所述 VL-CDR3 氨基酸序列除了四个或更少的氨基酸取代以外与选自以下组成的组的参考 VL-CDR3 氨基酸序列相同:SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:143 和 SEQ ID NO:153;并且其中包含所述 VL-CDR3 的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。

96. 根据权利要求 95 所述的多核苷酸或其片段,其中所述 VL-CDR3 氨基酸序列选自以下组成的组:SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:143 和 SEQ ID NO:153。

97. 一种分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸包含编码抗体 VH 多肽的核酸,其中所述 VH 多肽包含选自以下组成的组的 VH-CDR1、VH-CDR2 和 VH-CDR3 氨基酸序列:SEQ ID NO:5、6 和 7;SEQ ID NO:15、16 和 17;SEQ ID NO:25、26 和 27;SEQ ID NO:35、36 和 37;SEQ ID NO:45、46 和 47;SEQ ID NO:55、56 和 57;SEQ ID NO:65、66 和 67;SEQ ID NO:75、76 和 77;SEQ ID NO:85、86 和 87;SEQ ID NO:95、96 和 97;SEQ ID NO:116、117 和 118;SEQ ID NO:126、127 和 128;SEQ ID NO:136、137 和 138;以及 SEQ ID NO:146、147 和 148;并且其中包含所述 VH-CDR3 的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。

98. 一种分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸包含编码抗体 VL 多肽的核酸,其中所述 VL 多肽包含选自以下组成的组的 VL-CDR1、VL-CDR2 和 VL-CDR3 氨基酸序列:SEQ ID NO:10、11 和 12;SEQ ID NO:20、21 和 22;SEQ ID NO:30、31 和 32;SEQ ID NO:40、41 和 42;SEQ ID NO:50、51 和 52;SEQ ID NO:60、61 和 62;SEQ ID NO:70、71 和 72;SEQ ID NO:80、81 和 82;SEQ ID NO:90、91 和 92;SEQ ID NO:100、101 和 102;SEQ ID NO:121、122 和 123;SEQ ID NO:131、132 和 133;SEQ ID NO:141、142 和 143;以及 SEQ ID NO:151、152 和 153;并且其中包含所述 VL-CDR3 的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。

99. 根据权利要求 71 至 98 中任一项所述的多核苷酸,还包含编码融合于所述抗体 VH 多肽的信号肽的核酸。

100. 根据权利要求 71 至 98 中任一项所述的多核苷酸,还包含编码融合于所述抗体 VL 多肽的信号肽的核酸。

101. 根据权利要求 71 至 100 中任一项所述的多核苷酸,还包含编码融合于所述 VH 多肽的重链恒定区 CH1 结构域的核酸。

102. 根据权利要求 71 至 101 中任一项所述的多核苷酸,还包含编码融合于所述 VH 多肽的重链恒定区 CH2 结构域的核酸。

103. 根据权利要求 71 至 102 中任一项所述的多核苷酸,还包含编码融合于所述 VH 多肽的重链恒定区 CH3 结构域的核酸。

104. 根据权利要求 71 至 103 中任一项所述的多核苷酸,还包含编码融合于所述 VH 多肽的重链铰链区的核酸。

105. 根据权利要求 101 至 104 中任一项所述的多核苷酸,其中所述重链恒定区选自以下组成的组:人类 IgG4、IgG4agly、IgG1 和 IgG1agly。

106. 根据权利要求 71 至 105 中任一项所述的多核苷酸,还包含编码融合于所述 VL 多肽的轻链恒定区结构域的核酸。

107. 根据权利要求 106 所述的多核苷酸,其中所述轻链恒定区是人类 κ 。

108. 根据权利要求 71 至 107 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段特异性地结合与选自 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的参考单克隆 Fab 抗体片段或选自 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的参考单克隆抗体相同的 RON 表位。

109. 根据权利要求 71 至 108 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段竞争性地抑制选自 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的参考单克隆 Fab 抗体片段或选自 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的参考单克隆抗体。

110. 根据权利要求 71 至 109 中任一项所述的多核苷酸,其中除了五个或更少的氨基酸取代以外,所述 VH 多肽的构架区是人类的。

111. 根据权利要求 71 至 110 中任一项所述的多核苷酸,其中除了五个或更少的氨基酸取代以外,所述 VL 多肽的构架区是人类的。

112. 根据权利要求 71 至 111 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段结合于线性表位。

113. 根据权利要求 71 至 112 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段结合于非线性构象表位。

114. 根据权利要求 71 至 113 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是多价的,并包含至少两条重链和至少两条轻链。

115. 根据权利要求 71 至 114 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是多特异性的。

116. 根据权利要求 71 至 115 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是双特异性的。

117. 根据权利要求 71 至 116 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段包含为完全人类的重链和轻链可变结构域。

118. 根据权利要求 117 所述的多核苷酸,其中所述重链和轻链可变结构域与选自 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的单克隆 Fab 抗体片段的重链和轻链可变结构域相同。

119. 根据权利要求 71 至 116 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段包含鼠的重链和轻链可变结构域。

120. 根据权利要求 119 所述的多核苷酸,其中所述重链和轻链可变结构域与选自 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的单克隆抗体的重链和轻链可变结构域相同。

121. 根据权利要求 71 至 116 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是人源化的。

122. 根据权利要求 71 至 116 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是嵌合的。

123. 根据权利要求 71 至 116 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是灵长源化的。

124. 根据权利要求 71 至 116 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是完全人类的。

125. 根据权利要求 71 至 124 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是 Fab 片段。

126. 根据权利要求 71 至 124 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是 Fab' 片段。

127. 根据权利要求 71 至 124 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是 F(ab)2 片段。

128. 根据权利要求 71 至 124 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多

肽的抗体或其抗原结合片段是 Fv 片段。

129. 根据权利要求 71 至 124 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是单链抗体。

130. 根据权利要求 71 至 129 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段以解离常数 (KD) 所表征的亲合力特异性地结合至 RON 多肽或其片段、或 RON 变体多肽,所述解离常数 (KD) 不大于 $5 \times 10^{-2}\text{M}$ 、 10^{-2}M 、 $5 \times 10^{-3}\text{M}$ 、 10^{-3}M 、 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 、 10^{-4}M 、 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 、 10^{-5}M 、 $5 \times 10^{-6}\text{M}$ 、 10^{-6}M 、 $5 \times 10^{-7}\text{M}$ 、 10^{-7}M 、 $5 \times 10^{-8}\text{M}$ 、 10^{-8}M 、 $5 \times 10^{-9}\text{M}$ 、 10^{-9}M 、 $5 \times 10^{-10}\text{M}$ 、 10^{-10}M 、 $5 \times 10^{-11}\text{M}$ 、 10^{-11}M 、 $5 \times 10^{-12}\text{M}$ 、 10^{-12}M 、 $5 \times 10^{-13}\text{M}$ 、 10^{-13}M 、 $5 \times 10^{-14}\text{M}$ 、 10^{-14}M 、 $5 \times 10^{-15}\text{M}$ 或 10^{-15}M 。

131. 根据权利要求 71 至 130 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段相对于鼠 RON 多肽或其片段优先地结合至人类 RON 多肽或其片段。

132. 根据权利要求 71 至 131 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段结合于细胞表面上表达的 RON。

133. 根据权利要求 132 所述的多核苷酸,其中所述细胞是恶性细胞、赘生性细胞、肿瘤细胞、转移性细胞或肿瘤相关巨噬细胞。

134. 根据权利要求 71 至 133 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段阻断 MSP 与 RON 结合。

135. 根据权利要求 71 至 134 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段抑制 MSP 依赖性 RON 活化。

136. 根据权利要求 71 至 135 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段抑制抑制非 MSP 依赖性 RON 活化。

137. 根据权利要求 71 至 136 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段抑制 RON 介导的 Ras/MAPK 信号传导途径的活化。

138. 根据权利要求 71 至 137 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段抑制 RON 介导的 ERK 或 AKT 的磷酸化。

139. 根据权利要求 71 至 138 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段抑制 RON 介导的细胞增殖。

140. 根据权利要求 71 至 139 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段抑制肿瘤细胞生长、肿瘤细胞侵入或肿瘤细胞转移。

141. 根据权利要求 71 至 140 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段诱导凋亡。

142. 根据权利要求 71 至 141 中任一项所述的多核苷酸,还包含编码异源性多肽的核酸。

143. 根据权利要求 71 至 142 中任一项所述的多核苷酸,其中包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段适合于选自由以下组成的组的剂:细胞毒性剂、治疗剂、细胞抑制剂、生物毒素、前体药物、肽、蛋白、酶、病毒、脂质、生物反应调节剂、药物制剂、淋巴因子、异源性抗体或其片段、可检测标记、聚乙二醇 (PEG)、以及两种或两种以上任何所述剂的组合。

144. 根据权利要求 143 所述的多核苷酸,其中所述细胞毒性剂选自自由以下组成的组:放射性核素、生物毒素、酶促活性的毒素、细胞抑制性或细胞毒性治疗剂、前体药物、免疫活性的配体、生物反应调节剂、或者两种或两种以上任何所述细胞毒性剂的组合。

145. 根据权利要求 143 所述的多核苷酸,其中所述可检测标记选自自由以下组成的组:酶、荧光标记、化学发光标记、生物发光标记、放射性标记、或者两种或两种以上任何所述可检测标记的组合。

146. 一种组合物,所述组合物包含权利要求 71 至 145 中任一项的多核苷酸和载体。

147. 一种载体,所述载体包含权利要求 71 至 145 中任一项的多核苷酸。

148. 根据权利要求 147 所述的载体,其中所述多核苷酸可操作地与启动子相缔合。

149. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含权利要求 147 或权利要求 148 的载体。

150. 一种产生特异性地结合 RON 的抗体或其片段的方法,所述方法包括培养权利要求 149 的宿主细胞,并回收所述抗体或其片段。

151. 一种分离的多肽,所述分离的多肽由权利要求 150 的方法产生。

152. 一种分离的多肽,所述分离的多肽由权利要求 71 至 145 中任一项的多核苷酸编码。

153. 根据权利要求 152 所述的分离的多肽,其中包含所述多肽的抗体或其片段特异性地结合至 RON。

154. 一种分离的抗体或其片段,所述分离的抗体或其片段包含权利要求 152 或 153 的多肽。

155. 一种组合物,所述组合物包含分离的 VH 编码多核苷酸和分离的 VL 编码多核苷酸,其中所述 VH 编码多核苷酸和所述 VL 编码多核苷酸分别包含编码与选自自由以下组成的组的参考氨基酸序列至少 90% 相同的氨基酸序列的核酸:SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:19;SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:29;SEQ ID NO:34 和 SEQ ID NO:39;SEQ ID NO:44 和 SEQ ID NO:49;SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:59;SEQ ID NO:64 和 SEQ ID NO:69;SEQ ID NO:74 和 SEQ ID NO:79;SEQ ID NO:84 和 SEQ ID NO:89;SEQ ID NO:94 和 SEQ ID NO:99;SEQ ID NO:115 和 SEQ ID NO:120;SEQ ID NO:125 和 SEQ ID NO:130;SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:140 和 SEQ ID NO:145 和 SEQ ID NO:150;并且其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段特异性地结合 RON。

156. 根据权利要求 155 所述的组合物,其中所述 VH 编码多核苷酸和所述 VL 编码多核苷酸分别包含编码选自自由以下组成的组的氨基酸序列的核酸:SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:19;SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:29;SEQ ID NO:34 和 SEQ ID NO:39;SEQ ID NO:44 和 SEQ ID NO:49;SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:59;SEQ ID NO:64 和 SEQ ID NO:69;SEQ ID NO:74 和 SEQ ID NO:79;SEQ ID NO:84 和 SEQ ID NO:89;SEQ ID NO:94 和 SEQ ID NO:99;SEQ ID NO:115 和 SEQ ID NO:120;SEQ ID NO:125 和 SEQ ID NO:130;SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:140;以及 SEQ ID NO:145 和 SEQ ID NO:150。

157. 一种组合物,所述组合物包含分离的 VH 编码多核苷酸和分离的 VL 编码多核苷酸,其中所述 VH 编码多核苷酸和所述 VL 编码多核苷酸分别包含编码除了少于 20 个保守性氨基酸取代以外与选自自由以下组成的组的参考氨基酸序列相同的氨基酸序列的核酸:SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:19;SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:29;

SEQ ID NO:34 和 SEQ ID NO:39;SEQ ID NO:44 和 SEQ ID NO:49;SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:59;SEQ ID NO:64 和 SEQ ID NO:69;SEQ ID NO:74 和 SEQ ID NO:79;SEQ ID NO:84 和 SEQ ID NO:89;SEQ ID NO:94 和 SEQ ID NO:99;SEQ ID NO:115 和 SEQ ID NO:120;SEQ ID NO:125 和 SEQ ID NO:130;SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:140;以及 SEQ ID NO:145 和 SEQ ID NO:150;并且其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段特异性地结合 RON。

158. 一种组合物,所述组合物包含分离的 VH 编码多核苷酸和分离的 VL 编码多核苷酸,其中所述 VH 编码多核苷酸编码包含选自以下组成的组的 VH-CDR1、VH-CDR2 和 VH-CDR3 氨基酸序列的 VH 多肽:SEQ ID NO:5、6 和 7;SEQ ID NO:15、16 和 17;SEQ ID NO:25、26 和 27;SEQ ID NO:35、36 和 37;SEQ ID NO:45、46 和 47;SEQ ID NO:55、56 和 57;SEQ ID NO:65、66 和 67;SEQ ID NO:75、76 和 77;SEQ ID NO:85、86 和 87;以及 SEQ ID NO:95、96 和 97;其中所述 VL 编码多核苷酸编码包含选自以下组成的组的 VL-CDR1、VL-CDR2 和 VL-CDR3 氨基酸序列的 VL 多肽:SEQ ID NO:10、11 和 12;SEQ ID NO:20、21 和 22;SEQ ID NO:30、31 和 32;SEQ ID NO:40、41 和 42;SEQ ID NO:50、51 和 52;SEQ ID NO:60、61 和 62;SEQ ID NO:70、71 和 72;SEQ ID NO:80、81 和 82;SEQ ID NO:90、91 和 92;SEQ ID NO:100、101 和 102;SEQ ID NO:116、117 和 118;SEQ ID NO:126、127 和 128;SEQ ID NO:136、137 和 138;以及 SEQ ID NO:146、147 和 148;并且其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段特异性地结合 RON。

159. 根据权利要求 155 至 158 中任一项所述的组合物,其中所述 VH 编码多核苷酸还包含编码融合于所述抗体 VH 多肽的信号肽的核酸。

160. 根据权利要求 155 至 158 中任一项所述的组合物,其中所述 VL 编码多核苷酸还包含编码融合于所述抗体 VL 多肽的信号肽的核酸。

161. 根据权利要求 155 至 160 中任一项所述的组合物,其中所述 VH 编码多核苷酸还包含编码融合于所述 VH 多肽的重链恒定区 CH1 结构域的核酸。

162. 根据权利要求 155 至 161 中任一项所述的组合物,其中所述 VH 编码多核苷酸还包含编码融合于所述 VH 多肽的重链恒定区 CH2 结构域的核酸。

163. 根据权利要求 155 至 162 中任一项所述的组合物,其中所述 VH 编码多核苷酸还包含编码融合于所述 VH 多肽的重链恒定区 CH3 结构域的核酸。

164. 根据权利要求 155 至 163 中任一项所述的组合物,其中所述 VH 编码多核苷酸还包含编码融合于所述 VH 多肽的重链铰链区的核酸。

165. 根据权利要求 155 至 164 中任一项所述的组合物,其中所述重链恒定区选自由人类 IgG4、IgG4agly、IgG1 和 IgG1agly 组成的组。

166. 根据权利要求 155 至 165 中任一项所述的组合物,其中所述 VL 编码多核苷酸还包含编码融合于所述 VL 多肽的轻链恒定区结构域的核酸。

167. 根据权利要求 166 所述的组合物,其中所述轻链恒定区是人类 κ 。

168. 根据权利要求 155 至 167 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段特异性地结合与选自 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的参考单克隆 Fab 抗体片段或选自 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的参考单克隆抗体相同的 RON 表位。

169. 根据权利要求 155 至 167 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段竞争性地抑制选自 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的参考单克隆 Fab 抗体片段或选自 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的参考单克隆抗体。

170. 根据权利要求 155 至 169 中任一项所述的组合物,其中除了五个或更少的氨基酸取代以外,所述 VH 和 VL 多肽的构架区是人类的。

171. 根据权利要求 155 至 170 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段结合于线性表位。

172. 根据权利要求 155 至 170 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段结合于非线性构象表位。

173. 根据权利要求 155 至 170 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段是多价的,并包含至少两条重链和至少两条轻链。

174. 根据权利要求 155 至 173 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段是多特异性的。

175. 根据权利要求 155 至 174 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段是双特异性的。

176. 根据权利要求 155 至 175 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段包含为完全人类的重链和轻链可变结构域。

177. 根据权利要求 176 所述的组合物,其中所述重链和轻链可变结构域与选自 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的单克隆 Fab 抗体片段的重链和轻链可变结构域相同。

178. 根据权利要求 155 至 175 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段包含为鼠的重链和轻链可变结构域。

179. 根据权利要求 178 所述的组合物,其中所述重链和轻链可变结构域与选自 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的单克隆抗体的重链和轻链可变结构域相同。

180. 根据权利要求 155 至 175 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段是人源化的。

181. 根据权利要求 155 至 175 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段是嵌合的。

182. 根据权利要求 155 至 175 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段是灵长源化的。

183. 根据权利要求 155 至 175 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段是完全人类的。

184. 根据权利要求 155 至 183 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段是 Fab 片段。

185. 根据权利要求 155 至 183 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段是 Fab' 片段。

186. 根据权利要求 155 至 183 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核

核苷酸编码的抗体或其片段是 F(ab)2 片段。

187. 根据权利要求 155 至 183 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段是 Fv 片段。

188. 根据权利要求 155 至 183 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段是单链抗体。

189. 根据权利要求 155 至 188 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段以解离常数 (KD) 表征的亲和力特异性地结合至 RON 多肽或其片段、或 RON 变体多肽,其中所述解离常数 (KD) 不大于 $5 \times 10^{-2}M$ 、 $10^{-2}M$ 、 $5 \times 10^{-3}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $5 \times 10^{-4}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $5 \times 10^{-5}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $5 \times 10^{-6}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-7}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $5 \times 10^{-9}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $5 \times 10^{-10}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $5 \times 10^{-11}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $5 \times 10^{-13}M$ 、 $10^{-13}M$ 、 $5 \times 10^{-14}M$ 、 $10^{-14}M$ 、 $5 \times 10^{-15}M$ 或 $10^{-15}M$ 。

190. 根据权利要求 155 至 189 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段相对于鼠 RON 多肽或其片段优先地结合至人类 RON 多肽或其片段。

191. 根据权利要求 155 至 190 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段结合至细胞表面上表达的 RON。

192. 根据权利要求 191 所述的组合物,其中所述细胞是恶性细胞、赘生性细胞、肿瘤细胞、转移性细胞或肿瘤相关巨噬细胞。

193. 根据权利要求 155 至 192 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段阻断 MSP 与 RON 结合。

194. 根据权利要求 155 至 193 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段抑制 MSP 依赖性 RON 活化。

195. 根据权利要求 155 至 194 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段抑制非 MSP 依赖性 RON 活化。

196. 根据权利要求 155 至 195 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段抑制 RON 介导的 Ras/MAPK 信号传导途径的活化。

197. 根据权利要求 155 至 196 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段抑制 RON 介导的 ERK 或 AKT 的磷酸化。

198. 根据权利要求 155 至 197 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段抑制 RON 介导的细胞增殖。

199. 根据权利要求 155 至 198 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段抑制肿瘤细胞生长、肿瘤细胞侵入或肿瘤细胞转移。

200. 根据权利要求 155 至 199 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段诱导凋亡。

201. 根据权利要求 155 至 200 中任一项所述的组合物,其中所述 VH 编码多核苷酸、所述 VL 编码多核苷酸、或所述 VH 编码多核苷酸与所述 VL 编码多核苷酸二者还包含编码异源性多肽的核酸。

202. 根据权利要求 155 至 201 中任一项所述的组合物,其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段适合于选自由以下组成的组的剂:细胞毒性剂、治疗剂、细胞抑制

剂、生物毒素、前体药物、肽、蛋白、酶、病毒、脂质、生物反应调节剂、药物剂、淋巴因子、异源性抗体或其片段、可检测标记、聚乙二醇 (PEG)、和两种或两种以上任何所述剂的组合。

203. 根据权利要求 202 所述的组合物,其中所述细胞毒性剂选自自由以下组成的组:放射性核素、生物毒素、酶促活性的毒素、细胞抑制性或细胞毒性治疗剂、前体药物、免疫活性的配体、生物反应调节剂、或者两种或两种以上任何所述细胞毒性剂的组合。

204. 根据权利要求 202 所述的组合物,其中所述可检测标记选自自由以下组成的组:酶、荧光标记、化学发光标记、生物发光标记、放射性标记、或者两种或两种以上任何所述可检测标记的组合。

205. 根据权利要求 155 至 204 中任一项所述的组合物,其中所述 VH 编码多核苷酸被包含在第一载体上并且所述 VL 编码多核苷酸被包含在第二载体上。

206. 根据权利要求 205 所述的组合物,其中所述 VH 编码多核苷酸可操作地与第一启动子相缔合并且所述 VL 编码多核苷酸可操作地与第二启动子相缔合。

207. 根据权利要求 206 所述的组合物,其中所述第一启动子和所述第二启动子是同一启动子的拷贝。

208. 根据权利要求 206 所述的组合物,其中所述第一启动子和所述第二启动子是不相同的。

209. 根据权利要求 205 至 208 中任一项所述的组合物,其中所述第一载体和所述第二载体被包含在单个宿主细胞中。

210. 根据权利要求 205 至 208 中任一项所述的组合物,其中所述第一载体和所述第二载体被包含在分别的宿主细胞中。

211. 一种产生特异性地结合 RON 的抗体或其片段的方法,所述方法包括培养权利要求 209 的宿主细胞,并回收所述抗体或其片段。

212. 一种产生特异性地结合 RON 的抗体或其片段的方法,所述方法包括共培养权利要求 210 的分别的宿主细胞,并回收所述抗体或其片段。

213. 一种产生特异性地结合 RON 的抗体或其片段的方法,所述方法包括分别培养权利要求 210 的分别的宿主细胞,组合所述 VH 和 VL 编码多肽,并回收所述抗体或其片段。

214. 一种特异性地结合 RON 的抗体或其片段,所述抗体或其片段由权利要求 211 至 213 中任一项的方法产生。

215. 根据权利要求 155 至 204 中任一项所述的组合物,其中所述 VH 编码多核苷酸和所述 VL 编码多核苷酸在同一载体上。

216. 权利要求 215 的载体。

217. 根据权利要求 216 所述的载体,其中所述 VH 编码多核苷酸和所述 VL 编码多核苷酸各自可操作地与启动子缔合。

218. 根据权利要求 216 所述的载体,其中所述 VH 编码多核苷酸和所述 VL 编码多核苷酸在框内融合,从与其可操作地缔合的单个启动子共转录,并共翻译为单链抗体或其抗原结合片段。

219. 根据权利要求 216 所述的载体,其中所述 VH 编码多核苷酸和所述 VL 编码多核苷酸从与其可操作地缔合的单个启动子共转录,但分别翻译。

220. 根据权利要求 219 所述的载体,还包含设置在所述 VH 编码多核苷酸和所述 VL 编

码多核苷酸之间的 IRES 序列。

221. 根据权利要求 216 所述的载体,其中各自与分别的启动子可操作地缔合的所述编码 VH 的多核苷酸和所述编码 VL 的多核苷酸被分别转录。

222. 根据权利要求 221 所述的载体,其中所述分别的启动子是同一启动子的拷贝。

223. 根据权利要求 221 所述的载体,其中所述分别的启动子是不相同的。

224. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含权利要求 216 至 223 中任一项的载体。

225. 一种产生特异性地结合 RON 的抗体或其片段的方法,所述方法包括培养权利要求 224 的宿主细胞,并回收所述抗体或其片段。

226. 一种特异性地结合 RON 的抗体或其片段,所述抗体或其片段由权利要求 225 的方法产生。

227. 一种用于治疗动物的过度增生性病症的方法,所述方法包括向需要治疗的动物施用包含以下组分的组合物:

a) 权利要求 1 至 69、154、214 和 226 中任一项的分离的抗体或其片段;和

b) 药学上可接受的载体。

228. 根据权利要求 227 所述的方法,其中所述过度增生性疾病或病症选自癌症、赘生物、肿瘤、恶性肿瘤、或其转移组成的组。

229. 根据权利要求 228 所述的方法,其中所述抗体或其片段特异性地结合至恶性细胞表面上表达的 RON。

230. 根据权利要求 229 所述的方法,其中所述抗体或其片段与所述恶性细胞的结合使得所述恶性细胞的生长受抑制。

231. 根据权利要求 227 至 230 中任一项所述的方法,其中所述抗体或其片段抑制肿瘤细胞增殖。

232. 根据权利要求 231 所述的方法,其中通过阻止或阻滞转移性生长来抑制肿瘤细胞增殖。

233. 根据权利要求 227 至 230 中任一项所述的方法,其中所述抗体或其片段抑制肿瘤细胞迁移。

234. 根据权利要求 231 所述的方法,其中通过阻止或阻滞肿瘤向相邻组织扩散来抑制肿瘤细胞增殖。

235. 根据权利要求 228 所述的方法,其中所述过度增生性疾病或病症是位于以下位置的赘生物:前列腺、结肠、腹部、骨、乳房、消化系统、肝脏、胰、腹膜、肾上腺、甲状旁腺、垂体腺、睾丸、卵巢、胸腺、甲状腺、眼、头、颈、中枢神经系统、周围神经系统、淋巴系统、骨盆、皮肤、软组织、脾脏、胸部、或泌尿生殖道。

236. 根据权利要求 228 所述的方法,其中所述过度增生性疾病是癌症,所述癌症选自以下组成的组:上皮鳞状细胞癌、黑素瘤、白血病、骨髓瘤、胃癌、脑癌、肺癌、胰腺癌、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、肾癌、前列腺癌、睾丸癌、甲状腺癌和头颈癌。

237. 根据权利要求 236 所述的方法,其中所述癌症选自胃癌、肾癌、脑癌、膀胱癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌和前列腺癌组成的组。

238. 根据权利要求 227 至 237 中任一项所述的方法,其中所述动物是哺乳动物。

239. 根据权利要求 238 所述的方法,其中所述哺乳动物是人类。

RON 抗体及其用途

[0001] 发明背景

[0002] RON(recepteur d'origine nantais,也称为 MST1R) 是一种对于胚胎发育必不可少的受体型蛋白酪氨酸激酶,并且还在炎症反应中起重要作用 (Camp 等人 Ann. Surg. Oncol. 12 :273-281(2005))。RON 主要在来源于上皮的细胞类型中表达,并且有人提出 RON 同大量的其它受体型酪氨酸激酶一样可能在恶性上皮癌的演变中起作用 (Wang 等人 Carcinogenesis 23 :1291-1297(2003))。

[0003] 受体型蛋白酪氨酸激酶通常由结合胞外配体诸如生长因子和激素的胞外结构域以及具备激酶功能结构域的胞内结构域组成。受体型蛋白酪氨酸激酶已被细分为许多类别,并且 RON 是受体酪氨酸激酶的 MET 家族的成员,该家族还包括 Stk、c-Met 和 c-Sea (Camp 等人 Ann. Surg. Oncol. 12 :273-281(2005))。RON 和 c-Met 是在人类中发现的仅有的该家族的成员,并且它们总体上共有约 65% 的同源性。C-Met 是肝细胞生长因子 / 分散因子 (HGF/SF) 的受体并且已被相当充分地表征为原癌基因。

[0004] 已经确定 RON 的配体巨噬细胞刺激蛋白 (MSP), 其与 c-Met 配体 HGF/SF 共有约 40% 的同源性。MSP 和 HGF 属于通过 Kringle 结构域表征的纤溶酶原 - 凝血酶原家族。有趣的是, MSP 也已证实与癌症有关。例如, Welm 等人最近观察到 MSP 与乳腺癌的转移和不良预后之间的关联 (PNAS 104 :7501-7575(2007))。

[0005] 已经证实 MSP 与称为脑信号蛋白 (sema) 结构域的 RON 的胞外部分中的特定结构域结合。RON 和 c-Met 是仅有的具有胞外 sema 结构域的受体酪氨酸激酶,并且已经证实 RON 的 sema 结构域包括其配体结合位点。MSP 与 RON 的结合导致 RON 的激酶结构域中磷酸化,这使得 RON 激酶活性增加。或者, β_1 整合蛋白可经由 Src 依赖性途径将 RON 磷酸化并活化 (Camp 等人 Ann. Surg. Oncol. 12 :273-281(2005))。RON 的活化引发了许多途径的信号传导,包括 PI3-K、Ras、src、 β -连环蛋白和 Fak 信号传导。由 RON 活化的许多信号传导途径牵涉在与癌症相关的过程诸如增殖和凋亡的抑制中。

[0006] 最近,由于多种原因, RON 本身已牵涉在癌症演变中。例如, RON 在包括乳腺癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌和胰腺癌的多种人类肿瘤中表达。此外, RON 已经在体外显示出增加细胞增殖和活动性。而且, RON 在 RON 转基因小鼠中诱导肿瘤生长和转移 (metastasis) (Waltz 等人 Cancer Research 66 :11967-11974(2006))。因此,对可以抑制 RON 信号传导途径的包括抗 RON 抗体在内的分子存在需求。

发明内容

[0007] 在一些实施方案中,本发明提供一种分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段特异性地结合至与选自 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的参考单克隆 Fab 抗体片段或选自 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的参考单克隆抗体相同的 RON 表位。

[0008] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或片段竞争性地抑制选自 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、

M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的参考单克隆 Fab 抗体片段或选自由 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的参考单克隆抗体与 RON 结合。

[0009] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段包含与选自由 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的参考单克隆 Fab 抗体片段或选自由 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的参考单克隆抗体的抗原结合结构域相同的抗原结合结构域。

[0010] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的重链可变区 (VH) 包含与选自由以下组成的组的参考氨基酸序列至少 90% 相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:145。

[0011] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的轻链可变区 (VL) 包含与选自由以下组成的组的参考氨基酸序列至少 90% 相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:140 和 SEQ ID NO:150。

[0012] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VH 包含除了 20 个或更少的保守性氨基酸取代以外与选自由以下组成的组的参考氨基酸序列相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:145。

[0013] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VL 包含除了 20 个或更少的保守性氨基酸取代以外与选自由以下组成的组的参考氨基酸序列相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:140 和 SEQ ID NO:150。

[0014] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VH 包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:145。

[0015] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VL 包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:140 和 SEQ ID NO:150。

[0016] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VH 和 VL 分别包含与选自以下组成的组的参考氨基酸序列至少 90% 相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:19;SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:29;SEQ ID NO:34 和 SEQ ID NO:39;SEQ ID NO:44 和 SEQ ID NO:49;SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:59;SEQ ID NO:64 和 SEQ ID NO:69;SEQ ID NO:74 和 SEQ ID NO:79;SEQ ID NO:84 和 SEQ ID NO:89;SEQ ID NO:94 和 SEQ ID NO:99;SEQ ID NO:115 和 SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:125 和 SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:140、以及 SEQ ID NO:145 和 SEQ ID NO:150。

[0017] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VH 和 VL 各自除了 20 个或更少的保守性氨基酸取代以外,分别包含与选自以下组成的组的参考氨基酸序列相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:19;SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:29;SEQ ID NO:34 和 SEQ ID NO:39;SEQ ID NO:44 和 SEQ ID NO:49;SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:59;SEQ ID NO:64 和 SEQ ID NO:69;SEQ ID NO:74 和 SEQ ID NO:79;SEQ ID NO:84 和 SEQ ID NO:89;SEQ ID NO:94 和 SEQ ID NO:99;SEQ ID NO:115 和 SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:125 和 SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:140、以及 SEQ ID NO:145 和 SEQ ID NO:150。

[0018] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VH 和 VL 分别包含选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:19;SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:29;SEQ ID NO:34 和 SEQ ID NO:39;SEQ ID NO:44 和 SEQ ID NO:49;SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:59;SEQ ID NO:64 和 SEQ ID NO:69;SEQ ID NO:74 和 SEQ ID NO:79;SEQ ID NO:84 和 SEQ ID NO:89;SEQ ID NO:94 和 SEQ ID NO:99;SEQ ID NO:115 和 SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:125 和 SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:140、以及 SEQ ID NO:145 和 SEQ ID NO:150。

[0019] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VH 包含除了两个或更少的氨基酸取代以外与选自以下组成的组的参考重链互补决定区 -1 (VH-CDR1) 氨基酸序列相同的 Kabat VH-CDR1 氨基酸序列:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:136 和 SEQ ID NO:146。在另外的实施方案中,所述 VH-CDR1 氨基酸序列选自以下组成的组:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:136 和 SEQ ID NO:146。

[0020] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VH 包含除了四个或更少的氨基酸取代以外与选自以下组成的组的参考重链互补决定区 -2 (VH-CDR2) 氨基酸序列相同的 Kabat VH-CDR2 氨基酸序列:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:137 和 SEQ ID NO:147。在另外的实施方案中,所述 VH-CDR2 氨基酸

序列选自以下组成的组:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:137 和 SEQ ID NO:147。

[0021] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VH 包含除了四个或更少的氨基酸取代以外与选自以下组成的组的参考重链互补决定区-3(VH-CDR3)氨基酸序列相同的 Kabat VH-CDR3 氨基酸序列:SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:138 和 SEQ ID NO:148。在另外的实施方案中,所述 VH-CDR3 氨基酸序列选自以下组成的组:SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:138 和 SEQ ID NO:148。

[0022] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VL 包含除了四个或更少的氨基酸取代以外与选自以下组成的组的参考轻链互补决定区-1(VL-CDR1)氨基酸序列相同的 Kabat VL-CDR1 氨基酸序列:SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:141 和 SEQ ID NO:151。在另外的实施方案中,所述 VL-CDR1 氨基酸序列选自以下组成的组:SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:141 和 SEQ ID NO:151。

[0023] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VL 包含除了两个或更少的氨基酸取代以外与选自以下组成的组的参考轻链互补决定区-2(VL-CDR2)氨基酸序列相同的 Kabat VL-CDR2 氨基酸序列:SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:142 和 SEQ ID NO:152。在另外的实施方案中,所述 VL-CDR2 氨基酸序列选自以下组成的组:SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:142 和 SEQ ID NO:152。

[0024] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VL 包含除了四个或更少的氨基酸取代以外与选自以下组成的组的参考轻链互补决定区-3(VL-CDR3)氨基酸序列相同的 Kabat VL-CDR3 氨基酸序列:SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:143 和 SEQ ID NO:153。在另外的实施方案中,所述 VL-CDR3 氨基酸序列选自以下组成的组:SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:143 和 SEQ ID NO:153。

[0025] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中除了在所述 VH-CDR 中的至少一个上的一个、二个、三个或四个氨基酸取代以外,所述抗体或其片段的 VH 包含选自由以下组成的组的 VH-CDR1、VH-CDR2 和 VH-CDR3 氨基酸序列:SEQ ID NO:5、6 和 7;SEQ ID NO:15、16 和 17;SEQ ID NO:25、26 和 27;SEQ ID NO:35、36 和 37;SEQ ID NO:45、46 和 47;SEQ ID NO:55、56 和 57;SEQ ID NO:65、66 和 67;SEQ ID NO:75、76 和 77;SEQ ID NO:85、86 和 87;SEQ ID NO:95、96 和 97;SEQ ID NO:116、117 和 118;SEQ ID NO:126、127 和 128;SEQ ID NO:136、137 和 138;以及 SEQ ID NO:146、147 和 148。

[0026] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VH 包含选自由以下组成的组的 VH-CDR1、VH-CDR2 和 VH-CDR3 氨基酸序列:SEQ ID NO:5、6 和 7;SEQ ID NO:15、16 和 17;SEQ ID NO:25、26 和 27;SEQ ID NO:35、36 和 37;SEQ ID NO:45、46 和 47;SEQ ID NO:55、56 和 57;SEQ ID NO:65、66 和 67;SEQ ID NO:75、76 和 77;SEQ ID NO:85、86 和 87;SEQ ID NO:95、96 和 97;SEQ ID NO:116、117 和 118;SEQ ID NO:126、127 和 128;SEQ ID NO:136、137 和 138;以及 SEQ ID NO:146、147 和 148。

[0027] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中除了在 VL-CDR 中至少一个上的一个、二个、三个或四个氨基酸取代以外,所述抗体或其片段的 VL 包含选自由以下组成的组的 VL-CDR1、VL-CDR2 和 VL-CDR3 氨基酸序列:SEQ ID NO:10、11 和 12;SEQ ID NO:20、21 和 22;SEQ ID NO:30、31 和 32;SEQ ID NO:40、41 和 42;SEQ ID NO:50、51 和 52;SEQ ID NO:60、61 和 62;SEQ ID NO:70、71 和 72;SEQ ID NO:80、81 和 82;SEQ ID NO:90、91 和 92;SEQ ID NO:100、101 和 102;SEQ ID NO:121、122 和 123;SEQ ID NO:131、132 和 133;SEQ ID NO:141、142 和 143;以及 SEQ ID NO:151、152 和 153。

[0028] 在一些实施方案中,本发明提供一种特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段的 VL 包含选自由以下组成的组的 VL-CDR1、VL-CDR2 和 VL-CDR3 氨基酸序列:SEQ ID NO:10、11 和 12;SEQ ID NO:20、21 和 22;SEQ ID NO:30、31 和 32;SEQ ID NO:40、41 和 42;SEQ ID NO:50、51 和 52;SEQ ID NO:60、61 和 62;SEQ ID NO:70、71 和 72;SEQ ID NO:80、81 和 82;SEQ ID NO:90、91 和 92;SEQ ID NO:100、101 和 102;SEQ ID NO:121、122 和 123;SEQ ID NO:131、132 和 133;SEQ ID NO:141、142 和 143;以及 SEQ ID NO:151、152 和 153。

[0029] 在上述的抗体或其片段的各种实施方案中,除了五个或更少的氨基酸取代以外,所述 VH 构架区和 / 或 VL 构架区是人类的。

[0030] 在一些实施方案中,上述的抗体或其片段结合至线性表位或非线性构象表位。

[0031] 在一些实施方案中,上述的抗体或其片段是多价的,并包含至少两条重链和至少两条轻链。

[0032] 在一些实施方案中,上述的抗体或其片段是多特异性的。在另外的实施方案中,上述的抗体或其片段是双特异性的。

[0033] 在上述的抗体或其片段的各种实施方案中,重链和轻链可变结构域是鼠的。在另外的实施方案中,重链和轻链可变结构域来自选自由 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和

1P5B10 组成的组的单克隆抗体。

[0034] 在上述的抗体或其片段的各种实施方案中,重链和轻链可变结构域是完全人类的。在另外的实施方案中,重链和轻链可变结构域来自选自 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的单克隆 Fab 抗体片段。

[0035] 在各种实施方案中,上述的抗体或其片段是人源化的。

[0036] 在各种实施方案中,上述的抗体或其片段是嵌合的。

[0037] 在各种实施方案中,上述的抗体或其片段是灵长源化的。

[0038] 在各种实施方案中,上述的抗体或其片段是完全人类的。

[0039] 在某些实施方案中,上述的抗体或其片段是 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab)₂ 片段或 Fv 片段。

[0040] 在某些实施方案中,上述的抗体是单链抗体。

[0041] 在某些实施方案中,上述的抗体或其片段包含选自人类 κ 恒定区和人类 λ 恒定区组成的组的轻链恒定区。

[0042] 在某些实施方案中,上述的抗体或其片段包含重链恒定区或其片段。在另外的实施方案中,重链恒定区或其片段选自人类 IgG4、IgG4agly、IgG1 和 IgG1agly 组成的组。

[0043] 在一些实施方案中,上述的抗体或其片段以小于所述参考单克隆抗体的解离常数 (K_D) 的 K_D 所表征的亲合力特异性地结合至 RON 多肽或其片段、或 RON 变体多肽。在另外的实施方案中,解离常数 (K_D) 不大于 $5 \times 10^{-2}M$ 、 $10^{-2}M$ 、 $5 \times 10^{-3}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $5 \times 10^{-4}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $5 \times 10^{-5}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $5 \times 10^{-6}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-7}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $5 \times 10^{-9}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $5 \times 10^{-10}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $5 \times 10^{-11}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $5 \times 10^{-13}M$ 、 $10^{-13}M$ 、 $5 \times 10^{-14}M$ 、 $10^{-14}M$ 、 $5 \times 10^{-15}M$ 或 $10^{-15}M$ 。

[0044] 在一些实施方案中,上述的抗体或其片段相对于鼠 RON 多肽或其片段优先地结合至人类 RON 多肽或其片段。

[0045] 在一些实施方案中,上述的抗体或其片段结合至细胞表面上表达的 RON。在另外的实施方案中,所述细胞是恶性细胞、赘生性细胞、肿瘤细胞、转移性细胞或肿瘤相关巨噬细胞。

[0046] 在一些实施方案中,上述的抗体或其片段阻断 MSP 与 RON 结合。

[0047] 在一些实施方案中,上述的抗体或其片段抑制 MSP 依赖性 RON 活化。

[0048] 在一些实施方案中,上述的抗体或其片段抑制非 MSP 依赖性 RON 活化。

[0049] 在一些实施方案中,上述的抗体或其片段抑制 RON 介导的 RAS/MAPK 信号传导途径的活化。

[0050] 在一些实施方案中,上述的抗体或其片段抑制 RON 介导的 ERK 或 AKT 的磷酸化。

[0051] 在一些实施方案中,上述的抗体或其片段抑制 RON 介导的细胞增殖、肿瘤细胞生长、肿瘤细胞迁移、肿瘤细胞侵入或肿瘤细胞转移。

[0052] 在一些实施方案中,上述的抗体或其片段诱导凋亡。

[0053] 在另外的实施方案中,上述的抗体或其片段还包含与其融合的异源性多肽。

[0054] 在一些实施方案中,上述的抗体或其片段适合于选自以下组成的组的剂:细胞毒性剂、治疗剂、细胞抑制剂、生物毒素、前体药物、肽、蛋白、酶、病毒、脂质、生物反应调节剂、药物剂、淋巴因子、异源性抗体或其片段、可检测标记、聚乙二醇 (PEG)、和两种或两种以

上任何所述剂的组合。在另外的实施方案中,所述细胞毒性剂选自自由以下组成的组:放射性核素、生物毒素、酶促活性的毒素、细胞抑制性或细胞毒性治疗剂、前体药物、免疫活性的配体、生物反应调节剂、或者两种或两种以上任何所述细胞毒性剂的组合。在另外的实施方案中,所述可检测标记选自自由以下组成的组:酶、荧光标记、化学发光标记、生物发光标记、放射性标记、或者两种或两种以上任何所述可检测标记的组合。

[0055] 在另外的实施方案中,本发明包括包含上述抗体或其片段和载体的组合物。

[0056] 本发明的某些实施方案包括一种包含编码抗体 VH 多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述 VH 多肽的氨基酸序列与选自自由以下组成的组的参考氨基酸序列至少 90% 相同:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:145;并且其中包含所述 VH 多肽的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。在另外的实施方案中,所述 VH 多肽的氨基酸序列选自自由以下组成的组:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:145。

[0057] 在某些实施方案中,编码所述 VH 多肽的核苷酸序列被优化以增加所述 VH 多肽的表达而不改变其氨基酸序列。在另外的实施方案中,所述优化包括识别和移除剪接供体位点和剪接受体位点和/或表达所述多核苷酸细胞的密码子使用的优化。在另外的实施方案中,所述核酸包含选自自由以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:134 和 SEQ ID NO:144。

[0058] 在一些实施方案中,本发明提供一种包含编码抗体 VL 多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述 VL 多肽的氨基酸序列与选自自由以下组成的组的参考氨基酸序列至少 90% 相同:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:140 和 SEQ ID NO:150;并且其中包含所述 VL 多肽的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。在另外的实施方案中,所述 VL 多肽的氨基酸序列选自自由以下组成的组:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:140 和 SEQ ID NO:150。

[0059] 在某些实施方案中,编码所述 VL 多肽的核苷酸序列被优化以增加所述 VL 多肽的表达而不改变其氨基酸序列。在另外的实施方案中,所述优化包括识别和移除剪接供体位点和剪接受体位点和/或表达所述多核苷酸细胞的密码子使用的优化。在另外的实施方案中,所述核酸包含选自自由以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:129、SEQ ID NO:139 和 SEQ ID NO:149。

[0060] 在某些其它实施方案中,本发明提供一种包含编码抗体 VH 多肽的核酸的分离的

多核苷酸,其中除了 20 个或更少的保守性氨基酸取代以外,所述 VH 多肽的氨基酸序列与选自自由以下组成的组的参考氨基酸序列相同:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:145;并且其中包含所述 VH 多肽的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。

[0061] 在一些实施方案中,本发明提供一种包含编码抗体 VL 多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中除了 20 个或更少的保守性氨基酸取代以外,所述 VL 多肽的氨基酸序列与选自自由以下组成的组的参考氨基酸序列相同:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:140 和 SEQ ID NO:150;并且其中包含所述 VL 多肽的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。

[0062] 在一些实施方案中,本发明提供一种包含编码 VH-CDR1 氨基酸序列的核酸的分离的多核苷酸,其中除了两个或更少的氨基酸取代以外,所述 VH-CDR1 氨基酸序列与选自自由以下组成的组的参考 VH-CDR1 氨基酸序列相同:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:136 和 SEQ ID NO:146;并且其中包含所述 VH-CDR1 的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。在另外的实施方案中,所述 VH-CDR1 氨基酸序列选自自由以下组成的组:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:136 和 SEQ ID NO:146。

[0063] 在一些实施方案中,本发明提供一种包含编码 VH-CDR2 氨基酸序列的核酸的分离的多核苷酸,所述 VH-CDR2 氨基酸序列除了四个或更少的氨基酸取代以外,与选自自由以下组成的组的参考 VH-CDR2 氨基酸序列相同:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:137 和 SEQ ID NO:147;并且其中包含所述 VH-CDR2 的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。在另外的实施方案中,所述 VH-CDR2 氨基酸序列选自自由以下组成的组:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:137 和 SEQ ID NO:147。

[0064] 在一些实施方案中,本发明提供一种包含编码 VH-CDR3 氨基酸序列的核酸的分离的多核苷酸,所述 VH-CDR3 氨基酸序列除了四个或更少的氨基酸取代以外,与选自自由以下组成的组的参考 VH-CDR3 氨基酸序列相同:SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:138 和 SEQ ID NO:148;并且其中包含所述 VH-CDR3 的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。在另外的实施方案中,所述 VH-CDR3 氨基酸序列选自自由以下组成的组:SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:77、SEQ

ID NO :87、SEQ ID NO :97、SEQ ID NO :118、SEQ ID NO :128、SEQ ID NO :138 和 SEQ ID NO :148。

[0065] 在一些实施方案中,本发明提供一种包含编码 VL-CDR1 氨基酸序列的核酸的分离的多核苷酸,所述 VL-CDR1 氨基酸序列除了四个或更少的氨基酸取代以外,与选自以下组成的组的参考 VL-CDR1 氨基酸序列相同:SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :40、SEQ ID NO :50、SEQ ID NO :60、SEQ ID NO :70、SEQ ID NO :80、SEQ ID NO :90、SEQ ID NO :100、SEQ ID NO :121、SEQ ID NO :131、SEQ ID NO :141 和 SEQ ID NO :151;并且其中包含所述 VL-CDR1 的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。在另外的实施方案中,所述 VL-CDR1 氨基酸序列选自以下组成的组:SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :40、SEQ ID NO :50、SEQ ID NO :60、SEQ ID NO :70、SEQ ID NO :80、SEQ ID NO :90、SEQ ID NO :100、SEQ ID NO :121、SEQ ID NO :131、SEQ ID NO :141 和 SEQ ID NO :151。

[0066] 在一些实施方案中,本发明提供一种包含编码 VL-CDR2 氨基酸序列的核酸的分离的多核苷酸,所述 VL-CDR2 氨基酸序列除了两个或更少的氨基酸取代以外,与选自以下组成的组的参考 VL-CDR2 氨基酸序列相同:SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :41、SEQ ID NO :51、SEQ ID NO :61、SEQ ID NO :71、SEQ ID NO :81、SEQ ID NO :91、SEQ ID NO :101、SEQ ID NO :122、SEQ ID NO :132、SEQ ID NO :142 和 SEQ ID NO :152;并且其中包含所述 VL-CDR2 的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。在另外的实施方案中,所述 VL-CDR2 氨基酸序列选自以下组成的组:SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :41、SEQ ID NO :51、SEQ ID NO :61、SEQ ID NO :71、SEQ ID NO :81、SEQ ID NO :91、SEQ ID NO :101、SEQ ID NO :122、SEQ ID NO :132、SEQ ID NO :142 和 SEQ ID NO :152。

[0067] 在一些实施方案中,本发明提供一种包含编码 VL-CDR3 氨基酸序列的核酸的分离的多核苷酸,所述 VL-CDR3 氨基酸序列除了四个或更少的氨基酸取代以外,与选自以下组成的组的参考 VL-CDR3 氨基酸序列相同:SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :42、SEQ ID NO :52、SEQ ID NO :62、SEQ ID NO :72、SEQ ID NO :82、SEQ ID NO :92、SEQ ID NO :102、SEQ ID NO :123、SEQ ID NO :133、SEQ ID NO :143 和 SEQ ID NO :153;并且其中包含所述 VL-CDR3 的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。在另外的实施方案中,所述 VL-CDR3 氨基酸序列选自以下组成的组:SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :42、SEQ ID NO :52、SEQ ID NO :62、SEQ ID NO :72、SEQ ID NO :82、SEQ ID NO :92、SEQ ID NO :102、SEQ ID NO :123、SEQ ID NO :133、SEQ ID NO :143 和 SEQ ID NO :153。

[0068] 在一些实施方案中,本发明提供一种包含编码抗体 VH 多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述 VH 多肽包含选自以下组成的组的 VH-CDR1、VH-CDR2 和 VH-CDR3 氨基酸序列:SEQ ID NO :5、6 和 7;SEQ ID NO :15、16 和 17;SEQ ID NO :25、26 和 27;SEQ ID NO :35、36 和 37;SEQ ID NO :45、46 和 47;SEQ ID NO :55、56 和 57;SEQ ID NO :65、66 和 67;SEQ ID NO :75、76 和 77;SEQ ID NO :85、86 和 87;SEQ ID NO :95、96 和 97;SEQ ID NO :116、117 和 118;SEQ ID NO :126、127 和 128;SEQ ID NO :136、137 和 138;以及 SEQ ID NO :146、147 和 148;并且其中包含所述 VH-CDR3 的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。

[0069] 在一些实施方案中,本发明提供一种包含编码抗体 VL 多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述 VL 多肽包含选自以下组成的组的 VH-CDR1、VH-CDR2 和 VH-CDR3 氨基酸序列:SEQ ID NO:10、11 和 12;SEQ ID NO:20、21 和 22;SEQ ID NO:30、31 和 32;SEQ ID NO:40、41 和 42;SEQ ID NO:50、51 和 52;SEQ ID NO:60、61 和 62;SEQ ID NO:70、71 和 72;SEQ ID NO:80、81 和 82;SEQ ID NO:90、91 和 92;SEQ ID NO:100、101 和 102;SEQ ID NO:121、122 和 123;SEQ ID NO:131、132 和 133;SEQ ID NO:141、142 和 143;以及 SEQ ID NO:151、152 和 153;并且其中包含所述 VL-CDR3 的抗体或其抗原结合片段特异性地结合至 RON。

[0070] 在一些实施方案中,上述的多核苷酸还包含编码融合于所述抗体 VH 多肽或所述抗体 VL 多肽的信号肽的核酸。

[0071] 在某些其它实施方案中,上述的多核苷酸还包含编码融合于所述 VH 多肽的重链恒定区 CH1 结构域、编码融合于所述 VH 多肽的重链恒定区 CH2 结构域、编码融合于所述 VH 多肽的重链恒定区 CH3 结构域、或编码融合于所述 VH 多肽的重链铰链区的核酸。在另外的实施方案中,所述重链恒定区选自由人类 IgG4、IgG4agly、IgG1 或 IgG1agly 组成的组。

[0072] 在一些实施方案中,上述的多核苷酸包含编码融合于所述 VL 多肽的轻链恒定区结构域的核酸。在另外的实施方案中,所述轻链恒定区是人类 κ 。

[0073] 在上述多核苷酸的各种实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段特异性地结合与选自由 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10 和 M80-B03 组成的组的参考单克隆 Fab 抗体片段或选自由 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的参考单克隆抗体相同的 RON 表位。

[0074] 在上述多核苷酸的各种其它实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段竞争性地抑制选自由 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的参考单克隆 Fab 抗体片段或选自由 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的参考单克隆抗体。

[0075] 在上述多核苷酸的各种实施方案中,除了五个或更少的氨基酸取代以外,所述 VH 多肽或所述 VL 多肽的构架区是人类的。

[0076] 在上述多核苷酸的各种实施方案中,本发明提供一种包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段,其结合于线性表位或非线性构象表位。

[0077] 在上述多核苷酸的各种实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是多价的,并包含至少两条重链和至少两条轻链。

[0078] 在上述多核苷酸的某些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是多特异性的。在另外的实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是双特异性的。

[0079] 在上述多核苷酸的各种实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段包含为完全人类的重链和轻链可变结构域。在另外的实施方案中,重链和轻链可变结构域与选自由 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E 12 组成的组的单克隆 Fab 抗体片段的重链和轻链可变结构域相同。

[0080] 在上述多核苷酸的各种实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段包含为鼠的重链和轻链可变结构域。在另外的实施方案中,重链和轻链可变结构域与选自由 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的单克隆抗体的重链和轻链可

变结构域相同。

[0081] 在上述多核苷酸的各种实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是人源化的。

[0082] 在上述多核苷酸的各种实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是灵长源化的。

[0083] 在上述多核苷酸的各种实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是嵌合的。

[0084] 在上述多核苷酸的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是完全人类的。

[0085] 在上述多核苷酸的各种实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab)₂ 片段或 FV 片段。在上述多核苷酸的某些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是单链抗体。

[0086] 在上述多核苷酸的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段以解离常数 (K_D) 所表征的亲和力特异性地结合至 RON 多肽或其片段、或 RON 变体多肽,所述解离常数 (K_D) 不大于 $5 \times 10^{-2}M$ 、 $10^{-2}M$ 、 $5 \times 10^{-3}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $5 \times 10^{-4}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $5 \times 10^{-5}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $5 \times 10^{-6}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-7}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $5 \times 10^{-9}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $5 \times 10^{-10}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $5 \times 10^{-11}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $5 \times 10^{-13}M$ 、 $10^{-13}M$ 、 $5 \times 10^{-14}M$ 、 $10^{-14}M$ 、 $5 \times 10^{-15}M$ 或 $10^{-15}M$ 。

[0087] 在上述多核苷酸的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段相对于鼠 RON 多肽或其片段优先地结合至人类 RON 多肽或其片段。

[0088] 在上述多核苷酸的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段结合于细胞表面上表达的 RON。在另外的实施方案中,所述细胞是恶性细胞、增生性细胞、肿瘤细胞或转移性细胞。

[0089] 在上述多核苷酸的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段阻断 MSP 与 RON 结合。

[0090] 在上述多核苷酸的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段抑制 MSP 依赖性 RON 活化。

[0091] 在上述多核苷酸的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段抑制非 MSP 依赖性 RON 活化。

[0092] 在上述多核苷酸的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段抑制 Ras/MAPK 信号传导途径的活化。

[0093] 在上述多核苷酸的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段抑制 RON 介导的 ERK 的磷酸化。

[0094] 在上述多核苷酸的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段抑制 RON 介导的细胞增殖或肿瘤细胞生长。

[0095] 在上述多核苷酸的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段诱导凋亡。

[0096] 在一些实施方案中,上述的多核苷酸还包含编码异源性多肽的核酸。

[0097] 在上述多核苷酸的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段联合于选自由以下组成的组的剂:细胞毒性剂、治疗剂、细胞抑制剂、生物毒素、前

体药物、肽、蛋白、酶、病毒、脂质、生物反应调节剂、药物制剂、淋巴因子、异源性抗体或其片段、可检测标记、聚乙二醇 (PEG)、以及两种或两种以上任何所述剂的组合。在另外的实施方案中,所述细胞毒性剂选自由以下组成的组:放射性核素、生物毒素、酶促活性的毒素、细胞抑制性或细胞毒性治疗剂、前体药物、免疫活性的配体、生物反应调节剂、或者两种或两种以上任何所述细胞毒性剂的组合。在某些其它实施方案中,所述可检测标记选自由以下组成的组:酶、荧光标记、化学发光标记、生物发光标记、放射性标记、或者两种或两种以上任何所述可检测标记的组合。

[0098] 在一些实施方案中,本发明提供包含上述的多核苷酸的组合物。

[0099] 在某些其它实施方案中,本发明提供包含上述的多核苷酸的载体。在另外的实施方案中,所述多核苷酸可操作地与启动子缔合。在另外的实施方案中,本发明提供包含这样的载体的宿主细胞。在另外的实施方案中,本发明提供其中多核苷酸可操作地与启动子缔合的载体。

[0100] 在另外的实施方案中,本发明提供产生特异性地结合 RON 的抗体或其片段的方法,包括培养含有包含上述的多核苷酸的载体的宿主细胞,并回收所述抗体或其片段。在另外的实施方案中,本发明提供由上述方法产生的分离的多肽。

[0101] 在一些实施方案中,本发明提供由上述的多核苷酸编码的分离的多肽。

[0102] 在上述多肽的另外的实施方案中,包含所述多肽的抗体或其片段特异性地结合至 RON。其它实施方案包括包含上述多肽的分离的抗体或其片段。

[0103] 在一些实施方案中,本发明提供一种包含分离的 VH 编码多核苷酸和分离的 VL 编码多核苷酸的组合物,其中所述 VH 编码多核苷酸和所述 VL 编码多核苷酸分别包括编码与选自以下组成的组的参考氨基酸序列至少 90% 相同的氨基酸序列的核酸:SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:19;SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:29;SEQ ID NO:34 和 SEQ ID NO:39;SEQ ID NO:44 和 SEQ ID NO:49;SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:59;SEQ ID NO:64 和 SEQ ID NO:69;SEQ ID NO:74 和 SEQ ID NO:79;SEQ ID NO:84 和 SEQ ID NO:89;SEQ ID NO:94 和 SEQ ID NO:99;SEQ ID NO:115 和 SEQ ID NO:120;SEQ ID NO:125 和 SEQ ID NO:130;SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:140;以及 SEQ ID NO:145 和 SEQ ID NO:150;并且其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段特异性地结合 RON。在另外的实施方案中,所述 VH 编码多核苷酸和所述 VL 编码多核苷酸分别包括编码选自以下组成的组的氨基酸序列的核酸:SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:19;SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:29;SEQ ID NO:34 和 SEQ ID NO:39;SEQ ID NO:44 和 SEQ ID NO:49;SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:59;SEQ ID NO:64 和 SEQ ID NO:69;SEQ ID NO:74 和 SEQ ID NO:79;SEQ ID NO:84 和 SEQ ID NO:89;SEQ ID NO:94 和 SEQ ID NO:99;SEQ ID NO:115 和 SEQ ID NO:120;SEQ ID NO:125 和 SEQ ID NO:130;SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:140;以及 SEQ ID NO:145 和 SEQ ID NO:150。

[0104] 在某些其它实施方案中,本发明提供一种包含分离的 VH 编码多核苷酸和分离的 VL 编码多核苷酸的组合物,其中所述 VH 编码多核苷酸和所述 VL 编码多核苷酸分别包括编码除了少于 20 个保守性氨基酸取代以外与选自以下组成的组的参考氨基酸序列相同的氨基酸序列的核酸:SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:19;SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:29;SEQ ID NO:34 和 SEQ ID NO:39;SEQ ID NO:44 和 SEQ ID NO:49;

SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:59;SEQ ID NO:64 和 SEQ ID NO:69;SEQ ID NO:74 和 SEQ ID NO:79;SEQ ID NO:84 和 SEQ ID NO:89;SEQ ID NO:94 和 SEQ ID NO:99;SEQ ID NO:115 和 SEQ ID NO:120;SEQ ID NO:125 和 SEQ ID NO:130;SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:140;以及 SEQ ID NO:145 和 SEQ ID NO:150;并且其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段特异性地结合 RON。

[0105] 在另外的实施方案中,所述 VH 编码多核苷酸编码包含选自由以下组成的组的 VH-CDR1、VH-CDR2 和 VH-CDR3 氨基酸序列的 VH 多肽:SEQ ID NO:5、6 和 7;SEQ ID NO:15、16 和 17;SEQ ID NO:25、26 和 27;SEQ ID NO:35、36 和 37;SEQ ID NO:45、46 和 47;SEQ ID NO:55、56 和 57;SEQ ID NO:65、66 和 67;SEQ ID NO:75、76 和 77;SEQ ID NO:85、86 和 87;SEQ ID NO:95、96 和 97;SEQ ID NO:116、117 和 118;SEQ ID NO:126、127 和 128;SEQ ID NO:136、137 和 138;以及 SEQ ID NO:146、147 和 148;其中所述 VL 编码多核苷酸编码包含选自由以下组成的组的 VL-CDR1、VL-CDR2 和 VL-CDR3 氨基酸序列的 VL 多肽:SEQ ID NO:10、11 和 12;SEQ ID NO:20、21 和 22;SEQ ID NO:30、31 和 32;SEQ ID NO:40、41 和 42;SEQ ID NO:50、51 和 52;SEQ ID NO:60、61 和 62;SEQ ID NO:70、71 和 72;SEQ ID NO:80、81 和 82;SEQ ID NO:90、91 和 92;SEQ ID NO:100、101 和 102;SEQ ID NO:121、122 和 123;SEQ ID NO:131、132 和 133;SEQ ID NO:141、142 和 143;以及 SEQ ID NO:151、152 和 153;并且其中由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段特异性地结合 RON。

[0106] 在上述组合物的各种实施方案中,所述 VH 编码多核苷酸还包含编码融合于所述抗体 VH 多肽的信号肽的核酸。

[0107] 在上述组合物的各种实施方案中,所述 VL 编码多核苷酸还包含编码融合于所述抗体 VL 多肽的信号肽的核酸。

[0108] 在上述组合物的一些实施方案中,所述 VH 编码多核苷酸还包含编码融合于所述 VH 多肽的重链恒定区 CH1 结构域的核酸,还包含编码融合于所述 VH 多肽的重链恒定区 CH2 结构域的核酸,还包含编码融合于所述 VH 多肽的重链恒定区 CH3 结构域的核酸,或者还包含编码融合于所述 VH 多肽的重链铰链区的核酸。在另外的实施方案中,所述重链恒定区选自由人类 IgG4、IgG4agly、IgG1 和 IgG1agly 组成的组。

[0109] 在上述组合物的一些实施方案中,所述 VL 编码多核苷酸还包含编码融合于所述 VL 多肽的轻链恒定区结构域的核酸。在另外的实施方案中,所述轻链恒定区是人类 κ 。

[0110] 在上述组合物的一些实施方案中,由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段特异性地结合与选自由 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的参考单克隆 Fab 抗体片段或选自由 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的参考单克隆抗体相同的 RON 表位。

[0111] 在上述组合物的一些实施方案中,由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段竞争性地抑制选自由 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的参考单克隆 Fab 抗体片段或选自由 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的参考单克隆抗体与 RON 结合。

[0112] 在上述组合物的一些实施方案中,除了五个或更少的氨基酸取代以外,所述 VH 和 VL 多肽的构架区是人类的。

[0113] 在上述组合物的一些实施方案中,由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其

片段结合于线性表位或非线性构象表位。

[0114] 在上述组合物的一些实施方案中,由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段是多价的,并且包含至少两条重链和至少两条轻链。

[0115] 在上述组合物的一些实施方案中,由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段是多特异性的。在另外的实施方案中,由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段是双特异性的。

[0116] 在上述组合物的一些实施方案中,由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段包含为完全人类的重链和轻链可变结构域。在另外的实施方案中,所述重链和轻链可变结构域与选自 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的单克隆 Fab 抗体片段的重链和轻链可变结构域相同。

[0117] 在上述组合物的一些实施方案中,由所述 VH 和 VL 编码多核苷酸编码的抗体或其片段包含为鼠的重链和轻链可变结构域。在另外的实施方案中,所述重链和轻链可变结构域与选自 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的单克隆抗体的重链和轻链可变结构域相同。

[0118] 在上述组合物的各种实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是人源化的。

[0119] 在上述组合物的各种实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是灵长源化的。

[0120] 在上述组合物的各种实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是嵌合的。

[0121] 在上述组合物的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是完全人类的。

[0122] 在上述组合物的各种实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab)₂ 片段或 Fv 片段。在上述组合物的某些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段是单链抗体。

[0123] 在上述组合物的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段以解离常数 (K_D) 表征的亲和力特异性地结合至 RON 多肽或其片段、或 RON 变体多肽,其中所述解离常数 (K_D) 不大于 $5 \times 10^{-2}M$ 、 $10^{-2}M$ 、 $5 \times 10^{-3}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $5 \times 10^{-4}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $5 \times 10^{-5}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $5 \times 10^{-6}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-7}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $5 \times 10^{-9}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $5 \times 10^{-10}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $5 \times 10^{-11}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $5 \times 10^{-13}M$ 、 $10^{-13}M$ 、 $5 \times 10^{-14}M$ 、 $10^{-14}M$ 、 $5 \times 10^{-15}M$ 或 $10^{-15}M$ 。

[0124] 在上述组合物的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段相对于鼠 RON 多肽或其片段优先地结合至人类 RON 多肽或其片段。

[0125] 在上述组合物的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段结合至细胞表面上表达的 RON。在另外的实施方案中,所述细胞是恶性细胞、赘生性细胞、肿瘤细胞、转移性细胞或肿瘤相关巨噬细胞。

[0126] 在上述组合物的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段阻断 MSP 与 RON 结合。

[0127] 在上述组合物的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段抑制 MSP 依赖性 RON 活化。

[0128] 在上述组合物的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段抑制非 MSP 依赖性 RON 活化。

[0129] 在上述组合物的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段抑制 Ras/MAPK 信号传导途径的活化。

[0130] 在上述组合物的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段抑制 RON 介导的 ERK 或 AKT 的磷酸化。

[0131] 在上述组合物的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段抑制 RON 介导的细胞增殖、肿瘤细胞生长、肿瘤细胞迁移、肿瘤细胞侵入或肿瘤细胞转移。

[0132] 在上述组合物的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段诱导凋亡。

[0133] 在上述组合物的一些实施方案中,所述 VH 编码多核苷酸、所述 VL 编码多核苷酸、或所述 VH 和 VL 编码多核苷酸二者还包含编码异源性多肽的核酸。

[0134] 在上述组合物的一些实施方案中,包含由所述核酸编码的多肽的抗体或其抗原结合片段适合于选自以下组成的组的剂:细胞毒性剂、治疗剂、细胞抑制剂、生物毒素、前体药物、肽、蛋白、酶、病毒、脂质、生物反应调节剂、药物制剂、淋巴因子、异源性抗体或其片段、可检测标记、聚乙二醇 (PEG)、以及两种或两种以上任何所述剂的组合。在另外的实施方案中,所述细胞毒性剂选自以下组成的组:放射性核素、生物毒素、酶促活性的毒素、细胞抑制性或细胞毒性治疗剂、前体药物、免疫活性的配体、生物反应调节剂、或者两种或两种以上任何所述细胞毒性剂的组合。在某些其它实施方案中,所述可检测标记选自以下组成的组:酶、荧光标记、化学发光标记、生物发光标记、放射性标记、或者两种或两种以上任何所述可检测标记的组合。

[0135] 在上述组合物的一些实施方案中,所述 VH 编码多核苷酸包含在第一载体上且所述 VL 编码多核苷酸包含在第二载体上。在另外的实施方案中,所述 VH 编码多核苷酸可操作地与第一启动子缔合且所述 VL 编码多核苷酸可操作地与第二启动子缔合。在某些其它实施方案中,所述第一启动子和所述第二启动子是相同启动子的拷贝。在另外的实施方案中,所述第一启动子和所述第二启动子是不相同的。

[0136] 在上述组合物的各种实施方案中,所述第一载体和所述第二载体包含在单个宿主细胞中。

[0137] 在上述组合物的某些其它实施方案中,所述第一载体和所述第二载体包含在分别的宿主细胞中。

[0138] 在一些实施方案中,本发明提供一种产生特异性地结合 RON 的抗体或其片段的方法,包括培养上述的宿主细胞,并回收所述抗体或其片段。

[0139] 在其它实施方案中,本发明提供一种产生特异性地结合 RON 的抗体或其片段的方法,包括共培养分别的宿主细胞,并回收所述抗体或其片段。在上述方法的另外的实施方案中,本发明提供组合所述 VH 编码多肽和 VL 编码多肽,并回收所述抗体或其片段。

[0140] 在一些实施方案中,本发明提供由上述的方法产生的一种特异性地结合 RON 的抗体或其片段。

[0141] 在一些实施方案中,本发明提供组合物,其中所述 VH 和 VL 编码多核苷酸在同一载

体上,以及所述组合物所在的载体。

[0142] 在上述载体的各种实施方案中,所述 VH 和 VL 编码多核苷酸各自可操作地与启动子缔合。

[0143] 在上述载体的各种实施方案中,所述 VH 和 VL 编码多核苷酸在框内融合,从与其可操作地缔合的单个启动子共转录,并共翻译为单链抗体或其抗原结合片段。

[0144] 在上述载体的各种实施方案中,所述 VH 和 VL 编码多核苷酸从与其可操作地缔合的单个启动子共转录,但分别翻译。在另外的实施方案中,所述载体还包括安放在所述 VH 编码多核苷酸与所述 VL 编码多核苷酸之间的 IRES 序列。在某些其它实施方案中,各自与分别的启动子可操作地缔合的所述编码 VH 的多核苷酸和所述编码 VL 的多核苷酸分别转录。在另外的实施方案中,所述分别的启动子是同一启动子的拷贝,或所述分别的启动子是不相同的。

[0145] 在一些实施方案中,本发明提供包含上述载体的宿主细胞。

[0146] 在其它实施方案中,本发明提供一种产生特异性地结合 RON 的抗体或其片段的方法,包括培养上述的宿主细胞,并回收所述抗体或其片段。

[0147] 在一些实施方案中,本发明提供一种由上述的方法产生的特异性地结合 RON 的抗体或其片段。

[0148] 在一些实施方案中,本发明提供一种治疗动物的过度增生性病症的方法,包括向需要治疗的动物施用包含以下组分的组合物:a) 如上述的分离的抗体或片段;和 b) 药学上可接受的载体。在另外的实施方案中,所述过度增生性疾病或病症选自癌症、赘生物、肿瘤、恶性肿瘤、或其转移组成的组。

[0149] 在上述方法的各种实施方案中,所述抗体或其片段特异性地结合至恶性细胞表面上表达的 RON。在另外的实施方案中,所述抗体或其片段对恶性细胞的结合导致所述恶性细胞的生长抑制。

[0150] 在上述方法的各种实施方案中,所述抗体或其片段抑制 RON 磷酸化或抑制肿瘤细胞增殖。在另外的实施方案中,通过阻止或阻滞转移性生长而抑制肿瘤细胞增殖。

[0151] 在上述方法的各种实施方案中,所述抗体或其片段抑制肿瘤细胞迁移。在另外的实施方案中,通过阻止或阻滞肿瘤向相邻组织扩散而抑制肿瘤细胞增殖。

[0152] 在上述方法的各种实施方案中,所述过度增生性疾病或病症是位于以下位置的赘生物:前列腺、结肠、腹部、骨、乳房、消化系统、肝脏、胰、腹膜、肾上腺、甲状旁腺、垂体腺、睾丸、卵巢、胸腺、甲状腺、眼、头、颈、中枢神经系统、周围神经系统、淋巴系统、骨盆、皮肤、软组织、脾脏、胸部、或泌尿生殖道。

[0153] 在上述方法的各种实施方案中,所述过度增生性疾病是癌症,所述癌症选自以下组成的组:上皮鳞状细胞癌、黑素瘤、白血病、骨髓瘤、胃癌、脑癌、肺癌、胰腺癌、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、肾癌、前列腺癌、睾丸癌、甲状腺癌和头颈癌。在另外的实施方案中,所述癌症选自胃癌、肾癌、脑癌、膀胱癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌和前列腺癌组成的组。

[0154] 在上述方法的各种实施方案中,所述动物是哺乳动物。在另外的实施方案中,所述哺乳动物是人类。

附图说明

- [0155] 图 1 显示与 SW480 细胞结合的抗体的代表性 FACS 结合曲线。
- [0156] 图 2A 和 2B 显示单克隆鼠抗 RON 抗体和人类单克隆抗 RON Fab 对 MSP 与 RON 结合的作用。
- [0157] 图 3A-3C 显示抗 RON 抗体对 MB-453 乳腺癌细胞和 BxPC-3 胰腺癌细胞中 MSP 引起的 RON 磷酸化的作用。
- [0158] 图 4A-C 显示抗 RON 抗体对过表达野生型 RON 的 293 细胞、表达 RON 的组成型活化的激酶结构域突变体的细胞和 BxPC-3 胰腺细胞中非 MSP 依赖性 RON 信号传导的作用。
- [0159] 图 5 显示抗 RON 抗体对 BxPC3 和 MDA-MB-453 肿瘤细胞中 pAKT 磷酸化的作用。
- [0160] 图 6 显示与表达人类 RON 剪接变体 RON δ 160 的细胞结合的抗体的 FACS 结合曲线。
- [0161] 图 7 显示测量 RON 抗体对可溶性 RON 的结合的 ELISA 测定结果。
- [0162] 图 8 显示与表达 RON 的 293 细胞结合的抗体的 FACS 结合曲线。
- [0163] 图 9 是描绘测量与表达 RON 的 CHO 细胞结合的抗体的 FACS 测定结果的条形图。
- [0164] 图 10 显示用 RON 抗体处理的肿瘤细胞中 ERK 和磷酸-ERK 的蛋白质印迹。该条形图显示利用抗体 1P3B2.2 获得的蛋白质印迹中的结果定量。
- [0165] 图 11A 显示用 RON 抗体处理的肿瘤细胞中 AKT 和磷酸-AKT 的蛋白质印迹。图 11B 描绘条形图,显示利用抗体 1P3B2.2 获得的蛋白质印迹中的结果定量。
- [0166] 图 12 显示未处理的、用对照抗体处理的、用 MSP 处理的、或用 MSP 和抗 RON 抗体处理的各种肿瘤细胞中磷酸-AKT 和磷酸-ERK 的蛋白质印迹。
- [0167] 图 13A 显示测量 RON 抗体与可溶性人类 RON 和 cyno RON 的结合的 ELISA 测定结果。图 13B 和 13C 显示测量人类 MSP 与可溶性人类 RON (图 13C) 和 cyno (图 13B) RON 的结合的 ELISA 结果。
- [0168] 图 14A-C 显示利用 HT1080 和 HT1080-RON (图 14A)、AGS (图 14B) 和 MDA-MB-231 (图 14C) 细胞系的肿瘤细胞侵入测定结果。较高的条表示增加的细胞侵入。
- [0169] 图 15 显示测量 RON 抗体对可溶性人类 RON (Sema 和 PSI 结构域) 和 RON 的 PSI 结构域的结合的 ELISA 测定结果。
- [0170] 图 16 显示抗鼠 RON 抗体结合至表达鼠 RON 的 293 细胞的 FACS 结合曲线。
- [0171] 图 17A 显示表达鼠 RON 的且用抗鼠 RON 抗体处理的 CHO 细胞中 AKT 和磷酸-AKT 的蛋白质印迹。图 17B 显示其定量。
- [0172] 图 18A-B 显示抗鼠 RON 抗体和抗人类 RON 抗体与表达鼠 RON 蛋白 (图 18A) 或人类 (图 18B) RON 蛋白的 293 细胞结合的 FACS 结合曲线。
- [0173] 图 19 是显示在各种癌症细胞类型中 RON 表达水平和磷酸-ERK 与磷酸-AKT 的增加的表格。
- [0174] 图 20 显示展示施用了肿瘤细胞并用抗 RON 抗体治疗的 SCID 小鼠中肿瘤大小的图。箭头表示施用抗体的时间点。
- [0175] 发明详述
- [0176] I. 定义
- [0177] 注意:术语“一个”实体是指一个或多个该实体;例如“RON 抗体”理解为表示一个或多个 RON 抗体。像这样,术语“一个”、“一个或多个”和“至少一个”在本文中可互换地使

用。

[0178] 如本文所用,术语“多肽”旨在涵盖单数的“多肽”以及复数的“多肽”,并且指的是由被酰胺键(也被称作肽键)以线状连接的单体(氨基酸)所组成的分子。术语“多肽”是指含两个或更多个氨基酸的任何链,并且不是指特定长度的产物。因此,肽、二肽、三肽、低聚肽、“蛋白”、“氨基酸链”或用来指两个或更多个氨基酸的链的任何其它术语被包括在“多肽”的定义之中,而且术语“多肽”可替代这些术语中的任何一个使用或者可与这些术语中的任何一个互换地使用。术语“多肽”也意指多肽的表达后修饰的产物,所述修饰包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、由已知的保护/封端基团进行的衍生作用、蛋白酶剪切或由非天然存在的氨基酸进行的修饰。多肽可由天然生物来源得到或由重组技术产生,但不一定是从指定的核酸序列翻译而来。它能够以任何方式产生,包括通过化学合成。

[0179] 本发明的多肽可以具有大约3个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、25个或更多个、50个或更多个、75个或更多个、100个或更多个、200个或更多个、500个或更多个、1,000个或更多个或者2,000个或更多个氨基酸的大小。多肽可具有确定的三维结构,虽然它们不一定具有这种结构。具有确定的三维结构的多肽被称为是折叠的,而不具有确定的三维结构的多肽反而能够采用大量不同构象并且被称为是未折叠的。如本文所用,术语糖蛋白是指与至少一个碳水化合物部分偶联的蛋白,其中所述碳水化合物部分是通过氨基酸残基例如丝氨酸残基或天冬酰胺残基的含氧或含氮侧链连接至蛋白的。

[0180] “分离的”多肽或其片段、变体或衍生物意为不处于其天然环境的多肽。不需要特定水平的纯化。例如,分离的多肽可从其天生的或天然的环境中取出。表达在宿主细胞中的重组产生的多肽和蛋白被认为是为了本发明的目的而分离的,就像已通过任何适合的技术而分离、分馏或者部分地或基本上纯化的天然或重组多肽一样。

[0181] 本发明的多肽还包括前述多肽的片段、衍生物、类似物或变体及其任意组合。当指本发明的RON抗体或抗体多肽时,术语“片段”、“变体”、“衍生物”和“类似物”包括保留相应的天然抗体或多肽的至少一些抗原结合特性的任何多肽。本发明多肽的片段包括蛋白酶解片段以及缺失片段,另外还包括本文在别处所讨论的具体抗体片段。本发明的RON抗体和抗体多肽的变体包括上述的片段,并且还包括含有由于氨基酸取代、缺失或插入所致的氨基酸序列改变的多肽。变体可天然地存在或非天然地存在。可以使用领域已知的诱变技术产生非天然地存在的变体。变体多肽可包括保守的或非保守的氨基酸取代、缺失或添加。本发明的RON抗体和抗体多肽的衍生物是已被改变以表现未见于天然多肽的其它特征的多肽。实例包括融合蛋白。变体多肽在本文还称为“多肽类似物”。如本文所用,RON抗体或抗体多肽的“衍生物”是指具有通过功能侧基的反应而化学衍生出的一个或多个残基的主题多肽。还包括为“衍生物”的是包含二十种标准氨基酸的一种或多种自然产生的氨基酸衍生物的肽。例如,4-羟基脯氨酸可以取代脯氨酸;5-羟基赖氨酸可以取代赖氨酸;3-甲基组氨酸可以取代组氨酸;高丝氨酸可以取代丝氨酸;以及鸟氨酸可以取代赖氨酸。

[0182] 术语“多核苷酸”旨在涵盖单数的核酸以及复数的核酸,并且是指分离的核酸分子或构建体,例如信使RNA(mRNA)或质粒DNA(pDNA)。多核苷酸可包括常规的磷酸二酯键或非常规的键(例如酰胺键,像在肽核酸(PNA)中发现的)。术语“核酸”是指任何一个或多个核酸区段,例如存在于多核苷酸中的DNA或RNA片段。“分离的”核酸或多核苷酸是指从其天生环境被取出的核酸分子、DNA或RNA。例如,为了本发明的目的,包含在载体中的编码

RON 抗体的重组多核苷酸被视为分离的。分离的多核苷酸的另外的实例包括被保持在异源宿主细胞中的重组多核苷酸或溶液中的（部分地或基本上）纯化的多核苷酸。分离的 RNA 分子包括本发明多核苷酸的体内或体外 RNA 转录物。根据本发明的分离的多核苷酸或核酸还包括通过合成而产生的那些分子。另外，多核苷酸或核酸可以是调节元件或者可以包括调节元件，例如启动子、核糖体结合位点或转录终止子。

[0183] 如本文所用，“编码区”是由翻译为氨基酸的密码子所组成的核酸分子的一部分。虽然“终止密码子”(TAG、TGA 或 TAA) 未被翻译为氨基酸，但它可被视为编码区的一部分，然而任何旁侧序列例如启动子、核糖体结合位点、转录终止子、内含子以及诸如此类不是编码区的一部分。本发明的两个或多个编码区可存在于单个多核苷酸构建体中例如在单个载体上，或者在分别的多核苷酸构建体中例如在分别的（不同的）载体上。此外，任何载体可含有单个编码区，或者可包括两个或更多编码区，例如单个载体可分别编码免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区。另外，本发明的载体、多核苷酸或核酸可编码异源性编码区，所述异源性编码区被融合或未被融合至编码 RON 抗体或其片段、变体或衍生物的核酸。异源性编码区包括但不限于专门的元件或模体，例如分泌信号肽或异源性功能域。

[0184] 在某些实施方案中，所述多核苷酸或核酸是 DNA。在 DNA 的情况下，包括编码多肽的核酸在内的多核苷酸通常可包含与一个或多个编码区可操作地缔合的启动子和 / 或其它转录或翻译控制元件。可操作的缔合是指基因产物例如多肽的编码区以这样一种方式与一个或多个调节序列相缔合以将该基因产物的表达置于所述一个或多个调节序列的影响或控制之下。两个 DNA 片段（例如多肽编码区和与之相缔合的启动子）是“可操作地缔合的”，如果启动子功能的诱导导致编码期望的基因产物的 mRNA 的转录并且如果这两个 DNA 片段之间的连接的性质不干扰表达调节序列指导该基因产物的表达的能力或不干扰 DNA 模板被转录的能力的话。因此，可将启动子区与编码多肽的核酸可操作地缔合，如果所述启动子能够实现该核酸的转录。所述启动子可以是只在预先确定的细胞中指导 DNA 的大量转录的细胞特异性启动子。除了启动子之外的其它转录控制元件，例如增强子、操纵子、阻抑物和转录终止信号，能够与多核苷酸可操作地缔合以指导细胞特异性转录。适合的启动子和其它转录控制区公开在本文中。

[0185] 本领域技术人员知道各种转录控制区。这些包括但不限于在脊椎动物细胞中起作用的转录控制区，例如但不限于来自如下病毒的启动子和增强子区段：细胞巨化病毒（与内含子 A 一起的立即早期启动子）、猿猴病毒 40（早期启动子）和逆转录病毒（例如劳氏肉瘤病毒）。其它的转录控制区包括源自脊椎动物基因的那些，例如肌动蛋白、热激蛋白、牛生长激素和兔 β -球蛋白，以及能够控制真核细胞中的基因表达的其它序列。另外的适合的转录控制区包括组织特异性启动子和增强子以及淋巴因子诱导的启动子（例如可被干扰素或白细胞介素诱导的启动子）。

[0186] 相似地，各种翻译控制元件是本领域普通技术人员已知的。这些包括但不限于核糖体结合位点、翻译起始密码子和终止密码子以及源自微小 RNA 病毒的元件（特别是内部核糖体进入位点或 IRES，其也被称作 CITE 序列）。

[0187] 在其它的实施方案中，本发明的多核苷酸是 RNA，例如以信使 RNA (mRNA) 的形式。

[0188] 本发明的多核苷酸和核酸编码区可与编码分泌肽或信号肽的另外的编码区相缔合，其中所述分泌肽或信号肽指导由本发明的多核苷酸编码的多肽的分泌。根据信号假说，

由哺乳动物细胞分泌的蛋白具有信号肽或分泌前导序列,其在生长中的蛋白链跨粗面内质网输出被启动时从成熟蛋白上被切下。本领域普通技术人员知道,由脊椎动物细胞分泌的多肽通常具有融合至所述多肽 N 端的信号肽,其从完整的或“全长”的多肽被切下以产生分泌的或“成熟的”形式的多肽。在某些实施方案中,使用天然的信号肽例如免疫球蛋白重链或轻链信号肽,或者该序列的功能衍生物,所述功能性衍生物保持了指导与之可操作地缔合的多肽分泌的能力。或者,可以使用异源性哺乳动物信号肽或其功能性衍生物。例如,可以用人类组织纤溶酶原激活剂 (TPA) 或小鼠 β -葡萄糖醛酸酶的前导序列取代野生型前导序列。

[0189] 本发明还涉及某些 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物。除非具体地指原尺寸的抗体诸如自然产生的抗体,否则术语“RON 抗体”涵盖原尺寸的抗体以及这样的抗体的抗原结合片段、变体、类似物或衍生物,例如,以类似于抗体分子的方式结合抗原的天然产生的抗体或免疫球蛋白分子或改造的抗体分子或片段。

[0190] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文中被互换地使用。抗体或免疫球蛋白至少包含重链的可变结构域,并且通常至少包含重链和轻链的可变结构域。脊椎动物系统中基本的免疫球蛋白结构被理解得相对较好。参见,例如 Harlow 等人, *Antibodies :A Laboratory Manual* (抗体:实验手册), (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第 2 版, 1988)。

[0191] 下面将更详细地讨论到,术语“免疫球蛋白”包括可通过生物化学手段区别的各种广泛类别的多肽。本领域技术人员将理解,重链被分类为 gamma、mu、alpha、delta 或 epsilon (γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ) 以及它们中的一些亚类(例如, $\gamma 1$ - $\gamma 4$)。此链的性质决定抗体的“类别”分别为 IgG、IgM、IgA、IgG 或 IgE。免疫球蛋白亚类(同种型)例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 等被很好地表征并已知给予功能专门化。这些类别和同种型的各自的修饰形式是可由技术人员鉴于本公开而容易辨别的,并且因此在本发明的范围内。所有的免疫球蛋白类别都清楚地在本发明的范围内,下面的讨论通常将针对免疫球蛋白分子的 IgG 类别。关于 IgG,标准的免疫球蛋白分子包含两个分子量大约为 23,000 道尔顿的相同的轻链多肽和两个分子量为 53,000-70,000 的相同的重链多肽。这四条链通常被二硫键以“Y”构型连结,其中所述轻链支撑所述重链,其中所述重链从“Y”的口开始并延伸通过可变区。

[0192] 轻链被分类为 kappa 或 lambda (κ , λ)。每个重链类别可与 κ 或 λ 轻链结合。通常,轻链和重链互相以共价键相连,并且当免疫球蛋白由杂交瘤、B 细胞或基因工程改造的宿主细胞产生时,两条重链的“尾”部由共价的二硫键连接或非共价的连接相连。在重链中,氨基酸序列从处于 Y 构型叉端的 N 端向处于每条链底部的 C 端延伸。

[0193] 轻链和重链均被划分成结构和功能同源的一些区域。术语“恒定”和“可变”是就功能而言使用的。就此而言,将理解轻链 (VL) 和重链 (VH) 部分的可变结构域均决定抗原的识别和特异性。相反地,轻链的恒定结构域 (CL) 和重链的恒定结构域 (CH1、CH2 或 CH3) 赋予重要的生物特性,诸如分泌、经胎盘移动、Fc 受体结合、补体结合等。按照惯例,恒定区结构域的编号随着它们离抗原结合位点或抗体的氨基端更远而增加。N 端部分是可变区,而在 C 端部分是恒定区;CH3 和 CL 结构域实际上分别包含重链和轻链的羧基端。

[0194] 如上指出,可变区允许抗体选择性地识别并特异性地结合抗原上的表位。也就是说,抗体的 VL 结构域和 VH 结构域,或者多个互补决定区 (CDR) 的亚组联合形成定义三维抗原结合位点的可变区。这种四级抗体结构形成存在于 Y 每条臂末端的抗原结合位点。更

具体地,抗原结合位点是由在每条 VH 和 VL 链上的三个 CDR 所定义的。在一些情况下,例如来源于骆驼科动物物种或根据骆驼科动物免疫球蛋白工程化的某些免疫球蛋白分子,完整的免疫球蛋白分子可以只由重链组成而不含轻链。参见,例如 Hamers-Casterman 等人, Nature 363 :446-448(1993)。

[0195] 在天然存在的抗体中,各抗原结合结构域中存在的六个“互补决定区”或“CDR”是当抗体采取它在水环境中的三维构型时被特定地设置以形成抗原结合结构域的短的、不连续的氨基酸序列。抗原结合结构域中余下的氨基酸显示较少的分子间差异性,称作“构架”区。构架区很大程度地采用 β 折叠构象而且 CDR 形成环,所述环连接 β 折叠结构并且在一些情况下形成 β 折叠结构的一部分。因此,构架区起到形成支架的作用,所述支架有助于通过链间非共价相互作用而将六个 CDR 置于正确的方向。由放置的 CDR 形成的抗原结合结构域确定与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。该互补的表面促进抗体与其同类表位的非共价结合。对任何给定的重链或轻链可变区,分别包含 CDR 和构架区的氨基酸可由本领域普通技术人员容易地识别,因为它们已被准确地界定(参见,“Sequence of Proteins of Immunological Interest(免疫学上重要蛋白的序列)”Kabat,E. 等人,美国卫生和服务部(U. S. Department of Health and Human Services), (1983); 以及 Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol., 196 :901-917(1987),其全文以引用的方式并入本文)。

[0196] 在本领域中使用和 / 或公认术语的存在两种或两种以上定义的情况下,除非明确说明相反,否则如本文所用的术语的定义意为包括所有这样的含义。具体的实例是使用术语“互补决定区”(“CDR”)来描述见于重链和轻链多肽二者的可变区中的不连续抗原组合位点。这一特定区域已经描述在 Kabat 等人,美国卫生和服务部,“Sequence of Proteins of Immunological Interest(免疫学上重要蛋白的序列)”(1983) 和 Chothia 等人, J. Mol. Biol. 196 :901-917(1987),其以引用的方式并入本文,其中定义包括彼此比较时氨基酸残基的重叠或亚组。然而,应用任一种定义来指抗体或其变体的 CDR 意为在本文定义和使用的术语的范围之内。包含以上引用的参考文献定义的 CDR 的适当的氨基酸残基列在下表 1 中作为比较。包含特定 CDR 的准确残基数将依赖于 CDR 的序列和大小而变化。给出抗体的可变区氨基酸序列时,本领域技术人员可常规地确定哪些残基包含特定 CDR。

[0197] 表 1. CDR 定义¹

[0198]

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	53-55
VH CDR3	95-102	96-101
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52

VL CDR3	89-97	91-96
---------	-------	-------

[0199] ¹表 1 中所有的 CDR 定义的编号是根据由 Kabat 等人阐明的编号协议（参见以下）。

[0200] Kabat 等人还定义了可变结构域序列的编号系统，其适用于任何抗体。本领域普通技术人员可明确地将该“Kabat 编号”系统指定给任何可变结构域序列而不依赖于除序列自身之外的任何实验数据。如本文所用，“Kabat 编号”是指由 Kabat 等人，美国卫生和服务部，“Sequence of Proteins of Immunological Interest(免疫学上重要蛋白的序列)”(1983) 所阐述的编号系统。除非另外指出，否则提及本发明的 RON 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物中具体氨基酸残基位置的编号是根据 Kabat 编号系统。

[0201] 在骆驼科动物物种中，称为 VHH 的重链可变区形成完整的抗原结合结构域。骆驼科动物 VHH 可变区与来源于常规抗体的可变区 (VH) 之间的主要差异包括：(a) 与 VHH 中的对应区域相比，VH 的轻链接触表面中疏水氨基酸更多，(b) VHH 中 CDR3 更长，并且 (c) VHH 中 CDR1 与 CDR3 之间频繁出现二硫键。

[0202] 本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包括但不限于：多克隆的、单克隆的、多特异性的、人类的、人源化的、灵长源化的或嵌合的抗体，单链抗体，表位结合片段例如 Fab、Fab’ 和 F(ab’)₂，Fd，Fv，单链 Fv (scFv)，单链抗体，二硫键连接的 Fv (sdFv)，包含 VL 或 VH 结构域的片段，由 Fab 表达文库产生的片段，以及抗独特型（抗 Id）抗体（包括例如针对本文所公开的 RON 抗体的抗 Id 抗体）。ScFv 分子是本领域中已知的并被描述在例如美国专利 5,892,019 中。本发明的免疫球蛋白或抗体分子可以是免疫球蛋白分子的任何类型（例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY）、类（例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2）或亚类。

[0203] 包括单链抗体的抗体片段可包括单独的或与下面的整体或一部分组合的一个或多个可变区：铰链区、CH1、CH2 和 CH3 结构域。本发明还包括抗原结合片段，其也包括一个或多个可变区与铰链区、CH1、CH2 和 CH3 结构域的任何组合。本发明的抗体或其免疫特异性片段可以来自包括鸟和哺乳动物的任何动物来源。优选地，所述抗体是人类、鼠、驴、兔、山羊、豚鼠、骆驼、美洲驼、马或鸡的抗体。在另一个实施方案中，所述可变区可以是软骨鱼类 (condricthoid) 来源的（例如来自鲨鱼）。如本文所用，“人类”抗体包括具有人类免疫球蛋白氨基酸序列的抗体，并且包括从人类免疫球蛋白文库或从转基因动物分离的抗体，其中所述转基因动物表达一种或多种人类免疫球蛋白且不表达内源性免疫球蛋白，如下文所述并且例如在 Kucherlapati 等人的美国专利第 5,939,598 号中。即使在抗体中进行氨基酸取代，人类抗体仍然是“人类”的。

[0204] 如本文所用，术语“重链部分”包括来源于免疫球蛋白重链的氨基酸序列。包含重链部分的多肽包括以下中的至少一个：CH1 结构域、铰链（例如上、中和 / 或下铰链区）结构域、CH2 结构域、CH3 结构域、或其变体或片段。例如，本发明所用的结合多肽可包括含有 CH1 结构域的多肽链；含有 CH1 结构域、铰链结构域的至少一部分和 CH2 结构域的多肽链；含有 CH1 结构域和 CH3 结构域的多肽链；含有 CH1 结构域、铰链结构域的至少一部分和 CH3 结构域的多肽链；或者含有 CH1 结构域、铰链结构域的至少一部分、CH2 结构域和 CH3 结构域的多肽链。在另一个实施方案中，本发明的多肽包括含有 CH3 结构域的多肽链。此外，本发明所用的结合多肽可缺少 CH2 结构域的至少一部分（例如 CH2 结构域的全部或部分）。

如上所述,本领域普通技术人员将理解,这些结构域(例如重链部分)可被修饰以使它们在氨基酸序列上不同于天然存在的免疫球蛋白分子。

[0205] 在本文公开的某些 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物中,多聚体的一条多肽链的重链部分与所述多聚体的第二条多肽链上的那些相同。或者,本发明含有重链部分的单体是不相同的。例如,每个单体可包括不同的靶结合位点,形成例如双特异性抗体。

[0206] 用于本文所公开的诊断方法和治疗方法的结合多肽的重链部分可来源于不同的免疫球蛋白分子。例如,多肽的重链部分可包括来源于 IgG1 分子的 CH1 结构域和来源于 IgG3 分子的铰链区。在另一个实例中,重链部分可包括部分来源于 IgG1 分子和部分来源于 IgG3 分子的铰链区。在另一个实例中,重链部分可包括部分来源于 IgG1 分子和部分来源于 IgG4 分子的嵌合铰链。

[0207] 如本文所用,术语“轻链部分”包括来源于免疫球蛋白轻链的氨基酸序列。优选地,所述轻链部分包括 VL 或 CL 结构域中的至少一个。

[0208] 本文所公开的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物可从它们识别或特异性结合的抗原的一个或多个表位或一个或多个部分方面来描述或说明,例如靶多肽 (RON)。靶多肽与抗体的抗原结合结构域特异性相互作用的部分是“表位”或“抗原决定簇”。靶多肽可包括单个表位,但通常包括至少两个表位,并且可包括任何数目的表位,这取决于抗原的大小、构象和类型。此外,应该注意的是,靶多肽上的“表位”可以是非多肽元件或者包括非多肽元件,例如“表位”可包括碳水化合物侧链。

[0209] 抗体的肽表位或多肽表位的最小尺寸被认为是大约 4 至 5 个氨基酸。肽或多肽表位优选地含有至少 7 个,更优选地至少 9 个并且最优选地在至少约 15 个和约 30 个氨基酸之间。因为 CDR 能识别处于三级形式的抗原性肽或多肽,所以含有一个表位的氨基酸不需要是连续的,并且在一些情况下甚至可以不在相同的肽链上。在本发明中,由本发明 RON 抗体所识别的肽或多肽表位含有具有至少 4 个、至少 5 个、至少 6 个、至少 7 个,更优选地至少 8 个、至少 9 个、至少 10 个、至少 15 个、至少 20 个、至少 25 个,或者在约 15 个和约 30 个之间的连续或不连续的 RON 氨基酸的序列。

[0210] 所谓“特异性地结合”,它通常是指抗体通过其抗原结合结构域结合至表位,并且所述结合需要抗原结合结构域与表位之间的一定的互补性。根据此定义,当抗体通过其抗原结合结构域结合至表位比它与随机、无关表位结合更容易时,表述为抗体“特异性地结合”至该表位。本文使用术语“特异性”来限定某一抗体藉以结合至某一表位的相对亲和力。例如,可能认为抗体“A”对于给定表位比抗体“B”具有更高特异性,或抗体“A”可以被表述为以比其对相关的表位“D”更高的特异性结合至表位“C”。

[0211] 所谓“优先地结合”,它是指抗体特异性地结合至表位比其结合至相关的、相似的、同源的或类似的表位更容易。因此,“优先地结合”至给定表位的抗体相比于其与相关表位的结合将更可能与该表位结合,即使这样的抗体可能与相关表位交叉反应。

[0212] 通过非限制性示例的方式,如果抗体以小于其对第二表位的解离常数 (KD) 的 KD 结合第一表位,可认为该抗体优先地结合所述第一表位。在另一非限制性实例中,如果抗体以比它对第二表位的 K_D 小至少一个数量级的亲和力结合第一表位,可认为该抗体优先地结合第一抗原。在另一非限制性实例中,如果抗体以比抗体对第二表位的 K_D 小至少两个数量级的亲和力结合第一表位,可认为该抗体优先地结合第一表位。

[0213] 在另一非限制性实例中,如果抗体以小于抗体对第二表位的解离速率 ($k(\text{off})$) 的 $k(\text{off})$ 结合第一表位,可认为该抗体优先地结合第一表位。在另一非限制性实例中,如果抗体以比它对第二表位的 $k(\text{off})$ 小至少一个数量级的亲和力结合第一表位,可认为该抗体优先地结合第一表位。在另一非限制性实例中,如果抗体以比它对第二表位的 $k(\text{off})$ 小至少两个数量级的亲和力结合第一表位,可认为该抗体优先地结合第一表位。

[0214] 本文公开的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可描述为以小于或等于 $5 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-2}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或 10^{-3}sec^{-1} 的解离速率 ($k(\text{off})$) 结合本文公开的靶多肽或其片段或变体。更优选地,本发明的抗体可描述为以小于或等于 $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-4}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 或 10^{-5}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-6} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-6}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-7} \text{sec}^{-1}$ 或 10^{-7}sec^{-1} 的解离速率 ($k(\text{off})$) 结合本文公开的靶多肽或其片段或变体。

[0215] 本文公开的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可描述为以大于或等于 $10^3 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $10^4 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 或 $5 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 的结合速率 ($k(\text{on})$) 结合本文公开的靶多肽或其片段或变体。更优选地,本发明的抗体可描述为以大于或等于 $10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $10^6 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 或 $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 或 $10^7 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 的结合速率 ($k(\text{on})$) 结合本文公开的靶多肽或其片段或变体。

[0216] 如果抗体优先地结合给定表位的程度导致其在某种程度上阻碍了参考抗体与给定表位的结合,那么抗体被描述为竞争性地抑制参考抗体与给定表位的结合。可通过本领域熟知的任何方法来确定竞争性抑制,例如竞争 ELISA 测定。抗体可被描述为竞争性地抑制参考抗体与给定表位的结合至少 90%、至少 80%、至少 70%、至少 60% 或至少 50%。

[0217] 如本文所用,术语“亲和力”是指单独表位与免疫球蛋白分子的 CDR 的结合强度的量度。参见,例如 Harlow 等人, *Antibodies: A Laboratory Manual* (抗体:实验手册), (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第 2 版, 1988) 中第 27-28 页。如本文所用,术语“亲合力”是指免疫球蛋白的群体与抗原之间形成的复合物的总的稳定性,也就是免疫球蛋白混合物与抗原的功能性结合强度。参见,例如 Harlow 第 29-34 页。亲合力与群体中单个免疫球蛋白与特定表位的亲和力还有免疫球蛋白和抗原的价二者有关。例如,二价的单克隆抗体与具有高度重复的表位结构的抗原如多聚体之间的相互作用将是高度亲合力的一种。

[0218] 本发明的 RON 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物还可以从其交叉反应性方面描述或指明。如本文所用,术语“交叉反应性”是指对一种抗原有特异性的抗体与第二抗原反应的能力;是两种不同抗原性物质之间相关性的量度。因此,如果一种抗体结合至除了诱导其形成的表位之外的表位,则它是交叉反应性的。交叉反应性表位通常含有许多与诱导表位相同的互补结构特征,并且在一些情况下实际上可以比原先的表位适合得更好。

[0219] 例如,某些抗体具有某些程度的交叉反应性,原因是它们结合相关的但不相同的表位,例如与参考表位具有至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 70%、至少 65%、至少 60%、至少 55%、和至少 50% 同一性(如使用本领域已知的和本文所描述的方法计算)的表位。如果抗体不结合与参考表位有小于 95%、小于 90%、小于 85%、小于 80%、小于 75%、小于 70%、小于 65%、小于 60%、小于 55% 以及小于 50% 同一性(如使用本领域已知的和本文所描述的方法计算)的表位,则可以表述为它具有很少的交叉反应性或没有交叉反应性。如果抗体不结合某一表位的任何其它类似物、直向同源物或同系物,它可被视为对该表位“高度特异性的”。

[0220] 本发明的 RON 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物还可以从其对本发明的多肽的结合亲和力方面描述或指明。优选的结合亲和力包括具有小于 $5 \times 10^{-2} \text{M}$ 、 10^{-2}M 、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ 、 10^{-3}M 、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 10^{-4}M 、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 10^{-5}M 、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 10^{-6}M 、 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 10^{-7}M 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 10^{-8}M 、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 10^{-9}M 、 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 10^{-10}M 、 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 10^{-11}M 、 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 、 10^{-12}M 、 $5 \times 10^{-13} \text{M}$ 、 10^{-13}M 、 $5 \times 10^{-14} \text{M}$ 、 10^{-14}M 、 $5 \times 10^{-15} \text{M}$ 或 10^{-15}M 的解离常数或 Kd 的结合亲和力。

[0221] 本发明的 RON 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以是“多特异性的”，如双特异性的、三特异性的或更大的多特异性，表示其同时识别并结合至一个或多个不同抗原（如，蛋白）上存在的两个或多个不同表位。因此，RON 抗体是“单特异性的”或“多特异性的”，如“双特异性的”，是指结合多肽与之反应的不同表位的数目。多特异性的抗体对本文所述的靶多肽不同表位可以是特异性的，或对靶多肽以及对异源性表位诸如异源性多肽或固态支持材料可以是特异性的。

[0222] 如本文所用，术语“价”是指在 RON 抗体、结合多肽或抗体中存在的可能的结合结构域如抗原结合结构域的数目。每种结合结构域特异性地结合一种表位。当 RON 抗体、结合多肽或抗体包括多于一个结合结构域时，每个结合结构域可特异性地结合相同表位，对于具有两个结合结构域的抗体称为“二价单特异性”，或每个结合结构域可特异性地结合不同表位，对于具有两个结合结构域的抗体称为“二价双特异性的”。抗体对于每种特异性还可以是双特异性和二价的（称为“双特异性的四价抗体”）。在另一实施方案中，可制备四价微型抗体 (minibody) 或结构域缺失的抗体。

[0223] 双特异性的二价抗体以及制备它们的方法描述在例如美国专利第 5,731,168、5,807,706、5,821,333 号以及美国申请公布第 2003/020734 和 2002/015537 号中，其所有公开内容以引用的方式并入本文。双特异性的四价抗体以及制备它们的方法描述在例如 WO 02/096948 和 WO 00/44788 中，其所有公开内容以引用的方式并入本文。通常参见 PCT 公布 W093/17715；WO 92/08802；WO 91/00360；WO 92/05793；Tutt 等人，J. Immunol. 147：60-69(1991)；美国专利第 4,474,893、4,714,681、4,925,648、5,573,920、5,601,819 号；Kostelny 等人，J. Immunol. 148：1547-1553(1992)。

[0224] 如之前指出的，各种免疫球蛋白类别的恒定区的亚基结构和三维构型是公知的。如本文所用，术语“VH 结构域”包括免疫球蛋白重链的氨基端可变结构域，并且术语“CH1 结构域”包括免疫球蛋白重链的第一（最氨基端）恒定区结构域。所述 CH1 结构域与 VH 结构域邻近，并且是在免疫球蛋白重链分子铰链区的氨基端。

[0225] 如本文所用，术语“CH2 结构域”包括利用常规编号方案（残基 244 至 360，Kabat 编号系统；和残基 231-340，EU 编号系统；参见 Kabat EA 等人，同上）从抗体的约残基 244 至残基 360 延伸的重链分子的部分。CH2 结构域在其不与另外的结构域紧密配对方面是独特的。相反地，两条 N 连接的支链碳水化合物链被放入完整的天然 IgG 分子的两个 CH2 结构域之间。也被许多资料证明的是，CH3 结构域从 IgG 分子的 CH2 结构域延伸到 C 端，并包括大约 108 个残基。

[0226] 如本文所用，术语“铰链区”包括连接 CH1 结构域和 CH2 结构域的重链分子的部分。此铰链区包括大约 25 个残基并且是可弯曲的，因此其允许所述两个 N 端抗原结合区独立地移动。铰链区可被细分为三个不同的结构域：上、中和下铰链结构域 (Roux 等人，J. Immunol. 161：4083(1998))。

[0227] 如本文所用,术语“二硫键”包括两个硫原子之间形成的共价键。氨基酸半胱氨酸包含一个巯基,可以与第二巯基形成二硫键或桥。在多数天然存在的 IgG 分子中,CH1 和 CL 区通过二硫键连接,并且两个重链通过在对应于使用 Kabat 编号系统的 239 和 242 位 (EU 编号系统的 226 或 229 位) 的两个二硫键连接。

[0228] 如本文所用,术语“嵌合抗体”是指在其中免疫反应性区域或位点是从第一物种获得或衍生的,而恒定区 (其可以是完整的、部分的或根据本发明而修饰的) 是从第二物种获得的任何抗体。在优选的实施方案中,靶结合区域或位点将来自非人类来源 (例如小鼠或灵长类) 而恒定区是人类的。

[0229] 如本文所用,术语“工程化的抗体”是指这样的抗体,在其中重链和轻链任意一个或二者的可变结构域被改变,所述改变是通过具有已知特异性的抗体的一个或多个 CDR 的至少部分的替换,并且如果必要,是通过部分的构架区替换和序列改变。虽然 CDR 可来源于与构架区所来源的抗体相同的类别或甚至亚类别的抗体,据设想,所述 CDR 将来源于不同类别的抗体并且优选地来源于不同物种的抗体。在本文中被称作“人源化的抗体”是工程化的抗体,在其中来自具有已知特异性的非人类抗体的一个或多个“供体”CDR 被移植进人类重链或轻链构架区。用来自供体可变区的完整的 CDR 来替换所有 CDR 以将一个可变结构域的抗原结合能力转移至另一个可能不是必需的。相反地,可能只需转移对于维持靶结合位点的活性必要的那些残基。根据例如美国专利第 5,585,089、5,693,761、5,693,762 和 6,180,370 号中所述的解释,通过进行常规的实验或者试错测试 (trial and error testing) 来获得功能性工程化的或人源化的抗体完全是在本领域技术人员的能力之内。

[0230] 如本文所用,术语“适当地折叠的多肽”包括这样的多肽 (例如 RON 抗体),在其中包括所述多肽的所有功能性结构域都是明显地有活性的。如本文所用,术语“不适当地折叠的多肽”包括这样的多肽,在其中所述多肽的功能性结构域中的至少一个没有活性。在一个实施方案中,适当地折叠的多肽包括被至少一个二硫键连接的多肽链,并且相反地,不适当地折叠的多肽包括不被至少一个二硫键连接的多肽链。

[0231] 如本文所用,术语“工程化的”包括通过合成手段 (例如,通过重组技术、体外肽合成、通过肽的酶促或化学偶联,或者这些技术的组合) 对核酸或多肽分子进行的操作。

[0232] 如本文所用,术语“连接的”、“融合的”或者“融合”可以互换使用。这些术语是指通过包括化学耦联或重组手段在内的任何手段将两个以上的要素或成分联合到一起。“框内融合”是指将两个或两个以上的多核苷酸开放阅读框 (ORF) 连在一起形成一个连续的更长的 ORF,连接方式保持原始 ORF 的正确翻译阅读框。因此,重组融合蛋白是含有两个或两个以上区段的单个蛋白,所述区段对应于由原始 ORF 编码的多肽 (这些区段在自然界中正常不会那样连在一起)。虽然全部融合区段的阅读框被如此制成了连续的,这些区段可以被例如框架内连接序列在物理上或空间上分隔开。例如,编码免疫球蛋白可变区 CDR 的多核苷酸可被融合在框内但被编码至少一个免疫球蛋白构架区或另外的 CDR 区的多核苷酸分开,只要“融合的”CDR 作为连续多肽的一部分而被共同翻译。

[0233] 在多肽的背景下,“线性序列”或“序列”是处于氨基端到羧基端方向的多肽中氨基酸的顺序,其中序列中彼此相邻的残基在该多肽的一级结构中是连续的。

[0234] 本文所用术语“表达”是指基因藉以产生生物化学产物例如 RNA 或多肽的一种过程。该过程包括对细胞中基因的功能性存在的任何表现,其包括但不限于基因敲减以及瞬

时表达和稳定表达二者。它包括但不限于将基因转录成信使 RNA (mRNA)、转运 RNA (tRNA)、小发夹 RNA (shRNA)、小干扰 RNA (siRNA) 或任何其它 RNA 产物, 以及将这种 mRNA 翻译成一种或多种多肽。如果最终期望的产物是生物化学产物, 那么表达包括该生物化学产物和任何前体的产生。基因的表达产生“基因产物”。如本文所用, 基因产物可以是核酸 (例如由基因转录产生的信使 RNA) 或者从转录物翻译而来的多肽。本文所述的基因产物还包括具有转录后修饰 (例如多腺苷酸化) 的核酸或者具有翻译后修饰的多肽, 所述翻译后修饰例如甲基化、糖基化、脂质的加入、与其它蛋白亚基缔合、蛋白酶剪切以及诸如此类。

[0235] 如本文所用, 术语“治疗”是指治疗学上的治疗和预防或防止的措施, 其中目标是防止或延缓 (减轻) 不期望的生理改变或病症, 例如癌症的发生或扩散。有益的或期望的临床结果包括但不限于症状的缓解、疾病范围的减小、疾病的稳定 (即不继续恶化的) 状态、疾病演变的延迟或减缓、疾病状态的改善或减轻、以及缓和 (部分的或完全的), 不论是可检测的或是不可检测的。“治疗”还可以指与不接受治疗时所预期的存活相比存活的延长。需要治疗的那些人包括已经具有病况或病症的那些人以及倾向于具有病况或病症的那些人或者其中病况或病症有待预防的那些人。

[0236] “受治疗者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”是指如下的任何受治疗者, 特别是哺乳动物受治疗者: 对其而言诊断、预后或治疗是期望的。哺乳动物受治疗者包括人类、家畜、农畜和动物园、体育或宠物动物, 如狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、奶牛等等。

[0237] 如本文所用, 短语例如“将得益于结合分子的施用的受治疗者”和“需要治疗的动物”包括将得益于结合分子的施用和 / 或得益于使用特异性结合给定靶蛋白的结合分子的治疗 (即减轻或防止疾病例如癌症) 的受治疗者例如哺乳动物受治疗者, 其中所述结合分子被用来例如检测被结合分子所识别的抗原 (例如诊断程序)。如本文更详细描述, 结合分子能够以未轭合的形式使用或可被轭合至例如药物、前体药物或同位素。

[0238] 所谓“过度增生性疾病或病症”是指所有赘生性细胞的生长和增殖, 无论是恶性的还是良性的, 包括所有转化的细胞和组织以及所有的癌细胞和组织。过度增生性疾病或病症包括但不限于癌前病变、异常的细胞生长、良性肿瘤、恶性肿瘤和“癌症”。在本发明的某些实施方案中, 过度增生性疾病或病症例如癌前病变、异常的细胞生长、良性肿瘤、恶性肿瘤或“癌症”包括表达、过度表达或异常表达 RON 的细胞。

[0239] 过度增生性疾病、病症和 / 或病况的另外的例子包括但不限于赘生物, 不论是良性的还是恶性的, 其位于: 前列腺、结肠、腹部、骨、乳房、消化系统、肝脏、胰腺、腹膜、内分泌腺体 (肾上腺、甲状旁腺、垂体、睾丸、卵巢、胸腺、甲状腺)、眼睛、头颈、神经 (中枢和周围)、淋巴系统、骨盆、皮肤、软组织、脾脏、胸和泌尿生殖道。在某些实施方案中, 这种赘生物表达、过度表达或异常表达 RON。

[0240] 其它的过度增生性病症包括但不限于: 高 γ 球蛋白血症、淋巴增生性病症、病变蛋白血症、紫癜、肉样瘤病、塞扎里综合症、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、高歇氏病、组织细胞增生病以及除了位于上面所列器官系统中的赘生物之外的任何其它的过度增生性疾病。在本发明的某些实施方案中, 疾病包括表达、过度表达或异常表达 RON 的细胞。

[0241] 如本文所用, 术语“肿瘤”或“肿瘤组织”是指由过度的细胞分裂所致的异常的组织块, 在某些情况下组织包括表达、过度表达或异常表达 RON 的细胞。肿瘤或肿瘤组织包括

“肿瘤细胞”，其为具有异常生长特性并且不具有有用的身体功能的赘生性细胞。肿瘤、肿瘤组织和肿瘤细胞可以是良性的或恶性的。肿瘤或肿瘤组织还可包括“肿瘤相关的非肿瘤细胞”，例如形成血管以供给肿瘤或肿瘤组织的血管细胞。可以通过肿瘤细胞来诱导非肿瘤细胞的复制和发育，例如诱导肿瘤或肿瘤组织中的血管生成。

[0242] 如本文所用，术语“恶性肿瘤”是指非良性肿瘤或癌症。如本文所用，术语“癌症”意思就是一类过度增生性疾病，其包括特征为不受调节的或不受控制的细胞生长的恶性肿瘤。癌症的例子包括但不限于癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。此类癌症的更特别的例子被记录如下且包括：鳞状细胞癌（例如上皮鳞状细胞癌），包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状癌的肺癌，腹膜癌，肝细胞癌，包括胃肠癌的胃癌，胰腺癌，成胶质细胞瘤，子宫颈癌，卵巢癌，肝癌（liver cancer），膀胱癌，肝癌（hepatoma），乳腺癌，结肠癌，直肠癌，结肠直肠癌，子宫内膜癌或子宫癌，唾液腺癌，肾脏癌或肾癌，前列腺癌，外阴癌，甲状腺癌，肝癌，肛门癌，阴茎癌以及头颈癌。术语“癌症”包括原发性恶性细胞或肿瘤（例如其细胞未迁移至除原始恶性肿瘤或肿瘤的位点之外的受治疗者身体中的位点的那些恶性细胞或肿瘤）和继发性恶性细胞或肿瘤（例如由转移所引起的那些恶性细胞或肿瘤，所述转移是恶性细胞或肿瘤细胞向不同于原始肿瘤位点的二级位点的迁移）。有助于本发明的治疗方法的癌症包括表达、过度表达或异常表达 RON 的细胞。

[0243] 癌症或恶性肿瘤的其它例子包括但不限于：儿童急性淋巴母细胞白血病、急性淋巴母细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞样白血病、肾上腺皮质癌、成人（原发性）肝细胞癌、成人（原发性）肝癌、成人急性淋巴细胞白血病、成人急性髓细胞样白血病、成人霍奇金氏病、成人霍奇金氏淋巴瘤、成人淋巴细胞白血病、成人非霍奇金氏淋巴瘤、成人原发性肝癌、成人软组织肉瘤、艾滋病相关的淋巴瘤、艾滋病相关的恶性肿瘤、肛门癌、星形细胞瘤、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑干胶质瘤、脑肿瘤、乳腺癌、肾盂和输尿管癌、中枢神经系统（原发性）淋巴瘤、中枢神经系统淋巴瘤、小脑星形细胞瘤、大脑星形细胞瘤、子宫颈癌、儿童（原发性）肝细胞癌、儿童（原发性）肝癌、儿童急性淋巴母细胞白血病、儿童急性髓细胞样白血病、儿童脑干胶质瘤、儿童小脑星形细胞瘤、儿童大脑星形细胞瘤、儿童颅外生殖细胞肿瘤、儿童霍奇金氏病、儿童霍奇金氏淋巴瘤、儿童下丘脑和视觉通路胶质瘤、儿童淋巴母细胞白血病、儿童髓母细胞瘤、儿童非霍奇金氏淋巴瘤、儿童松果体和幕上原始神经外胚层肿瘤、儿童原发性肝癌、儿童横纹肌肉瘤、儿童软组织肉瘤、儿童视觉通路和下丘脑胶质瘤、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓性白血病、结肠癌、皮肤 T 细胞淋巴瘤、内分泌胰岛细胞癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、上皮癌、食道癌、尤因氏肉瘤和相关肿瘤、外分泌胰腺癌、颅外生殖细胞肿瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、眼癌、女性乳腺癌、高歇氏病、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠肿瘤、生殖细胞肿瘤、妊娠滋养细胞肿瘤、毛细胞白血病、头颈癌、肝细胞癌、霍奇金氏病、霍奇金氏淋巴瘤、高 γ 球蛋白血症、下咽癌、肠癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞癌、胰岛细胞胰腺癌、卡波西氏肉瘤、肾脏癌、喉癌、唇及口腔癌、肝癌、肺癌、淋巴增生性疾病、巨球蛋白血症、男性乳腺癌、恶性间皮瘤、恶性胸腺瘤、髓母细胞瘤、黑色素瘤、间皮瘤、转移隐匿原发性鳞状颈癌（Metastatic Occult Primary Squamous Neck Cancer）、转移原发性鳞状颈癌、转移性鳞状颈癌、多发性骨髓瘤、多发性骨髓瘤 / 浆细胞赘生物、骨髓增生异常综合征、骨髓性白血病、髓细胞性白血病、骨髓增殖性疾病、鼻腔及鼻旁窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、怀孕期间的非霍奇金氏淋巴瘤、非黑色素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌、隐匿

原发转移性鳞状颈癌、口咽癌、骨 / 恶性纤维肉瘤、骨肉瘤 / 恶性纤维组织细胞瘤、骨骼的骨肉瘤 / 骨恶性纤维组织细胞瘤、卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞肿瘤、卵巢低恶性度肿瘤、胰腺癌、病变蛋白血症、紫癜、甲状旁腺癌、阴茎癌、嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、浆细胞赘生物 / 多发性骨髓瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性肝癌、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌、肾盂和输尿管癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉样瘤病肉瘤、塞扎里综合征、皮肤癌、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状颈癌、胃癌、幕上原始神经外胚层和松果体肿瘤、T 细胞淋巴瘤、睾丸癌、胸腺瘤、甲状腺癌、肾盂和输尿管的移行细胞癌、移行性肾盂和输尿管癌、滋养细胞肿瘤、输尿管和肾盂细胞癌、尿道癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、视觉通路和下丘脑胶质瘤、外阴癌、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、维尔姆斯氏肿瘤以及除了位于上面所列器官系统中的赘生物之外任何其它的过度增生性疾病。

[0244] 本发明的方法可被用来治疗恶化前的状况并预防演变至赘生性或恶性状态,包括但不限于上述的那些病症。这种用途在已知的或被怀疑为前述的向瘤形成或癌症演变的状态中被指出,其中所述状况特别是在发生由增生、组织转化或最特别地发育异常所组成的非赘生性细胞生长的时候(关于这种异常生长状况的综述,参见 Robbins 和 Angell, Basic Pathology (基础病理学), 第 2 版, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 第 68-79 页 (1976))。其中细胞开始表达、过度表达或异常表达 RON 的这种状况可以特别地通过本发明的方法治疗。

[0245] 增生是一种受控的细胞增殖形式,其包括组织或器官中细胞数量的增多,而不显著改变结构或功能。可以通过本发明的方法治疗的增生病症包括但不限于血管滤泡纵膈淋巴结的增生、血管淋巴样增生伴嗜酸性粒细胞增多、非典型的黑素细胞增生、基底细胞增生、良性巨大淋巴结增生、牙骨质增生、先天性肾上腺增生、先天性皮脂腺增生、囊性增生、乳腺囊性增生、义齿增生、导管增生、子宫内膜增生、纤维肌性增生、局灶性上皮增生、牙龈增生、炎性纤维增生、炎症性乳头状增生、血管内乳头状内皮增生、前列腺结节性增生、结节再生性增生、假性上皮瘤性增生、老年皮脂腺增生和疣状增生。

[0246] 组织转化是一种受控的细胞生长形式,在其中一种类型的成年或完全分化的细胞代替另一种类型的成年细胞。可以通过本发明的方法治疗的组织转化病症包括但不限于特发性骨髓样组织转化、顶泌腺组织转化、非典型组织转化、自发实质性组织转化、结缔组织的组织转化、上皮组织转化、肠组织转化、组织转化性贫血、组织转化性骨化、组织转化性息肉、骨髓样组织转化、原发性骨髓样组织转化、继发性骨髓样组织转化、鳞状组织转化、羊膜的鳞状组织转化和症状性骨髓样组织转化。

[0247] 发育异常经常是癌症的先兆,并且主要在上皮中被发现;它是非赘生性细胞生长的最无序的形式,包括个别细胞的均一性和细胞构造方向的丧失。发育异常的细胞常常具有异常巨大的、深度染色的核,并且显示多形现象。发育异常特征性地发生在存在慢性刺激或炎症之处。可以通过本发明的方法治疗的发育异常病症包括但不限于无汗性外胚层发育异常、前脸 (anterofacial) 发育异常、窒息性胸廓发育异常、心房手指发育异常、支气管肺发育异常、脑发育异常、宫颈发育异常、软骨外胚层发育异常、锁骨颅骨发育异常、先天性外胚层发育异常、颅骨骨干发育异常、颅腕跗发育异常、颅骨干骺端发育异常 (craniometaphysial dysplasia)、牙本质发育异常、骨干发育异常、外胚层发育异常、釉质发育异常、脑-眼发育异常、半肢骨骺发育异常 (dysplasia epiphysialis hemimelia)、

多发性骨骺发育异常、点状骨骺发育异常、上皮发育异常、面指生殖器发育异常、家族性颌骨纤维性发育异常、家族性白色褶皱发育异常、纤维肌性发育异常、骨纤维发育异常、繁盛性骨发育异常、遗传性肾脏-视网膜发育异常、出汗性外胚层发育异常、少汗性外胚层发育异常、淋巴细胞减少性胸腺发育异常、乳腺发育异常、下颌面发育异常 (mandibulofacial dysplasia)、干骺端发育异常、Mondini 发育异常、单骨纤维发育异常、粘液上皮发育异常 (mucoepithelial dysplasia)、多发性骨骺发育异常、眼耳脊椎发育异常、眼牙指发育异常、眼与脊椎发育异常、牙源性发育异常、眼下颌肢发育异常、根尖周牙骨质发育异常、多骨纤维性发育异常、假性软骨性脊柱骨骺发育异常、视网膜发育异常、视网中隔发育异常、脊柱骨骺发育异常和心室径向发育异常。

[0248] 可以通过本发明的方法治疗的另外的瘤前病症包括但不限于良性增殖异常病症 (例如良性肿瘤、纤维性囊肿病况、组织肥大、肠息肉、结肠息肉和食管发育异常)、粘膜白斑病、角化病、博温氏病 (Bowen's disease)、农民皮肤、日光性唇炎和日光性角化病。

[0249] 在优选的实施方案中,本发明的方法用来抑制癌症的生长、演变和/或转移,特别是上面所列的那些。

[0250] 另外的过度增生性疾病、病症和/或病况包括但不限于恶性肿瘤和相关病症的演变和/或转移,所述相关病症例如白血病 (包括急性白血病 (例如,急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病 (其包括成髓细胞的、前髓细胞白血病、髓单核细胞白血病、单核细胞白血病和红白血病)) 和慢性白血病 (例如,慢性髓细胞 (粒细胞) 白血病和慢性淋巴细胞白血病))、真性红细胞增多症、淋巴瘤 (例如,霍奇金氏病和非霍奇金氏病)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、重链病和实体瘤,所述实体瘤包括但不限于肉瘤和癌瘤如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、肉皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、维尔姆斯氏肿瘤、子宫颈癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤 (emangioblastoma)、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤 (menangioma)、黑素瘤、成神经细胞瘤和成视网膜母细胞瘤。

[0251] II. RON

[0252] 天然产生的成熟 RON (receptor d'origine nantais) 是由较小的 λ 链和较大 β 链构成的异二聚体,它包括跨膜结构域和激酶结构域。这种成熟形式的 RON 通过裂解单链前体 pro-RON 而产生。裂解后, λ 和 β 链经由二硫键保持缔合。

[0253] 报道以下多肽序列为人类 RON 序列,在 Genbank 中具有登录号 NP_002438。

[0254] 人类 RON (SEQ ID NO :1) :

[0255] MELLPLPLQSFLLLLLLLPAKPAAGEDWQCPRTPYAASRDFDVKYVVPSPF

[0256] SAGGLVQAMVTYEGDRNESAVFVAIRNRLHVLGPDLKSVQSLATGPAG

[0257] DPGCQTCAACGPGPHGPPGDTDTKVLVLDPALPALVSCGSSLQGRCFLH

[0258] DLEPQGTAVHLAAPACLFSAHHNRPDDCPDCVASPLGTRVTVVEQGQA

[0259] SYFYVASSLDAVAASFSPRSVSIRRLKADASGFAPGFVALSVLPKHLVS

- [0260] YSIEYVHSFHTGAFVYFLTVQPASVTDDPSALHTRLARLSATEPELG DYR
- [0261] ELVLDCRFAPKRRRRGAPEGGQYPVLRVAHSAPVGAQLATELSIAEGQ
- [0262] EVLFGVFVTGKDGGPGVGPNSVVCAPFIDLLDTLIDEGVERCCESPVHPG
- [0263] LRRGLDFFQSPSFCPNPPGLEALSPNTSCRHFPLLVS SFSRVDFLNGLLG
- [0264] PVQVTALYVTRLDNVTVAHMGTM DGRILQVELVRSLNYLLYVS NFSLG
- [0265] DSGQPVRDVSRLGDHLLFASGDQVFQVPIQGPGRHF LTCGRCLRAW
- [0266] HFMGCGWCGNMCGQQKECPGSWQQDHCPPKLTEFHPHSGPLRGSTRL
- [0267] TLGCSNFYLHPSGLVPEGTHQVTVGQSPCRPLPKDSSKLRPVPRKDFVEE
- [0268] FECELEPLGTQAVGPTNVSLTVTNMPPGKHFRVDGTSVLRGFSFMEPVLI
- [0269] AVQPLFGPRAGGTCLTLEGQSLSVGTSRAVLVNGTECLLARVSEGQLLC
- [0270] ATPPGATVASVPLSLQVGGAQVPGSWTFQYREDPVVLSISPNCGYINSHI
- [0271] TICGQHLSAWHLVLSFHDGLRAVESRCERQLPEQQLCRLPEYVVRDPQ
- [0272] GWVAGNLSARGDGAAGFTLPGFRFLPPPHPPSANLVPLKPEEHA IKFEYI
- [0273] GLGAVADCVGINVTVGGESQHEFRGDMVVCPLPPSLQLGQDGAPLQV
- [0274] CVDGECHILGRVVRPGPDGVPQSTLLGILLPLLLLVAALATALVFSYWW
- [0275] RRKQLVLPPNLDLASLDQTAGATPLPILYSGSDYRSGLALPAIDGLDST
- [0276] TCVHGASFSDSEDESCVPLLRKESIQLRDLDSALLAEVKDVLIPHERVVT
- [0277] HSDRVIGKGHFGVYHGEYIDQAQNR IQCAIKSLSRITEMQQVEAFLRE
- [0278] GLLMRGLNHPNVLALIGIMLPPEGLPHVLLPYMCHGDLLQFIRSPQRNPT
- [0279] VKDLISFGLQVARGMEYLAEQKFVHRDLAARNCMLDESFTVKVADFG L
- [0280] ARDILDREYYSVQQHRHARLPVKWMALES LQTYRFTTKSDVWSFGVLL
- [0281] WELLTRGAPPYRHIDPFDLTHFLAQGRRLPQPEYCPDSLYQVMQQCWE
- [0282] ADPAVRPTFRVLVGEVEQIVSALLGDHYVQLPATYMN LGPSTSHEMN V
- [0283] RPEQPQFSPMPGNVRRRPRLSEPPRPT
- [0284] 已报道小鼠 RON 多肽具有以下序列,并且在 Genbank 中具有登录号 NP_033100 (SEQ ID NO :2) :
- [0285] MGLPLPLLQSSLLMLLLRLSAASTNLNWQCPRI PYAASRDFSVKYV
- [0286] VPSFSAGGRVQATAAYEDSTNSAVFVATR NHLHVLGPD LQFIENLTT
- [0287] GPIGNPGCQTCASCGPGPHGPPKDTDTLVLM EPGLPALVSCGSTLQ
- [0288] GRCFLHELEPRGKALHLAAPACLF SANNNKPEACTDCVASPLGTRVT
- [0289] VVEQGHASYFYVASSLDPELAASFSPRSV SIRRLKSDTSGFQPGFP SLS
- [0290] VLPKYLASYL IKYVSFHS GDFVYFLTVQPI SVTSPPSALHTRLVRLN
- [0291] AVEPEIGDYRELVL DCHFAPKRRRRGAPEGTQ PYPVLQAAHSAPVD
- [0292] AKLAVELSI SEGEVLF GVFVTVKDG GSGMGPNSVVCAPFIYHLN ILI
- [0293] EEGVEYCCHSSNSSSLLSRGLDFFQTPSFCPNPPGGEASGPSSRCHYFP
- [0294] LMVHASFTRVDL FNGLLGSVKVTALHVTRLGNVTVAHMGTV DGRV
- [0295] LQVEIARSLNYLLYVS NFSLGSSGQPVHRDVSRLGNDLLFASGDQVF
- [0296] KVPIQGPGRHF LTCWRCLRAQRFMGCGWCDRC DRQKECPGSWQ
- [0297] QDHCPPEISEFYPHSGPLRGTTTRLTLCGSNFYLRPDDVVPEGTHQITV

- [0298] GQSPCRLLPKDSSSPRPGSLKEFIQELECELEPLVTQAVGTTNISLVIT
- [0299] NMPAGKHFRVEGISVQEGFSFVEPVLTSLKPDFGPRAGGTYLTLLEGQS
- [0300] LSIATSRAALVNGTQCRLEQVNEEQILCVTPPGAGTARVPLHLQIGG
- [0301] AEVPGSWTFHYKEDPIVLDISPCKGYSGSHIMIHGQHLTSAWHFTLSF
- [0302] HDGQSTVESRCAGQFVEQQRRRCRLPEYVVRNPQGWTGNLSVWG
- [0303] DGAAGFTLPGFRFLPPSPPLRAGLVELKPEEHSVKVEYVGLGAVADC
- [0304] VTVNMTVGGVEVCQHELRGDVVICPLPPSLQLGKDGVPQLQVCVDGGC
- [0305] HILSQVVRSSPGRASQRILLIALLVLILLVAVLAVALIFNSRRRKKQLG
- [0306] AHSLSPPTLSDINDTASGAPNHEESSESRDGTSPVLLRTESIRLQDLDR
- [0307] MLLAEVKDVLIPHEQVVIHTDQVIGKGFVGVYHGEYTDGAQNQTH
- [0308] CAIKSLSRITEVQEVEAFLREGLLMRGLHHPNIALALIGIMLPPEGLPRV
- [0309] LLPYMRHGDLLRFIRSPQRNPTVKDLVSFGLQVACGMEYLAEQKFV
- [0310] HRDLAARNCMLEDSFTVKVADFGGLARGVLDKEYYSVRQHRHARLP
- [0311] VKWMALESLQTYRFTTKSDVWSFGVLLWELLTRGAPPYPHIDPFDL
- [0312] SHFLAQGRRLPQPEYCPDSLYHVMLRCWEADPAARPTFRALVLEVK
- [0313] QVVASLLGDHYVQLTAAYVNVGPRAVDDGSPPEQVQPSQHCST
- [0314] SKPRPLSEPPLPT
- [0315] 本文所用的 RON 多肽结构域名称被定义如下：
- [0316] 表 2. RON 多肽结构域的实例

[0317]

结构域	RON (人类)	RON (小鼠)
可能的信号序列	1-24	1-23
胞外	25-957	25-960
跨膜	958-978	961-981
胞内	979-1400	982-1378
α -链	25-304	25-305
β -链	310-1400	311-1378
Sema 结构域	31-522	33-524
IPT 丛蛋白1	569-671	571-673
IPT 丛蛋白2	684-767	686-769
IPT 丛蛋白3	770-860	772-864
激酶结构域	1082-1345	1059-1322

[0318] 如本领域技术人员将理解的,所列的结构域的开始残基和结束残基可随着用于确定结构域的计算机建模程序或方法而不同。

[0319] 已经识别了人类 RON 序列的一种变体 RON δ 160。RON δ 160 (p160) 具有以下氨基酸序列 (SEQ ID NO:113):

[0320] MELLPLPQSFLLLLLLPAKPAAGEDWQCPRTPYAASRDFVKYVVP
 [0321] SFSAGGLVQAMVTYEGDRNESAVFVAIRNRLHVLGPDLSVQSLAT
 [0322] GPAGDPGCQTCAACGPGPHGPPGDTDTKVLVLDPALPALVSCGSSL
 [0323] QGRCFLHDLEPQGTAVHLAAPACLFSAHHNRPDPCDCVASPLGTR
 [0324] VTVVEQQASYFYVASSLDAAVAASFSPRSVSIRRLKADASGFAPGF
 [0325] VALSVLPKHLVSYSIEYVHSFHTGAFVYFLTVQPASVTDDPSALHTR
 [0326] LARLSATEPELGDYRELVLDCRFAPKRRRRGAPEGGQPYPVQLQVAH
 [0327] SAPVGAQLATELSIAEGQEVLFGVFVTGKDGGPGVGPNSVVCAPID
 [0328] LLDTLIDEGVERCCESPVHPGLRRGLDFFQSPSFCPNPPGLEALSPNTS
 [0329] CRHFPLLSSSFVRDLFNGLLGPVQVTALYVTRLDNVTVAHMGTM
 [0330] DGRILQVELVRSLNYLLYVSNFSLGDSGQPVQRDVSRLGDHLLFASG
 [0331] DQVFQVPIQGPGCRHFLTCGRCLRAWHFMGCGWCGNMCGQKQKECP
 [0332] GSWQQDHCPPKLTEEPVLIQVPLFGPRAGGTCLTLEGQSLSVGTSR
 [0333] AVLNGTECLLARVSEGQLLCATPPGATVASVPLSLQVGAQVPGS

[0334] WTFQYREDPWLSISPNCGYINSHITICGQHLTSAWHLVLSFHDGLRA
 [0335] VESRCERQLPEQQLCRLPEYVVRDPQGWVAGNLSARGDGAAGFTLP
 [0336] GFRFLPPPHPPSANLVPLKPEEHAIKFEYIGLGAVADCVGINVTVGGE
 [0337] SCQHEFRGDMVVCPLPPSLQLGQDGAQLQVCVDGECHILGRVVRPG
 [0338] PDGVPQSTLLGILLPLLLLVAALATALVFSYWRRKQLVLPPLNDL
 [0339] ASLDQTAGATPLPILYSGSDYRSGALPAIDGLDSTTCVHGASFSDSE
 [0340] DESCVPLLRKESIQLRDLSALLAEVKDVLIPHERVVTHSDRVIGKGH
 [0341] FGVVYHGEYIDQAQNRIQCAIKSLSRITEMQQVEAFLREGLLMRGLN
 [0342] HPNVLALIGIMLPPEGLPHVLLPYMCHGDLLQFIRSPQRNPTVKDLIS
 [0343] FGLQVARGMEYLAEQKFVHRDLAARNCMLEDSFTVKVADFGGLARD
 [0344] ILDREYYSVQQHRHARLPVKWMALESQTYRFTTKSDVWSFGVLL
 [0345] WELLTRGAPPYRHIDPFDLTHFLAQGRRLPQPEYCPDSLYQVMQQC
 [0346] WEADPAVRPTFRVLVGEVEQIVSALLGDHYVQLPATYMNLPSTSH
 [0347] EMNVRPEQPQFSPMPGNVRRRPLSEPPRPT

[0348] 本发明还涉及特异性地、优先地或竞争性地结合至非人类 RON 蛋白（例如来自于啮齿动物或非人类灵长类的 RON）的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物。

[0349] RON 在大量肿瘤细胞中表达,包括但不限于以下的某些肿瘤细胞:乳腺癌 (Camp 等人 . Ann. Surg. Oncol. 12 :273-281 (2005))、结肠直肠癌、肺癌、卵巢癌、肝细胞癌、头颈鳞状细胞癌、甲状腺癌 (Wang 等人 . Journal of Pathology 213 :402-411 (2007))、皮肤癌、膀胱癌、胰腺癌、胃癌 (O' Toole 等人 . Cancer Research 66 :9162-9710 (2006))、肝癌和肾癌。

[0350] III. RON 抗体

[0351] 在一个实施方案中,本发明涉及 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物。例如,本发明至少包括表 3 和表 4 中显示的某些单克隆抗体、及其片段、变体和衍生物的抗原结合结构域。表 3 列出从噬菌体展示文库确定的人类抗 RON Fab 区。表 4 列出来源于杂交瘤的小鼠抗 RON 抗体。

[0352] 表 3 :RON 特异性人类 Fab。

[0353]

	Fab
1	M14-H06
2	M15-E10
3	M16-C07
4.	M23-F10
5	M80-B03

6	M93-D02
7	M96-C05
8	M97-D03
9	M98-E12

[0354] 表 4 :RON 特异性鼠单克隆抗体。

[0355]

	抗体	杂交瘤	ATCC 保藏名称
1	1P2E7	1.P2E7.3	PTA-8816
2	1P3B2	1P3B2.2	PTA-8813
3	1P4A3	1.P4A3.3	PTA-8814
4.	1P4A12	1.P4A12.2	PTA-8815
5	1P5B10	1.P5B10.3.10	PTA-8817

[0356] 在 2007 年 12 月 4 日,将以下杂交瘤保存在 Manassas, VA 的美国典型培养物保藏中心 (ATCC) :1. P2E7. 3、1P3B2. 2、1. P4A3. 3、1. P4A12. 2 和 1. P5B10. 3. 10,并分别给出以下 ATCC 专利保存名称 :PTA-8816、PTA-8813、PTA-8814、PTA-8815 和 PTA-8817。保存的杂交瘤 1. P2E7. 3 产生本文所述的单克隆抗体 1P2E7。保存的杂交瘤 1P3B2. 2 产生本文所述的单克隆抗体 1P4A3。保存的杂交瘤 1. P4A3. 3 产生本文所述的单克隆抗体 1P3B2。保存的杂交瘤 1. P4A12. 2 产生本文所述的单克隆抗体 1P4A12。保存的杂交瘤 1. P5B10. 3. 10 产生本文所述的单克隆抗体 1P5B10。

[0357] 如本文所用,术语“抗原结合结构域”包括特异性地结合抗原上的表位(例如,RON 的表位)的位点。抗体的抗原结合结构域通常包括免疫球蛋白重链可变区的至少一部分和免疫球蛋白轻链可变区的至少一部分。由这些可变区形成的结合位点决定抗体的特异性。

[0358] 本发明更具体地涉及 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物,其中 RON 抗体特异性地结合至与选自 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的参考单克隆 Fab 抗体片段或选自 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的参考单克隆抗体相同的 RON 表位。

[0359] 本发明还涉及如下 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物,其中 RON 抗体竞争性地抑制选自 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的参考单克隆 Fab 抗体片段或选自 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的参考单克隆抗体与 RON 的结合。

[0360] 本发明还涉及如下 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物,其中 RON 抗体包含与选自 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的单克隆 Fab 抗体片段或选自 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10

组成的组的参考单克隆抗体相同的抗原结合结构域。

[0361] 制备抗体的方法是本领域公知的并在本文描述。产生了针对不含信号序列的各种 RON 片段或针对全长 RON 的抗体之后,可通过本文所述的表位定位方案以及本领域已知的方法(例如“第 11 章-免疫学”,Current Protocols in Molecular Biology(分子生物学最新实验方案),Ausubel 等人编辑,第 2 版,John Wiley & Sons, Inc. (1996) 中所述的双抗体夹心 ELISA) 来确定抗体或抗原结合片段结合 RON 的哪些氨基酸或表位。可在 Morris, G. Epitope Mapping Protocols(表位定位方案), New Jersey: Humana Press (1996) 中找到另外的表位定位方案,二者的全文以引用的方式并入本文。还可通过市售的方式(即 ProtoPROBE, Inc. (Milwaukee, Wisconsin)) 来进行表位定位。

[0362] 另外,然后可筛选产生的与 RON 的任何部分结合的抗体作为 RON 的拮抗剂起作用的能力,例如,抑制 MSP 与 RON 的结合,抑制 PI3-K/Akt 途径的活化,抑制 Ras/MAPK 信号传导途径的活化,抑制 src 信号传导途径的活化,抑制 β -连环蛋白信号传导途径的活化,抑制 Fak 途径的活化,抑制 Erk 1/2 的磷酸化,抑制 Erk 1/2 的活化,诱导凋亡,诱导失巢凋亡,抑制受体酪氨酸激酶 (RTK) 活性,阻断 VEGF 分泌,阻断包括但不限于 EGFR、TGF β 受体和 Met 的其它受体激酶的活性,诱导细胞毒性一氧化氮 (NO) 分泌,诱导 IL-12 分泌,阻断 MSP 分泌或抑制肿瘤细胞生长、增殖、粘附、活动性、侵入或转移。可根据实施例中详细描述的方法筛选抗体的这些特性和其它特性。可使用本文实施例中所述的其它测定检验本发明的抗体的其它功能。

[0363] 在其它实施方案中,本发明包括特异性地或优先地结合至 RON 的至少一个表位的抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物,其中该表位包括、基本上由或者由以下组成: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:113 的至少约四个至五个氨基酸、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:113 的至少七个、至少九个或至少约 15 个至约 30 个氨基酸。如所述的 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:113 的给定表位的氨基酸可以是,但不必须是连续或线性的。在某些实施方案中, RON 的至少一个表位包括、基本上由或者由以下组成: 由在细胞表面上表达或作为例如融合于 IgG Fc 区的可溶片段的 RON 的胞外结构域形成的非线性表位。因此,在某些实施方案中, RON 的至少一个表位包括、基本上由或者由以下组成: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:113 的至少 4 个、至少 5 个、至少 6 个、至少 7 个、至少 8 个、至少 9 个、至少 10 个、至少 15 个、至少 20 个、至少 25 个、约 15 个至约 30 个、或至少 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100 个连续或不连续的氨基酸,其中不连续的氨基酸通过蛋白折叠形成表位。

[0364] 在其它实施方案中,本发明包括特异性地或优先地结合至 RON 的至少一个表位的抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物,其中该表位除了如上述的 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:113 的一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个连续或不连续的氨基酸以外,还包括、基本上由或者由修饰蛋白的另外部分组成,例如可包括糖类部分以使 RON 抗体以比它对未修饰形式的蛋白更高的亲和力结合修饰的靶蛋白。或者, RON 抗体完全不结合未修饰形式的靶蛋白。

[0365] 在某些方面,本发明涉及抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物,它们以比对给定的参考单克隆抗体的解离常数 (K_D) 小的 K_D 表征的亲和力特异性地结合至 RON 多肽或其片段、或 RON 变体多肽。

[0366] 在某些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物特异性地结合至上述 RON 或片段或变体的至少一个表位,即,与结合至不相关的或随机的表位相比更容易地结合至这样的表位;优先地结合至上述 RON 或片段或变体的至少一个表位,即与结合至相关的、相似的、同源的或类似的表位相比更容易地结合至这样的表位;竞争性地抑制参考抗体的结合,所述参考抗体自身与上述 RON 或片段或变体的某个表位特异性地或优先地结合;或者以由解离常数 K_D 所表征的亲和力结合至上述 RON 或片段或变体的至少一个表位,所述 K_D 小于约 $5 \times 10^{-2}M$ 、约 $10^{-2}M$ 、约 $5 \times 10^{-3}M$ 、约 $10^{-3}M$ 、约 $5 \times 10^{-4}M$ 、约 $10^{-4}M$ 、约 $5 \times 10^{-5}M$ 、约 $10^{-5}M$ 、约 $5 \times 10^{-6}M$ 、约 $10^{-6}M$ 、约 $5 \times 10^{-7}M$ 、约 $10^{-7}M$ 、约 $5 \times 10^{-8}M$ 、约 $10^{-8}M$ 、约 $5 \times 10^{-9}M$ 、约 $10^{-9}M$ 、约 $5 \times 10^{-10}M$ 、约 $10^{-10}M$ 、约 $5 \times 10^{-11}M$ 、约 $10^{-11}M$ 、约 $5 \times 10^{-12}M$ 、约 $10^{-12}M$ 、约 $5 \times 10^{-13}M$ 、约 $10^{-13}M$ 、约 $5 \times 10^{-14}M$ 、约 $10^{-14}M$ 、约 $5 \times 10^{-15}M$ 或约 $10^{-15}M$ 。在一个具体方面,抗体或其片段相对于鼠 RON 多肽或其片段优先地结合至人类 RON 多肽或其片段。在另一具体方面,抗体或其片段优先地结合至一种或多种 RON 多肽或其片段,例如一种或多种哺乳动物 RON 多肽。

[0367] 如在抗体结合解离常数的范畴中使用的,术语“约”允许在用于测量抗体亲和力的方法中固有的变化程度。例如,取决于所用的仪器装备的精密水平、基于所测量的样品数目的标准差、和舍入误差,术语“约 $10^{-2}M$ ”可以包括例如,从 0.05M 到 0.005M。

[0368] 在特定的实施方案中,本发明的抗体、或其抗原结合片段、免疫特异性片段、变体或衍生物以小于或等于 $5 \times 10^{-2}sec^{-1}$ 、 $10^{-2}sec^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-3}sec^{-1}$ 或 $10^{-3}sec^{-1}$ 的解离速率 ($k(off)$) 结合 RON 多肽或其片段或变体。或者,本发明的抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物以小于或等于 $5 \times 10^{-4}sec^{-1}$ 、 $10^{-4}sec^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-5}sec^{-1}$ 或 $10^{-5}sec^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-6}sec^{-1}$ 、 $10^{-6}sec^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-7}sec^{-1}$ 或 $10^{-7}sec^{-1}$ 的解离速率 ($k(off)$) 结合 RON 多肽或其片段或变体。

[0369] 在其它的实施方案中,本发明的抗体、或其抗原结合片段、免疫特异性片段、变体或衍生物以大于或等于 $10^3M^{-1}sec^{-1}$ 、 $5 \times 10^3M^{-1}sec^{-1}$ 、 $10^4M^{-1}sec^{-1}$ 或 $5 \times 10^4M^{-1}sec^{-1}$ 的结合速率 ($k(on)$) 结合 RON 多肽或其片段或变体。或者,本发明的抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物以大于或等于 $10^5M^{-1}sec^{-1}$ 、 $5 \times 10^5M^{-1}sec^{-1}$ 、 $10^6M^{-1}sec^{-1}$ 或 $5 \times 10^6M^{-1}sec^{-1}$ 或 $10^7M^{-1}sec^{-1}$ 的结合速率 ($k(on)$) 结合 RON 多肽或其片段或变体。

[0370] 在各种实施方案中,如本文所述的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物是 RON 活性的拮抗剂。在某些实施方案中,例如,拮抗剂 RON 抗体与肿瘤细胞或肿瘤相关巨噬细胞上表达的 RON 的结合抑制 MSP 与 RON 的结合,抑制 MSP 诱导的 RON 信号传导,抑制 PI3-K/Akt 途径、Ras/MAPK 途径、src 途径、Fak 途径或 β -连环蛋白途径的活化,抑制 ERK1/2 的磷酸化或活化,阻断 VEGF 分泌,阻断包括但不限于 EGFR、TGF β 受体和 Met 的其它受体激酶的活性,诱导细胞毒性一氧化氮 (NO) 分泌,诱导 IL-12 分泌,阻断 MSP 分泌或者抑制肿瘤细胞增殖、活动性或转移或者促进凋亡或失巢凋亡。

[0371] 除非具体地指明,否则如本文所用的关于抗体的“其片段”是指抗原结合片段,即抗体的特异性地结合至抗原的部分。在一个实施方案中,RON 抗体,例如本发明的抗体是双特异性的 RON 抗体,例如是对多于一个表位(如多于一个抗原或同一抗原上多于一个表位)具有结合特异性的双特异性的抗体、微型抗体、结构域缺失的抗体或融合蛋白。在一个实施方案中,双特异性的 RON 抗体具有对本文公开的靶多肽如 RON 上至少一个表位具有特异性的至少一个结合结构域。在另一实施方案中,双特异性的 RON 抗体具有对靶多肽上的表位具有特异性的至少一个结合结构域和对药物或毒素具有特异性的至少一个靶结合结构域。

又在另一实施方案中,双特异性的 RON 抗体具有对本文公开的靶多肽上的表位具有特异性的至少一个结合结构域和对前体药物具有特异性的至少一个结合结构域。双特异性 RON 抗体可以是四价抗体,具有对本文公开的靶多肽的表位具有特异性的两个靶结合结构域和对第二靶具有特异性的两个靶结合结构域。因此,四价双特异性 RON 抗体对于每种特异性可以是二价的。

[0372] 如本领域普通技术人员已知的,本发明的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物可包括介导一种或多种效应子功能的恒定区。例如,补体的 C1 组分与抗体恒定区结合会活化补体系统。补体的活化在调理作用和细胞病原体的裂解中非常重要。补体的活化还刺激炎症反应,并可能参与自身免疫超敏反应。此外,随着抗体 Fc 区域的 Fc 受体结合位点结合到细胞上的 Fc 受体 (FcR),抗体借助 Fc 区域结合到不同细胞上的受体。存在许多对不同种类的抗体具有特异性的 Fc 受体,所述抗体包括 IgG(γ 受体)、IgE(ϵ 受体)、IgA(λ 受体)和 IgM(μ 受体)。抗体结合细胞表面上的 Fc 受体引发大量重要和多样的生物反应,包括吞入和破坏被抗体包覆的颗粒、清除免疫复合体、杀伤细胞对包覆抗体的靶细胞的裂解(称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,或 ADCC)、释放炎症介质、胎盘转移以及控制免疫球蛋白的产生。

[0373] 因此,本发明的某些实施方案包括 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物,其中一个或多个恒定区结构域中的至少一个部分已被缺失或以其它方式被改变以提供期望的生化特征,诸如与具有大致相同免疫原性的完整、未改变的抗体相比,减少的效应子功能,非共价地二聚化的能力,增加的在肿瘤部位集中的能力,减少的血清半衰期或增加的血清半衰期。例如,用于本文所述的诊断和治疗方法中的某些抗体是结构域缺失的抗体,所述抗体包括与免疫球蛋白重链相似的多肽链,但缺少一个或多个重链结构域的至少一部分。例如,在某些抗体中,修饰的抗体的恒定区的一个完整结构域将被缺失,例如,CH2 结构域的全部或部分将被缺失。例如,Fc 区改变的 RON 抗体可耗尽癌症或炎症中牵涉的巨噬细胞。在其它实施方案中,用于本文所述的诊断和治疗方法中的某些抗体具有已被改变以消除糖基化的恒定区,例如 IgG4 重链恒定区,在本文别处称为“agly”抗体。尽管不被理论限制,认为“agly”抗体可能具有改进的体内安全性和稳定性特性。产生具有期望的效应子功能的去糖基化的抗体的方法例如见于 WO 2005018572,其全文以引用的方式并入。

[0374] 在本文所述的某些 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物中,可以利用本领域已知技术将 Fc 部分突变来降低效应子功能。例如,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其它手段)可能减少 Fc 受体结合循环系统中的经修饰的抗体,从而提高肿瘤定位。其它情况中,可能与本发明一致的恒定区修饰会减缓补体结合,并因此降低了结合的细胞毒素的血清半衰期和非特异性缔合。然而,可以用恒定区的其它修饰来改变二硫键或寡糖部分,从而使其定位因为抗原特异性或抗体柔性增加的而增强。这些修饰所产生的生理特性、生物利用度及其它生化效果(诸如肿瘤定位、生物分布和血清半衰期)可以容易地利用已知免疫技术测量和定量而不需要过多实验。

[0375] 可以用本领域已知技术由整个前体或亲本抗体制得修饰形式的本发明的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物。示范性技术在本文更详细地讨论。

[0376] 在某些实施方案中,RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物的可变区和恒定区二者都是完全人类的。可以使用本领域已知的和本文所描述的技术来制备是完全人类

的抗体。例如,可以通过将抗原施用于转基因动物来制备针对特异性抗原的完全人类的抗体,所述转基因动物被修饰以产生这种抗体作为对抗原性攻击的响应,但是其内源性基因座已失去功能。可被用来制备这种抗体的示例性的技术被描述于美国专利第 6,150,584; 6,458,592; 6,420,140 号。其它技术是本领域已知的。可以通过如本文其它地方更详细所述的各种展示技术例如噬菌体展示系统或其它病毒展示系统来同样地产生完全人类的抗体。

[0377] 本发明的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物可利用本领域已知的技术制备或制造。在某些实施方案中,抗体分子或其片段被“重组地产生”,即,利用重组 DNA 技术产生。用于制备抗体分子或其片段的示例性技术在本文别处更详细地讨论。

[0378] 本发明的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物还包括被修饰的衍生物,所述修饰例如,通过将任何类型的分子共价连接至抗体以致该共价连接不阻止抗体与其同类表位的特异性结合。例如但不进行限制,抗体衍生物包括已经通过例如如下方式修饰的抗体:糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封端基团的衍生化、蛋白酶剪切、与细胞配体或其它蛋白的连接等。可以通过已知技术进行许多化学修饰中的任一种,包括但不限于特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等等。另外,衍生物可含有一种或多种非经典的氨基酸。

[0379] 在某些实施方案中,本发明的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物将不引起待治疗的动物例如人类中的有害的免疫反应。在一个实施方案中,使用本领域公认的技术修饰本发明的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物以减少它们的免疫原性。例如,抗体可被人源化、灵长源化、去免疫化,或者可制备嵌合抗体。这些类型的抗体来源于非人类的抗体,通常是鼠或灵长类抗体,其保留或基本上保留亲本抗体的抗原结合特性,但是在人类中具有较少的免疫原性。这可通过各种方法来实现,包括 (a) 将完整的非人类可变结构域拼接到人类恒定区上以产生嵌合抗体;(b) 将一种或多种非人类互补决定区 (CDR) 的至少一部分拼接到保留或不保留关键骨架残基的人类构架区和恒定区上;或者 (c) 移植完整的非人类可变结构域,但通过替换表面残基用类似于人类的部分将它们“覆盖”。这类方法公开在 Morrison 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-6855 (1984); Morrison 等人, Adv. Immunol. 44:65-92 (1988); Verhoeyen 等人, Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun. 31:169-217 (1994) 和美国专利第 5,585,089、5,693,761、5,693,762 和 6,190,370 号中,所有这些专利的全文据此以引用的方式并入本文。

[0380] 还可使用去免疫作用来减少抗体的免疫原性。如本文所用,术语“去免疫作用”包括改变抗体以修饰 T 细胞表位(参见例如 W09852976A1、W00034317A2)。例如,分析来自起始抗体的 VH 和 VL 序列,以及来自每个 V 区的人类 T 细胞表位“图谱”显示与互补决定区 (CDR) 和序列中的其它关键残基相关的表位位置。分析来自 T 细胞表位图谱的单个 T 细胞表位以确定具有低的改变最终抗体活性的风险的可选的氨基酸取代。设计一系列可选的 VH 和 VL 序列,其包括氨基酸取代的组合,并且这些序列随后被并入一系列结合多肽例如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段中以用于本文所公开的诊断和治疗方法,然后测试其功能。通常,产生并检验 12 至 24 个变体抗体。然后将包括修饰的 V 和人类 C 区域的完整的重链和轻链基因克隆进表达载体,并将所得的质粒引入细胞系以产生完整的抗体。然后在适当的

生化和生物测定中比较所述抗体,并确定最佳的变体。

[0381] 本发明的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物可通过本领域已知的任何适合方法产生。可通过本领域熟知的各种步骤产生针对感兴趣的抗原的多克隆抗体。例如,可将 RON 抗体,例如结合多肽,如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段施用于各种宿主动物(包括但不限于兔、小鼠、大鼠、鸡、仓鼠、山羊、驴等)以诱导含有对该抗原具有特异性的多克隆抗体的血清的产生。可以根据宿主物种来使用各种佐剂以增加免疫应答,并且佐剂包括但不限于弗氏(完全的和不完全的)、矿物凝胶例如氢氧化铝、表面活性物质例如溶血卵磷脂、普卢兰尼克多元醇(pluronicpolyol)、聚阴离子、肽类、油乳剂、钥孔血蓝蛋白、二硝基苯酚和潜在有用的人类佐剂例如 BCG(卡介苗)和短棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*)。这样的佐剂也是本领域中熟知的。

[0382] 可以使用本领域已知的各种各样的技术来制备单克隆抗体,包括使用杂交瘤、重组体和噬菌体展示技术、或其组合。例如,可以使用杂交瘤技术产生单克隆抗体,所述杂交瘤技术包括本领域已知的以及在例如 Harlow 等人, *Antibodies :A Laboratory Manual* (抗体:实验手册), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第 2 版 (1988); Hammerling 等人, *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (单克隆抗体和 T 细胞杂交瘤), Elsevier, N. Y., 563-681 (1981) 中所教导的那些技术(所述参考文献的全文以引用的方式并入)。如本文所用,术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术所产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指来源于包括任何真核的、原核的或噬菌体克隆在内的单个克隆的抗体,而不是指产生它的方法。因此,术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术所产生的抗体。可以使用 RON 敲除小鼠制备单克隆抗体以增加表位识别的区域。可以使用本领域已知的各种各样的技术来制备单克隆抗体,包括如本文其它地方所述的杂交瘤和重组体和噬菌体展示技术的使用。

[0383] 在一个实例中,使用本领域公认的方案,通过多次在皮下或腹膜内注射相关抗原(例如纯化的 RON 或者含 RON 的细胞或细胞提取物)和佐剂来在哺乳动物体内产生抗体。此免疫接种通常引发这样的免疫应答,其包括来自激活的脾细胞或淋巴细胞的抗原反应性抗体的产生。虽然所得的抗体可从动物血清收集以提供多克隆制品,但是常常期望从脾脏、淋巴结或外周血来分离单独的淋巴细胞以提供单克隆抗体 (MAb) 的同质制品。优选地,从脾脏获得淋巴细胞。

[0384] 在这个熟知的过程 (Kohler 等人, *Nature* 256 :495 (1975)) 中,与抗原一起被注射的来自哺乳动物的相对短命的或必死的淋巴细胞与不死的肿瘤细胞系(例如骨髓瘤细胞系)融合,因此产生杂交细胞或“杂交瘤”,其既是不死的又能够产生 B 细胞的遗传编码的抗体。通过选择、稀释和再生长而将所得的杂交物分离成单个的遗传株,而每个单个的株包括用于形成单个抗体的特定基因。它们产生对期望的抗原具有同质性的抗体,并且根据它们纯的遗传谱系被称为“单克隆的”。

[0385] 将如此制备的杂交瘤细胞接种并生长在适合的培养基中,所述培养基优选地含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞的生长或存活的一种或多种物质。本领域技术人员将会理解,杂交瘤的形成、选择和生长所需的试剂、细胞系和培养基是可从若干商业来源获得的,而且很好地建立了标准化方案。通常,对杂交瘤细胞所生长的培养基进行测定以确定针对期望抗原的单克隆抗体的产生。优选地,通过体外测定来确定由杂交瘤细胞所产生的单克隆抗体的结合特异性,所述体外测定例如免疫沉淀、放射免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附

测定 (ELISA)。在确定杂交瘤细胞产生期望的特异性、亲和性和 / 或活性的抗体之后,可通过有限稀释步骤对所述克隆进行亚克隆,并通过标准方法使其生长 (Goding, Monoclonal Antibodies :Principles and Practice(编码、单克隆抗体:原理和实践), Academic Press, 第 59-103 页 (1986))。还将理解的是,由亚克隆所分泌的单克隆抗体可通过常规的纯化步骤从培养基、腹水或血清中分离,所述纯化步骤例如蛋白 A、羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳法、透析或亲和色谱法。

[0386] 识别具体表位的抗体片段可通过已知技术产生。例如, Fab 和 $F(ab')_2$ 片段可重组地产生或利用酶诸如木瓜蛋白酶 (以产生 Fab 片段) 或胃蛋白酶 (以产生 $F(ab')_2$ 片段) 通过蛋白酶剪切免疫球蛋白分子产生。 $F(ab')_2$ 片段包含可变区、轻链恒定区和重链的 CH1 结构域。

[0387] 本领域技术人员还将理解,编码抗体或抗体片段 (例如抗原结合位点) 的 DNA 还可以来源于抗体文库,例如噬菌体展示文库。特别地,这种噬菌体可用来展示从所有组成成分或组合抗体文库 (例如人类或鼠的) 表达的抗原结合结构域。可以使用抗原来选择或确定表达结合至感兴趣抗原的抗原结合结构域的噬菌体,例如使用标记的抗原或者被结合或捕获至固体表面或珠子上的抗原。用在这些方法中的噬菌体通常是丝状噬菌体,其包括从噬菌体表达的 fd 和 M13 结合结构域,所述噬菌体具有以重组方式与噬菌体基因 III 或基因 VIII 蛋白融合的 Fab、Fv 或 DAB (来自轻链或重链的单个 Fv 区) 或者二硫键稳定的 Fv 抗体结构域。示例性的方法列在例如 EP 368 684 B1; 美国专利 5,969,108, Hoogenboom, H. R. 和 Chames, Immunol. Today 21 :371 (2000); Nagy 等人, Nat. Med. 8 :801 (2002); Huie 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 :2682 (2001); Lui 等人, J. Mol. Biol. 315 :1063 (2002) 中, 其中的每一个均以引用的方式并入本文。一些出版物 (例如 Marks 等人, Bio/Technology 10 :779-783 (1992)) 描述了通过链改组来产生高亲和性人类抗体,以及作为构建大噬菌体文库的策略的组合感染和体内重组。在另一个实施方案中,核糖体展示可被用来替代噬菌体作为展示平台 (参见例如 Hanes 等人, Nat. Biotechnol. 18 :1287 (2000); Wilson 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 :3750 (2001); 或 Irving 等人, J. Immunol. Methods 248 :31 (2001))。在又一个实施方案中,可以筛选细胞表面文库以寻找抗体 (Boder 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 :10701 (2000); Daugherty 等人, J. Immunol. Methods 243 :211 (2000))。这样的方案提供了对传统杂交瘤技术的替代方案用于分离和随后克隆单克隆抗体。

[0388] 在噬菌体展示方法中,功能性抗体结构域被展示在载有编码它们的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面上。例如,编码 VH 和 VL 区的 DNA 序列被扩增或以其它方式从动物 cDNA 文库 (例如人类或鼠的淋巴样组织的 cDNA 文库) 或合成的 cDNA 文库中分离。在某些实施方案中,编码 VH 和 VL 区的 DNA 通过 PCR 被 scFv 连接序列连接在一起,并被克隆进噬菌粒载体 (例如 p CANTAB 6 或 pComb 3HSS)。将所述载体经过电穿孔导入大肠杆菌,并用辅助噬菌体将大肠杆菌感染。用于这些方法的噬菌体通常是包括 fd 和 M13 的丝状噬菌体,而且 VH 或 VL 区常常被重组地融合至噬菌体基因 III 或基因 VIII。可以使用抗原来选择或确定表达结合至感兴趣抗原的抗原结合结构域 (即 RON 多肽或其片段) 的噬菌体,例如使用标记的抗原或者被结合或捕获至固体表面或珠子上的抗原。

[0389] 可被用来制备抗体的噬菌体展示方法的另外的实例包括在 Brinkman 等

人, J. Immunol. Methods 182:41-50(1995); Ames 等人, J. Immunol. Methods 184:177-186(1995); Kettleborough 等人, Eur. J. Immunol. 24:952-958(1994); Persic 等人, Gene 187:9-18(1997); Burton 等人, Advances in Immunology 57:191-280(1994); PCT 申请第 PCT/GB91/01134 号; PCT 公布 WO 90/02809、WO 91/10737、WO 92/01047、WO 92/18619、WO93/11236、WO 95/15982、WO 95/20401; 以及美国专利第 5,698,426、5,223,409、5,403,484、5,580,717、5,427,908、5,750,753、5,821,047、5,571,698、5,427,908、5,516,637、5,780,225、5,658,727、5,733,743 和 5,969,108 号中所公开的那些, 其中每个的全文均以引用的方式并入本文。

[0390] 如上面的参考文献所述, 在噬菌体选择之后, 来自噬菌体的编码抗体的区域可被分离并用来产生包括人类抗体在内的完整抗体或任何其它期望的抗原结合片段, 而且被表达在任何期望的宿主中, 所述宿主包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌。例如, 还可利用使用本领域已知的方法来重组地产生 Fab、Fab' 和 F(ab')₂ 片段的技术, 所述方法例如公开在 PCT 公布 WO 92/22324; Mullinax 等人, BioTechniques 12(6):864-869(1992); 和 Sawai 等人, AJRI 34:26-34(1995); 以及 Better 等人, Science 240:1041-1043(1988) 中的那些 (所述参考文献的全文以引用的方式并入)。

[0391] 可用来产生单链 Fv 和抗体的技术的实例包括在美国专利第 4,946,778 和 5,258,498 号; Huston 等人, Methods in Enzymology 203:46-88(1991); Shu 等人, PNAS 90:7995-7999(1993); 和 Skerra 等人, Science 240:1038-1040(1988) 中所述的那些。对于一些用途 (包括抗体在人类的体内用途和体外检测测定), 优选使用嵌合的、人源化的或人类的抗体。嵌合抗体是这样的分子, 在其中抗体的不同部分来源于不同动物物种, 例如具有来源于鼠单克隆抗体可变区和人类免疫球蛋白恒定区的抗体。用于产生嵌合抗体的方法是本领域已知的。参见例如 Morrison, Science 229:1202(1985); Oi 等人, BioTechniques 4:214(1986); Gillies 等人, J. Immunol. Methods 125:191-202(1989); 美国专利第 5,807,715; 4,816,567 和 4,816,397 号, 其全文以引用的方式并入本文。另外, 可以使用为产生“嵌合抗体”而开发的技术 (Morrison 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855(1984); Neuberger 等人, Nature 312:604-608(1984); Takeda 等人, Nature 314:452-454(1985)), 通过将来自适当抗原特异性的小鼠抗体分子的基因与来自适当生物活性的人类抗体分子的基因剪接在一起。如本文所用, 嵌合抗体是这样的分子, 其中不同的部分来源于不同的动物物种, 例如具有来源于鼠单克隆抗体的可变区和人类免疫球蛋白恒定区的那些抗体, 例如人源化的抗体。

[0392] 人源化的抗体是结合期望的抗原的来自非人类物种抗体的抗体分子, 其具有来自非人类物种的一个或多个互补决定区 (CDR) 以及来自人类免疫球蛋白分子的构架区。通常, 人类构架区中的骨架残基将被来自 CDR 供体抗体的相应残基所取代以改变、优选地促进抗原结合。通过本领域中熟知的方法确定这些骨架取代, 例如通过对 CDR 和骨架残基的相互作用进行建模以确定对于抗原结合重要的骨架残基, 并且通过序列对比来确定在特殊位置的不常见的骨架残基。(参见例如 Queen 等人, 美国专利第 5,585,089 号; Riechmann 等人, Nature 332:323(1988), 其全文以引用的方式并入本文。) 可以使用本领域已知的各种技术将抗体人源化, 所述技术包括例如 CDR 拼接 (EP 239,400; PCT 公布 WO 91/09967; 美国专利第 5,225,539、5,530,101 和 5,585,089 号)、镶饰 (veneering) 或表面

重建 (EP592, 106 ;EP 519, 596 ;Padlan, Molecular Immunology 28(4/5) :489-498(1991) ; Studnicka 等 人, Protein Engineering 7(6) :805-814(1994) ;Roguska 等 人, PNAS91 : 969-973(1994)) 和链改组 (美国专利第 5, 565, 332 号)。

[0393] 完全人类的抗体是在人类患者的治疗性处理中特别期望的。可通过本领域已知的各种方法制备人类抗体,包括上述的使用来源于人类免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示方法。还参见美国专利第 4, 444, 887 和 4, 716, 111 号 ;和 PCT 公布 WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735 和 WO 91/10741,其中每个的全文均以引用的方式并入本文。

[0394] 还可使用转基因小鼠来产生人类抗体,所述转基因小鼠不能表达功能性内源免疫球蛋白,但是能表达人类免疫球蛋白基因。例如,可将人类重链和轻链免疫球蛋白基因复合物随机地或通过同源重组引入小鼠胚胎干细胞。或者,除人类重链和轻链基因之外,人类可变区、恒定区 and 多变区可被引入小鼠胚胎干细胞中。随着通过同源重组将人类免疫球蛋白基因座引入,小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因可分别或同时变得无功能。具体地说, JH 区的纯合缺失阻止内源性抗体的产生。将修饰的胚胎干细胞扩增并微注射进胚泡以产生嵌合小鼠。然后将嵌合小鼠繁殖以产生表达人类抗体的纯合后代。以通常方式用所选的抗原例如期望的靶多肽的全部或一部分来对转基因小鼠进行免疫。可使用常规的杂交瘤技术从被免疫的转基因小鼠获得针对所述抗原的单克隆抗体。转基因小鼠所含的人类免疫球蛋白转基因在 B 细胞分化时重排,并且随后进行类转换和体细胞突变。因此,使用这种技术可能产生治疗上有用的 IgG、IgA、IgM 和 IgE 抗体。关于产生人类抗体的该技术的概况,参见 Lonberg 和 Huszar Int. Rev. Immunol. 13 :65-93(1995)。关于产生人类抗体和人类单克隆抗体的该技术以及产生这种抗体的方案的详细讨论,参见例如 PCT 公布 WO 98/24893、WO96/34096、WO 96/33735 ;美国专利第 5, 413, 923、5, 625, 126、5, 633, 425、5, 569, 825、5, 661, 016、5, 545, 806、5, 814, 318 和 5, 939, 598 号,其全文以引用的方式并入本文。另外,可聘请例如 Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) 和 GenPharm(San Jose, Calif.) 等公司使用与上述相似的技术来提供针对所选抗原的人类抗体。

[0395] 可使用称作“定向选择”的技术产生识别所选的表位的完全人类的抗体。在该方法中,所选的非人类单克隆抗体例如小鼠抗体被用来指导对识别相同表位的完全人类的抗体的选择。(Jespers 等人, Bio/Technology 12 :899-903(1994)。还参见美国专利第 5, 565, 332 号。)

[0396] 此外,可以反过来利用针对本发明靶多肽的抗体通过本领域技术人员熟知的技术来产生“模拟”靶多肽的抗独特型抗体。(参见例如 Greenspan & Bona, FASEB J. 7(5) : 437-444(1989) 和 Nisino, J. Immunol. 147(8) :2429-2438(1991))。例如,结合至并且竞争性地抑制多肽多聚化和 / 或本发明的多肽与配体结合的抗体可被用来产生“模拟”多肽多聚化和 / 或结合结构域的抗独特型,并且因此结合至并且中和多肽和 / 或其配体。这种中和的抗独特型或这种抗独特型的 Fab 片段可被用在治疗方案中以中和多肽配体。例如,这种抗独特型抗体可被用来结合期望的靶多肽和 / 或结合靶多肽的配体 / 受体,并且从而阻断靶多肽的生物活性。

[0397] 在另一实施方案中,编码期望的单克隆抗体的 DNA 可利用常规步骤容易地分离和测序(例如,通过利用能够特异性地结合编码鼠抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探

针)。分离和亚克隆的杂交瘤细胞用作这样的 DNA 的优选来源。分离后,可将 DNA 放入表达载体中,随后将表达载体转染到原核或真核宿主细胞,诸如但不限于本来不产生免疫球蛋白的大肠杆菌细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞。更特别地,分离的 DNA (可以是如本文所述合成的) 可用于克隆恒定区和可变区序列以制造抗体,如 Newman 等人,1995 年 1 月 25 日提交的美国专利第 5,658,570 号,其以引用的方式并入本文。基本上,这必须从选择的细胞提取 RNA,转化为 cDNA,并利用 Ig 特异性引物通过 PCR 扩增。为此目的合适的引物也描述在美国专利第 5,658,570 号中。如将在以下更详细地讨论的,可以相对大量地生长表达期望抗体的转化的细胞以提供免疫球蛋白的临床和商业供应。

[0398] 在一个实施方案中,本发明的 RON 抗体包括抗体分子的至少一个重链或轻链 CDR。在另一个实施方案中,本发明的 RON 抗体包括来自一个或多个抗体分子的至少两个 CDR。在另一个实施方案中,本发明的 RON 抗体包括来自一个或多个抗体分子的至少三个 CDR。在另一个实施方案中,本发明的 RON 抗体包括来自一个或多个抗体分子的至少四个 CDR。在另一个实施方案中,本发明的 RON 抗体包括来自一个或多个抗体分子的至少五个 CDR。在另一个实施方案中,本发明的 RON 抗体包括来自一个或多个抗体分子的至少六个 CDR。本文描述了包括可被包含在主题 RON 抗体中的至少一个 CDR 的示例性的抗体分子。

[0399] 在一个具体实施方案中,可以检查重链和 / 或轻链可变结构域的氨基酸序列以通过本领域熟知的方法 (例如通过将其与其它重链和轻链可变区的已知氨基酸序列进行比较以确定具有序列超变化性的区域) 来确定互补决定区 (CDR) 的序列。使用常规的重组 DNA 技术,可将一个或多个 CDR 插入构架区例如人类构架区中以使得非人类抗体人源化。所述构架区可以是天然存在的或共有的构架区,并优选地为人类构架区 (关于人类构架区的列表,参见例如 Chothia 等人, *J. Mol. Biol.* 278 :457-479 (1998))。优选地,由构架区和 CDR 的组合所产生的多核苷酸编码特异性地结合至期望的多肽例如 RON 的至少一个表位的抗体。优选地,可在构架区中制备一个或多个氨基酸取代,并且优选地,所述氨基酸取代改善抗体与其抗原的结合。另外,这种方法可被用来制备参与链内二硫键的一个或多个可变区半胱氨酸残基的氨基酸取代或缺失,以便产生缺少一个或多个链内二硫键的抗体分子。多核苷酸的其它改变被包括在本发明中并且在本领域的技术之内。

[0400] 或者,所述用于生产单链抗体的技术 (美国专利第 4,694,778 号; Bird, *Science* 242 :423-442 (1988); Huston 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 :5879-5883 (1988); 和 Ward 等人, *Nature* 334 :544-554 (1989)) 可被修改以产生单链抗体。通过氨基酸桥连将 Fv 区的重链和轻链片段连接以形成单链抗体,从而得到单链抗体。还可以使用在大肠杆菌中装配功能性 Fv 片段的技术 (Skerra 等人, *Science* 242 :1038-1041 (1988))。

[0401] 然而本发明的其它实施方案包括在不能够产生内源性免疫球蛋白的转基因动物 (例如小鼠) 中生产人类的或基本上是人类抗体 (参见例如美国专利第 6,075,181、5,939,598、5,591,669 和 5,589,369 号,其中每个均以引用的方式并入本文)。例如已经描述,在嵌合的和种系突变的小鼠中抗体重链连接区的纯合缺失导致完全抑制内源性抗体的产生。将人类免疫球蛋白基因阵列转移至这种种系突变的小鼠将在抗原攻击时导致人类抗体的产生。使用 SCID 小鼠产生人类抗体的另一个优选的方法公开在美国专利第 5,811,524 号中,其以引用的方式并入本文。将会理解的是,还可按照本文所述来分离并操作与这些人类抗体相关的遗传物质。

[0402] 另一高度有效的产生重组抗体的手段由 Newman, Biotechnology 10: 1455-1460 (1992) 公开。具体地, 此技术导致产生含有猴可变结构域和人类恒定序列的灵长源化抗体。此文献的全文以引用的方式并入本文。此外, 此技术还描述在共同指定的美国专利第 5, 658, 570、5, 693, 780 和 5, 756, 096 号之中, 其中每个均以引用的方式并入本文。

[0403] 在另一个实施方案中, 可通过显微操作来选择淋巴细胞, 并且分离可变基因。例如, 可从免疫的哺乳动物分离外周血单核细胞并在体外培养大约 7 天。可筛选培养物中符合筛选标准的特异性 IgG。可以分离来自阳性孔的细胞。单个的产生 Ig 的 B 细胞可通过 FACS 或通过补体介导的溶血斑测定中确定它们来分离。可将产生 Ig 的 B 细胞显微操作进入管中, 并使用例如 RT-PCR 扩增 VH 和 VL 基因。可将 VH 和 VL 基因克隆进抗体表达载体中并转染进细胞 (例如真核或原核细胞) 以表达。

[0404] 或者, 可以使用技术人员熟知的技术选择和培养产生抗体的细胞系。这些技术在各种实验室手册和主要出版物中都有描述。在这点上, 如下所述适合用于本发明的技术描述在 Current Protocols in Immunology (免疫学最新实验方案), Coligan 等人编辑, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991) 中, 其全文以引用的方式并入本文, 包括附录。

[0405] 本发明的抗体可由本领域已知用于合成抗体的任何方法产生, 特别是通过化学合成, 或优选地通过本文所述的重组表达技术。

[0406] 在一个实施方案中, 本发明的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物包括合成的恒定区, 其中部分地或全部地缺失了一个或多个结构域 (“缺失结构域的抗体”)。在某些实施方案中, 适合的修饰的抗体将包括缺失了结构域的构建体或变体, 其中完整的 CH2 结构域已被除去 (Δ CH2 构建体)。对于其它实施方案, 短连接肽可取代缺失的结构域以便为可变区提供柔性和移动的自由性。本领域技术人员将理解, 由于 CH2 结构域对抗体分解代谢率的调节特性, 这种构建体是特别优选的。可使用编码 IgG₁ 人类恒定结构域的载体来获得缺失结构域的构建体 (参见例如 W002/060955A2 和 W002/096948A2)。此载体被工程化以缺失 CH2 结构域并提供表达缺失结构域的 IgG₁ 恒定区的合成载体。

[0407] 在某些实施方案中, 本发明的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物是微型抗体。可使用本领域所描述的方法来制备微型抗体 (参见例如美国专利第 5, 837, 821 号或 WO 94/09817A1)。

[0408] 在一个实施方案中, 本发明的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物包括具有一些或甚至一个氨基酸的缺失或取代的免疫球蛋白重链, 只要它允许单体亚基之间的缔合。例如, 在 CH2 结构域所选区域中单个氨基酸的突变可足以基本上减少 Fc 结合并因此增加肿瘤定位。相似地, 可以期望简单地缺失控制待调节的效应子功能 (例如补体结合) 的一个或多个恒定区结构域的部分。恒定区的这种部分缺失可改进抗体的所选特征 (血清半衰期), 而让与所述主题恒定区结构域相关的其它期望的功能保持完整。此外, 如上面所提到的, 公开的抗体的恒定区可以通过突变或取代一个或多个氨基酸而合成的, 所述氨基酸增强所得构建体的特性。在这方面, 可能破坏由保守结合位点所提供的活性 (例如 Fc 结合), 而基本上保持被修饰的抗体的构型和免疫原性概况。然而其它的实施方案包括将一个或多个氨基酸加入恒定区以增强期望的特征例如效应子功能, 或者提供更多细胞毒素或碳水化合物附着。在这样的实施方案中, 可以期望插入或复制来源于所选恒定区结构域的特

定序列。

[0409] 本发明还提供这样的抗体,其包括、基本上由或者由本文所述的抗体分子(例如 VH 区和 / 或 VL 区)的变体(包括衍生物)所组成,所述抗体或其片段免疫特异性地结合至 RON 多肽或者其片段或变体。可以使用本领域技术人员已知的标准技术来将突变引入编码 RON 抗体的核苷酸序列中,其中所述技术包括但不限于导致氨基酸取代的位点定向诱变和 PCR 介导的诱变。优选地,所述变体(包括衍生物)编码相对于参考 VH 区、VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL 区、VL-CDR1、VL-CDR2 或 VL-CDR3 的少于 50 个氨基酸的取代,少于 40 个氨基酸的取代,少于 30 个氨基酸的取代,少于 25 个氨基酸的取代,少于 20 个氨基酸的取代,少于 15 个氨基酸的取代,少于 10 个氨基酸的取代,少于 5 个氨基酸的取代,少于 4 个氨基酸的取代,少于 3 个氨基酸的取代,或少于 2 个氨基酸的取代。“保守的氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基所替换的氨基酸取代。具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基家族已在本领域中被定义。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β 分支的侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。或者,可沿着编码序列的全部或部分通过例如饱和诱变来随机地引入突变,而且可筛选所得的突变体的生物活性以确定保持活性(例如结合 RON 多肽的能力)的突变体。

[0410] 例如,可能只在抗体分子的构架区或 CDR 区引入突变。引入的突变可以是沉默的或中性的错义突变,即对于抗体结合抗原的能力没有作用或作用很少,实际上一些此类突变对于氨基酸序列没有任何改变。这些类型的突变对于优化密码子使用、或者改进杂交瘤的抗体产生可能是有用的。在本文其它地方公开了编码本发明的 RON 抗体的密码子优化的编码区。或者,非中性错义突变可改变抗体结合抗原的能力。大多数沉默的和中性的错义突变的位置可能是在构架区中,而大多数非中性的错义突变的位置可能是在 CDR 中,虽然这不是绝对要求。本领域技术人员能够设计和检验具有期望特性的突变分子,所述期望特性例如不改变抗原结合活性或改变结合活性(例如改进抗原结合活性或改变抗体特异性)。诱变之后,可常规地表达被编码的蛋白,并且可以使用本文所述的技术或通过本领域已知的常规修饰技术来确定被编码的蛋白的功能活性和 / 或生物活性(例如免疫特异性地结合 RON 多肽的至少一个表位的能力)。

[0411] IV. 编码 RON 抗体的多核苷酸

[0412] 本发明还提供了编码本发明的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物的核酸分子。

[0413] 在一个实施方案中,本发明提供分离的多核苷酸,其包括、基本上由或者由编码免疫球蛋白重链可变区(VH)的核酸所组成,其中所述重链可变区 CDR 中的至少一个或所述重链可变区 VH-CDR 中的至少两个与来自本文公开的单克隆 RON 抗体的参考重链 VH-CDR1、VH-CDR2 或 VH-CDR3 氨基酸序列至少 80%、85%、90% 或 95% 相同。或者,VH 的 VH-CDR1、VH-CDR2 和 VH-CDR3 区与来自本文公开的单克隆 RON 抗体的参考重链 VH-CDR1、VH-CDR2 和 VH-CDR3 氨基酸序列至少 80%、85%、90% 或 95% 相同。因此,根据此实施方案,本发明的重链可变区具有与以下多肽序列相关的 VH-CDR1、VH-CDR2 或 VH-CDR3 多肽序列:SEQ IDNO :5、

SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:136、和 SEQ ID NO:146；SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:137、和 SEQ ID NO:147；以及 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:138、和 SEQ ID NO:148。

[0414] 在另一个实施方案中，本发明提供分离的多核苷酸，其包括、基本上由或者由编码免疫球蛋白轻链可变区 (VL) 的核酸所组成，其中所述轻链可变区 VL-CDR 中的至少一个或所述轻链可变区 VL-CDR 中的至少两个与来自本文公开的单克隆 RON 抗体的参考轻链 VL-CDR1、VL-CDR2 或 VL-CDR3 氨基酸序列至少 80%、85%、90% 或 95% 相同。或者，VL 的 VL-CDR1、VL-CDR2 和 VL-CDR3 区与来自本文公开的单克隆 RON 抗体的参考轻链 VL-CDR1、VL-CDR2 和 VL-CDR3 氨基酸序列至少 80%、85%、90% 或 95% 相同。因此，根据此实施方案，本发明的轻链可变区具有与以下多肽序列相关的 VL-CDR1、VL-CDR2 或 VL-CDR3 多肽序列：SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:141、和 SEQ ID NO:151；SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:142、和 SEQ ID NO:152；和 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:143、和 SEQ ID NO:153。

[0415] 如本领域所知，通过比较一条多肽或多核苷酸的氨基酸或核酸序列与第二条多肽或多核苷酸的序列来确定两条多肽或两条多核苷酸之间的“序列同一性”。当在本文中讨论时，可使用本领域已知的方法和计算机程序/软件来确定任何特定的多肽是否与另一条多肽为至少大约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90% 或 95% 相同，所述计算机程序/软件例如但不限于 BESTFIT 程序（威斯康辛序列分析包，用于 Unix 的第 8 版，Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711）。BESTFIT 使用 Smith 和 Waterman, *Advances in Applied Mathematics* (应用数学进展) 2:482-489 (1981) 中的局部同源性算法来找到两条序列之间最佳的同源区段。当使用 BESTFIT 或任何其它序列对比程序来确定特定序列是否根据与本发明的参考序列为例如 95% 相同时，毫无疑问地设置参数以针对参考多肽序列的全长来计算同一性百分比，并且允许参考序列中氨基酸总数的至多 5% 的同源性空位。

[0416] 在某些实施方案中，含有由多核苷酸编码的 VH 的抗体或抗原结合片段特异性地或优先地结合至 RON。在某些实施方案中，改变编码 VH 多肽的核苷酸序列而不改变由其编码的氨基酸序列。例如，可以改变序列以提高给定物种中的密码子使用，从而除去剪接位点，或除去限制酶切位点。像这些的序列优化描述在实施例 1 中，并且是本领域普通技术人员所熟知的和常规地进行的。

[0417] 在某些实施方案中,含有由所述多核苷酸编码的 VH 的抗体或抗原结合片段特异性地或优先地结合至 RON。

[0418] 在一些实施方案中,本发明提供分离的多核苷酸,其包括编码抗体 VH 多肽的核酸,其中所述 VH 多肽包括选自以下组成的组的 VH-CDR1、VH-CDR2 和 VH-CDR3 氨基酸序列:SEQ ID NO:5、6 和 7;SEQ ID NO:15、16 和 17;SEQ ID NO:25、26 和 27;SEQ ID NO:35、36 和 37;SEQ ID NO:45、46 和 47;SEQ ID NO:55、56 和 57;SEQ ID NO:65、66 和 67;SEQ ID NO:75、76 和 77;SEQ ID NO:85、86 和 87;SEQ ID NO:95、96 和 97;SEQ ID NO:116、117 和 118;SEQ ID NO:126、127 和 128;SEQ ID NO:136、137 和 138;以及 SEQ ID NO:146、147 和 148;并且其中包含所述 VH-CDR3 的抗体或其抗原结合片段特异性地结合 RON。

[0419] 在某些实施方案中,包括、基本上由或者由被一种或多种上述多核苷酸编码的 VH 所组成的抗体或其抗原结合片段特异性地或优先地结合至与参考单克隆 Fab 抗体片段(选自自由 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组)或参考单克隆抗体(选自自由 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组)相同的 RON 表位,或者将竞争性地抑制这样的单克隆抗体或片段与 RON 的结合。

[0420] 在某些实施方案中,包括、基本上由或者由被一种或多种上述多核苷酸编码的 VH 所组成的抗体或其抗原结合片段以解离常数(K_D)所表征的亲和力特异性地或优先地结合至 RON 多肽或其片段或者 RON 变体多肽,所述解离常数(K_D)不大于 $5 \times 10^{-2}\text{M}$ 、 10^{-2}M 、 $5 \times 10^{-3}\text{M}$ 、 10^{-3}M 、 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 、 10^{-4}M 、 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 、 10^{-5}M 、 $5 \times 10^{-6}\text{M}$ 、 10^{-6}M 、 $5 \times 10^{-7}\text{M}$ 、 10^{-7}M 、 $5 \times 10^{-8}\text{M}$ 、 10^{-8}M 、 $5 \times 10^{-9}\text{M}$ 、 10^{-9}M 、 $5 \times 10^{-10}\text{M}$ 、 10^{-10}M 、 $5 \times 10^{-11}\text{M}$ 、 10^{-11}M 、 $5 \times 10^{-12}\text{M}$ 、 10^{-12}M 、 $5 \times 10^{-13}\text{M}$ 、 10^{-13}M 、 $5 \times 10^{-14}\text{M}$ 、 10^{-14}M 、 $5 \times 10^{-15}\text{M}$ 或 10^{-15}M 。

[0421] 在某些实施方案中,含有由所述多核苷酸编码的 VL 的抗体或抗原结合片段特异性地或优先地结合至 RON。

[0422] 在一些实施方案中,本发明提供分离的多核苷酸,其包括编码抗体 VL 多肽的核酸,其中所述 VL 多肽包括选自以下组成的组的 VL-CDR1、VL-CDR2 和 VL-CDR3 氨基酸序列:SEQ ID NO:10、11 和 12;SEQ ID NO:20、21 和 22;SEQ ID NO:30、31 和 32;SEQ ID NO:40、41 和 42;SEQ ID NO:50、51 和 52;SEQ ID NO:60、61 和 62;SEQ ID NO:70、71 和 72;SEQ ID NO:80、81 和 82;SEQ ID NO:90、91 和 92;SEQ ID NO:100、101 和 102;SEQ ID NO:121、122 和 123;SEQ ID NO:131、132 和 133;SEQ ID NO:141、142 和 143;以及 SEQ ID NO:151、152 和 153;并且其中包含所述 VL-CDR3 的抗体或其抗原结合片段特异性地结合 RON。

[0423] 在某些实施方案中,包括、基本上由或者由被一种或多种上述多核苷酸编码的 VL 所组成的抗体或其抗原结合片段特异性地或优先地结合至与参考单克隆 Fab 抗体片段(选自自由 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组)或参考单克隆抗体(选自自由 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组)相同的 RON 表位,或者将竞争性地抑制这样的单克隆抗体或片段与 RON 的结合。

[0424] 在某些实施方案中,包括、基本上由或者由被一种或多种上述多核苷酸编码的 VL 所组成的抗体或其抗原结合片段以解离常数(K_D)所表征的亲和力特异性地或优先地结合至 RON 多肽或其片段或者 RON 变体多肽,所述解离常数(K_D)不大于 $5 \times 10^{-2}\text{M}$ 、 10^{-2}M 、 $5 \times 10^{-3}\text{M}$ 、 10^{-3}M 、 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 、 10^{-4}M 、 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 、 10^{-5}M 、 $5 \times 10^{-6}\text{M}$ 、 10^{-6}M 、 $5 \times 10^{-7}\text{M}$ 、 10^{-7}M 、 $5 \times 10^{-8}\text{M}$ 、 10^{-8}M 、 $5 \times 10^{-9}\text{M}$ 、 10^{-9}M 、 $5 \times 10^{-10}\text{M}$ 、 10^{-10}M 、 $5 \times 10^{-11}\text{M}$ 、 10^{-11}M 、 $5 \times 10^{-12}\text{M}$ 、 10^{-12}M 、 $5 \times 10^{-13}\text{M}$ 、 10^{-13}M 、

$5 \times 10^{-14} \text{M}$ 、 10^{-14}M 、 $5 \times 10^{-15} \text{M}$ 或 10^{-15}M 。

[0425] 在另外的实施方案中,本发明包括分离的多核苷酸,其包括、基本上由或者由编码与参考 VH 多肽序列至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 相同的 VH 的核酸所组成,所述参考 VH 多肽序列选自 SEQ ID NO :4、14、24、34、44、54、64、74、84、94、115、125、135 和 145 组成的组。在某些实施方案中,含有由所述多核苷酸编码的 VH 的抗体或抗原结合片段特异性地或优先地结合至 RON。

[0426] 另一方面,本发明包括分离的多核苷酸,其包括、基本上由或者由编码 VH 的核酸序列所组成,所述 VH 具有选自 SEQ ID NO :4、14、24、34、44、54、64、74、84、94、115、125、135 和 145 组成的组的多肽序列。在某些实施方案中,含有由所述多核苷酸编码的 VH 的抗体或抗原结合片段特异性地或优先地结合至 RON。

[0427] 在另外的实施方案中,本发明包括分离的多核苷酸,其包括、基本上由或者由编码与参考核酸序列至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 相同的编码 VH 的核酸所组成,所述参考核酸序列选自 SEQ ID NO :3、13、23、33、43、53、63、73、83、93、114、124、134 和 144 组成的组。在某些实施方案中,含有由所述多核苷酸编码的 VH 的抗体或抗原结合片段特异性地或优先地结合至 RON。

[0428] 另一方面,本发明包括分离的多核苷酸,其包括、基本上由或者由编码本发明的 VH 的核酸序列所组成,其中所述 VH 的氨基酸序列选自 SEQ ID NO :4、14、24、34、44、54、64、74、84、94、115、125、135 和 145 组成的组。本发明还包括分离的多核苷酸,其包括、基本上由或者由编码本发明的 VH 的核酸序列所组成,所述核酸序列选自 SEQ ID NO :3、13、23、33、43、53、63、73、83、93、114、124、134 和 144 组成的组。在某些实施方案中,含有由此类多核苷酸编码的 VH 的抗体或抗原结合片段特异性地或优先地结合至 RON。

[0429] 在某些实施方案中,包括、基本上由或者由被一种或多种上述多核苷酸编码的 VH 所组成的抗体或其抗原结合片段特异性地或优先地结合至与参考单克隆 Fab 抗体片段(选自 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组)或参考单克隆抗体(选自 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组)相同的 RON 表位,或者将竞争性地抑制这样的单克隆抗体或片段与 RON 的结合,或者将竞争性地抑制这样的单克隆抗体与 RON 的结合。

[0430] 在某些实施方案中,包括、基本上由或者由被一种或多种上述多核苷酸编码的 VH 所组成的抗体或其抗原结合片段以解离常数 (K_D) 所表征的亲和力特异性地或优先地结合至 RON 多肽或其片段或者 RON 变体多肽,所述解离常数 (K_D) 不大于 $5 \times 10^{-2} \text{M}$ 、 10^{-2}M 、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ 、 10^{-3}M 、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 10^{-4}M 、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 10^{-5}M 、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 10^{-6}M 、 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 10^{-7}M 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 10^{-8}M 、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 10^{-9}M 、 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 10^{-10}M 、 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 10^{-11}M 、 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 、 10^{-12}M 、 $5 \times 10^{-13} \text{M}$ 、 10^{-13}M 、 $5 \times 10^{-14} \text{M}$ 、 10^{-14}M 、 $5 \times 10^{-15} \text{M}$ 或 10^{-15}M 。

[0431] 在另外的实施方案中,本发明包括分离的多核苷酸,其包括、基本上由或者由编码 VL 的核酸所组成,所述编码 VL 的核酸与参考 VL 多肽序列至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 相同,所述参考 VL 多肽序列选自 SEQ ID NO :9、19、29、39、49、59、69、79、89、99、120、130、140 和 150 组成的组。在另外的实施方案中,本发明包括分离的多核苷酸,其包括、基本上由或者由编码 VL 的核酸所组成,所述编码 VL 的核酸与参考核酸序列至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 相同,所述参考核酸序列选自 SEQ ID NO :8、18、28、38、48、58、

68、78、88、98、119、129、139 和 149 组成的组。在某些实施方案中,含有由此类多核苷酸编码的 VL 的抗体或抗原结合片段特异性地或优先地结合至 RON。

[0432] 另一方面,本发明包括分离的多核苷酸,其包括、基本上由或者由编码 VL 的核酸序列所组成,所述 VL 具有选自 SEQ ID NO :9、19、29、39、49、59、69、79、89、99、120、130、140 和 150 组成的组的多肽序列。本发明还包括分离的多核苷酸,其包括、基本上由或者由编码本发明的 VL 的核酸序列所组成,其中所述核酸序列选自 SEQ ID NO :8、18、28、38、48、58、68、78、88、98、119、129、139 和 149 组成的组。在某些实施方案中,含有由此类多核苷酸编码的 VL 的抗体或抗原结合片段特异性地或优先地结合至 RON。

[0433] 在某些实施方案中,包括、基本上由或者由被一种或多种上述多核苷酸编码的 VL 所组成的抗体或其抗原结合片段特异性地或优先地结合至与参考单克隆 Fab 抗体片段(选自自由 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组)或参考单克隆抗体(选自自由 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组)相同的 RON 表位,或者将竞争性地抑制这样的单克隆抗体或片段与 RON 的结合。

[0434] 在某些实施方案中,包括、基本上由或者由被一种或多种上述多核苷酸编码的 VL 所组成的抗体或其抗原结合片段以解离常数 (K_D) 所表征的亲和力特异性地或优先地结合至 RON 多肽或其片段或者 RON 变体多肽,所述解离常数 (K_D) 不大于 $5 \times 10^{-2}M$ 、 $10^{-2}M$ 、 $5 \times 10^{-3}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $5 \times 10^{-4}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $5 \times 10^{-5}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $5 \times 10^{-6}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-7}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $5 \times 10^{-9}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $5 \times 10^{-10}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $5 \times 10^{-11}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $5 \times 10^{-13}M$ 、 $10^{-13}M$ 、 $5 \times 10^{-14}M$ 、 $10^{-14}M$ 、 $5 \times 10^{-15}M$ 或 $10^{-15}M$ 。

[0435] 上述多核苷酸中的任一个还可包括另外的核酸,所述另外的核酸编码例如指导被编码的多肽的分泌的信号肽、如本文所述的抗体恒定区或如本文所述的其它异源性多肽。

[0436] 而且,如本文其它地方更详细描述,本发明包括含有一种或多种上述的多核苷酸的多核苷酸的组合物。在一个实施方案中,本发明包括含有第一多核苷酸和第二多核苷酸的组合物,其中所述第一多核苷酸编码本文所述的 VH 多肽而且所述第二多核苷酸编码本文所述的 VL 多肽。特别地,组合物包括,基本上由或者由 VH 多核苷酸和 VL 多核苷酸所组成,其中所述 VH 多核苷酸和 VL 多核苷酸编码分别与参考 VH 和 VL 多肽氨基酸序列至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 相同的多肽,所述参考 VH 和 VL 多肽氨基酸序列选自 SEQ ID NO :4 和 9、14 和 19、24 和 29、34 和 39、44 和 49、54 和 59、64 和 69、74 和 79、84 和 89、94 和 99、115 和 120、125 和 130、135 和 140、以及 145 和 150 组成的组。或者可选地,组合物包括,基本上由或者由 VH 多核苷酸和 VL 多核苷酸所组成,所述 VH 多核苷酸和 VL 多核苷酸分别与参考 VL 和 VL 核酸序列至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 相同,所述参考 VL 和 VL 核酸序列选自 SEQ ID NO :3 和 8、13 和 18、23 和 28、33 和 38、43 和 48、53 和 58、63 和 68、73 和 78、83 和 88、93 和 98、114 和 119、124 和 129、134 和 139、以及 144 和 149 组成的组。在某些实施方案中,含有由这种组合物中的多核苷酸所编码的 VH 和 VL 的抗体或抗原结合片段特异性地或优先地结合至 RON。

[0437] 本发明还包括本发明的多核苷酸的片段,如别处描述的。另外,编码如本文所述的融合多核苷酸、Fab 片段和其它衍生物的多核苷酸也被本发明所包括。

[0438] 可通过本领域任何已知方法来产生或制造多核苷酸。例如,如果抗体的核苷酸序列是已知的,那么可以从化学合成的寡核苷酸(例如,如 Kutmeier 等人, BioTechniques

17:242(1994) 中所述) 组装编码该抗体的多核苷酸, 这简单地包括合成重叠的含有编码该抗体的部分序列的寡核苷酸, 将那些寡核苷酸退火并连接, 并且然后将连接的寡核苷酸通过 PCR 进行扩增。

[0439] 或者, 可以由来自适合来源的核酸产生编码 RON 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的多核苷酸。如果含有编码特定抗体的核酸的克隆是不可得的但该抗体分子的序列是已知的, 那么编码所述抗体的核酸可以化学合成或者从适合来源 (例如抗体 cDNA 文库, 或者从表达所述抗体或其它 RON 抗体的任何组织或细胞 (例如被选择来表达抗体的杂交瘤细胞) 所产生的 cDNA 文库或从中所分离的核酸, 优选为 poly A+RNA) 通过如下手段获得以便确定例如来自编码所述抗体或其它 RON 抗体的 cDNA 文库的 cDNA 克隆, 所述手段是通过使用可与序列的 3' 和 5' 端杂交的合成引物进行 PCR 扩增或者通过使用对特定基因序列有特异性的寡核苷酸探针进行克隆。然后使用本领域熟知的任何方法将通过 PCR 产生的扩增的核酸克隆到可复制的克隆载体中。

[0440] 确定了 RON 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的核苷酸序列和相应的氨基酸序列之后, 可以使用本领域熟知的用于操作核苷酸序列的方法例如重组 DNA 技术、位点定向诱变、PCR 等 (参见例如在 Sambrook 等人, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (分子克隆实验手册), 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1990) 和 Ausubel 等人编辑, *Current Protocols in Molecular Biology* (分子生物学最新实验方案), John Wiley & Sons, NY (1998) 中所描述的技术, 二者的全文以引用的方式并入本文) 来操作它的核苷酸序列, 以产生具有不同氨基酸序列的抗体, 例如产生氨基酸取代、缺失和 / 或插入。

[0441] 编码 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物的多核苷酸可由任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸所组成, 所述多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸可以是未修饰的 RNA 或 DNA 或者修饰的 RNA 或 DNA。例如, 编码 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物的多核苷酸可由单链和双链 DNA、作为单链和双链区域的混合物的 DNA、单链和双链 RNA 以及作为单链和双链区域的混合物的 RNA、包括可能是单链的或更通常地是双链的或者单链和双链区域混合物的 DNA 和 RNA 在内的杂交分子所组成。另外, 编码 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物的多核苷酸可由三链区域所组成, 其包括 RNA 或 DNA 或者 RNA 和 DNA 二者。编码 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物的多核苷酸还可含有一个或多个修饰的碱基或者为了稳定性或其它原因而修饰的 DNA 或 RNA 骨架。“修饰的”碱基包括例如三苯甲基化的碱基和不常见的碱基例如肌苷。可以对 DNA 和 RNA 进行各种修饰; 因此, “多核苷酸”包括化学地、酶促地或代谢地修饰的形式。

[0442] 可通过将一个或多个核苷酸取代、添加或缺失引入免疫球蛋白的核苷酸序列中从而将一个或多个氨基酸取代、添加或缺失引入被编码的蛋白来产生编码来源于免疫球蛋白的多肽 (例如免疫球蛋白重链部分或轻链部分) 的非天然变体的分离的多核苷酸。可以通过标准的技术例如位点定向诱变和 PCR 介导的诱变来引入突变。优选地, 在一个或多个非必需氨基酸残基上进行保守的氨基酸取代。

[0443] V. RON 抗体多肽

[0444] 本发明还涉及构成 RON 抗体的分离的多肽, 以及编码这种多肽的多核苷酸。本发明的 RON 抗体包括多肽例如编码来源于免疫球蛋白分子的 RON 特异性抗原结合区的氨基酸

序列。“来源于”指定蛋白的多肽或氨基酸序列是指具有某种氨基酸序列的多肽的起源。在某些情况下,来源于特定起始多肽或氨基酸序列的多肽或氨基酸序列具有与该起始序列或其一部分基本上相同或者可以由本领域普通技术人员确定为在起始序列中具有其起源的氨基酸序列,其中所述部分是由至少 10-20 个氨基酸、至少 20-30 个氨基酸、至少 30-50 个氨基酸所组成的。

[0445] 在一个实施方案中,本发明提供分离的多肽,其包括、基本上由或者由免疫球蛋白重链可变区 (VH) 所组成,其中所述重链可变区 VH-CDR 中的至少一个或所述重链可变区 VH-CDR 中的至少两个与来自本文公开的单克隆 RON 抗体的参考重链 VH-CDR1、VH-CDR2 或 VH-CDR3 氨基酸序列至少 80%、85%、90% 或 95% 相同。或者, VH 的 VH-CDR1、VH-CDR2 和 VH-CDR3 区与来自本文公开的单克隆 RON 抗体的参考重链 VH-CDR1、VH-CDR2 和 VH-CDR3 氨基酸序列至少 80%、85%、90% 或 95% 相同。尽管 VH-CDR 可由 Kabat 系统限定,但其它 CDR 定义例如由 Chothia 系统限定的 VH-CDR 也包括在本发明中。在某些实施方案中,包含所述 VH 的抗体或抗原结合片段特异性或优先地结合 RON。

[0446] 在一些实施方案中,本发明提供分离的多肽,其包括、基本上由或者由免疫球蛋白重链可变区 (VH) 所组成,在其中 VH-CDR1、VH-CDR2 和 VH-CDR3 区除了在所述 VH-CDR 中的至少一个上的 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个或 6 个氨基酸取代之外具有选自以下组成的组的多肽序列:SEQ ID NO:5、6 和 7;SEQ ID NO:15、16 和 17;SEQ ID NO:25、26 和 27;SEQ ID NO:35、36 和 37;SEQ ID NO:45、46 和 47;SEQ ID NO:55、56 和 57;SEQ ID NO:65、66 和 67;SEQ ID NO:75、76 和 77;SEQ ID NO:85、86 和 87;SEQ ID NO:95、96 和 97;SEQ ID NO:116、117 和 118;SEQ ID NO:126、127 和 128;SEQ ID NO:136、137 和 138;以及 SEQ ID NO:146、147 和 148。

[0447] 在一些实施方案中,本发明提供分离的多肽,其包括、基本上由或者由免疫球蛋白重链可变区 (VH) 所组成,在其中 VH-CDR1、VH-CDR2 和 VH-CDR3 区具有选自以下组成的组的多肽序列:SEQ ID NO:5、6 和 7;SEQ ID NO:15、16 和 17;SEQ ID NO:25、26 和 27;SEQ ID NO:35、36 和 37;SEQ ID NO:45、46 和 47;SEQ ID NO:55、56 和 57;SEQ ID NO:65、66 和 67;SEQ ID NO:75、76 和 77;SEQ ID NO:85、86 和 87;SEQ ID NO:95、96 和 97;SEQ ID NO:116、117 和 118;SEQ ID NO:126、127 和 128;SEQ ID NO:136、137 和 138;以及 SEQ ID NO:146、147 和 148。

[0448] 在另外的实施方案中,本发明包括分离的多肽,其包括、基本上由或者由与参考 VH 多肽氨基酸序列至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 相同的 VH 多肽所组成,所述参考 VH 多肽序列选自 4、14、24、34、44、54、64、74、84、94、115、125、135 和 145 组成的组。在某些实施方案中,含有所述 VH 多肽的抗体或抗原结合片段特异性地或优先地结合至 RON。

[0449] 在另一方面,本发明包括分离的多肽,其包括、基本上由或者由选自 SEQ ID NO:4、14、24、34、44、54、64、74、84、94、115、125、135 和 145 组成的组的 VH 多肽所组成。在某些实施方案中,含有所述 VH 多肽的抗体或抗原结合片段特异性地或优先地结合至 RON。

[0450] 在某些实施方案中,包括、基本上由或者由一种或多种上述 VH 多肽所组成的抗体或其抗原结合片段特异性地或优先地结合至与参考单克隆 Fab 抗体片段(选自 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组)或参考单克隆抗体(选自 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组)相同的 RON

表位,或者将竞争性地抑制这样的单克隆抗体或片段与 RON 的结合。

[0451] 在某些实施方案中,包括、基本上由或者由一种或多种上述 VH 多肽所组成的抗体或其抗原结合片段以解离常数 (K_D) 所表征的亲合力特异性地或优先地结合至 RON 多肽或其片段或者 RON 变体多肽,所述解离常数 (K_D) 不大于 $5 \times 10^{-2}M$ 、 $10^{-2}M$ 、 $5 \times 10^{-3}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $5 \times 10^{-4}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $5 \times 10^{-5}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $5 \times 10^{-6}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-7}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $5 \times 10^{-9}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $5 \times 10^{-10}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $5 \times 10^{-11}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $5 \times 10^{-13}M$ 、 $10^{-13}M$ 、 $5 \times 10^{-14}M$ 、 $10^{-14}M$ 、 $5 \times 10^{-15}M$ 或 $10^{-15}M$ 。

[0452] 在另一个实施方案中,本发明提供分离的多肽,其包括、基本上由或者由免疫球蛋白轻链可变区 (VL) 所组成,其中所述轻链可变区 VL-CDR 中的至少一个或所述轻链可变区 VL-CDR 中的至少两个与来自本文公开的单克隆 RON 抗体的参考轻链 VL-CDR1、VL-CDR2 或 VL-CDR3 氨基酸序列至少 80%、85%、90% 或 95% 相同。或者,VL 的 VL-CDR1、VL-CDR2 和 VL-CDR3 区与来自本文公开的单克隆 RON 抗体的参考轻链 VL-CDR1、VL-CDR2 和 VL-CDR3 氨基酸序列至少 80%、85%、90% 或 95% 相同。尽管 VL-CDR 可由 Kabat 系统限定,但其它 CDR 定义例如由 Chothia 系统限定的 VL-CDR 也包括在本发明中。在某些实施方案中,包含所述 VL 多肽的抗体或抗原结合片段特异性或优先地结合 RON。

[0453] 在一些实施方案中,本发明提供分离的多肽,其包括,基本上由或者由免疫球蛋白轻链可变区 (VL) 所组成,在其中 VL-CDR1、VL-CDR2 和 VL-CDR3 区除了在所述 VL-CDR 中的至少一个上的 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个或 6 个氨基酸取代之外具有选自以下组成的组的多肽序列:SEQ ID NO:10、11 和 12;SEQ ID NO:20、21 和 22;SEQ ID NO:30、31 和 32;SEQ ID NO:40、41 和 42;SEQ ID NO:50、51 和 52;SEQ ID NO:60、61 和 62;SEQ ID NO:70、71 和 72;SEQ ID NO:80、81 和 82;SEQ ID NO:90、91 和 92;SEQ ID NO:100、101 和 102;SEQ ID NO:121、122 和 123;SEQ ID NO:131、132 和 133;SEQ ID NO:141、142 和 143;以及 SEQ ID NO:151、152 和 153。

[0454] 在一些实施方案中,本发明提供分离的多肽,其包括、基本上由或者由免疫球蛋白重链可变区 (VL) 所组成,在其中 VL-CDR1、VL-CDR2 和 VL-CDR3 区具有选自以下组成的组的多肽序列:SEQ ID NO:10、11 和 12;SEQ ID NO:20、21 和 22;SEQ ID NO:30、31 和 32;SEQ ID NO:40、41 和 42;SEQ ID NO:50、51 和 52;SEQ ID NO:60、61 和 62;SEQ ID NO:70、71 和 72;SEQ ID NO:80、81 和 82;SEQ ID NO:90、91 和 92;SEQ ID NO:100、101 和 102;SEQ ID NO:121、122 和 123;SEQ ID NO:131、132 和 133;SEQ ID NO:141、142 和 143;以及 SEQ ID NO:151、152 和 153。

[0455] 在另外的实施方案中,本发明包括分离的多肽,其包括,基本上由或者由与参考 VL 多肽序列至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 相同的 VL 多肽所组成,其中所述参考 VL 多肽序列选自 SEQ ID NO:9、19、29、39、49、59、69、79、89、99、120、130、140 和 150 组成的组。在某些实施方案中,含有所述 VL 多肽的抗体或抗原结合片段特异性地或优先地结合至 RON。

[0456] 在另一方面,本发明包括分离的多肽,其包括,基本上由或者由选自 SEQ ID NO:9、19、29、39、49、59、69、79、89、99、120、130、140 和 150 组成的组的 VL 多肽所组成。在某些实施方案中,含有所述 VL 多肽的抗体或抗原结合片段特异性地或优先地结合至 RON。

[0457] 在某些实施方案中,包括、基本上由或者由一种或多种上述 VL 多肽所组成的抗体或其抗原结合片段特异性地或优先地结合至与参考单克隆 Fab 抗体片段(选自 M14-H06、

M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组) 或参考单克隆抗体(选自 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B 10 组成的组) 相同的 RON 表位, 或者将竞争性地抑制这样的单克隆抗体或片段与 RON 的结合。

[0458] 在某些实施方案中, 包括、基本上由或者由一种或多种上述 VL 多肽所组成的抗体或其抗原结合片段以解离常数 (K_D) 所表征的亲合力特异性地或优先地结合至 RON 多肽或其片段或者 RON 变体多肽, 所述解离常数 (K_D) 不大于 $5 \times 10^{-2}M$ 、 $10^{-2}M$ 、 $5 \times 10^{-3}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $5 \times 10^{-4}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $5 \times 10^{-5}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $5 \times 10^{-6}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-7}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $5 \times 10^{-9}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $5 \times 10^{-10}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $5 \times 10^{-11}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $5 \times 10^{-13}M$ 、 $10^{-13}M$ 、 $5 \times 10^{-14}M$ 、 $10^{-14}M$ 、 $5 \times 10^{-15}M$ 或 $10^{-15}M$ 。

[0459] 在其它实施方案中, 抗体或其抗原结合片段包括、基本上由或者由 VH 多肽和 VL 多肽组成, 其中所述 VH 多肽和 VL 多肽分别与参考 VH 和 VL 多肽氨基酸序列至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 相同, 所述参考 VH 和 VL 多肽氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 4 和 9、14 和 19、24 和 29、34 和 39、44 和 49、54 和 59、64 和 69、74 和 79、84 和 89、94 和 99、115 和 120、125 和 130、135 和 134、以及 145 和 150 组成的组。在某些实施方案中, 含有这些 VH 和 VL 多肽的抗体或抗原结合片段特异性地或优先地结合至 RON。

[0460] 上述任何多肽还可包括另外的多肽, 例如指导被编码的多肽的分泌的信号肽、本文所述的抗体恒定区或本文所述的其它异源性多肽。另外, 如其它地方所述, 本发明的多肽包括多肽片段。另外, 如本文所述, 本发明的多肽包括融合多肽、Fab 片段和其它衍生物。

[0461] 而且, 如本文其它地方更详细描述, 本发明包括含有上述多肽的组合物。

[0462] 本领域普通技术人员还将理解, 可以修饰本文所公开的 RON 抗体多肽以使它们在氨基酸序列上与天然存在的结合多肽不同, 其中所述 RON 抗体多肽来源于这些天然存在的结合多肽。例如, 来源于指定蛋白的多肽或氨基酸序列可以是相似的, 例如与起始序列具有某种百分比同一性, 例如, 它可以与起始序列 60%、70%、75%、80%、85%、90% 或 95% 相同。

[0463] 此外, 可以进行导致在“非必需的”氨基酸区域的保守取代或改变的核苷酸或氨基酸取代、缺失或插入。例如, 来源于指定蛋白的多肽或氨基酸序列可以除了一个或多个单个氨基酸取代、插入或缺失之外与起始序列相同, 例如, 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、15 个、20 个或更多单个氨基酸取代、插入或缺失。来源于指定蛋白的多肽或氨基酸序列可以除了一个或多个单个氨基酸取代、插入或缺失之外与起始序列相同, 例如, 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、15 个、20 个或更多单个氨基酸取代、插入或缺失。在其它实施方案中, 来源于指定蛋白的多肽或氨基酸序列除了 2 个或更少、3 个或更少、4 个或更少、5 个或更少、6 个或更少、7 个或更少、8 个或更少、9 个或更少、10 个或更少、15 个或更少或者 20 个或更少的单个氨基酸取代、插入或缺失之外可以与起始序列相同。在某些实施方案中, 来源于指定蛋白的多肽或氨基酸序列相对于起始序列具有 1 至 5 个、1 至 10 个、1 至 15 个或 1 至 20 个单个氨基酸取代、插入或缺失。

[0464] 本发明的某些 RON 抗体多肽包括、基本上由或者由来源于人类氨基酸序列的氨基酸序列所组成。然而, 某些 RON 抗体多肽包括来源于另一哺乳动物物种的一个或多个连续的氨基酸。例如, 本发明的 RON 抗体可包括灵长类重链部分、铰链部分或抗原结合区。在另一个例子中, 一种或多种来源于鼠的氨基酸可存在于非鼠抗体多肽中, 例如在 RON 抗体的

抗原结合位点中。在另一个例子中，RON 抗体的抗原结合位点完全是鼠的。在某些治疗应用中，设计 RON 特异性的抗体或其抗原结合片段、变体或类似物以使其在施用所述抗体的动物中不是免疫原性的。

[0465] 在某些实施方案中，RON 抗体多肽包括通常不与抗体缔合的氨基酸序列或者一个或多个部分。下面更详细地描述了示例性的修饰。例如，本发明的单链 Fv 抗体片段可包括柔性连接序列，或可被修饰以添加功能性部分（例如 PEG、药物、毒素或标记物）。

[0466] 本发明的 RON 抗体多肽可包括，基本上由或者由融合蛋白所组成。融合蛋白是嵌合分子，其包括例如具有至少一个靶结合位点的免疫球蛋白抗原结合结构域，以及至少一个异源性部分即在性质上是与免疫球蛋白抗原结合结构域非天然连接的部分。氨基酸序列通常可存在于被集合在融合多肽的不同蛋白中，或者它们通常可存在于相同蛋白中但在融合多肽中以新的排列安置。可以通过例如化学合成或通过产生和翻译多核苷酸来产生融合蛋白，其中所述多核苷酸中的肽区域以期望的关系被编码。

[0467] 应用于多核苷酸或多肽的术语“异源性的”是指多核苷酸或多肽来源于与被比较的其它实体不同的实体。例如，如本文所用，待融合至 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或类似物的“异源性的多肽”来源于相同物种的非免疫球蛋白多肽，或者不同物种的免疫球蛋白或非免疫球蛋白多肽。

[0468] “保守的氨基酸取代”是这样的取代，在其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基所替换。具有相似侧链的氨基酸残基家族已在本领域中定义，包括碱性侧链（例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、酸性侧链（例如天冬氨酸、谷氨酸）、不带电的极性侧链（例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸）、非极性侧链（例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸）、 β 分支的侧链（例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和芳香侧链（例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）。因此，免疫球蛋白多肽中的非必需氨基酸残基优选地被来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基所替换。在另一个实施方案中，一串氨基酸可被结构上相似但在侧链家族成员的顺序和 / 或组成上不同的一串所替换。

[0469] 或者，在另一个实施方案中，可沿着免疫球蛋白编码序列的全部或部分通过例如饱和诱变来随机地引入突变，并且可将所得的突变体并入 RON 抗体以用于本文公开的诊断和治疗方法，并筛选其结合至期望的抗原例如 RON 的能力。

[0470] VI. 融合蛋白和抗体轭合物

[0471] 如本文其它地方更详细地讨论的，本发明的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物还可以在 N 端或 C 端被重组地融合至异源性多肽，或化学地轭合（包括共价和非共价轭合）至多肽或其它组合物。例如，RON 特异性的 RON 抗体可被重组地融合或轭合至在检测测定中作为标记物有用的分子和效应分子，如异源性多肽、药物、放射性核素或毒素。参见例如 PCT 公布 WO 92/08495 ;WO 91/14438 ;WO 89/12624 ;美国专利第 5,314,995 号和 EP 396,387。

[0472] 本发明的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物包括被修饰的衍生物，即，通过将任何类型的分子共价连接至抗体以致共价连接不阻止抗体与 RON 的结合。例如但不进行限制，抗体衍生物包括已经通过例如如下方式进行修饰的抗体：糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化（phosphorylation）、磷酸化、酰胺化、通过已知保护 / 封端基团的衍生化、蛋

白酶剪切、与细胞配体或其它蛋白的连接等。可以通过已知技术进行许多化学修饰中的任一种,其包括但不限于特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。另外地,衍生物可含有一种或多种非经典的氨基酸。

[0473] 本发明的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物可由通过肽键或修饰的肽键(即肽等排体)互相连接的氨基酸组成,并且可含有除了 20 个基因编码的氨基酸之外的氨基酸。可通过天然过程(例如翻译后加工)或本领域公知的化学修饰技术来修饰 RON 特异性抗体。在基础教科书中、在更详细的专题著作中、并在大量的研究文献中很好地描述了这些修饰。修饰可发生在 RON 特异性抗体中任何地方,其包括肽骨架、氨基酸侧链和氨基或羧基末端,或在如碳水化合物等部分上。将理解的是,相同类型的修饰可以相同或不同程度地存在于给定的 RON 特异性抗体的若干位点。而且,给定的 RON 特异性抗体可含有许多类型的修饰。RON 特异性抗体可以由于例如泛素化而是分支的,并且它们可以是含有或不含分支的环状。环状的、分支的和分支环状的 RON 特异性抗体可从翻译后的天然过程得到,或可以通过合成方法制备。修饰包括乙酰化、酰化、ADP 核糖基化、酰胺化、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、共价交联的形成、半胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、 γ -羧基化、糖基化、GPI 锚的形成、羟基化、碘化、甲基化、十四酰化、氧化、聚乙二醇化、蛋白酶解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒化(selenoylation)、硫酸化、转运 RNA 介导的氨基酸向蛋白的添加例如精氨酰化(arginylation)和泛素化。(参见例如 Proteins-Structure And Molecular Properties(蛋白-结构和分子特性), T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York 第 2 版, (1993); Posttranslational Covalent Modification Of Proteins(蛋白的翻译后共价修饰), B.C. Johnson 编辑, Academic Press, New York, 第 1-12 页 (1983); Seifter 等人, Meth. Enzymol. 182: 626-646 (1990); Rattan 等人, Ann. NY Acad. Sci. 663: 48-62 (1992))。

[0474] 本发明还提供这样的融合蛋白,其包括 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物和异源性多肽。与抗体融合的异源性多肽对功能可能是有用的,或者对表达靶 RON 多肽的细胞是有用的。在一个实施方案中,本发明的融合蛋白包括、基本上由或者由具有本发明抗体的任何一个或多个 VH 区的氨基酸序列或本发明抗体的任何一个或多个 VL 区的氨基酸序列的多肽或其片段或变体、和异源性多肽序列组成。在另一个实施方案中,用于本文公开的诊断和治疗方法的融合蛋白包括、基本上由或者由具有 RON 特异性抗体、或其片段、变体或衍生物的任何两个、三个 VH-CDR 的氨基酸序列,或者具有 RON 特异性抗体、或其片段、变体或衍生物的任何两个、三个 VL-CDR 的氨基酸序列的多肽和异源性多肽序列组成。在一个实施方案中,融合蛋白包括具有本发明的 RON 特异性抗体、或其片段、衍生物或变体的 VH-CDR3 的氨基酸序列的多肽和异源性多肽序列,所述融合蛋白特异性地结合至 RON 的至少一个表位。在另一个实施方案中,融合蛋白包括具有本发明的 RON 特异性抗体的至少一个 VH 区的氨基酸序列和本发明的 RON 特异性抗体的至少一个 VL 区的氨基酸序列的多肽,或者其片段、衍生物或变体,以及异源性多肽序列。优选地,融合蛋白的 VH 和 VL 区对应于特异性地结合 RON 的至少一个表位的单个来源的抗体(或 scFv 或 Fab 片段)。在又一个实施方案中,用于本文公开的诊断和治疗方法的融合蛋白包括这样的多肽,其具有 RON 特异性抗体的任何一个、两个、三个或更多个 VH CDR 的氨基酸序列和 RON 特异性抗体的任

何一个、两个、三个或更多个 VL CDR 的氨基酸序列的多肽,或者其片段或变体,以及异源性多肽序列。优选地,两个、三个、四个、五个、六个或更多个 VH-CDR 或 VL-CDR 对应于本发明的单个来源的抗体(或 scFv 或 Fab 片段)。编码这些融合蛋白的核酸分子也包括在本发明中。

[0475] 文献中报道的示例性融合蛋白包括以下物质的融合蛋白:T 细胞受体(Gascoigne 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936-2940(1987));CD4(Capon 等人, Nature 337:525-531(1989));Traunecker 等人, Nature339:68-70(1989);Zettmeissl 等人, DNA Cell Biol. USA 9:347-353(1990);和 Byrn 等人, Nature 344:667-670(1990));L- 选择蛋白(归巢受体)(Watson 等人, J. Cell. Biol. 110:2221-2229(1990);和 Watson 等人, Nature349:164-167(1991));CD44(Aruffo 等人, Cell 61:1303-1313(1990));CD28 和 B7(Linsley 等人, J. Exp. Med. 173:721-730(1991));CTLA-4(Lisley 等人, J. Exp. Med. 174:561-569(1991));CD22(Stamenkovic 等人, Cell66:1133-1144(1991));TNF 受体(Ashkenazi 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA88:10535-10539(1991));Lesslauer 等人, Eur. J. Immunol. 27:2883-2886(1991);和 Peppel 等人, J. Exp. Med. 174:1483-1489(1991));以及 IgE 受体 α (Ridgway 和 Gorman, J. Cell. Biol. 第 115 卷,摘要号 1448(1991))。

[0476] 如本文其它地方所讨论的,本发明的 RON 抗体或者其抗原结合片段、变体或衍生物可被融合至异源性多肽以增加多肽的体内半衰期或者供使用本领域已知方法的免疫测定中使用。例如,在一个实施方案中,可将 PEG 轭合至本发明的 RON 抗体以增加其体内半衰期。Leong, S. R. 等人, Cytokine16:106(2001);Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531(2002);或 Weir 等人, Biochem. Soc. Transactions 30:512(2002)。

[0477] 此外,本发明的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物可被融合至标志物序列(例如肽)以促进它们的纯化或检测。在优选的实施方案中,标志物氨基酸序列是六组氨酸肽,例如在 pQE 载体(QIAGEN, Inc., 9259Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311)中提供的标签,除此之外,许多其它的也可以市售的方式获得。如 Gentz 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA86:821-824(1989)中所述,例如,六组氨酸提供融合蛋白的方便的纯化。对纯化有用的其它肽标签包括但不限于“HA”标签和“flag”标签,所述“HA”标签对应于来源于流感血凝素蛋白的表位(Wilson 等人, Cell 37:767(1984))。

[0478] 融合蛋白可以利用本领域熟知的方法来制备(参见,例如美国专利第 5,116,964 和 5,225,538 号)。可以根据经验选择进行融合的确切位点以便优化融合蛋白的分泌或结合特性。然后编码融合蛋白的 DNA 被转染到宿主细胞内进行表达。

[0479] 能够以未轭合的形式使用本发明的 RON 抗体,或可将其轭合至各种分子中的至少一个以例如改进该分子的治疗特性,促进靶检测或用于患者的成像或治疗。当进行纯化时,本发明的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物可在纯化之前或之后被标记或轭合。

[0480] 特别地,本发明的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物可被轭合至治疗剂、前体药物、肽、蛋白、酶、病毒、脂质、生物反应调节剂、药剂或 PEG。

[0481] 本领域技术人员将理解,还可使用各种技术将轭合物组装,其取决于待轭合的所选剂。例如,通过将结合多肽与激活的生物素的酯(例如生物素 N-羟基琥珀酰亚胺酯)进行反应来制备含生物素的轭合物。相似地,可在偶联剂例如本文所列的那些偶联剂存在下,或通过与异硫氰酸酯(优选为荧光素-异硫氰酸酯)进行反应来制备含荧光标志物的轭合

物。以类似的方式来制备本发明的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物的轭合物。

[0482] 本发明还包括轭合至诊断剂或治疗剂的 RON 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物。可在诊断上使用 RON 抗体以例如监测神经疾病的形成或演变,其作为临床检验步骤的一部分以例如确定给定治疗和 / 或预防方案的效力。可通过将 RON 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物偶联至可检测的物质以便于检测。可检测的物质的例子包括各种酶、辅基、荧光物质、发光物质、生物发光物质、放射性物质、使用各种正电子发射断层摄影术的发射正电子的金属和非放射性顺磁金属离子。参见例如美国专利第 4,741,900 号中可被与根据本发明的用于诊断的抗体轭合的金属离子。适合的酶的例子包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;适合的辅基复合物的例子包括抗生蛋白链菌素 / 生物素和抗生物素蛋白 / 生物素;适合的荧光物质的例子包括伞形花内酯、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹酰氯或藻红蛋白;发光物质的例子包括鲁米诺;生物发光物质的例子包括荧光素酶、虫荧光素和水母发光蛋白;并且适合的放射性物质的例子包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 或 ^{99}Tc 。

[0483] RON 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物还可以通过将它轭合至化学发光化合物而被可检测地标记。然后通过检测在化学反应过程中产生的发光的存在来确定化学发光标记的 RON 抗体的存在。特别有用的化学发光标记化合物的例子是鲁米诺、异鲁米诺、热性吖啶酯 (theromaticacridinium ester)、咪唑、吖啶盐和草酸酯。

[0484] 可将 RON 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可检测地标记的方法中的一种是通过将其连接至酶并在酶免疫测定 (EIA) 中利用连接的产物 (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (酶联免疫吸附测定 (ELISA))" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2: 1-7 (1978)); Voller 等人, J. Clin. Pathol. 31:507-520 (1978); Butler, J. E., Meth. Enzymol. 73:482-523 (1981); Maggio, E. (编辑), Enzyme Immunoassay (酶的免疫测定), CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. 等人, (编辑), Enzyme Immunoassay (酶的免疫测定), Kigaku Shoin, Tokyo (1981))。结合至 RON 抗体的酶将与合适的底物 (优选地显色底物) 以产生可通过例如分光光度计测量的、荧光的或目视手段检测的化学部分的方式发生反应。可被用来可检测地标记抗体的酶包括但不限于苹果酸脱氢酶、葡萄糖球菌核糖核酸酶、 δ -5-类固醇异构酶、酵母醇脱氢酶、 α -甘油磷酸脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡萄糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。另外,可通过使用酶的显色底物的比色法来完成检测。还可通过将底物的酶反应程度与相似地制备的标准物进行视觉对比来完成检测。

[0485] 还可使用各种其它免疫测定中的任一种来完成检测。例如,通过 RON 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的放射性标记,可能通过使用放射免疫测定 (RIA) 来检测该抗体 (参见例如 Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques (放射免疫测定原理,放射配体测定技术的第七次培训课程), The Endocrine Society, (1986 年 3 月), 其以引用的方式并入本文)。可通过一些手段来检测放射性同位素,包括但不限于伽玛计数器、闪烁计数器或放射自显影法。

[0486] 还可使用发射荧光的金属例如 ^{152}Eu 或镧系的其它元素来可检测地标记 RON 抗体

或其抗原结合片段、变体或衍生物。可使用诸如二乙烯三胺五乙酸 (DTPA) 或乙二胺四乙酸 (EDTA) 这类金属螯合基团来将这些金属连接至所述抗体。

[0487] 用于将各种部分辄合至 RON 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的技术是熟知的,参见例如 Arnon 等人,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy (癌症疗法中用于药物免疫靶向的单克隆抗体)”, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy (单克隆抗体和癌症疗法) 中, Reisfeld 等人 (编辑), 第 243-56 页 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom 等人, “Antibodies For Drug Delivery (用于药物递送的抗体)”, Controlled Drug Delivery (受控的药物递送) (第 2 版) 中, Robinson 等人 (编辑), Marcel Dekker, Inc., 第 623-53 页 (1987); Thorpe, “Antibodies Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review (癌症疗法中细胞毒性剂的抗体载体: 综述)”, Monoclonal Antibodies' 84: Biological And Clinical Applications (单克隆抗体' 84: 生物和临床应用) 中, Pinchera 等人 (编辑), 第 475-506 页 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy (癌症疗法中放射性标记的抗体的治疗用途的分析、结果和未来展望)”, Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy (用于癌症检测和疗法的单克隆抗体) 中, Baldwin 等人 (编辑), Academic Press, 第 303-16 页 (1985); 以及 Thorpe 等人, “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates (抗体-毒素结合物的制备和细胞毒特性)”, Immunol. Rev. 62: 119-58 (1982)。

[0488] 具体地, 用于本文公开的诊断和治疗方法中的结合分子, 例如结合多肽, 如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段可辄合于细胞毒素 (诸如放射性同位素、细胞毒性药物或毒素)、治疗剂、细胞抑制剂、生物毒素、前体药物、肽、蛋白、酶、病毒、脂质、生物反应调节剂、药剂、免疫活性配体 (例如淋巴因子或其它抗体, 其中所得分子既结合赘生性细胞, 又结合效应细胞, 诸如 T 细胞)、或 PEG。在另一个实施方案中, 用于本文公开的诊断和治疗方法中的结合分子, 例如结合多肽, 如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段可以与减少肿瘤的血管化作用的分子辄合。在其它实施方案中, 公开的组合物可包含偶联了药物或前体药物的结合分子, 例如结合多肽, 如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段。本发明的再其它实施方案包括辄合了特异性生物毒素 (诸如蓖麻毒蛋白、白树毒素、假单胞菌外毒素或白喉毒素) 或其细胞毒性片段的结合分子, 例如结合多肽, 如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段的用途。使用的辄合或未辄合的结合分子的选择取决于癌症的类型和阶段、辅助治疗 (例如化疗或外部辐射) 的使用以及患者的状况。应当意识到, 本领域技术人员根据本文的教导可以容易地做出这类选择。

[0489] 应当意识到, 在以前的研究中, 标记了同位素的抗肿瘤抗体已被成功地用于在动物模型中以及在某些情况下在人类中破坏实体瘤的细胞以及淋巴瘤/白血病细胞。示例性放射性同位素包括: ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{105}Rh 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 和 ^{188}Re 。放射性核素通过产生电离辐射而起作用, 所述电离辐射引起核 DNA 多处链断裂, 导致细胞死亡。用于产生治疗性结合物的同位素典型地产生具有短路径长度的高能 α 或 β 粒子。这些放射性核素杀伤其邻近的细胞, 例如该结合物所附着的或已经进入的赘生性细胞。它们对非定位的细胞几乎无作用或完全无作用。放射性核素基本上是无免疫原性的。

[0490] 在与本发明一起的放射标记轭合物的使用方面,结合分子,例如结合多肽,如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段可以被直接标记(诸如通过碘化)或可以通过利用螯合剂来间接标记。本文所用的短语“间接标记”和“间接标记方法”均意味着将螯合剂共价地连接结合分子,而将至少一种放射性核素与该螯合剂相关联。这些螯合剂通常是指双功能螯合剂,因为它们既能结合多肽,又能结合放射性同位素。特别优选的螯合剂包括 1- 异硫氰酸苄基-3- 甲基二乙烯三胺五乙酸(1-isothiocycmatobenzyl-3-methyldiothelene triaminepentaacetic acid) (“MX-DTPA”) 和环己基二乙烯三胺五乙酸 (“CHX-DTPA”) 衍生物。其它螯合剂包括 P-DOTA 和 EDTA 衍生物。特别优选的用于间接标记的放射性核素包括 ^{111}In 和 ^{90}Y 。

[0491] 本文所用的短语“直接标记”和“直接标记方法”均意味着将放射性核素直接共价地连到多肽上(通常借助氨基酸残基)。更具体的说,这些连接技术包括随机标记和定点标记。在后一种情况中,将标记定点到多肽上的特定位置,诸如仅存在于轭合物 Fc 部分上的 N- 连接的糖残基。此外,各种直接标记技术和实验方案是适用于本发明的。例如,铈-99 标记的多肽可以通过配体交换过程来制备,即通过用二价锡离子溶液还原铈酸盐(pertechnate) (TcO_4^-),将被还原的铈螯合到 Sephadex 柱上,并将结合多肽施加到该柱上;或者通过批量标记技术制备,例如通过将铈酸盐、还原剂(诸如 SnCl_2)、缓冲液(诸如邻苯二甲酸钠钾溶液)、以及抗体一起孵育。在任何情况中,用于直接标记抗体的优选放射性核素是本领域公知的,并且用于直接标记的特别优选的放射性核素是通过酪氨酸残基共价连接的 ^{131}I 。用于本文公开的诊断和治疗方法中的结合分子,例如结合多肽,如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段可以用例如放射性碘化钠或碘化钾和化学氧化剂(诸如次氯酸钠、氯胺 T 或类似物质),或者酶促氧化剂(诸如乳过氧化物酶、葡萄糖氧化酶和葡萄糖)来获得。

[0492] 关于螯合剂和螯合轭合物的专利是本领域已知的。例如, Gansow 的美国专利第 4,831,175 号涉及多重取代的二乙烯三胺五乙酸螯合物,和含有该螯合物的蛋白轭合物,以及它们的制备方法。Gansow 的美国专利第 5,099,069、5,246,692、5,286,850、5,434,287 和 5,124,471 号还涉及到多重取代的 DTPA 螯合物。这些专利的全文均以引用的方式并入本文。适用的金属螯合剂的其它例子是乙二胺四乙酸(EDTA)、二乙烯三胺五乙酸(DPTA)、1,4,8,11- 四氮杂十四烷(tetraazatetradecane)、1,4,8,11- 四氮杂十四烷-1,4,8,11- 四乙酸、1- 氧代-4,7,12,15- 四氮杂十七烷-4,7,12,15- 四乙酸或类似物。环己基-DTPA 或 CHX-DTPA 是特别优选的,并且在下文有大量的例子。还有其它一些适用的螯合剂,包括那些还有待发现的螯合剂,可能很容易地被技术人员识别,并且显然在本发明的范围内。

[0493] 优选地选择美国专利第 6,682,134、6,399,061 和 5,843,439 号(其全文以引用的方式并入本文)中用于协助螯合的相容螯合剂,包括特异性双功能螯合剂来提供对三价金属的高亲和力,显示升高的肿瘤对非肿瘤比率,骨吸收下降以及更高的放射性核素在体内目标部位(即 B 细胞淋巴瘤肿瘤位点)的停留。然而,其它可能具备或可能不具备所有这些特点的双功能性螯合剂是本领域已知的,并且也有益于肿瘤治疗。

[0494] 还应当意识到,与本文的教导一致,为了诊断和治疗目的,结合分子可以与不同的放射性标记轭合。为了这个目的,前面提到的美国专利第 6,682,134、6,399,061 和 5,843,439 号公开了放射性标记的治疗轭合物,其用于在施用治疗抗体前进行肿瘤的诊断

“成像”。“In2B8”轭合物包含对人类 CD20 抗原具有特异性的小鼠单克隆抗体 2B8, 该抗体借助双功能螯合剂连接于 ^{111}In , 所述螯合剂即是包含 1- 异硫氰苄基 -3- 甲基 -DTPA 和 1- 甲基 -3- 异硫氰苄基 -DTPA 的 1 : 1 混合物的 MX-DTPA (二乙烯三胺五乙酸)。 ^{111}In 作为诊断放射性核素是特别优选的, 因为在约 1 到约 10mCi 之间可以安全地施用而没有可检测到的毒性; 并且成像数据通常可以预测后续的 ^{90}Y 标记的抗体分布。多数成像研究使用 5mCi ^{111}In 标记的抗体, 因为这个剂量既安全又比更低剂量的成像效果好, 最佳成像发生在施用抗体后的 3 到 6 天。参见, 例如 Murray, J. Nuc. Med. 26 :3328 (1985) 和 Carraguiillo 等人, J. Nuc. Med. 26 :67 (1985)。

[0495] 如上文所指出, 有许多放射性核素可以用于本发明, 并且本领域技术人员可以容易地确定各种情况下, 哪种放射性核素是最合适的。例如, ^{131}I 是公知用于靶向免疫治疗的放射性核素。然而, ^{131}I 的临床应用可能受到几个因素的限制, 包括: 8 天的物理半衰期; 碘化抗体在血液和肿瘤部位的脱卤作用; 以及发射特性 (例如, γ 成分高), 这对肿瘤局部剂量蓄积可能是次优状态。随着更佳螯合剂的出现, 连接金属螯合基团与蛋白的机会提高了利用其它放射性核素诸如 ^{111}In 和 ^{90}Y 的机会。 ^{90}Y 提供了几个用于放射免疫治疗应用的益处: 64 小时的 ^{90}Y 的半衰期足以允许肿瘤的抗体积聚; 并且与例如 ^{131}I 不同, ^{90}Y 是单纯的高能 β 发射体, 在其衰变过程中不伴随 γ 辐射; 辐射范围在 100 到 1,000 细胞直径的组织内。另外, 最低贯穿辐射量使得可以门诊施用 ^{90}Y - 标记的抗体。此外, 细胞杀伤不要求标记抗体的内化, 并且电离辐射的局部发射对没有靶分子的临近肿瘤细胞应该是致死性的。

[0496] 另一种用于轭合结合分子, 例如结合多肽, 如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段的优选药剂是细胞毒性药物, 特别是用于癌症治疗的那些细胞毒性药物。如本文所用, “细胞毒素或细胞毒性剂”意味着对细胞的生长和增殖有害的任何试剂, 并且其可能表现为减少、抑制或破坏细胞和恶性肿瘤。示例性的细胞毒素包括但不限于, 放射性核素、生物毒素、酶促活性毒素、细胞抑制剂或细胞毒性治疗剂、前体药物、免疫活性配体和生物反应调节剂 (诸如细胞因子)。任何表现为阻滞或减慢免疫反应性细胞或恶性肿瘤细胞生长的细胞毒素均在本发明范围内。

[0497] 示例性细胞毒素通常包括, 细胞抑制剂、烷化剂、抗代谢物、抗增殖剂、微管蛋白结合剂、激素和激素拮抗剂、和类似的细胞毒素。适用于本发明的示例性细胞抑制剂包括烷化物质, 诸如双氯乙基甲胺、三亚乙基磷酰胺、环磷酰胺、异环磷酰胺、苯丁酸氮芥、白消安、美法仑或三亚胺醌, 还有亚硝基脲化合物, 诸如卡莫司汀、洛莫司汀或司莫司汀。其它优选的细胞毒性剂类别包括例如类美登素 (maytansinoid) 族的药物。其它优选的细胞毒试剂种类包括, 例如蒽环霉素 (anthracycline) 族药物、长春花属药物、丝裂霉素、博莱霉素、细胞毒性核苷、蝶啶族药物、二炔类 (diynene) 以及鬼臼毒素。这些种类中特别有用的成员包括, 例如阿霉素、洋红霉素 (carminomycin)、柔红霉素 (道诺霉素)、多柔比星 (doxorubicin)、氨基蝶呤 (aminopterin)、氮甲蝶呤、甲基叶酸 (methopterin)、光辉霉素 (mithramycin)、链黑菌素 (streptonigrin)、二氯甲氨蝶呤、丝裂霉素 C、放线菌素 D、泊非霉素 (porfiromycin)、5- 氟尿嘧啶、氟尿苷 (fioxuridine)、替加氟 (ftorafur)、6- 巯基嘌呤、阿糖胞苷 (cytarabine)、阿糖胞嘧啶 (cytosinearabinoside)、鬼臼毒素 (podophyllotoxin) 或鬼臼毒素衍生物 (诸如依托泊苷 (etoposide) 或磷酸依托泊苷)、美法仑 (melphalan)、长春碱 (vinblastine)、长春新碱 (vincristine)、异长春碱

(leurosidine)、长春地辛 (vindesine)、环氧长春碱 (leurosine) 及类似物。还有其他适用于本文教导的细胞毒素包括紫杉酚、紫杉烷 (taxane), 松胞菌素 B (cytochalasin B), 短杆菌肽 D (gramicidin D)、溴化乙锭、吐根碱 (emetine), 替尼泊苷 (tenoposide), 秋水仙碱 (colchicin)、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌 (mitoxantrone)、普鲁卡因 (procaine)、丁卡因 (tetracaine)、利多卡因 (lidocaine)、心得安 (propranolol) 和嘌呤霉素 (puromycin) 以及它们的类似物或同系物。激素和激素拮抗剂, 诸如皮质类固醇, 例如泼尼松 (Prednisone); 孕激素, 例如羟基孕酮或甲羟孕酮 (medroprogesterone); 雌激素, 例如己烯雌酚 (diethylstilbestrol); 抗雌激素, 例如他莫昔芬; 雄激素, 例如睾酮, 以及芳香酶抑制剂, 例如氨鲁米特 (aminoglutethimide) 也适用于本文的教导。本领域技术人员可以对所需化合物进行化学修饰, 从而为了制备本发明的轭合物的目的使得该化合物的反应更方便。

[0498] 特别优选的细胞毒素的一个实例包含抗肿瘤抗生素中烯二炔 (enediyne) 家族的成员或衍生物, 包括刺孢霉素 (calicheamicin)、埃斯培拉霉素 (esperamicin) 或达内霉素 (dynemicin)。这些毒素非常强力, 并且通过切割核 DNA 起作用, 导致细胞死亡。与能被体内切割产生许多无活性但是有免疫原性的多肽片段的蛋白毒素不同, 象刺孢霉素、埃斯培拉霉素和其它烯二炔类毒素是基本没有免疫原性的小分子。这些非肽毒素是通过以前用于标记单克隆抗体和其它分子的技术以化学方式连接到二聚体或四聚体上。这些连接技术包括经由只存在于构建体 Fc 部分上的 N-连接的糖残基发生的位点特异性连接。这种定点连接方法的优点是减少了连接对构建体的结合特性的可能的影响。

[0499] 如前面提到的, 用于制备轭合物的相容的细胞毒素可以包含前体药物。本文所用的术语“前体药物”是指药物活性物质的前体或衍生物形式, 与亲本药物相比, 它们对肿瘤细胞的细胞毒性低, 并且能被酶促活化或转化成活性更高的亲本形式。适用于本发明的前体药物包括但不限于, 含磷酸酯的前体药物、含硫代磷酸酯的前体药物、含硫酸酯的前体药物、含肽的前体药物、含 β -内酰胺的前体药物, 含有任选地取代的苯氧乙酰胺的前体药物或含有任选地取代的苯乙酰胺的前体药物、5-氟胞嘧啶和其它 5-氟尿苷前体药物, 它们能被转化为细胞毒性更高的游离型药物。可以衍生成前体药物形式用于本发明的细胞毒性药物的其他实例包括上面描述过的那些化疗剂。

[0500] 在其它细胞毒素中, 将理解的是, 本文公开的结合分子, 例如结合多肽, 如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段还可与生物毒素相缔合或轭合, 所述生物毒素例如蓖麻毒蛋白 A 亚基、相思豆毒素、白喉毒素、肉毒杆菌毒素、蓝藻毒素 (cyanoginsin)、蛤蚌毒素 (saxitoxin)、志贺毒素、破伤风、河豚毒素、单端孢霉烯毒素 (trichothecene)、疣孢青霉原 (verrucologen) 或毒性酶。优选地, 将使用允许抗体-毒素构建体的直接表达的基因工程技术来制备这种构建体。可与本文公开的结合分子, 例如结合多肽, 如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段相缔合的其它生物反应调节剂包括细胞因子, 例如淋巴因子和干扰素。鉴于本公开, 认为本领域技术人员可容易地使用常规技术形成这种构建体。

[0501] 可用来与所公开的结合分子, 例如结合多肽, 如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段缔合或轭合的另一类相容的细胞毒素是放射性敏化药物, 其可有效地针对肿瘤细胞或免疫活性细胞。这种药物增强对电离辐射的敏感性, 从而增加放射疗法的效力。被肿瘤细胞内化的抗体轭合物将把放射性敏化剂递送至较接近核处, 在该处放射性敏化作用将是最

大的。连接了未结合的放射性敏化剂的本发明的结合分子将被快速地从血液清除,将余下的放射性敏化剂定位在靶肿瘤中并在正常组织中提供最小吸收。在从血液快速清除之后,将以下面三种方法之一与相同靶向抗体一起施用附加放射疗法:1.) 特别针对肿瘤的外部激光辐射,2.) 直接植入肿瘤的放射性或3.) 全身放射免疫疗法。该方法潜在的有吸引力的变化是将治疗性放射性同位素连接至放射性敏化的免疫轭合物,从而为了给患者施用单种药物提供方便。

[0502] 在某些实施方案中,可以轭合增强结合分子,例如结合多肽,如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段的稳定性或效力的部分。例如,在一个实施方案中,可将 PEG 轭合至本发明的结合分子以增加它们的体内半衰期。Leong, S. R., 等人, *Cytokine* 16:106(2001); *Adv. in Drug Deliv. Rev.* 54:531(2002); 或 Weir 等人, *Biochem. Soc. Transactions* 30:512(2002)。

[0503] 本发明还包括轭合至诊断剂或治疗剂的结合分子,例如结合多肽,如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段的用途。结合分子可以作为临床检验步骤的一部分在诊断上用来例如监测肿瘤的形成或演变以例如确定给定治疗和 / 或预防方案的效力。可通过将结合分子,例如结合多肽,如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段与可检测的物质偶联以便于检测。可检测的物质的例子包括各种酶、辅基、荧光物质、发光物质、生物发光物质、放射性物质、使用各种正电子发射断层摄影术的发射正电子的金属和非放射性顺磁金属离子。参见例如美国专利第 4,741,900 号中可与根据本发明的用于诊断的抗体轭合的金属离子。适合的酶的例子包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;适合的辅基复合物的例子包括抗生蛋白链菌素 / 生物素和抗生物素蛋白 / 生物素;适合的荧光物质的例子包括伞形花内酯、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹酰氯或藻红蛋白;发光物质的例子包括鲁米诺;生物发光物质的例子包括荧光素酶、虫荧光素和水母发光蛋白;并且适合的放射性物质的例子包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 或 ^{99}Tc 。

[0504] 结合分子,例如结合多肽,如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段还可通过将它偶联至化学发光化合物而被可检测地标记。然后通过检测在化学反应过程中产生的发光的存在来确定化学发光标记的结合分子的存在。特别有用的化学发光标记化合物的例子是鲁米诺、异鲁米诺、热性吖啶酯、咪唑、吖啶盐和草酸酯。

[0505] 可将结合分子,例如结合多肽,如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段可检测地标记的方法中的一种是通过将其连接至酶并在酶免疫测定 (EIA) 中使用连接的产物 (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (酶联免疫吸附测定 (ELISA))" *Microbiological Associates Quarterly Publication*, Walkersville, Md., *Diagnostic Horizons* 2:1-7(1978)); Voller 等人, *J. Clin. Pathol.* 31:507-520(1978); Butler, J. E., *Meth. Enzymol.* 73:482-523(1981); Maggio, E. (编辑), *Enzyme Immunoassay (酶的免疫测定)*, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. 等人, (编辑), *Enzyme Immunoassay (酶的免疫测定)*, Kigaku Shoin, Tokyo(1981))。结合至结合分子的酶将与合适的底物 (优选地为显色底物) 以产生可通过例如分光光度计测量的、荧光的或目视手段检测的化学部分的方式发生反应。可被用来可检测地标记抗体的酶包括但不限于苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 δ -5-类固醇异构酶、酵母醇脱氢酶、 α -甘油磷酸脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 β -半

乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡萄糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。另外,可通过使用酶的显色底物的比色法来完成检测。还可通过将底物的酶反应程度与相似地制备的标准物进行视觉对比来完成检测。

[0506] 还可使用各种其它免疫测定中的任一种来完成检测。例如,通过结合分子,例如结合多肽,如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段的放射性标记,可能通过使用放射免疫测定(RIA)来检测癌症抗原(参见例如 Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques(放射免疫测定原理,放射配体测定技术的第七次培训课程), The Endocrine Society, (1986 年 3 月), 其以引用的方式并入本文)。可通过一些手段来检测放射性同位素,其包括但不限于伽玛计数器、闪烁计数器或放射自显影法。

[0507] 还可使用发射荧光的金属例如 ^{152}Eu 或镧系的其它元素来可检测地标记结合分子,例如结合多肽,如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段。可使用金属螯合基团如二乙烯三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)来将这些金属连接至所述抗体。

[0508] 用于将各种部分耦合至结合分子,例如结合多肽,如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段的技术是熟知的,参见例如 Arnon 等人,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy(癌症疗法中用于药物免疫靶向的单克隆抗体)”, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy(单克隆抗体和癌症疗法)中, Reisfeld 等人(编辑), 第 243-56 页 (Alan R. Liss, Inc. (1985)); Hellstrom 等人,“Antibodies For Drug Delivery(用于药物递送的抗体)”, Controlled Drug Delivery(受控的药物递送)(第 2 版)中, Robinson 等人(编辑), Marcel Dekker, Inc., 第 623-53 页 (1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review(癌症疗法中细胞毒性剂的抗体载体:综述)”, Monoclonal Antibodies' 84: Biological And Clinical Applications(单克隆抗体'84:生物和临床应用)中, Pinchera 等人(编辑), 第 475-506 页 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy(癌症疗法中放射性标记的抗体的治疗用途的分析、结果和未来展望)”, Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy(用于癌症检测和治疗的单克隆抗体)中, Baldwin 等人(编辑), Academic Press, 第 303-16 页 (1985); 以及 Thorpe 等人, “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates(抗体-毒素偶合物的制备和细胞毒特性)”, Immunol. Rev. 62:119-58(1982)。

[0509] VII. 抗体多肽的表达

[0510] 如所熟知,可从原始的杂交瘤细胞或从通过标准技术转化的其它细胞来分离 RNA,其中所述标准技术例如异硫氰酸胍提取和沉淀接着是离心或色谱。当期望时,可通过标准技术例如寡 dT 纤维素上的色谱从总 RNA 分离 mRNA。适合的技术是本领域所熟悉的。

[0511] 在一个实施方案中,可以根据公知方法使用逆转录酶和 DNA 聚合酶来同时或分别制备编码抗体的轻链和重链的 cDNA。可通过共有恒定区引物或通过基于公布的重链和轻链 DNA 和氨基酸序列的更特异的引物来起始 PCR。如上所讨论,还可将 PCR 用于分离编码抗体的轻链和重链的 DNA 克隆。在该情况下,可通过共有引物或更大的同源探针如小鼠恒定区探针来筛选文库。

[0512] 可使用本领域已知的技术从细胞中分离 DNA,通常是质粒 DNA,根据例如前面关于重组 DNA 技术的文献详细阐述的标准的公知技术来绘制其限制性图谱并测序。当然,根据本发明,在分离过程中或之后的分析过程中的任一点,所述 DNA 可以是合成的。

[0513] 在操作分离的遗传物质以提供本发明的 RON 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物之后,编码 RON 抗体的多核苷酸通常被插在表达载体中以引入到宿主细胞中,所述宿主细胞可被用来产生期望数量的 RON 抗体。

[0514] 抗体或其片段、衍生物或类似物例如结合至本文所述靶分子(如 RON)的抗体的重链或轻链的重组表达,要求构建含有编码所述抗体的多核苷酸的表达载体。获得编码本发明的抗体分子或抗体的重链或轻链或其部分(优选地包含重链或轻链可变结构域)的多核苷酸之后,可通过使用本领域公知技术的重组 DNA 技术来产生用于产生抗体分子的载体。因此,本文描述了通过表达含有编码抗体的核苷酸序列的多核苷酸来制备蛋白的方法。本领域技术人员公知的方法可被用来构建含有编码抗体的序列和适合的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括例如体外重组 DNA 技术、合成技术和体内遗传重组。因此,本发明提供可复制的载体,其包含编码本发明的抗体分子、或者其重链或轻链、或者重链或轻链可变结构域的可操作地连接至启动子的核苷酸序列。这种载体可包含编码抗体分子恒定区的核苷酸序列(参见例如 PCT 公布 WO 86/05807、PCT 公布 W089/01036 和美国专利第 5,122,464 号),而且抗体的可变结构域可被克隆进这种载体以表达完整的重链或轻链。

[0515] 可用本发明的两种表达载体共同转染宿主细胞,第一载体编码重链衍生的多肽并且第二载体编码轻链衍生的多肽。两种载体可含有相同的选择性标记,其使得重链多肽和轻链多肽同等表达。或者,可以使用编码重链多肽和轻链多肽二者的单个载体。在这种情况下,轻链被有利地置于重链之前以避免过量的毒性游离重链(Proudfoot, Nature 322:52(1986);Kohler,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:2197(1980))。重链和轻链的编码序列可包括 cDNA 或基因组 DNA。

[0516] 本文使用术语“载体”或“表达载体”来表示根据本发明被用作引入到宿主细胞中并且在宿主细胞中表达期望基因的媒介物的载体。如本领域技术人员所知,这种载体可容易地选自由质粒、噬菌体、病毒和逆转录病毒组成的组。通常,与本发明相容的载体将包括选择性标记、促进期望基因的克隆的适合的限制位点以及进入和/或在真核或原核细胞中复制的能力。

[0517] 为了本发明的目的,可以使用许多表达载体系统。例如,一种类别的载体使用来源于动物病毒例如牛乳头瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、痘苗病毒、杆状病毒、逆转录病毒(RSV、MMTV 或 MOMLV)或 SV40 病毒的 DNA 元件。其它的载体包括使用具有内部核糖体结合位点的多顺反子系统。另外,可通过引入一个或多个允许选择转染的宿主细胞的标记来选择已经将 DNA 整合进它们的染色体的细胞。所述标记可提供针对营养缺陷型宿主的原营养、杀生物剂(例如抗生素)抗性或对重金属例如铜的抗性。可将选择性标记基因直接连接至待表达的 DNA 序列,或者通过共同转化引入相同细胞中。对于 mRNA 的最优合成还可能需要另外的元件。这些元件可包括信号序列、剪接信号以及转录启动子、增强子和终止信号。

[0518] 在特别优选的实施方案中,将克隆的可变区基因与按上面所讨论合成的重链和轻链恒定区基因(优选为人类的)一起插入表达载体中。在一个实施方案中,使用 Biogen IDEC, Inc. 的被称作 NEOSPLA 的有专利权的表达载体(公开于美国专利第 6,159,730 号)

来使其实现。该载体含有细胞巨化病毒启动子 / 增强子、小鼠 β 珠蛋白主要启动子、SV40 复制起点、牛生长激素多腺苷酸化序列、新霉素磷酸转移酶外显子 1 和外显子 2、二氢叶酸还原酶基因和前导序列。已经发现,在并入可变区和恒定区基因、转染进 CHO 细胞然后在含有 G418 的培养基中选择并用氨甲蝶呤扩增时,该载体导致非常高水平的抗体表达。当然,能够在真核细胞中引发表达的任何表达载体可被用于本发明。适合的载体的例子包括但不限于质粒 pcDNA3、pHCMV/Zeo、pCR3.1、pEF1/His、pIND/GS、pRc/HCMV2、pSV40/Zeo2、pTRACER-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1 和 pZeoSV2(可从 Invitrogen, San Diego, CA 获得)以及质粒 pCI(可从 Promega, Madison, WI 获得)。通常,筛选大量的转化细胞中表达适当高水平的那些细胞,如果免疫球蛋白重链和轻链是可通过例如机器人系统进行的常规实验的话。还在美国专利第 5,736,137 号和 5,658,570 号中教导了载体系统,其中每个的全文均以引用的方式并入本文。该系统提供了高表达水平,例如 $> 30\text{pg}/\text{细胞}/\text{天}$ 。其它示例性的载体系统被公开于例如美国专利第 6,413,777 号中。

[0519] 在其它优选的实施方案中,可以使用多顺反子构建体来表达本发明的 RON 抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物,所述多顺反子构建体为例如在 2002 年 11 月 18 日提交并且其全文以引用的方式并入本文的美国专利申请公布第 2003-0157641A1 号中所公开的那些。在这些全新的表达系统中,可以从单个多顺反子构建体来产生感兴趣的多种基因产物例如抗体的重链和轻链。这些系统有利地使用内部核糖体进入位点(IRES)以在真核宿主细胞中提供相对高水平的 RON 抗体,例如结合多肽,如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段。相容的 IRES 序列公开在美国专利第 6,193,980 号中,其也被并入本文。本领域技术人员将了解,这种表达系统可用来有效地产生公开在本申请中的全范围的 RON 抗体。

[0520] 更通常地,制备了编码 RON 抗体的单体亚基的载体或 DNA 序列之后,可将表达载体引入适合的宿主细胞中。可通过本领域技术人员熟知的各种技术来实现质粒向宿主细胞的引入。这些技术包括但不限于转染(包括电泳和电穿孔)、原生质体融合、磷酸钙沉淀、用有包膜的 DNA 的细胞融合、微注射和用完整病毒感染。参见 Ridgway, A. A. G. “Mammalian Expression Vectors(哺乳动物表达载体)” Vectors(载体), Rodriguez 和 Denhardt 编辑, Butterworths, 波士顿, 马萨诸塞州, 第 24.2 章, 第 470-472 页 (1988)。通常,质粒引入到宿主中是通过电穿孔。使含有表达构建体的宿主细胞在适合产生轻链和重链的条件下生长,并且测定了重链和 / 或轻链蛋白的合成。示例性的测定技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)或荧光激活细胞分选器分析(FACS)、免疫组织化学以及诸如此类。

[0521] 通过常规技术将表达载体转移进宿主细胞,然后通过常规技术培养转染的细胞以产生用于本文所述方法的抗体。因此,本发明包括含有编码本发明抗体或其重链或轻链的多核苷酸的宿主细胞,其中所述多核苷酸被可操作地连接至异源性启动子。在用于表达双链抗体的优选的实施方案中,编码重链和轻链二者的载体可被共表达在宿主细胞中以表达完整免疫球蛋白分子,如下所详述。

[0522] 如本文所用,“宿主细胞”是指含有使用重组 DNA 技术构建的并编码至少一个异源性基因的载体的细胞。在描述从重组宿主中分离抗体的步骤中,术语“细胞”和“细胞培养物”可被互换地使用以表示抗体的来源,除非它被另外清楚地说明。换言之,从“细胞”中回收多肽可以指从全细胞的旋转沉淀物或从含有培养基和悬浮细胞二者的细胞培养物中。

[0523] 可以利用各种宿主表达载体系统来表达用于本文所述方法的抗体分子。这种宿主表达系统表示感兴趣的编码序列可通过其而产生并接着被纯化的媒介物,但是也代表当用适合的核苷酸编码序列转化或转染时可原位表达本发明的抗体分子的细胞。这些包括但不限于微生物,例如用含有抗体编码序列的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA 或黏粒 DNA 表达载体转化的细菌(例如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌);用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如酵母属、毕赤酵母属);用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒, CaMV; 烟草花叶病毒, TMV)感染的或用含有抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如 Ti 质粒)转化的植物细胞系统;或者包括含有来源于哺乳动物细胞(例如金属硫蛋白启动子)或哺乳动物病毒(例如腺病毒晚期启动子、痘苗病毒 7.5K 启动子)基因组的启动子的重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如 COS、CHO、BLK、293、3T3 细胞)。优选地,细菌细胞例如大肠杆菌,以及更优选地,特别是用来表达整个重组抗体分子的真核细胞被用来表达重组抗体分子。例如,与载体(例如来自人类细胞巨化病毒的主要立即早期基因启动子元件)结合在一起的哺乳动物细胞例如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)是抗体的有效表达系统(Foecking 等人, Gene 45:101(1986);Cockett 等人, Bio/Technology 8:2(1990))。

[0524] 用于蛋白表达的宿主细胞系通常具有哺乳动物来源;相信本领域技术人员具有优先地确定最适合于期望的基因产物在其中表达的特定宿主细胞系的能力。示例性的宿主细胞系包括但不限于 CHO(中国仓鼠卵巢)、DG44 和 DUXB 11(中国仓鼠卵巢系、二氢叶酸还原酶负)、HELA(人宫颈癌)、CVI(猴肾系)、COS(含 SV40T 抗原的 CVI 衍生物)、VERY、BHK(幼仓鼠肾)、MDCK、293、WI38、R1610(中国仓鼠成纤维细胞)BALBC/3T3(小鼠成纤维细胞)、HAK(仓鼠肾系)、SP2/0(小鼠骨髓瘤)、P3x63-Ag3.653(小鼠骨髓瘤)、BFA-1c1BPT(牛内皮细胞)、RAJI(人淋巴细胞)和 293(人肾)。CHO 细胞是特别优选的。宿主细胞系通常是可以从商业服务即美国典型培养物保藏中心或者从发表的文献获得。

[0525] 此外,可以选择调节插入序列的表达或以期望的特定形式来修饰并加工基因产物的宿主细胞株。蛋白产物的这种修饰(例如糖基化)和加工(例如剪切)对于蛋白的功能可能是重要的。不同宿主细胞对于蛋白和基因产物的翻译后加工和修饰具有特征性的且特别的机制。可以选择适合的细胞系或宿主系统来保证所表达的外来蛋白的正确修饰和加工。为此目的,可以使用具有初级转录物适当加工、糖基化和基因产物磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。

[0526] 对于长期、高产率的重组蛋白产生,稳定的表达是优选的。例如,稳定表达抗体分子的细胞系可被工程化。并非使用含有病毒复制起点的表达载体,可将宿主细胞用 DNA 和选择性标记转化,其中所述 DNA 是由适当的表达控制元件(例如启动子、增强子、序列、转录终止子、多腺苷酸化位点等)控制的。在引入外来 DNA 之后,可允许工程化的细胞在营养丰富的培养基中生长 1-2 天,然后被换成选择性培养基中。重组质粒中的选择性标记给予对选择的抗性,并允许细胞稳定地将质粒整合进它们的染色体中并生长以形成集中点(foci),其反过来又能被克隆并扩展进细胞系中。该方法可被有利地用来对稳定表达抗体分子的细胞系进行工程化。

[0527] 可以使用若干选择系统,包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler 等人, Cell 11:223(1977))、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(Szybalska & Szybalski, Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 48:202(1992)) 和腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (Lowy 等人, Cell 22:817 1980), 其可被分别用于 tk⁻、hgprt⁻ 或 aprt⁻ 细胞。而且, 抗代谢物抗性可被用作选择下述基因的基础: dhfr, 其赋予对氨甲蝶呤的抗性 (Wigler 等人, Natl. Acad. Sci. USA 77:357(1980); 0' Hare 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527(1981)); gpt, 其赋予对霉酚酸的抗性 (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072(1981)); neo, 其赋予对氨基葡萄糖苷 G-418 的抗性 (Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu 和 Wu, Biotherapy 3:87-95(1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596(1993); Mulligan, Science 260:926-932(1993); 以及 Morgan 和 Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217(1993); TIB TECH 11(5):155-215(1993 年 5 月)); 以及 hyg^r, 其赋予对潮霉素的抗性 (Santerre 等人, Gene 30:147(1984))。可以使用的重组 DNA 技术的领域中通常已知的方法被描述在 Ausubel 等人 (编辑), Current Protocols in Molecular Biology (分子生物学最新实验方案), John Wiley & Sons, NY(1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual (基因转移和表达的实验手册), Stockton Press, NY(1990); 以及第 12 和 13 章, Dracopoli 等人 (编辑), Current Protocols in Human Genetics (人类遗传学最新实验方案), John Wiley & Sons, NY(1994); Colberre-Garapin 等人, J. Mol. Biol. 150:1(1981) 中, 其全文以引用的方式并入本文。

[0528] 可通过载体扩增来增加抗体分子的表达水平 (关于综述, 参见 Bebbington 和 Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning (基于基因扩增的载体用于在 DNA 克隆中在哺乳动物细胞中表达克隆的基因的用途), Academic Press, New York, 第 3 卷 (1987))。当表达抗体的载体系统中的标记是可扩增的时, 存在于宿主细胞培养物中的抑制剂水平的增加将增加标记基因的拷贝数。因为扩增的区域与抗体基因相关, 抗体的产生也将增加 (Crouse 等人, Mol. Cell. Biol. 3:257(1983))。

[0529] 体外生产允许规模扩大以便得到大量的期望多肽。在组织培养条件下培养哺乳动物细胞的技术是本领域已知的并且包括在例如气升式反应器中或在连续的搅拌反应器中的均质悬浮培养, 或者在例如空心纤维、微囊、琼脂糖微珠或陶瓷管壳中的固定化或截留的细胞培养。如果必要和 / 或期望, 可在例如合成的铰链区多肽的优先生物合成之后或在本文所述的 HIC 色谱步骤之前或之后使用通常的色谱方法来纯化多肽的溶液, 其中所述方法例如凝胶过滤、离子交换色谱、DEAE-纤维素上的色谱或者 (免疫) 亲和色谱。

[0530] 编码本发明的 RON 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的基因还可被表达在非哺乳动物细胞例如细菌或昆虫或酵母或植物细胞中。容易地吸收核酸的细菌包括肠杆菌科的成员, 例如大肠杆菌或沙门氏菌 (Salmonella) 等菌株; 芽胞杆菌科的成员, 例如枯草芽孢杆菌; 肺炎球菌、链球菌和流感嗜血杆菌。还将理解的是, 当在细菌中表达时, 异源性多肽通常变为包涵体的一部分。异源性多肽必须被分离, 纯化然后组装成功能性分子。当期望四价形式的抗体时, 亚基然后将自装配为四价抗体 (WO02/096948A2)。

[0531] 在细菌系统中, 取决于被表达的抗体分子期望的用途, 可以有利地选择若干表达载体。例如, 当大量这种蛋白待产生时, 为了产生抗体分子的药物组合物, 可以期待指导融合蛋白产物高水平表达的载体, 其中所述融合蛋白产物被容易地纯化。这种载体包括但不限于大肠杆菌表达载体 pUR278 (Ruther 等人, EMBO J. 2:1791(1983)), 在其中抗体编码序

列可被个别地连接至载体而与 lacZ 编码区同在框内以便产生融合蛋白 ;pIN 载体 (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13 :3101-3109(1985) ;Van Heeke &Schuster. J. Biol. Chem. 24 :5503-5509(1989)) ;以及诸如此类。还可使用 pGEX 载体来表达作为与谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 的融合蛋白的外来多肽。通常,这种融合蛋白是可溶的并且可容易地从溶解的细胞来纯化,其中所述纯化是通过吸附和结合至基质谷胱甘肽琼脂糖珠并接着在游离谷胱甘肽存在下洗脱。设计 pGEX 载体而包括凝血酶或因子 Xa 蛋白酶裂解位点以致于可从 GST 部分释放克隆的靶基因产物。

[0532] 除了原核生物之外,还可使用真核微生物。酿酒酵母或普通面包酵母是真核微生物中最常用的,虽然若干其它株系也常用,例如毕赤酵母。

[0533] 为了在酵母属中表达,常用例如质粒 YRp7(Stinchcomb 等人, Nature282 :39(1979) ;Kingsman 等人, Gene 7 :141(1979) ;Tschemper 等人, Gene10 :157(1980))。该质粒已经含有 TRP1 基因,所述 TRP1 基因给缺乏在色氨酸中生长的能力的酵母突变株例如 ATCC 第 44076 或 PEP4-1 号提供选择性标记 (Jones, Genetics 85 :12(1977))。然后,作为酵母宿主细胞基因组的特征的 trp1 损伤的存在提供有效的环境以通过在不含色氨酸条件下生长来检测转化。

[0534] 在昆虫系统中,夜蛾 (*Autographa californica*) 核型多角体病毒 (AcNPV) 通常被用作载体来表达外来基因。该病毒生长在草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞中。编码抗体的序列可被个别地克隆进病毒的非必需区域 (例如多角体蛋白基因) 并被置于 AcNPV 启动子 (例如多角体蛋白启动子) 的控制下。

[0535] 重组地表达本发明的抗体分子后,可通过本领域任何已知的纯化免疫球蛋白分子的方法来将它纯化,例如通过色谱法 (例如离子交换色谱、亲和色谱,特别是对蛋白 A 后的特异性抗原的亲和性色谱以及分筛柱色谱)、离心、差异溶解或蛋白纯化的任何其它标准技术。或者,增加本发明抗体亲和力的优选的方法公开在 US 20020123057A1。

[0536] VIII. 使用治疗性 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段的治疗方法

[0537] 本发明的一个实施方案提供用于治疗患有过度增生性疾病或病症如癌症、恶性肿瘤、肿瘤、或其转移或倾向于感染所述疾病的动物的所述疾病的方法,该方法包括、基本上由或由向动物施用有效量的结合 RON 或 RON 变体的抗体或其免疫特异性片段组成。合适的抗体包括本文描述的所有抗体和其抗原特异性片段。实例包括但不限于,特异性地结合至与选自由 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的参考单克隆 Fab 抗体片段或选自由 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的参考单克隆抗体相同的 RON 表位的分离的抗体或其抗原结合片段、特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其片段竞争性地抑制选自由 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的参考单克隆 Fab 抗体片段或选自由 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的参考单克隆抗体与 RON 结合、或特异性地结合至 RON 的分离的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其片段包含与选自由 M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10、M80-B03、M93-D02、M96-C05、M97-D03 和 M98-E12 组成的组的单克隆 Fab 抗体片段或选自由 1P2E7、1P3B2、1P4A3、1P4A12 和 1P5B10 组成的组的参考单克隆抗体相同的抗原结合结构域。

[0538] 在某些实施方案中,特异性地结合至 RON 或其变体的本发明的抗体抑制 MSP 与 RON

的结合。在另外的实施方案中,与细胞,特别是肿瘤细胞或肿瘤相关巨噬细胞上表达的 RON 或其变体特异性地结合的本发明的抗体抑制牵涉在细胞增殖、活动性和 / 或转移中的下游信号转导分子的活化。这样的分子包括但不限于 PI3-K、Akt、mTOR 和 Rac。在另外的实施方案中,与细胞,特别是肿瘤细胞或肿瘤相关巨噬细胞上表达的 RON 或其变体特异性地结合的本发明的抗体抑制 Ras/MAPK 信号传导途径的活化。在另外的实施方案中,与细胞,特别是肿瘤细胞或肿瘤相关巨噬细胞上表达的 RON 或其变体特异性地结合的本发明的抗体抑制 src 信号传导途径的活化。在另外的实施方案中,与细胞,特别是肿瘤细胞或肿瘤相关巨噬细胞上表达的 RON 或其变体特异性地结合的本发明的抗体抑制 β -连环蛋白信号传导途径的活化。在又另外的实施方案中,与细胞,特别是肿瘤细胞或肿瘤相关巨噬细胞上表达的 RON 或其变体特异性地结合的本发明的抗体抑制 RON 与 MSP 的相互作用。在另一实施方案中,与细胞,特别是肿瘤细胞或肿瘤相关巨噬细胞上表达的 RON 或其变体特异性地结合的本发明的抗体抑制包括 PI3-K/Akt 途径、Ras/MAPK 途径、src 途径、Fak 途径和 β -连环蛋白信号传导途径的 RON 活化的途径的活化。在另一实施方案中,与细胞,特别是肿瘤细胞或肿瘤相关巨噬细胞上表达的 RON 或其变体特异性地结合的本发明的抗体抑制 Erk 1/2 的磷酸化或活化。在又另外的实施方案中,与细胞,特别是肿瘤细胞或肿瘤相关巨噬细胞上表达的 RON 或其变体特异性地结合的本发明的抗体抑制细胞增殖、活动性和 / 或转移。在又另外的实施方案中,与细胞,特别是肿瘤细胞或肿瘤相关巨噬细胞上表达的 RON 或其变体特异性地结合的本发明的抗体促进凋亡或失巢凋亡。在又另外的实施方案中,与细胞,特别是肿瘤细胞或肿瘤相关巨噬细胞上表达的 RON 或其变体特异性地结合的本发明的抗体阻断 VEGF 分泌。在又另外的实施方案中,与细胞,特别是肿瘤细胞或肿瘤相关巨噬细胞上表达的 RON 或其变体特异性地结合的本发明的抗体阻断包括但不限于 EGFR、TGF β 受体和 Met 的其它受体激酶的活性。在又另外的实施方案中,与细胞,特别是肿瘤细胞或肿瘤相关巨噬细胞上表达的 RON 或其变体特异性地结合的本发明的抗体诱导细胞毒性一氧化氮 (NO) 分泌。在又另外的实施方案中,与细胞,特别是肿瘤细胞或肿瘤相关巨噬细胞上表达的 RON 或其变体特异性地结合的本发明的抗体诱导 IL-12 分泌。在又另外的实施方案中,与细胞,特别是肿瘤细胞或肿瘤相关巨噬细胞上表达的 RON 或其变体特异性地结合的本发明的抗体阻断 MSP 分泌。

[0539] 待用于本文公开的治疗方法的特异性地结合至 RON 的本发明的抗体或其变体可被制备并用作治疗剂,其终止、减少、阻止或抑制牵涉在细胞过度增生中的细胞活动,例如诱导通常与过度增生性疾病或病症相关的改变的或异常的类型血管化作用的细胞活动。

[0540] 本发明的抗体或其免疫特异性片段包括但不限于特异性地结合肿瘤相关蛋白诸如 RON 的单克隆抗体、嵌合抗体或人源化的抗体、和抗体片段。抗体可以是单价、二价、多价或双功能抗体,并且抗体片段包括 Fab、F(ab')₂ 和 Fv。

[0541] 根据本发明的治疗性抗体能够以未标记的或未耦联的形式被使用,或者可被偶联或连接至细胞毒性部分(例如放射性标记和生化细胞毒素)以产生发挥治疗作用的剂。

[0542] 在某些实施方案中,本发明的抗体或其免疫特异性片段包括抗原结合结构域。抗原结合结构域由在抗体之间不同的抗体可变区形成。天然产生的抗体包括至少两个抗原结合结构域,即,它们是至少二价的。如本文所用,术语“抗原结合结构域”包括特异性地结合抗原(例如,细胞表面或可溶性抗原)上的表位的位点。抗体的抗原结合结构域通常包括

至少一部分的免疫球蛋白重链可变区和至少一部分的免疫球蛋白轻链可变区。由这些可变区形成的结合位点决定抗体的特异性。

[0543] 本发明提供用于治疗哺乳动物的各种过度增生性病症的方法,例如通过抑制肿瘤生长,所述方法包括、基本上由或者由对哺乳动物施用有效量的特异性地或优先地结合 RON(例如人类 RON)的抗体或其抗原结合片段组成。

[0544] 本发明更具体地针对治疗动物(例如哺乳动物,如人类)的过度增生性疾病的方法,例如抑制或阻止肿瘤形成、肿瘤生长、肿瘤侵入和/或转移形成,所述方法包括、基本上由或者由向对其有需要的动物施用有效量的特异性结合或优先结合 RON 的一个或多个表位的抗体或其免疫特异性片段组成。

[0545] 在其它实施方案中,本发明包括用于治疗动物(例如人类患者)的过度增生性疾病的方法,例如抑制肿瘤形成、肿瘤生长、肿瘤侵入和/或转移形成,其中所述方法包括对需要这种治疗的动物施用有效量的组合物,所述组合物除了药学上可接受的载体之外,包括、基本上由或者由特异性结合 RON 的至少一个表位的抗体或其免疫特异性片段所组成,其中所述表位包括、基本上由或者由 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:113 的至少四个到五个氨基酸、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:113 的至少七个、至少九个或至少约 15 个到至少约 30 个氨基酸所组成。如所述的 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:113 的给定表位的氨基酸可以是连续的但不必是连续的。

[0546] 在某些实施方案中, RON 的至少一个表位包括、基本上由、或由细胞表面上表达的 RON 的胞外结构域形成的非线性表位组成。因此在某些实施方案中, RON 的至少一个表位包括、基本上由、或由 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:113 的至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 15、至少 20、至少 25、约 15 至约 30、或至少 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100 个连续或不连续氨基酸组成,其中不连续氨基酸通过蛋白折叠形成表位。

[0547] 在其它实施方案中,本发明包括用于治疗动物(例如人类患者)的过度增生性疾病的方法,例如抑制肿瘤形成、肿瘤生长、肿瘤侵入和/或转移形成,其中所述方法包括对需要这种治疗的动物施用有效量的组合物,所述组合物除了药学上可接受的载体之外,包括、基本上由或者由特异性结合 RON 的至少一个表位的抗体或其免疫特异性片段(其中所述表位包括、基本上由或者由除了如上所述的 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:113 的一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个连续或不连续氨基酸以外所组成)以及修饰蛋白的另外部分所组成,例如,碳水化合物部分可被包括以使结合分子以高于对未修饰形式蛋白的亲和力与修饰的靶蛋白相结合。可选择地,结合分子根本不结合未修饰形式的靶蛋白。

[0548] 更具体地,本发明提供治疗人类癌症的方法,包括对需要治疗的人类施用一种组合物,所述组合物包括有效量的 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段,以及药学上可接受的载体。待治疗的癌症类型包括但不限于胃癌、肾癌、脑癌、膀胱癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌和前列腺癌。

[0549] 在某些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合至上述 RON 或片段或变体的至少一个表位,即,与结合至不相关的或随机的表位相比更容易地结合至这样的表位;优先地结合至上述 RON 或片段或变体的至少一个表位,即与结合至相关的、相似的、同源的或类似的

表位相比更容易地结合至这样的表位；竞争性地抑制参考抗体的结合，其中所述参考抗体自身与上述 RON 或片段或变体的某表位特异性地或优先地结合；或者以由解离常数 K_D 所表征的亲合力结合至上述 RON 或片段或变体的至少一个表位，其中所述 K_D 小于约 $5 \times 10^{-2}M$ 、约 $10^{-2}M$ 、约 $5 \times 10^{-3}M$ 、约 $10^{-3}M$ 、约 $5 \times 10^{-4}M$ 、约 $10^{-4}M$ 、约 $5 \times 10^{-5}M$ 、约 $10^{-5}M$ 、约 $5 \times 10^{-6}M$ 、约 $10^{-6}M$ 、约 $5 \times 10^{-7}M$ 、约 $10^{-7}M$ 、约 $5 \times 10^{-8}M$ 、约 $10^{-8}M$ 、约 $5 \times 10^{-9}M$ 、约 $10^{-9}M$ 、约 $5 \times 10^{-10}M$ 、约 $10^{-10}M$ 、约 $5 \times 10^{-11}M$ 、约 $10^{-11}M$ 、约 $5 \times 10^{-12}M$ 、约 $10^{-12}M$ 、约 $5 \times 10^{-13}M$ 、约 $10^{-13}M$ 、约 $5 \times 10^{-14}M$ 、约 $10^{-14}M$ 、约 $5 \times 10^{-15}M$ 或约 $10^{-15}M$ 。如在抗体结合解离常数的范畴中使用的，术语“约”允许用于测量抗体亲和力的方法中固有的变化程度。例如，取决于所用的仪器的精密水平、基于所测量的样品数目的标准差、和舍入误差，术语“约 $10^{-2}M$ ”可以包括例如，从 0.05M 到 0.005M。在某些实施方案中，本发明的抗体和其片段与其所来源的其它物种的 RON 蛋白交叉反应，例如与人类 RON 特异性地结合的抗体或其片段还与鼠 RON 结合。本发明的其它适合的抗体或其片段包括高度物种特异性的那些。

[0550] 在特定的实施方案中，本文公开的抗体或其免疫特异性片段以小于或等于 $5 \times 10^{-2}sec^{-1}$ 、 $10^{-2}sec^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-3}sec^{-1}$ 或 $10^{-3}sec^{-1}$ 的解离速率 ($k(off)$) 结合 RON 多肽或其片段或变体。本文公开的其它抗体或其免疫特异性片段以小于或等于 $5 \times 10^{-4}sec^{-1}$ 、 $10^{-4}sec^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-5}sec^{-1}$ 或 $10^{-5}sec^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-6}sec^{-1}$ 、 $10^{-6}sec^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-7}sec^{-1}$ 或 $10^{-7}sec^{-1}$ 的解离速率 ($k(off)$) 结合 RON 多肽或其片段或变体。

[0551] 在其它的实施方案中，本文公开的抗体或其免疫特异性片段以大于或等于 $10^3M^{-1}sec^{-1}$ 、 $5 \times 10^3M^{-1}sec^{-1}$ 、 $10^4M^{-1}sec^{-1}$ 或 $5 \times 10^4M^{-1}sec^{-1}$ 的结合速率 ($k(on)$) 结合 RON 多肽或其片段或变体。用于本文公开的诊断和治疗方法中的其它抗体或其免疫特异性片段以大于或等于 $10^5M^{-1}sec^{-1}$ 、 $5 \times 10^5M^{-1}sec^{-1}$ 、 $10^6M^{-1}sec^{-1}$ 或 $5 \times 10^6M^{-1}sec^{-1}$ 或 $10^7M^{-1}sec^{-1}$ 的结合速率 ($k(on)$) 结合 RON 多肽或其片段或变体。

[0552] 在各个实施方案中，上述的一种或多种结合分子是 RON 活性的拮抗剂，例如，拮抗剂 RON 抗体与肿瘤细胞上表达的 RON 的结合抑制 MSP 的结合，抑制信号转导途径中下游分子如 PI3-K、Akt、Ras、MAPK、src、Fak、 β -连环蛋白和 ERK 1/2 的活化，或抑制肿瘤细胞的增殖、活动性或转移。

[0553] IX. 使用 RON 特异性结合分子和核酸扩增测定的诊断或预后方法

[0554] RON 特异性抗体、或其片段、衍生物或类似物可被用于诊断目的以检测、诊断或监测与 RON 的异常的表达和 / 或活性相关的疾病、病症和 / 或病况。RON 表达在肿瘤组织和其它瘤病况中增加。

[0555] RON 特异性抗体或其片段对于哺乳动物（优选地为人类）中过度增生性病症的诊断、治疗、预防和 / 或预后是有用的。这种病症包括但不限于癌症、赘生物、肿瘤和 / 或如本文下面其它地方所述的特别是 RON 相关的癌症，例如胃癌、脑癌、膀胱癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌和前列腺癌。

[0556] 例如，如本文所公开，RON 的表达至少与胃、脑、膀胱、结肠、肺、乳腺、胰腺、卵巢和前列腺肿瘤组织相关。因此，针对 RON 的抗体（和抗体片段）可被用来检测表达升高水平的 RON 的特定组织。这些诊断测定可以在体内或在体外例如在血液样品、活检组织或尸检组织上进行。

[0557] 因此，本发明提供在诊断癌症和其它过度增生性病症过程中有用的诊断方法，其

包括测量来自个体的组织或其它细胞或体液中的 RON 蛋白或转录物的表达水平,以及将所测量的表达水平与正常组织或体液中标准的 RON 表达水平进行比较,由此,表达水平与标准相比的增加病症。

[0558] 一个实施方案提供了检测液体或组织样品中异常的过度增生细胞例如癌症前期细胞或癌细胞的存在的方法,其包括测定个体的组织或体液样品中 RON 的表达,以及将样品中 RON 表达的存在或水平与一组标准组织或体液样品中 RON 表达的存在或水平进行比较,其中 RON 表达的检测或者 RON 表达与标准相比的增加表明了异常的过度增生细胞生长。

[0559] 更具体地,本发明提供检测体液或组织样品中异常的过度增生细胞的存在的方法,其包括 (a) 使用本发明的 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段来测定个体的组织或体液样品中 RON 的表达,以及 (b) 将样品中 RON 表达的存在或水平与一组标准组织或体液样品中 RON 表达的存在或水平进行比较,由此,RON 表达的检测或者 RON 表达与标准相比的增加表明了异常的过度增生细胞生长。

[0560] 关于癌症,来自个体的活检组织中的相对高含量的 RON 蛋白的存在可表明肿瘤或其它恶性生长的存在,可表明这种恶性肿瘤或肿瘤的发展的素因,或者可提供在实际的临床症状显现之前检测疾病的手段。此类型的更确定的诊断可允许健康专业人士更早地使用预防措施或大胆治疗,从而预防癌症的形成或进一步演变。

[0561] 本发明的 RON 特异性抗体可被用来使用本领域技术人员已知的经典的免疫组织化学方法测定生物样品中的蛋白水平(例如,参见 Jalkanen 等人, *J. Cell. Biol.* 101 : 976-985(1985); Jalkanen 等人, *J. Cell. Biol.* 105 :3087-3096(1987))。对于检测蛋白表达有用的其它基于抗体的方法包括免疫测定,例如酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射免疫测定(RIA)。适合的抗体测定标记物是本领域已知的,并且包括酶标记物,例如葡萄糖氧化酶;放射性同位素,例如碘(^{125}I 、 ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟(^{112}In)和锝(^{99}Tc);发光标记物,例如鲁米诺;以及荧光标记物,例如荧光素和若丹明,以及生物素。适合的测定在本文其它地方更详细地描述。

[0562] 本发明的一个方面是用于体内检测或诊断过度增生疾病或病症的方法,其中所述过度增生性疾病或病症是与动物,优选地为哺乳动物,以及最优选地为人类的 RON 的异常表达相关的。在一个实施方案中,诊断包括:a)对受治疗者施用(例如,在肠胃外、皮下或腹膜内)有效量的特异性结合至 RON 的本发明的标记的抗体或其片段;b)施用后等待一段时间间隔以允许标记的结合分子优先地集中在受治疗者中 RON 被表达的位点(而且未结合的标记的分子被清除至背景水平);c)确定背景水平;和 d)检测受治疗者体内标记的分子,以至于背景水平以上的标记的分子的检测表明受治疗者具有与 RON 异常表达相关的特殊疾病或病症。可通过各种方法来确定背景水平,包括将所检测的标记的分子的量与之前在特定系统中确定的标准值进行比较。

[0563] 本领域中将理解的是,受治疗者的个头和所用的成像系统将确定产生诊断图像所需的成像部分的量。在放射性同位素部分的情况下,对于人类受治疗者,所注入的放射性的量将通常是在从约 5 至 20 毫居里范围内的例如 ^{99}Tc 。然后,标记的结合分子例如抗体或抗体片段将优先地聚集在细胞中含有特定蛋白的位置处。体内肿瘤成像描述在 S. W. Burchiel 等人,“Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments(放射标记的抗体和其片段的免疫药代动力学)”,(第 13 章, *Tumor Imaging: The*

Radiochemical Detection of Cancer(肿瘤成像:癌症的放射化学检测), S. W. Burchiel 和 B. A. Rhodes 编辑, Masson Publishing Inc. (1982)。

[0564] 取决于若干可变的因素,包括所用的标记物类型和施用方式,允许标记的分子优先地集中在受治疗者中的位点以及为了使未结合的标记的分子被清除至背景水平的施用后时间间隔是 6 至 48 小时或 6 至 24 小时或 6 至 12 小时。在另一个实施方案中,施用后的时间间隔是 5 至 20 天或 7 至 10 天。

[0565] 可以使用本领域已知的用于体内扫描的方法来检测患者体内标记的分子的存在。这些方法取决于所用的标记物的类型。技术人员将能够确定用于具体特殊标记物的适合方法。可被用于本发明的诊断方法中的方法和装置包括但不限于计算机断层成像 (CT), 全身扫描例如正电子发射断层成像 (position emission tomography, PET)、磁共振成像 (MRI) 和超声波成像。

[0566] 在特定的实施方案中,用放射性同位素标记结合分子,并且用辐射响应的外科仪器在患者中检测 (Thurston 等人, 美国专利第 5, 441, 050 号)。在另一个实施方案中,用荧光化合物标记结合分子,并且用荧光响应的扫描仪器在患者中检测。在另一个实施方案中,用发射正电子的金属标记结合分子,并且用正电子发射断层成像在患者中检测。在再一个实施方案中,用顺磁标记物来标记结合分子,并且用磁共振成像 (MRI) 在患者中检测。

[0567] 用于 RON 表达的体内成像的抗体标记物或标志物包括通过 X- 射线成像、核磁共振成像 (NMR)、MRI、CAT 扫描或电子自旋共振成像 (ESR) 可检测的那些。对于 X- 射线成像,适合的标记物包括放射性同位素例如钼或铯,其发射可检测的辐射但不明显地有害于受治疗者。对于 NMR 和 ESR 适合的标志物包括具有可检测的特征性自旋的那些,例如氘,其可通过对相关杂交瘤的营养物进行标记而被并入抗体。当为了在人体中诊断而使用体内成像来检测增高水平的 RON 表达时,可以优选地使用如本文其它地方所述的人类抗体或“人源化的”嵌合单克隆抗体。

[0568] 在与上述的那些相关的实施方案中,通过重复任一个诊断疾病或病症的方法来对已经诊断的疾病或病症进行监测,其中所述重复是在例如最初诊断之后一个月、最初诊断之后六个月、最初诊断之后一年等等。

[0569] 在已经根据传统方法进行了病症的诊断(包括肿瘤的诊断)的情况下,本文公开的检测方法作为预后的指示器是有用的,由此,继续展现增强的 RON 表达的患者将经历与表达水平降低到更接近标准水平的患者相比更糟的临床后果。

[0570] 所谓“测定肿瘤相关的 RON 多肽的表达水平”是指以定性或定量方式直接地(例如通过确定或估计绝对蛋白水平)或间接地(例如通过与第二生物样品中癌症相关的多肽水平进行比较)测量或估计第一生物样品中 RON 多肽的水平。优选地,测量或估计第一生物样品中 RON 多肽的表达水平,并将其与标准 RON 多肽水平比较,所述标准是从第二生物样品取得的或通过将来自不具有该病症的个体的群体中的水平进行平均而确定的,其中所述第二生物样品是从不具有该病症的个体中获得的。本领域将会理解,一旦知道了“标准”RON 多肽水平,它可被反复地用作比较的标准。

[0571] 所谓“生物样品”是指从潜在表达 RON 的个体、细胞系、组织培养物或其它细胞来源获得的任何生物样品。如所指出,生物样品包括体液(例如血清、血浆、尿、滑液和脊髓液)和含有潜在表达 RON 的细胞的其它组织来源。从哺乳动物获得活检组织和体液的方法

是本领域熟知的。

[0572] 在另外的实施方案中,针对 RON 的构象表位的抗体或抗体的免疫特异性片段可被用来定量地或定性地检测 RON 基因产物或者其保守的变体或肽片段的存在。这可通过例如免疫荧光技术来完成,其利用与光学显微检测、流式细胞计量的检测或荧光的检测相结合的荧光标记的抗体。

[0573] 可使用上述方法诊断和 / 或预后的癌症包括但不限于胃癌、肾癌、脑癌、膀胱癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌和前列腺癌。

[0574] X. 免疫测定

[0575] 可以通过本领域任何已知方法来测定本文公开的 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段的免疫特异性结合。可以使用的免疫测定包括但不限于竞争性和非竞争性测定系统,其使用技术例如蛋白质印迹、放射免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“三明治”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、凝集测定、补体固定测定、免疫放射测定、荧光免疫测定、蛋白 A 免疫测定,仅举几个例子。这种测定是本领域中常规的和熟知的(参见例如 Ausubel 等人编辑,Current Protocols in Molecular Biology(分子生物学最新实验方案),John Wiley & Sons, Inc., New York, 第 1 卷(1994),其全文以引用的方式并入本文)。示例性的免疫测定简短地描述如下(但不旨在进行限制)。

[0576] 免疫沉淀方案通常包括将细胞群体在裂解缓冲液例如补充有蛋白磷酸酶和 / 或蛋白酶抑制剂(例如 EDTA、PMSF、抑肽酶、钒酸钠)的 RIPA 缓冲液(1% NP-40 或 Triton X-100, 1% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 0.15M NaCl, 0.01M 磷酸钠, pH 7.2, 1% Trasyol) 中裂解,将感兴趣的抗体加入细胞裂解产物,在 4℃ 孵育一段时间(例如 1-4 小时),将蛋白 A 和 / 或蛋白 G 琼脂糖珠加至细胞裂解产物,在 4℃ 孵育约 1 小时或更长,在裂解缓冲液中洗涤珠子并且将珠子重新悬浮在 SDS/ 样品缓冲液中。可通过例如蛋白质印迹分析来评估感兴趣的抗体将特定抗原免疫沉淀的能力。本领域技术人员将知道可修改参数以增加抗体与抗原的结合以及减少背景(例如用琼脂糖珠预先清除细胞裂解产物)。关于免疫沉淀方案的进一步讨论,参见例如 Ausubel 等人编辑,Current Protocols in Molecular Biology(分子生物学最新实验方案),John Wiley & Sons, Inc., New York, 第 1 卷(1994) 章节 10.16.1。

[0577] 蛋白质印迹分析通常包括制备蛋白样品,在聚丙烯酰胺凝胶(例如 8% -20% SDS-PAGE, 取决于抗原的分子量)中进行蛋白样品的电泳,将蛋白样品从聚丙烯酰胺凝胶转移至膜例如硝酸纤维素、PVDF 或尼龙上,在封闭溶液(例如含有 3% BSA 或脱脂奶的 PBS)中封闭所述膜,在洗涤缓冲液(例如 PBS- 吐温 20)中洗涤所述膜,用在封闭缓冲液中稀释的第一抗体(感兴趣的抗体)封闭所述膜,在洗涤缓冲液中洗涤所述膜,用在封闭缓冲液中稀释的耦联至酶底物(例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)或放射性分子(例如 ^{32}p 或 ^{125}I)的第二抗体(其识别第一抗体,例如抗人类抗体)封闭所述膜,在洗涤缓冲液中洗涤所述膜,以及检测抗原的存在。本领域技术人员将知道可被修改以增加检测的信号并减少背景噪声的参数。关于蛋白质印迹方案的进一步讨论,参见例如 Ausubel 等人编辑,Current Protocols in Molecular Biology(分子生物学最新实验方案),John Wiley & Sons, Inc., New York, 第 1 卷(1994) 章节 10.8.1。

[0578] ELISA 包括制备抗原,用所述抗原包被 96 孔微量滴定板的孔,将耦联至可检测的

化合物例如酶底物（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）的感兴趣的抗体加入孔中并孵育一段时间，以及检测抗原的存在。在 ELISA 中，感兴趣的抗体不必结合至可检测的化合物；相反，可将结合至可检测的化合物的第二抗体（其识别感兴趣的抗体）加入孔中。进一步地，可将抗体包被于孔中，而不是用抗原来包被孔。在这种情况下，在将感兴趣的抗原加入包被的孔中之后，可加入结合至可检测的化合物的第二抗体。本领域技术人员将知道可被修改以增加检测的信号参数，以及本领域已知的其它改进形式的 ELISA。关于 ELISA 的进一步讨论，参见例如 Ausubel 等人编辑，*Current Protocols in Molecular Biology*（分子生物学最新实验方案），John Wiley & Sons, Inc., New York, 第 1 卷（1994）章节 11.2.1。

[0579] 可通过竞争性结合测定来确定抗体对抗原的结合亲和力以及抗体-抗原相互作用的解离速率。竞争性结合测定的一个例子是放射免疫测定，其包括用感兴趣的抗体在逐渐增加量的未标记抗原的存在下孵育被标记的抗原（例如 ^3H 或 ^{125}I ），以及检测结合至被标记的抗原的抗体。可以从 Scatchard 图形分析的数据来确定感兴趣的抗体对特定抗原的亲和力以及结合的解离速率。可使用放射免疫测定来确定与第二抗体的竞争。在这种情况下，在逐渐增加量的未标记的第二抗体的存在下，将抗原与结合至标记的化合物（例如 ^3H 或 ^{125}I ）的感兴趣的抗体一起孵育。

[0580] RON 特异性抗体可被另外地用于组织学，如在免疫荧光、免疫电子显微术或非免疫测定中，以原位检测癌症抗原基因产物或者其保守的变体或肽片段。可通过从患者取出组织学标本并对其应用标记的 RON 特异性抗体或其片段来完成原位检测，其中所述应用优选地是通过将被标记的抗体（或片段）覆盖在生物样品上。通过使用这种步骤，不仅可能确定 RON 蛋白或者保守的变体或肽片段的存在，而且可能确定它在被检验的组织中的分布。使用本发明，普通技术人员将容易理解，可以修改许多组织学方法（例如染色步骤）中的任一种以便实现这种原位检测。

[0581] RON 基因产物或者其保守的变体或肽片段的免疫测定和非免疫测定通常将包括在能够结合至 RON 或者其保守的变体或肽片段的可检测地标记的抗体的存在下孵育一种样品例如生物液、组织提取物、新鲜收集的细胞或在细胞培养物中培养的细胞的溶解产物，以及通过本领域熟知的若干技术中的任一种来检测结合的抗体。

[0582] 可将生物样品与固相支撑物或载体（例如硝酸纤维素或者能够固定细胞、细胞颗粒或可溶性蛋白的其它固体支撑物）接触并固定于其上。然后可用适合的缓冲液洗涤所述支撑物，之后用可检测地标记的 RON 特异性抗体进行处理。然后可用缓冲液再一次洗涤所述固相支撑物以除去未结合的抗体。任选地，接下来对抗体进行标记。然后可通过传统方法来检测固体支撑物上的结合的标记物的量。

[0583] 所谓“固相支撑物或载体”是指能够结合抗原或抗体的任何支撑物。熟知的支撑物或载体包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然的和修饰的纤维素、聚丙烯酰胺、辉长岩和磁铁矿石。出于本发明的目的载体的性质可以是在某种程度上可溶的或是不可溶的。支撑物质实际上可具有任何可能的结构构型，只要偶联的分子能够结合至抗原或抗体。因此，支撑物的构型可以是如珠子般的球形的，或者如试管的内表面或棒的外表面一样的圆柱状的。或者，表面可以是如纸张、测试条等一样的平的。优选的支撑物包括聚苯乙烯珠子。本领域技术人员将知道用来结合抗体或抗原的许多其它适合的载体，或通过使用常规实验将能够确定结合抗体或抗原的许多其它适合的载体。

[0584] 可根据熟知的方法来确定给定批量的 RON 特异性抗体的结合活性。本领域技术人员通过使用常规的实验方法将能够针对每次测定来确定可操作的和最佳的测定条件。

[0585] 有许多方法可用来测量抗体 - 抗原相互作用的亲和力,但用于确定速率常数的方法相对较少。大多数方法依赖于对抗体或抗原进行标记,其不可避免地使常规测量变得复杂,并且给被测量的量带来不确定性。

[0586] 在 BIAcore 上进行的表面等离子体共振 (SPR) 提供优于测量抗体 - 抗原相互作用亲和力的传统方法的许多优点:(i) 不需要标记抗体或抗原;(ii) 不需要提前纯化抗体,并可直接使用细胞培养物上清液;(iii) 使得允许对不同单克隆抗体相互作用进行快速的半定量比较的实时测量变得可能,而且足以用于许多评估目的;(iv) 可重新产生双特异性表面以便可在相同条件下容易地比较一系列不同的单克隆抗体;(v) 分析步骤完全是自动化的,并且不需要使用者介入就能进行广泛系列的测量。BIAapplications 手册,第 AB 版(1998 年重印),BIACORE 序号 BR-1001-86;BIAtchnology 手册,第 AB 版(1998 年重印),BIACORE 序号 BR-1001-84。

[0587] 基于 SPR 的结合研究需要结合对儿的一个成员被固定在传感器表面上。被固定的结合配偶体被称作配体。溶液中的结合配偶体被称作分析物。在一些情况下,通过结合至称作捕捉分子的另一个固定的分子而将配体间接地结合至表面上。SPR 响应反映了在分析物结合或解离时检测器表面上的质量浓度的变化。

[0588] 基于 SPR,实时 BIAcore 测量在相互作用发生时直接监测它们。此技术十分适合于动力学参数的确定。进行比较亲和力的排序是极简单的,而且动力学和亲和力常数二者都可来源于感应图数据。

[0589] 当在穿过配体表面的离散脉冲中注入分析物时,所得的感应图可被分成三个基本阶段:(i) 在注射样品的过程中将分析物与配体缔合;(ii) 在注射样品的过程中的平衡或稳态,其中分析物结合的速率是通过从复合物解离而平衡;(iii) 在缓冲液流动过程中分析物从表面上解离。

[0590] 缔合和解离阶段提供关于分析物 - 配体相互作用的动力学信息 (k_a 和 k_d ,复合物形成和解离的速率, $k_d/k_a = K_D$)。平衡阶段提供关于分析物 - 配体相互作用的亲和力信息 (K_D)。

[0591] BIAevaluation 软件使用数值积分和全局拟合算法二者来为曲线拟合提供广泛的便利。通过数据的适当分析,可从简单的 BIAcore 研究中获得相互作用的单独速率和亲和力常数。通过该技术可测量的亲和力的范围是非常宽的,其从 mM 至 pM 变化。

[0592] 表位特异性是单克隆抗体的重要特性。与使用放射免疫测定、ELISA 或其它表面吸附方法的传统技术相反,使用 BIAcore 的表位定位不需要标记抗体或纯化的抗体,并且允许使用一系列的多种单克隆抗体来进行多位点特异性测试。另外,大量的分析可被自动处理。

[0593] 配对的结合实验测试两个 MAb 同时与同一个抗原结合的能力。针对不同表位的 MAb 将独立地结合,而针对相同的或密切相关的表位的 MAb 将干扰彼此之间的结合。可以直截了当地进行使用 BIAcore 的这些结合实验。

[0594] 例如,人们可使用捕捉分子来结合第一 MAb,然后相继加入抗原和第二 MAb。感应图将揭示:1. 有多少抗原结合至第一 MAb,2. 第二 MAb 以什么程度结合至连接在表面的抗

原, 3. 如果第二 MAb 不结合, 配对测试的顺序的颠倒是否改变结果。

[0595] 肽抑制是用于表位定位的另一种技术。此方法可为配对的抗体结合研究进行补充, 并且在知道抗原的一级序列的时候能将功能性表位与结构特征相联系。测试了肽或抗原片段对于不同 MAb 与固定的抗原之间结合的抑制。据假设, 干扰给定 MAb 的结合的肽与该 MAb 所确定的表位在结构上相关。

[0596] XI. 药物组合物和施用方法

[0597] 制备并将 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段施用于需要其的受治疗者的方法是本领域技术人员所熟知或容易确定的。结合分子, 例如结合多肽, 如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段的施用途径可以是例如口服、肠胃外、经吸入或局部。本文所用的术语肠胃外包括例如静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮下、直肠或阴道施用。虽然所有这些施用方式都清楚地被认为是本发明范围内的, 但一种施用形式是用于注射, 特别是静脉内或动脉内注射或滴注的溶液。一般来说, 适用于注射的药物组合物可以包含缓冲液 (例如, 乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液)、表面活性剂 (例如, 聚山梨醇酯), 任选稳定剂 (例如人类白蛋白) 等。然而, 在与本文教导相容的其它方法中, 可以将结合分子, 例如结合多肽, 如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段直接递送到有害细胞群体的部位, 从而提高患病组织暴露于治疗剂。

[0598] 用于肠胃外给药的制品包括无菌的水溶液或非水溶液、悬浮液和乳液。非水溶剂的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油 (诸如橄榄油) 以及可注射的有机酯 (诸如油酸乙酯)。水性载体包括水、醇 / 水溶液、乳液或悬浮液, 包括盐水和缓冲的介质。在主题发明中, 药物上可接受的载体包括但不限于 0.01-0.1M、并且优选 0.05M 磷酸盐缓冲液或 0.8% 盐水。其它常见肠胃外载体包括磷酸钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏溶液, 或者不挥发油。静脉内载体包括液体和营养补充剂、电解质补充剂, 诸如那些基于林格氏右旋糖的等等。还可以存在防腐剂和其添加剂, 例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0599] 更具体地说, 适用于注射用途的药物组合物包括无菌水性溶液 (当是水溶性的时) 或分散体以及用于临时制备无菌注射溶液或分散体的无菌粉末。在这些情况中, 所述组合物必须是无菌的, 并且应该是容易进行注射器操作的液体。它应当在制造和储存条件下是稳定的, 并且优选抗微生物 (诸如细菌和真菌) 的污染作用而保存。载体可以是溶剂或分散体介质, 其含有例如水、乙醇、多元醇 (例如, 甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等), 和其合适的混合物。可以通过利用涂层 (诸如卵磷脂)、通过在分散体的情况中维持所需颗粒大小, 以及通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。用于本文公开的治疗方法的适合的制剂描述在 Remington's Pharmaceutical Sciences (雷明登氏制药科学), Mack Publishing Co., 第 16 版 (1980) 中。

[0600] 防止微生物的作用可以通过各种抗细菌和抗真菌剂来实现, 例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等。在许多情况中, 优选在组合物中包括等渗剂, 例如糖、多元醇 (诸如甘露醇、山梨醇) 或氯化钠。通过在组合物中包含能延迟吸收的试剂 (例如, 单硬脂酸铝和明胶), 可以将注射组合物的吸收延长。

[0601] 在任何情况中, 可通过将所需量的活性化合物 (例如, 结合分子, 如结合多肽, 如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段自身或联合其它活性剂)、与所需的如本文所列的一

种成分或多种成分的组合一起引入合适溶剂中,随后过滤除菌制得无菌注射液。通常通过将活性化合物引入含有基本分散体介质的无菌载体和以上列举的其它所需成分,制得分散体。对于制备无菌注射液的无菌粉末来说,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,这些方法由先前无菌过滤的溶液产生出活性成分和任何其它所需成分的粉末。用于注射的制品根据本领域已知的方法经过加工、装入容器(诸如安瓿、袋子、瓶子、注射器或小瓶),在无菌条件下封口。进一步,可以将制剂包装,并以药盒的形式出售,象共同待审的U. S. S. N. 09/25 9, 337 (US-2002-0102208A1) 中描述的那些,该申请的全文以引用的方式并入本文。这类制造产品将优选带有标签或包装插页,表明相关组合物用于治疗患有或易患自身免疫或肿瘤病症的受治疗者。

[0602] 对于本文所述的过度增生性病症的治疗,本发明组合物的有效剂量随着许多不同因素而变化,所述因素包括施用方式、靶位点、患者的生理学状况、患者是人类还是动物、施用的其它药物、以及治疗是预防性的还是治疗性的。通常,患者是人类,但是也可以治疗非人类哺乳动物包括转基因哺乳动物。可使用本领域技术人员已知的常规方法滴定治疗剂量以优化安全性和效力。

[0603] 对于用抗体或其片段治疗过度增生性病症,剂量范围可以是宿主体重的大约0.0001至100mg/kg、以及更通常是0.01至5mg/kg(例如,0.02mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kg等)。例如,剂量可以是1mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg的范围内的任何剂量,优选地至少1mg/kg。上述范围中的中间剂量也意为在本发明范围内。可以每日、隔日、每周、或根据任何其它通过经验性分析确定的方案,向受治疗者施用此剂量。一种示例性疗法需要长期,例如至少6个月的多剂量施用。其它示例性治疗方案需要每两周施用一次或每月施用一次或每3至6个月施用1次。示例性的剂量安排包括每日1-10mg/kg或15mg/kg、隔日30mg/kg、或每周60mg/kg。在一些方法中,具有不同结合特异性的两种或两种以上单克隆抗体同时施用,这种情况施用的每种抗体的剂量落入所示范围内。

[0604] 本文公开的RON特异性抗体或其免疫特异性片段可以多次施用。单次剂量之间的间隔可以是每周、每月或每年。间隔也可以是不规律的,如通过测量患者中靶多肽或靶分子的血液水平所示的。在一些方法中,调节剂量使血浆多肽浓度达到1-1000 μ g/ml和在一些方法中达到25-300 μ g/ml。或者,结合分子能够以缓释制剂施用,这种情况需要较低的施用频率。剂量和频率根据患者体内抗体的半衰期而不同。还可通过融合至稳定多肽或部分例如白蛋白或PEG来延长结合分子的半衰期。通常,人源化抗体表现出最长的半衰期,然后是嵌合抗体和非人类抗体。在一个实施方案中,能够以未轭合的形式施用本发明的结合分子。在另一实施方案中,结合分子,例如结合多肽,如用于本文公开方法中的RON特异性抗体或其免疫特异性片段能够以轭合形式多次施用。还有一实施方案中,本发明的结合分子能够以未轭合形式施用,然后施用轭合形式,或者反过来。

[0605] 施用剂量和频率可以根据治疗是治疗性还是预防性的而变化。在预防性应用中,含有抗体或其鸡尾酒式混合物的组合物向还未在疾病状态或处于疾病前状态的患者施用以增强患者的抵抗力。这样的剂量定义为“预防有效量”。在此应用中,准确的量又取决于患者的健康状态和一般免疫状态,但是通常为0.1至25mg/剂的范围,尤其是0.5至2.5mg/剂。能够以相对稀疏的间隔长期施用相对低的剂量。一些患者可以在其有生之年持续接受

治疗。

[0606] 在治疗性应用中,有时需要以相对短的间隔施用相对高的剂量(例如,约 1 至 400mg/kg 结合分子如抗体/剂,对于放射免疫偶合物更通常使用 5 至 25mg 的剂量,并且对于细胞毒素-药物偶合的分子使用更高剂量),直到减缓或终止疾病进程,并且优选地直到患者显示疾病症状的部分或完全的改善。之后,可患者可被施用预防性剂量方案。

[0607] 在一个实施方案中,可以用编码 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段的核酸分子(例如在载体中)来治疗受治疗者。编码多肽的核酸剂量在约 10ng 到 1g、100ng 到 100mg、1 μ g 到 10mg 或 30-300 μ g DNA/患者的范围内。对于感染性病毒载体,剂量在每剂 10-100 或更多病毒粒子。

[0608] 治疗剂可以通过肠胃外、局部、静脉内、口服、皮下、动脉内、颅内、腹膜内、鼻内或肌内的方式施用以用于预防性和/或治疗性的治疗。在一些方法中,将药剂直接注射进其中表达 RON 的细胞聚集的特定组织中,例如颅内注射。抗体的施用优选以肌肉注射或静脉内输注进行。在一些方法中,特定的治疗抗体直接注射到颅内。一些方法中,抗体以缓释组合物或装置的形式施用,诸如 Medipad™ 装置。

[0609] 任选地可将本发明的 RON 抗体或其片段与治疗需要治疗(例如,预防性或治疗性)的病症或病况有效的其它药剂一起联合施用。

[0610] ^{90}Y 标记的结合多肽的有效单次治疗剂量(即治疗有效量)的范围在约 5 到约 75mCi,更优选在约 10 到约 40mCi。 ^{131}I 标记的抗体的单次治疗非骨髓清除性有效剂量的范围在约 5 到约 70mCi,更优选约 5 到约 40mCi。 ^{131}I 标记的抗体的单次治疗清除有效剂量(即,可能需要自体骨髓移植)在约 30 到约 600mCi,更优选在约 50 到少于约 500mCi 的范围。就嵌合抗体而言,由于其循环半衰期比小鼠抗体长,碘-131 标记的嵌合抗体的单次治疗非骨髓清除性有效剂量的范围在约 5 到约 40mCi,更优选少于约 30mCi。对于例如 ^{111}In 标记,成像标准通常少于 5mCi。

[0611] 虽然对于 ^{131}I 和 ^{90}Y 已取得了大量的临床经验,但其它放射标记也是本领域已知的,并且已被用于类似的目的。还有另外一些放射性同位素被用于成像。例如,其它与本发明范围相容的放射性同位素包括但不限于, ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{57}Co 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{77}Br 、 ^{81}Rb 、 ^{81}Kr 、 ^{87}Sr 、 ^{113}In 、 ^{127}Cs 、 ^{129}Cs 、 ^{132}I 、 ^{197}Hg 、 ^{203}Pb 、 ^{206}Bi 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{47}Sc 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{153}Sm 、 ^{188}Re 、 ^{199}Au 、 ^{225}Ac 、 ^{211}At 和 ^{213}Bi 。在这方面, α 、 β 和 γ 放射源均与本发明相容。此外,鉴于本公开内容,应当认为本领域技术人员可以容易地确定哪些放射性核素与选定的治疗过程相匹配,而不需进行过多实验。为了这一目的,其它曾被用于临床诊断的放射性核素包括 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{99}Tc 、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 以及 ^{111}In 。抗体也已被标记上各种放射性核素,可能用于定向免疫治疗(Peirersz 等人, *Immunol. Cell Biol.* 65:111-125(1987))。这些放射性核素包括 ^{188}Re 和 ^{186}Re ,以及在较小程度上的 ^{199}Au 和 ^{67}Cu 。美国专利第 5,460,785 号提供了涉及到这些放射性同位素的另外数据,该专利以引用的方式并入本文。

[0612] 无论以偶合形式或未偶合形式使用本文公开的 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段,都应当意识到,本发明的主要优点是在骨髓抑制患者、特别是正在进行或已进行了辅助治疗(诸如放疗或化疗)的那些患者中使用这些分子的能力。即,在其它优选实施方案中,分子的有益的输送概况(即相对短的血清停留时间、高结合亲和力和增强的定位)使它们对于治疗具有减少的红骨髓储量并对骨髓毒性敏感的患者特别有用。在这点上,分子的

独特输送概况使它们在将放射标记的轭合物施用于骨髓抑制的癌症患者时非常有效。像这样,本文公开的 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段以轭合形式或未轭合形式在之前经受过辅助疗法例如外部照射放疗或化疗的患者中是有用的。在其它优选的实施方案中,结合分子,例如结合多肽,如 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段(也是轭合或未轭合形式)可以与化疗剂一起用于联合治疗方案中。本领域技术人员明白,这类治疗方案可能包含相继、同时、并行或共同施用本文公开的抗体或其它结合分子与一种或多种化疗剂。本发明这个方面特别优选的实施方案包括施用放射标记的结合多肽。

[0613] 虽然 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段可以象上面描述的来施用,应当强调的是在其它实施方案中,可以将轭合和未轭合的结合分子施用给本来健康的患者作为一线治疗剂。在这类实施方案中,可以将结合分子施用给具有正常或平均的红骨髓储备的患者,和/或施用给未曾并且没有进行辅助疗法(诸如体外照射或化疗)的患者。

[0614] 然而,象上面讨论过的,选择的本发明的实施方案包括将 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段施用给骨髓抑制患者,或者与一种或多种辅助疗法,诸如放疗或化疗联合或共同使用(即联合治疗方案)。如本文所用,RON 特异性抗体或其免疫特异性片段与辅助疗法的共同或联合施用意味着相继、同时、共同、并行、相伴或同期施用或应用所述疗法和本文公开的结合分子。本领域技术人员会理解,联合治疗方案的各种成分的施用或应用应当被定时以便增强治疗的整体效果。例如,应当以标准的公知治疗过程施用化疗剂,然后在几周内施用本文描述的放射免疫轭合物。相反,可以静脉内施用连接了细胞毒素的结合分子,然后进行肿瘤局限性的体外放射。还在其它实施方案中,可以将结合分子与一种或多种选定的化疗剂在一次就诊中并行施用。技术人员(例如,有经验的肿瘤医生)基于选定的辅助疗法和本说明书的教导能很容易地确定有效的联合治疗方案,而不需过多实验。

[0615] 在此方面,可以理解,结合分子(带有细胞毒素或不带细胞毒素)和化疗剂的联合可能以任何次序并在向患者提供治疗益处的任何时间段内施用。即,化疗剂和 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段可能以任何顺序或并行施用。在选定的实施方案中,本发明的 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段将被施用给之前已经进行过化疗的患者。在其它实施方案中,本发明的 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段将与化疗治疗基本上同时或并行地施用。例如,可以给予正在经历化疗疗程的患者结合分子。在优选的实施方案中,将在任何化疗剂或化疗治疗的 1 年内施用结合分子。在其它优选实施方案中,将在任何化疗剂或化疗治疗的 10、8、6、4 或 2 个月内施用多肽。还在其它优选的实施方案中,将在任何化疗剂或化疗治疗的 4、3、2、或 1 周内施用结合分子。又在其它实施方案中,将在选定的化疗剂或化疗治疗的 5、4、3、2 或 1 天内施用结合分子。还可以理解,两种药剂或治疗法可以在大约数小时或数分钟内(即,基本上同时地)施用给患者。

[0616] 此外,根据本发明,骨髓抑制患者意味着表现出任何血液计数下降的患者。本领域技术人员应当意识到,有多种血液计数参数被常规用作骨髓抑制的临床指标,并且人们可以很容易地测量患者体内出现的骨髓抑制程度。领域认同的骨髓抑制量度的例子是绝对中性粒细胞计数(ANC)或血小板计数。这种骨髓抑制或部分骨髓抑制可能是多种生化病症或疾病的结果,或者更有可能的,是之前化疗或放疗的结果。在这方面,本领域技术人员会明白,曾经接受常规化疗的患者一般会表现出红骨髓储备下降。正如上面讨论过的,这样的受治疗者通常不能用最佳水平的细胞毒素(即放射性核素)来治疗,因为会出现导致更高的

死亡率或发病率的不能接受的副作用,诸如贫血或免疫抑制。

[0617] 更具体的说,本发明所述轭合或未轭合的 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段可以用来有效地治疗 ANC 低于约 2000/mm³ 或血小板计数低于约 150,000/mm³ 的患者。更优选地,本发明的 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段可以用于治疗 ANC 低于约 1500/mm³、低于约 1000/mm³ 或者更优选低于约 500/mm³ 的患者。类似的,本发明的 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段可以用来治疗血小板计数低于约 75,000/mm³、低于约 50,000/mm³ 或者甚至低于约 10,000/mm³ 的患者。更一般的来说,本领域技术人员可以容易地采用政府制定的指南和程序确定何时患者是骨髓抑制的。

[0618] 如上文指出的,许多骨髓抑制患者已经经过了多个疗程,包括化疗、植入物放疗或体外放射。在后一种情况中,体外放射源是用于对恶性肿瘤的局部辐射。对于植入放疗法,放射性试剂通过手术被放置到恶性肿瘤内,从而选择性地辐射疾病部位。任何情况中,本发明的 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段都可以用于治疗表现出骨髓抑制的患者的紊乱,而不管是什么原因引起的骨髓抑制。

[0619] 在这方面,还应当意识到,本发明的 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段可以与任何能消除、减少、抑制或控制赘生性细胞的体内生长的化疗剂被共同或联合使用(例如,提供联合治疗方案)。正如讨论过的,这类试剂经常导致红骨髓储备的下降。这种下降可全部或部分由本发明化合物的骨髓毒性的减少来补偿,这使得能够积极地治疗这些患者的瘤形成。在其它实施方案中,本文公开的放射标记的免疫轭合物可以有效地与能提高赘生性细胞对放射性核素的易感性的放射增敏剂一起使用。例如,可以在放射标记的结合分子已大部分从血流中清除,但在肿瘤部位仍维持在治疗有效水平之后施用放射增敏化合物。

[0620] 考虑到本发明的这些方面,与本发明相容的示例性化疗剂包括烷化剂、长春花生物碱(例如,长春新碱、长春碱)、丙卡巴肼、甲氨蝶呤和强的松。四药物联合 MOPP(mechlethamine(氮芥)、长春新碱(Oncovin)、丙卡巴肼和强的松)可以非常有效地治疗各种类型的淋巴瘤,并包括本发明的优选实施方案。在 MOPP 耐药性患者中,可以使用 ABVD(例如,阿霉素、博来霉素、长春碱和达卡巴嗪)、CH1VPP(苯丁酸氮芥、长春碱、丙卡巴肼和强的松)、CABS(洛莫司汀、多柔比星、博来霉素和链脲佐菌素)、MOPP 加 ABVD、MOPP 加 ABV(多柔比星、博来霉素和长春碱)或 BCVPP(卡莫司汀、环磷酰胺、长春碱、丙卡巴肼和强的松)的联合。对于标准给药剂量和进度,可参见 Arnold S.Freedman 和 Lee M.Nadler, Malignant Lymphomas(恶性淋巴瘤),在 Harrison's Principles of Internal Medicine(哈里森内科学原理)1774-1788(Kurt J. Isselbacher 等人编辑,第 13 版,1994)和 V. T. DeVita 等人,(1997) 和其中引用的参考文献。这些疗法可以不经改变使用或者按照具体患者需要经过改变后与本发明的一种或多种 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段联合使用。

[0621] 可用于本发明范畴的其它方案包括使用单独烷化剂例如环磷酰胺或苯丁酸氮芥、或者药物联合如 CVP(环磷酰胺、长春新碱和强的松)、CHOP(CVP 和多柔比星)、C-MOPP(环磷酰胺、长春新碱、强的松和丙卡巴肼)、CAP-BOP(CHOP 加丙卡巴肼和博来霉素)、m-BACOD(CHOP 加甲氨蝶呤、博来霉素和甲酰四氢叶酸)、ProMACE-MOPP(强的松、甲氨蝶呤、多柔比星、环磷酰胺、依托泊苷和甲酰四氢叶酸加标准 MOPP)、ProMACE-CytaBOM(强的松、多柔比星、环磷酰胺、依托泊苷、阿糖胞苷、博来霉素、长春新碱、甲氨蝶呤和甲酰四氢

叶酸) 以及 MACOP-B(甲氨蝶呤、多柔比星、环磷酰胺、长春新碱、固定剂量的强的松、博来霉素和甲酰四氢叶酸)。本领域技术人员能够容易地确定用于这些方案之中每一个的标准剂量和进度。CHOP 也已经与博来霉素、甲氨蝶呤、丙卡巴肼、氮芥、胞嘧啶阿拉伯糖苷以及依托泊苷联合。其它相容的化疗剂包括但不限于 2- 氯脱氧腺苷 (2-CDA)、2'- 脱氧助间型霉素 (Deoxycoformycin) 和氟达拉滨。

[0622] 对于不能实现疾病缓解或复发的中级和高级恶性肿瘤患者, 使用救援治疗 (salvage therapy)。救援治疗使用药物, 例如胞嘧啶阿拉伯糖苷、顺铂、卡铂、依托泊苷和异环磷酰胺 (单独地或联合地给予)。在复发或侵袭形式的某些肿瘤病症中, 常常使用以下方案: IMVP-16 (异环磷酰胺、甲氨蝶呤和依托泊苷)、MIME (甲基 -gag、异环磷酰胺、甲氨蝶呤和依托泊苷)、DHAP (地塞米松、高剂量阿糖胞苷和顺铂)、ESHAP (依托泊苷、甲基强的松龙 (methylprednisolone)、HD 阿糖胞苷、顺铂)、CEPP (B) (环磷酰胺、依托泊苷、丙卡巴肼、强的松和博来霉素) 和 CAMP (洛莫司汀、米托蒽醌、阿糖胞苷和强的松), 每个均有熟知的给药速率和进度。

[0623] 可以与本发明的 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段联合使用的化疗剂的量可以随着受治疗者而变化, 或者可以根据本领域熟知的方法施用。见例如, Bruce A Chabner 等人, Antineoplastic Agents (抗肿瘤剂), 在 Goodman & Gilman 的 The Pharmacological Basis of Therapeutics (治疗的药理学基础) 1233-1287 (Joel G. Hardman 等人编辑, 第 9 版 (1996))。

[0624] 在另一个实施方案中, 本发明的 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段可以与生物制剂一起施用。可以用于治疗癌症的生物制剂是本领域已知的, 本发明的结合分子可以与例如这些已知的生物制剂一起使用。

[0625] 例如, FDA 已批准以下用于治疗乳腺癌的生物制剂: **Herceptin[®]** (曲妥珠单抗, Genentech Inc., South San Francisco, CA; 在 HER2 阳性乳腺癌中有抗肿瘤活性的一种人源化单克隆抗体); **Faslodex[®]** (氟维司群, AstraZeneca Pharmaceuticals, LP, Wilmington, DE; 一种用于治疗乳腺癌的雌激素受体拮抗剂); **Arimidex[®]** (阿那曲唑, AstraZeneca Pharmaceuticals, LP; 一种非类固醇类芳香酶抑制剂, 它能阻断产生雌激素所需要的芳香酶); **Aromasin[®]** (依西美坦, Pfizer Inc., New York, NY; 一种用于治疗乳腺癌的不可逆的类固醇类芳香酶灭活剂); **Femara[®]** (来曲唑, Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, NJ; 一种由 FDA 批准的治疗乳腺癌的非类固醇类芳香酶抑制剂); 以及 **Nolvadex[®]** (他莫昔芬, AstraZeneca Pharmaceuticals, LP; 一种由 FDA 批准的治疗乳腺癌的非类固醇类抗雌激素)。其它能与本发明的结合分子联合使用的生物制剂包括: **Avastin[™]** (贝伐单抗, Genentech Inc.; FDA 批准的第一个设计用于抑制血管新生的疗法); 和 **Zevalin[®]** (替伊莫单抗, Biogen Idec, Cambridge, MA; 一种目前批准用于治疗 B 细胞淋巴瘤的放射标记的单克隆抗体)。

[0626] 此外, FDA 还批准了以下用于治疗结肠癌的生物制剂: **Avastin[™]**; **Erbix[™]** (西妥昔单抗, ImClone Systems Inc., New York, NY, 和 Bristol-Myers Squibb, New York, NY; 是一种直接针对表皮生长因子受体 (EGFR) 的单克隆抗体); **Gleevec[®]** (甲磺酸伊马替尼; 蛋白激酶抑制剂); 和 **Ergamisol[®]** (盐酸左旋咪唑, Janssen Pharmaceutica Products, LP,

Titusville, NJ; 由 FDA 在 1990 年批准的一种免疫调节剂, 与 5- 氟尿嘧啶联合用于 Dukes' C 期结肠癌患者手术切除后的辅助治疗)。

[0627] 目前批准的用于治疗非霍奇金淋巴瘤的疗法包括:**Bexxar**[®] (托西莫单抗和碘 I-131 托西莫单抗, GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC; 一种多步骤治疗, 涉及到连接有放射性分子 (碘 I-131) 的小鼠单克隆抗体 (托西莫单抗)); **Intron**[®] A (干扰素 α -2b, Schering Corporation, Kenilworth, NJ; 一类批准的与含有蒽环类抗生素的联合化疗 (例如, 环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和强的松 [CHOP] 一起用于治疗滤泡性非霍奇金淋巴瘤的干扰素)); **Rituxan**[®] (利妥昔单抗, Genentech Inc., South San Francisco, CA, 和 Biogen Idec, Cambridge, MA; 一种批准用于治疗非霍奇金淋巴瘤的单克隆抗体); **Ontak**[®] (地尼白介素毒素连接物, Ligand Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA; 由白喉毒素的一个片段与白细胞介素-2 基因融合构成的融合蛋白); 以及 **Zevalin**[®] (替伊莫单抗, Biogen Idec; 由 FDA 批准用于治疗 B 细胞非霍奇金淋巴瘤的放射标记的单克隆抗体)。

[0628] 对于治疗白血病, 能与本发明的结合分子联合使用的示例性生物制剂包括 **Gleevec**[®]; **Campath**[®]-1H (阿仑单抗, Berlex Laboratories, Richmond, CA; 一类用于治疗慢性淋巴细胞白血病的单克隆抗体)。此外, Genasense (奥利莫森 (oblimersen), Genta Corporation, Berkley Heights, NJ; 可使用一种开发中的用于治疗白血病的 BCL-2 反义治疗剂 (例如单独使用或者与一种或多种化疗药物, 诸如氟达拉滨和环磷酰胺联合使用) 可能与要求保护的结合分子一起施用。

[0629] 对于治疗肺癌, 示例性的生物制剂包括 Tarceva[™] (盐酸厄洛替尼, OSI Pharmaceuticals Inc., Melville, NY; 一种设计用来靶向到人类表皮生长因子受体 1 (HER1) 途径的小分子)。

[0630] 对于治疗多发性骨髓瘤, 示例性的生物制剂包括 **Velcade**[®] Velcade (硼替佐米, Millennium Pharmaceuticals, Cambridge MA; 一种蛋白酶体抑制剂)。其它生物制剂包括 **Thalidomid**[®] (沙利度胺, Clegene Corporation, Warren, NJ; 一种免疫调节剂, 似乎具有多种作用, 包括能抑制骨髓瘤细胞的生长和存活以及抗血管新生)。

[0631] 其它示例性的生物制剂包括由 ImClone Systems, Inc., New York, NY 开发的 MOAB IMC-C225。

[0632] 如前文所讨论的, 可以将本发明的 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段、或其重组体以药学上有效量施用以用于体内治疗哺乳动物的过度增生性病症。在这方面, 应当意识到所公开的抗体要配制能协助活性药剂的施用并提高其稳定性。优选地, 符合本发明的药物组合物包含药学上可接受的无毒、无菌载体, 诸如生理盐水、无毒缓冲液、防腐剂等。为了本申请的目的, 与治疗剂联合或未联合的药物有效量的本发明的 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段、或其重组体应该理解为这样的量, 其足够实现与靶的有效结合, 并取得益处, 例如减轻疾病或病症的症状或者检测物质或细胞。在肿瘤细胞的情况中, 优选所述结合分子能与赘生性或免疫反应性细胞上或非赘生性细胞 (例如与赘生性细胞相伴的血管细胞) 上的选定的免疫反应性抗原相互作用, 并能引起这些细胞的死亡增加。当然, 可以将本发明的药物组合物以单次剂量或多次剂量施用, 从而提供药学上有效量的结合分子。

[0633] 与本公开的范围保持一致, 可以将本发明的 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段

按照前面提到的治疗方法以足够产生治疗或预防效果的用量施用给人类或其它动物。可以将本发明的 RON 特异性抗体或其免疫特异性片段以常规剂型给予这样的人类或其它动物,所述剂型是通过将本发明的抗体与常规的药学上可接受的载体或稀释剂按照已知技术结合在一起制备的。本领域技术人员会意识到,药学上可接受的载体或稀释剂的形式和特点受到与之结合使用的活性成分的量、施用途径和其它公知变量支配。本领域技术人员还会意识到,包含一种或多种根据本发明的结合分子种类的混合物可能证明是特别有效的。

[0634] 除非另外说明,否则本发明的实施将利用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的常用技术,其在本领域的技术之内。这些技术在文献中被充分地解释。参见例如 Molecular Cloning A Laboratory Manual(分子克隆实验手册),第2版,Sambrook 等人编辑,Cold Spring Harbor Laboratory Press:(1989); MolecularCloning:A Laboratory Manual(分子克隆:实验手册),Sambrook 等人编辑,Cold Springs Harbor Laboratory,New York(1992),DNA Cloning(DNA 克隆),D. N. Glover 编辑,卷 I 和 II(1985);Oligonucleotide Synthesis(寡核苷酸合成),M. J. Gait 编辑,(1984);Mullis 等人. 美国专利第 4,683,195 号;Nucleic Acid Hybridization(核酸杂交),B. D. Hames & S. J. Higgins 编辑(1984);Transcription And Translation(转录和翻译),B. D. Hames & S. J. Higgins 编辑(1984);Culture Of Animal Cells(动物细胞培养),R. I. Freshney,Alan R. Liss, Inc.,(1987);Immobilized Cells And Enzymes(固定化的细胞和酶),IRL Press,(1986);B. Perbal,A Practical Guide To MolecularCloning(分子克隆实用指南)(1984);专题论文,Methods In Enzymology(酶学方法),Academic Press, Inc., N. Y.;Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(哺乳动物细胞的基因转移载体),J. H. Miller 和 M. P. Calos 编辑,ColdSpring Harbor Laboratory(1987);Methods In Enzymology(酶学方法),卷 154 和 155(Wu 等人编辑);Immunochemical Methods In Cell And MolecularBiology(细胞和分子生物学中的免疫化学方法),Mayer 和 Walker 编辑,Academic Press, London(1987);Handbook Of Experimental Immunology(实验免疫学手册),卷 I-IV, D. M. Weir 和 C. C. Blackwell 编辑,(1986);Manipulating the Mouse Embryo(小鼠胚胎操作),Cold Spring HarborLaboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.,(1986);和在 Ausubel 等人,Current Protocols in Molecular Biology(分子生物学最新实验方案),JohnWiley 和 Sons,Baltimore, Maryland(1989)。

[0635] 抗体工程的一般原理阐述在 Antibody Engineering(抗体工程),第2版,C. A. K. Borrebaeck 编辑,牛津大学出版社(1995)中。蛋白质工程的一般原理阐述在 Protein Engineering, A Practical Approach(蛋白工程的实用方法),RickWood, D. 等人编辑,IRL Press,牛津大学出版社,牛津,英格兰(1995)中。抗体和抗体-半抗原结合的一般原理阐述在:Nisonoff, A., Molecular Immunology(分子免疫学),第2版,Sinauer Associates, Sunderland, MA(1984);和 Steward, M. W., Antibodies, Their Structure andFunction(抗体、其结构和功能),Chapman 和 Hall, New York, NY(1984)。另外,本领域已知的和未特别描述的免疫学标准方法通常是按照CurrentProtocols in Immunology(免疫学最新实验方案),John Wiley & Sons, NewYork;Stites 等人(编辑),Basic and Clinical-Immunology(基础和临床免疫学)(第8版),Appleton & Lange, Norwalk, CT(1994)以及 Mishell 和 Shiigi(编辑),Selected Methods in Cellular Immunology(细

胞免疫学中的精选方法), W. H. Freeman and Co., New York(1980)。

[0636] 阐述免疫学的一般原理的标准参考著作包括 Current Protocols in Immunology(免疫学最新实验方案), John Wiley & Sons, New York; Klein, J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination(免疫学: 辨别自身-非自身的科学), John Wiley & Sons, New York(1982); Kennett, R 等人编辑, Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses(单克隆抗体、杂交瘤: 生物学分析的新尺度), Plenum Press, New York(1980); Campbell, A., “Monoclonal Antibody Technology(单克隆抗体技术)”, Burden, R 等人编辑, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology(生物化学和分子生物学实验技术), 卷 13, Elsevier, Amsterdam(1984), Kuby Immunology 第 4 版, 编辑 Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt 和 Barbara A. Osborn, H. Freeman & Co. (2000); Roitt, I., Brostoff, J. 和 Male D., Immunology(免疫学) 第 6 版 London: Mosby(2001); Abbas A., Abul, A. 和 Lichtman, A., Cellular and Molecular Immunology(细胞和分子免疫学) 第 5 版, Elsevier Health Sciences Division(2005); Kontermann 和 Dubel, Antibodies Engineering(抗体工程), Springer Verlag(2001); Sambrook 和 Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(分子克隆实验手册), Cold Spring Harbor Press(2001); Lewin, Genes VIII(基因 VIII), Prentice Hall(2003); Harlow 和 Lane, Antibodies: A Laboratory Manual(抗体实验手册), Cold Spring Harbor Press(1988); Dieffenbach 和 Dveksler, PCR Primer(PCR 引物) Cold Spring Harbor Press(2003)。

[0637] 上面所引用的所有参考文献, 以及本文所引用的所有文献的全文均以引用的方式并入本文。

实施例

[0638] 实施例 1

[0639] 噬菌体展示获得的 Fab 抗体的产生和转化

[0640] 重组的人类和鼠 RON 胞外结构域蛋白用于筛选人类首次用于试验的包含 3.5×10^{10} 个独特克隆的噬菌粒 Fab 文库 (Nat Biotechnol. 23(3):344-8(2005))。将生物素化的 RON 蛋白捕获到抗生物素包被的磁珠上, 随后与噬菌体文库一起孵育。如以前所述进行选择 (Nat Biotechnol. 23(3):344-8(2005))。利用人类 RON sema 胞外结构域和融合于人类 IgG1Fc 的全长鼠胞外结构域 (muRON-Fc) (R&D Systems, Inc.) 进行三次不同的淘选臂。臂 1 淘选人类 RON sema 结构域蛋白 3 轮。臂 2 淘选 muRON-Fc 蛋白三轮。臂 3 淘选人类蛋白两轮, 并且对鼠蛋白淘选第三轮。3 轮淘选后, 通过 MluI 消化除去 479bp 基因 III 残余端, 并为了在 TG1 细胞中可溶性 Fab 的表达将载体重新连接。对来自人类 RON sema 结构域淘选 (臂 1) 的 960 个克隆的 ELISA 分析产生含有 52 个独特序列的 314 个阳性克隆。对来自臂 2 和臂 3 的 1920 个克隆的 ELISA 分析产生含有 65 个独特序列的 282 个阳性克隆。纯化独特的克隆, 由 ELISA 再次证实对重组人类 RON sema 胞外结构域和 muRON-Fc 以及稳定地转染全长人类和鼠 RON 的 CHO 细胞的结合。基于结合数据, 选择从臂 1 分离的四个克隆和从臂 2 和 3 分离的五个克隆用于进一步分析: M93-D02、M96-C05、M97-D03、M98-E12、M14-H06、M15-E10、M16-C07、M23-F10 和 M80-B03。

[0641] 实施例 2

[0642] 鼠单克隆抗体的产生

[0643] 免疫和血液取样

[0644] 对九周大的雌性 Rbf 小鼠 (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) 用固定在 25 μ l Talon 金属螯合树脂 (Clonetech) 上的最终珠密度为 1.6mg/ml 树脂的 40.5 μ g hRON-10His (R&D Systems, Inc.) 腹膜内 (IP) 免疫。随后, 以 25 μ g IP 施用两次另外的注射, 最终珠密度也是 1.6mg/ml 树脂。两次 25 μ g 注射之后是融合前 IP 施用 RIBI 佐剂中的 50 μ g, 之后收集淋巴组织。

[0645] 在第一次免疫之前、第一次加强免疫七天后、随后两次免疫的每一次之后和收集淋巴细胞之前通过眼窝后血管丛收集方法从免疫的小鼠收集血清样品。利用 ELISA 和 FACS 测定测量血清滴度。

[0646] 固相测定 (ELISA)

[0647] 将 96-孔微滴定板 Maxisorp (Nunc) 用 50 μ l/孔的 Dulbecco 磷酸盐缓冲液, pH 7.2 中的 1 μ g/ml hRON-10His 样品包被过夜。然后倒空板, 用在 PBS 中的 0.05% 吐温-20 溶液, pH 7.2 利用 Embla 自动洗板器 (Skatron) 洗涤三次。在洗涤步骤之后, 用在 PBS 中的过滤的 1% BSA, pH 7.2 封闭溶液充满孔并允许在室温孵育 1 小时。封闭板之后, 将板弹空, 立即加入在封闭缓冲液中的 50 μ l 血清、前血清、对照样品或稀释的 mAb 上清液 (来自产生单克隆的杂交瘤) 的连续稀释液; 允许 ELISA 板在室温孵育 1 小时。如上述洗涤板四次, 随后向每个孔加入 50 μ l 在封闭缓冲液中的 1:5000 稀释的山羊抗小鼠 IgG-HRP (Jackson Labs), 再次允许在室温孵育 1 小时。如上述洗涤板五次, 随后加入 50 μ l Ultra TMB (Pierce) 底物, 然后允许催化大约 10 分钟。通过加入等体积的 2.0N H_2SO_4 来终止酶反应, 在 Spectramax 384Plus (Molecular Devices) 自动板扫描机上在 450nm 读板。利用 Softmax Pro (Molecular Devices) 分析软件完成 ELISA 分析。

[0648] 流式细胞术测定

[0649] 流式细胞术测定在 SW480 和 HT1080 细胞系进行。通过首先除去生长培养基并用 20ml 无菌 PBS 轻柔洗涤细胞单层两次以除去细胞碎片和代谢的生长培养基来从 T162 烧瓶 (Nunc) 抬升单层细胞来进行细胞分离。每次洗涤后, 通过抽吸轻柔除去 PBS 洗液。然后向每个烧瓶加入 10ml 非酶促的细胞解离缓冲液 (Sigma, 目录号 C5914) 并允许孵育 2-5 分钟, 伴随周期性的轻拍和摇动以从组织培养塑料瓶释放细胞单层。向每个烧瓶加入 15 至 20ml 的生长培养基, 并轻柔混合细胞, 然后转移到 50ml 无菌管中。在 1200RPM 离心细胞 4 分钟以沉淀细胞团块。在 20ml 无菌 PBS 中洗涤细胞两次, 然后计数并悬浮到 FACS 缓冲液中 (PBS 中的 1% BSA)。

[0650] 为了使荧光可见, 进行了细胞染色。所有细胞染色步骤在冰上或在 4°C 进行。首先, 利用台盼蓝排除法将洗涤的细胞在血细胞计数器上计数, 并在 FACS 缓冲液中悬浮 $1-2 \times 10^6$ /ml, 以每孔 50 μ l 铺板到 96-孔 V 或 U 形底板中。然后, 向每个孔加入 50 μ l 一抗 (稀释的纯化的对照抗体、血清抗体或 mAb 上清液), 并将板保留在冰上 30 分钟。洗涤细胞三次。每个洗涤循环通过如下进行: 向每个孔加入 150 μ l FAC 缓冲液, 在 1300rpm 将板离心 4 分钟, 丢弃上清液并将细胞团块轻拍松散, 向每个孔加入 200 μ l FACS 缓冲液, 然后在 1300rpm 将板离心 4 分钟。第三次洗涤之后, 丢弃上清液, 将细胞团块轻拍松散。然后, 向每

个孔加入 50 μ l 的二抗工作溶液（如制造商建议的 1 : 200）。使用来自 Jackson Lab 的物种特异性荧光素（FITC）或藻红蛋白（PE）- 耦联的二抗。加入二抗之后，用箔覆盖板，摇动，然后在冰上或在 4℃ 保存 30 分钟。然后洗涤细胞三次（如上所述）随后固定。为了固定细胞，向每个孔加入 200 μ l 固定缓冲液（PBS 中的 1% 低聚甲醛）。然后摇动板并由流式细胞术读数或保存在 4℃。48 或 72 小时后读板。这些测定中使用以下抗体对照：小鼠免疫血清、小鼠前血清、鼠 mAb 691 (R&D)。

[0651] 杂交瘤的产生

[0652] 在淋巴细胞的细胞融合实验之前，将 Ig-/HGPRT-Balb/c 小鼠骨髓瘤细胞系的 APRT- 衍生物 FL653 和 Ig-/HGPRT-Balb/c 小鼠骨髓瘤细胞系的 SP2/0-Ag14 在包含 4500mg/L 葡萄糖、L- 谷氨酰胺和 20 μ g/ml 8- 氮杂鸟嘌呤 (Sigma Chemical Co.) 的达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (DMEM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 中的 10% 胎牛血清中培养至少 10 天。将骨髓瘤细胞培养在 Series II™ 模型水套层培养箱 (Forma Scientific, Marietta, OH) 中，该培养箱程序设置为保持在 37℃、98% 湿环境、伴有大气环境中的 7% CO₂。

[0653] 处死在 ELISA 和 FACS 中筛选为对 hRON 10His 抗原特异性抗体阳性的小鼠，无菌地收集脾脏 B- 淋巴细胞。洗涤脾脏 B- 淋巴细胞并制备为用于 PEG 介导的融合于 FL653 或 SP2/0-Ag14 骨髓瘤的淋巴细胞体细胞融合体，根据 Kennett 等人, (Monoclonal Antibody : A New Dimension in Biological Analyses (单克隆抗体 : 生物学分析的新尺度), Plenum Press, New York (1992))。将融合的细胞铺板到 24- 孔无菌组织培养板 (Corning Glass Works, Corning, NY)，对于基于 FL653 或 SP2/0-Ag14 骨髓瘤的融合体分别向融合细胞提供含有腺嘌呤、氨基嘌呤和胸苷 (AAT) 或次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷的培养基。细胞培养物环境保持在 37℃、98% 湿环境、伴有大气环境中的 7% CO₂。

[0654] 10 天后，分离 AAT 或 HAT 抗性培养物并如前所述由 ELISA 筛选对 hRON 的 ELISA (R&D 形式) 和 FACS (SW480hRON+/HT1080hRON-) 形式具有特异性的免疫反应性。随后克隆阳性培养物，扩增并冷冻。通过有限稀释（约 1 个细胞 / 孔）进行克隆并在显微镜下记录生长以确保所选的克隆的克隆来源。扩增在 ELISA 和 FACS 形式测定上都被筛选为阳性的克隆用于冷冻，利用 IsoStrip 测定 (Roche) 表征亚类，测定单克隆产生水平并为了微克水平量的所选单克隆抗体将其转移到 1 升细胞袋 (Lampire Biologicals Laboratories, Inc.)。

[0655] 实施例 3

[0656] 鼠抗人类 RON 功能阻断 mAb 的克隆

[0657] 鼠杂交瘤免疫球蛋白可变区的克隆

[0658] 按照制造商推荐的方案利用 Qiagen RNeasy 微型试剂盒从鼠杂交瘤细胞制备总细胞 RNA。利用用于引发第一链 cDNA 的随机六聚物，通过 RT-PCR 从总细胞 RNA 中克隆编码重链和轻链的可变区的 cDNA。对于 PCR 扩增带有完整信号序列的鼠免疫球蛋白可变结构域，与多种鼠免疫球蛋白基因家族信号序列杂交的简并正向引物和对鼠恒定结构域的 5' 端具有特异性的单种反向引物的混合物。凝胶纯化 PCR 产物并按照制造商推荐的方案利用 TOPO 克隆试剂盒将其亚克隆到 Invitrogen 的 pCR2.1TOPO 载体中。对来自多种独立亚克隆的插入物测序来确立共有序列。推测的成熟免疫球蛋白 N 端与通过 Edman 降解从杂交瘤确定的一致。利用来自 Kabat 数据库的共有的免疫球蛋白可变结构域序列基于 BLAST 分析分配到

具体亚组。CDR 利用 Kabat 定义来命名。

[0659] 1P3B2.2

[0660] 以下显示为 SEQ ID NO :54 的是 1P3B2.2 成熟重链可变结构域蛋白序列,CDR 加下划线:

[0661] 1 EVQLQQSGPE LEKPGASVKI SCKASGYSFT GYNMNWVKQS NGESLEWIGD

[0662] 51 IDPYYGTRY NQKFKGKATL TVDKSSSTAY MQLKSLTSED SAVYYCAREG

[0663] 101 RGFAYWGQT LVTVSA

[0664] 这是鼠亚组 II(A) 重链。以下显示为 SEQ ID NO :53 的是 1P3B2.2 重链可变结构域(来自 pYL363)的 DNA 序列,其信号序列加下划线(编码重链的信号是 MGWICIFLFLVSVTTGVHS(SEQ ID NO :103)):

[0665] 1 ATGGGTTGGATCTGTATCTTTCTCTTCCTCGTGTCACTAACTACAGGTGT

[0666] 51 CCACTCTGAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGAGAAGCCTG

[0667] 101 GCGCTTCAGTGAAAAATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCAGTGGC

[0668] 151 TACAACATGAACTGGGTGAAGCAGAGCAATGGAGAGAGCCTTGAGTGGAT

[0669] 201 TGGAGATATTGATCCTTACTATGGTGGTACTAGGTACAACCAGAAGTTCA

[0670] 251 AGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG

[0671] 301 CAACTCAAGAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAG

[0672] 351 AGAGGGGAGGGGTTTTGCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCT

[0673] 401 CTGCA

[0674] 以下显示为 SEQ ID NO :59 的是 1P3B2.2 成熟轻链可变结构域蛋白序列,其 CDR 加下划线:

[0675] 1 DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQKKQKSPQLLVYN

[0676] 51 AKTSVEGVPSRFSGSGSIQFSLKINSLQPEDFGSYCHCQHGYTLPTF

[0677] 101 GGGTKLEIK

[0678] 这是鼠亚组 V_K 轻链。(注意 CDR3 中不常见的未配对的半胱氨酸。)以下显示为 SEQ ID NO :58 的是轻链可变结构域(来自 pYL359)的 DNA 序列,其信号序列加下划线(编码轻链的信号是 MRAPAQFLGLLLLWLTGARC(SEQ ID NO :104)):

[0679] 1 ATGAGGGCCCTGCTCAGTTCCTTGGGTTGCTGCTGTGGCTTACAGG

[0680] 51 TGCCAGATGTGACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCAT

[0681] 101 CTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGAGAATATTTAC

[0682] 151 AGTTATTTAGCATGGTATCAGAAGAAACAGGGAAAAATCTCCTCAACTCCT

[0683] 201 GGTCTATAATGCAAAAACCTCAGTAGAAGGTGTGCCATCAAGGTTCAAGT

[0684] 251 GCAGTGGATCAGGCATACAGTTTTCTCTGAAGATCAATAGCCTGCAGCCT

[0685] 301 GAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCACTGTCAACATCATTATGGTACTCT

[0686] 351 TCCGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

[0687] 1P4A3.3

[0688] 以下显示为 SEQ ID NO :64 的是 1P4A3.3 成熟重链可变结构域蛋白序列,其 CDR 加下划线:

[0689] 1 EVQLQQSGPE LEKPGASVMI SCKASGYSFT GYNMNWVKQS TGKSLEWIGD

[0690] 51 IDPYYDGTRY NQKFKGKATL TADKSSSTAY MQLKSLTSED SAVYYCTREG

[0691] 101 RGFAYWQGGL LVTVSA

[0692] 这是鼠亚组 II(A) 重链。以下显示为 SEQ ID NO:63 的是 1P4A3.3 重链可变结构域 (来自 pYL367) 的 DNA 序列,其信号序列加下划线 (编码重链的信号是 MGWSWVFLLI LSVTTGVHS(SEQ ID NO:105)):

[0693] 1 ATGGGATGGA GCTGGGTCTT TCTCTTAATC CTATCAGTAA CTACAGGTGT

[0694] 51 CCACTCTGAG GTCCAGCTGC AGCAGTCTGG ACCTGAGCTG GAGAAGCCTG

[0695] 101 GCGCTTCAGT GATGATATCC TGCAAGGCTT CTGGTTACTC ATTCAGTGGC

[0696] 151 TACAACATGA ACTGGGTGAA GCAGAGCACT GGCAAGAGCC TTGAGTGGAT

[0697] 201 TGGAGATATT GATCCTTACT ATGATGGTAC TAGGTACAAC CAGAAGTTCA

[0698] 251 AGGGCAAGGC CACATTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG

[0699] 301 CAGCTCAAGA GCCTGACATC TGAAGACTCT GCAGTCTATT ACTGTACAAG

[0700] 351 AGAGGGAAGA GGGTTTGCTT ACTGGGGCCA AGGGACTCTG GTCAGTGTCT

[0701] 401 CTGCA

[0702] 以下显示为 SEQ ID NO:69 的是 1P4A3.3 成熟轻链可变结构域蛋白序列,其 CDR 加下划线:

[0703] 1 DIQMTQSPAS LSASVGETVT ITCRASENIY SYLAWYQQKQ GKSPQLLVYN

[0704] 51 AKTLAGGVPS RFSGSGSGTQ FSLKINSLQP EDFGSYVCQH YYGTPLTFGA

[0705] 101 GTKLELK

[0706] 这是鼠亚组 V_K 轻链。以下显示为 SEQ ID NO:68 的是轻链可变结构域 (来自 pYL360) 的 DNA 序列,其信号序列加下划线 (编码轻链的信号是 MRSPAQFLGL LLLWLTGARC(SEQ ID NO:106)):

[0707] 1 ATGAGGTCCC CAGCTCAGTT CCTTGGGTTG CTGCTGCTGT GGCTTACAGG

[0708] 51 TGCCAGATGT GACATCCAGA TGACTCAGTC TCCAGCCTCC CTATCTGCAT

[0709] 101 CTGTGGGAGA AACTGTCACC ATCACATGTC GAGCAAGTGA GAATATTTAC

[0710] 151 AGTTATTTAG CATGGTATCA GCAGAAACAG GGAAAATCTC CTCAGCTCCT

[0711] 201 GGTCTATAAT GCAAAAACCT TAGCAGGAGG TGTGCCATCA AGGTTCACTG

[0712] 251 GCAGTGGATC AGGCACACAG TTTTCTCTGA AGATCAACAG CCTGCAGCCT

[0713] 301 GAAGATTTTG GGAGTTATTA TTGTCAACAT TATTATGGTA CTCCTCTCAC

[0714] 351 GTTCTGGTGCT GGGACCAAGC TGGAGCTGAA A

[0715] 1P3B2.2 与 1P4A3.3mAb 是高度同源的。以下显示的是 1P3B2.2(上)与 1P4A3.3(下)的重链的比对,其共有 94.8%同一性:

[0716] 1 EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSNGESLEWIGD 50

[0717] |||||||||||||||| |||||||||||||||||||||.|||||||

[0718] 1 EVQLQQSGPELEKPGASVMISCKASGYSFTGYNMNWVKQSTGKSLEWIGD 50

[0719] 51 IDPYYGGTRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSSAVYYCAREG 100

[0720] ||||| |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||| |||

[0721] 51 IDPYYDGTRYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLKSLTSEDSSAVYYCTREG 100

[0722] 101 RGFAYWQGGLLVTVSA 116 (SEQ ID NO:54)

[0723] | | | | | | | | | | | | | | | |

[0724] 101 RGFAYWGQGLTVSA 116 (SEQ ID NO :64)

[0725] 以下显示的是 1P3B2.2(上)与 1P4A3.3(下)的轻链的比对,其共有 90.7%同一性:

[0726] 1 DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQKKQKGKSPQLLVYN 50

[illegible]

[0728] 1 DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKGKSPQLLVYN 50

[0729] 51 AKTSVEGVPSRFSGSGSGIQFSLKINSLQPEDFGSYCHCQHHTYGLPTF 100

[0730] | : | | |

[0731] 51 AKTLAGGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYC..QHYYGTPLTF 98

[0732] 101 GGGTKLEIK 109 (SEQ ID NO:59)

[0733] | | | | | : |

[0734] 99 GAGTKLELK 107 (SEQ ID NO :69)

[0735] 1P5B10.3

[0736] 以下显示为 SEQ ID NO :74 的是 1P5B10.3 成熟重链可变结构域蛋白序列,其 CDR 加下划线:

[0737] 1 EVQLQQSGPE LVKPGASKI SCRAAGSFT GYTMNWVKQS HGKSLEWIGL

[0738] 51 INLNNGGTSH NQFKGKATL TVDKSSSTAY MELLSLTSED SAVYYCARWL

[0739] 101 RRGYAMDYW GQGISVTVSS

[0740] 这是鼠亚组 II(A) 重链。以下显示为 SEQ ID NO:73 的是 1P5B10.3 重链可变结构域 (来自 pYL358) 的 DNA 序列,其信号序列加下划线 (编码重链的信号是 MGCSWVMLFL LSGTAGVHS(SEQ ID NO:107)):

[0741] 1 ATGGGATGCA GCTGGGTAAT GCTCTTCCTC CTGTCAGGAA CTGCAGGTGT

[0742] 51 CCACTCTGAG GTCCAGCTAC AACAGTCTGG ACCTGAACTG GTGAAGCCTG

[0743] 101 GAGCTTCAAT GAAGATATCC TGCAGGGCTG CTGGTTTCTC ATTCAGTGGC

[0744] 151 TACACCATGA ACTGGGTGAA GCAGAGCCAT GGAAAGAGCC TTGAGTGGAT

[0745] 201 TGGACTTATT AATCTTAACA ATGGTGGTAC TAGCCACAAC CAGAAGTTCA

[0746] 251 AGGGCAAGGC CACATTA ACT GTAGACAAGT CATCCAGCAC AGCCTACATG

[0747] 301 GAGCTCCTCA GTCTGACATC TGAGGACTCT GCAGTCTATT ACTGTGCAAG

[0748] 351 ATGGTTACGT CGTGGGGGCT ATGCTATGGA CTACTGGGGT CAAGGAATTT

[0749] 401 CAGTCACCGT CTCCTCA

[0750] 以下显示为 SEQ ID NO :79 的是 1P5B10.3 成熟轻链可变结构域蛋白序列,其 CDR 加下划线:

[0751] 1 DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSCRASQNIQ TSIHWYQORT NGSPRLLIKQ

[0752] 51 ASESISGIPS RFSGSGSGTD FTLINSVES EDIADYYCQQ SDSWPLTFGA

[0753] 101 GTKLELK

[0754] 这是鼠亚组 I κ 轻链。以下显示为 SEQ ID NO:78 的是轻链可变结构域 (来自 pYL368) 的 DNA 序列, 其信号序列加下划线 (编码轻链的信号是 MVSS AQFLVF LLFWIPASRG (SEQ ID NO:108)):

[0755] 1 ATGGTGTCT CAGCTCAGTT CCTTGTATTT TTGCTTTTCT GGATTCCAGC
 [0756] 51 CTCCAGAGGT GACATCTTGC TGACTCAGTC TCCAGCCATC CTGTCTGTGA
 [0757] 101 GTCCAGGAGA AAGAGTCAGT TTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAACATTGGC
 [0758] 151 ACAAGCATAC ACTGGTATCA GCAAAGAACA AATGGTTCTC CAAGGCTTCT
 [0759] 201 CATAAAGTAT GCTTCTGAGT CTATCTCTGG GATCCCTTCC AGGTTTAGTG
 [0760] 251 GCAGTGGATC AGGGACAGAT TTACTCTTA GCATCAACAG TGTGGAGTCT
 [0761] 301 GAAGATATTG CAGATTATTA CTGTCAACAA AGTGATAGCT GGCCACTCAC
 [0762] 351 GTTTGGTGCT GGGACCAAGC TGGAGCTGAA A

[0763] 1P4A 12.2

[0764] 以下显示为 SEQ ID NO:84 的是 1P4A12.2 成熟重链可变结构域蛋白序列,其 CDR 加下划线:

[0765] 1 EVQLQQSGPE LVKPGASKMI SCKASGYSFT GYTMNWVKQS HGKKLEWIGL
 [0766] 51 INPYNGGTIY NQKFKGKATL TVDKSSSTAY MELLSLTSED SAVYYCARWL
 [0767] 101 RRGGYAMDYW GQGASVTVSS

[0768] 这是鼠亚组 II(A) 重链。以下显示为 SEQ ID NO:83 的是 1P5B10.3 重链可变结构域(来自 pCN558)的 DNA 序列,其信号序列加下划线(编码重链的信号是 MGCSCVMLFL LSGTAGVRS(SEQ ID NO:109)):

[0769] 1ATGGGATGCAGCTGTGTAATGCTCTTCTCCTGTCAGGAACTGCAGGTGT
 [0770] 51CCGCTCTGAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTG
 [0771] 101GAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGC
 [0772] 151TACACCATGAAGTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAAGCTTGAGTGGAT
 [0773] 201TGGACTTATTAATCCTTACAATGGTGGGACTATCTACAACCAGAAGTTCA
 [0774] 251AGGGCAAGGCCACATTAAGTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATG
 [0775] 301GAGCTCCTCAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAG
 [0776] 351ATGGTTACGACGTGGGGGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAGCCT
 [0777] 401CAGTCACCGTCTCCTCA

[0778] 以下显示为 SEQ ID NO:89 的是 1P5B10.3 成熟轻链可变结构域蛋白序列,其 CDR 加下划线:

[0779] 1 DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSCRASQSIG TSIHWYQQRT NGSPRLLIKE
 [0780] 51 ASESISGIPS RFSGSGSGTD FTLSINSVES EDIADYYCQQ SDSWPLTFGA
 [0781] 101 GTKLEVK

[0782] 这是鼠亚组 κ I 轻链。以下显示为 SEQ ID NO:88 的是轻链可变结构域(来自 pCN559)的 DNA 序列,其信号序列加下划线(编码轻链的信号是 MVSSAQFLVF LLFWIPASRG(SEQ ID NO:110)):

[0783] 1ATGGTGTCTCAGCTCAGTTCCTTGTATTTTTGCTTTTCTGGATTCCAGC
 [0784] 51CTCCAGAGGTGACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGA
 [0785] 101GTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGCATTGGC
 [0786] 151ACAAGCATACACTGGTATCAGCAAAGAACAATGGTTCTCCAAGGCTTCT
 [0787] 201CATAAAGTTTGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGTG

[0788] 251GCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT

[0789] 301GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTGATAGCTGGCCACTCAC

[0790] 351GTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGGTGAAA

[0791] 1P5B10.3 与 1P4A12.2mAb 是高度同源的。以下显示的是 1P5B10.3(上)与 1P4A12.2(下)的重链的比对,其共有 92.5%同一性:

[0792] 1 EVQLQQSGPELVKPGASMKISCRAAGFSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGL 50

[0793] |||||:|.|||

[0794] 1 EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKKLEWIGL 50

[0795] 51 INLNNGGTSHNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARWL 100

[0796] || |||:|||||

[0797] 51 INPYNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARWL 100

[0798] 101 RRGYAMDYWGQGISVTVSS 120 (SEQ ID NO:74)

[0799] |||||

[0800] 101 RRGYAMDYWGQASVTVSS 120 (SEQ ID NO:84)

[0801] 以下显示的是 1P5B 10.3(上)与 1P4A12.2(下)的轻链的比对,其共有 97.2%同一性:

[0802] 1 DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQNI⁵TSIH⁵WYQ⁵RTNGSPRLLIKY 50

[0803] |||||.|||||:

[0804] 1 DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQSI⁵GT⁵SIH⁵WYQ⁵RTNGSPRLLIKE 50

[0805] 51 ASESISGIPSRFSGSGSGTDF⁵TL⁵SINSVESEDIADYYCQ⁵QSDSWPLTFGA 100

[0806] |||||

[0807] 51 ASESISGIPSRFSGSGSGTDF⁵TL⁵SINSVESEDIADYYCQ⁵QSDSWPLTFGA 100

[0808] 101 GTKLELK 107 (SEQ ID NO:79)

[0809] |||||

[0810] 101 GTKLEVK 107 (SEQ ID NO:89)

[0811] 1P2E7.3

[0812] 以下显示为 SEQ ID NO:94 的是 1P2E7.3 成熟重链可变结构域蛋白序列,其 CDR 加下划线:

[0813] 1DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGDSITSDYAWN⁵WIRQFPGNKLEWMG

[0814] 51YISYSGSTSYNPSL⁵KSRFSITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDSATYYCARGG

[0815] 101FYRYAGPGFAYWGQGLVTVSA

[0816] 这是鼠亚组 I(A) 重链。以下显示为 SEQ ID NO:93 的是 1P2E7.3 重链可变结构域(来自 pCN556)的 DNA 序列,其信号序列加下划线(编码重链的信号是 MRVLILLWLF TAFPGILS(SEQ ID NO:111)):

[0817] 1 ATGAGAGTGC TGATTCTTTT GTGGCTGTTC ACAGCCTTCC CTGGTATCCT

[0818] 51 GTCTGATGTG CAGCTTCAGG AGTCGGGACC TGGCCTGGTG AAACCTTCTC

[0819] 101 AGTCTCTGTC CCTCACCTGC ACTGTCACTG GCGACTCAAT CACCAAGTGTAT

[0820] 151 TATGCCTGGA ACTGGATCCG GCAGTTTCCA GGAAACAAAC TGGAGTGGAT

[0821] 201 GGGCTACATA AGCTACAGTG GTAGCACTAG CTACAACCCA TCTCTCAAAA

[0822] 251 GTCGATTCTC TATCACTCGA GACACATCCA AGAACCAGTT CTTCTGTCAG

[0823] 301 TTGAATTCTG TGACTACTGA GGACTCAGCC ACATATTACT GTGCAAGAGG

[0824] 351 GGGGTTCTAC TATAGGTACG CCGGGCCTGG GTTTGCTTAT TGGGGCCAAG

[0825] 401 GGACTCTGGT CACTGTCTCT GCA

[0826] 以下显示为 SEQ ID NO :99 的是 1P2E7.3 成熟轻链可变结构域蛋白序列,其 CDR 加下划线:

[0827] 1 DVVMTQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL YTNGKTYLNW LLQRPQGSPK

[0828] 51 RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCLQSTHFP

[0829] 101 LTFGAGTKLE LK

[0830] 这是鼠亚组 II κ 轻链。以下显示为 SEQ ID NO :99 的是 1P2E7.3 轻链可变结构域 (来自 pCN557) 的 DNA 序列,其信号序列加下划线 (编码重链的信号是 MMSPAQLFL LVL SIQEING (SEQ ID NO :112)):

[0831] 1ATGATGAGTCCTGCCAGTTCCTGTTTCTGTTAGTGCTCTCGATTTCAGGA

[0832] 51AATCAACGGTGATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTA

[0833] 101CCATTGGACAACCAGCTTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTA

[0834] 151TATACTAATGGAAAAACCTATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCA

[0835] 201GTCTCCAAAACGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAATTGGACTCTGGAGTCC

[0836] 251CTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTGAAAAATC

[0837] 301AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTACTGCTTGCAGAGTAC

[0838] 351ACATTTTCCGCTCACGTTCCGGTGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0839] 实施例 4

[0840] 由流式细胞术确定鼠单克隆抗体与表达 RON 的肿瘤细胞的结合

[0841] 由流式细胞术分析 RON 抗体与表达 RON 的肿瘤细胞的结合,并计算表观亲和力。用 5mM EDTA 将汇合的 SW480 细胞分离,用 FACS 缓冲液 (1% FCS, 0.05% 叠氮化钠, 1×PBS) 洗涤 1 次并以 $0.5-1.0 \times 10^7$ /ml 重悬。将细胞以 $100 \mu\text{l}$ /孔加到 96-孔 V 底聚丙烯板。在 FACS 缓冲液中以 $2 \times$ 终浓度进行抗体稀释并以 $100 \mu\text{l}$ /孔加入板。在 4℃ 孵育板 1 小时,然后用 FACS 缓冲液洗涤 3 次。然后将细胞团块重悬在 $150 \mu\text{l}$ $1/200$ 稀释的 PE 标记的山羊抗鼠 IgG H&L 二抗中,并在 4℃ 孵育 1 小时。然后用 FACS 缓冲液洗涤细胞 1 次,并在室温用 $150 \mu\text{l}$ 3% 甲醛固定 10 分钟。将细胞团块重悬在 $150 \mu\text{l}$ FACS 缓冲液中并通过 FACS 分析。抗体 1P5B10、1P4A3、1P2E7、1P3B2 和 1P4A12 在 SW480-RON 细胞上的代表性的 FACS 滴定显示在图 1 中。利用标准 4P 拟合等式从结合曲线计算结合的 EC₅₀。多种抗体的表观亲和力显示在表 5 中。这些数据表示,抗体结合至人类 RON。

[0842] 表 5:通过 FACS 利用标准 4P 拟合等式计算的抗体与肿瘤细胞的结合的表观亲和力 (参见图 1)

[0843]

亚克隆	EC ₅₀ nM
1P2E7	0.09

1P3B2	0.04
1P4A3	0.07
1P4A12	0.07
1P5B10	0.34

[0844] 实施例 5

[0845] 抗 RON 抗体阻断 MSP-RON 结合

[0846] 利用标准 ELISA 方案测量抗体或 Fab 阻断 MSP 与 RON 结合的能力。简单地说,将可溶性 RON 蛋白 (R&D Systems, 目录号 1947) 以 PBS 中 $1\mu\text{g/ml}$ 的浓度在 4°C 在 Nunc Maxisorb ELISA 板上包被过夜。用自动洗板器在 PBS、0.05% 吐温 20 中洗涤板 4 次。然后在室温 (RT) 在 PBS+1% 无蛋白酶的、无 IgG 的 BSA (Jackson Labs 001-000-162) 中封闭板 1-2 小时。洗涤后,将抗体或 Fab 在封闭缓冲液中的连续稀释液加到板中 ($200\mu\text{l}$ /孔)。将在封闭液中 200ng/ml 浓度的 MSP (R&D Systems 目录号 4306-MS) 加到板中 ($10\mu\text{l}$ /孔) 并在室温孵育混合物 1-2 小时。再次用自动洗板器 (PBS, 0.05% 吐温 20) 洗涤板 4 次。然后,在室温以在封闭液中 $0.5\mu\text{g/ml}$ 浓度的生物素化的山羊抗 MSP 多克隆抗体 (R&D Systems BAF 352) 孵育板 0.5-1 小时。在另外的洗涤步骤之后,加入在封闭液中 1:200 稀释的抗生物素化 HRP (DY998, R&D Systems) 并在室温孵育 0.5-1 小时。在最终洗涤步骤之后,用 TMB 溶液 (25ml 100mM 醋酸钠,用柠檬酸调整 pH 至 6, $4\mu\text{l}$ 30% H_2O_2 , $250\mu\text{l}$ 在 DMSO 中的 42mM TMB) 将板显色 5 分钟,用 $100\mu\text{l}$ H_2SO_4 终止反应。在 Molecular Devices Spectramax M5 上在 450nm 波长读板,且 Softmax pro V5 软件用于分析数据。利用鼠单克隆抗体和人类 Fab 的 ELISA 测定结果分别显示在图 2A 和 2B 中,并证明鼠单克隆抗体和人类 Fab 可阻断 MSP 与 RON 的结合。

[0847] 实施例 6

[0848] 抗 RON 抗体阻断 MSP 依赖性 RON 活性

[0849] 为了测量抗体阻断 MSP 诱导的磷酸化 RON,使用 ELISA 捕获方法,其中将总 RON 蛋白捕获在 ELISA 板上,随后用抗磷酸-酪氨酸抗体 (pRONDuoSet IC ELISA, R&D Systems, 目录号 DYC1947) 检测。对于这些实验,将 MDA-MB-453 乳腺癌细胞 (图 3A-B) 或 BxPC-3 (图 3C) 胰腺癌细胞以大约 8×10^5 个细胞/孔铺板到 6-孔组织培养盘内的 RPMI/10% FCS 中并允许粘附过夜。第二天,将细胞血清饥饿 2.5 小时。然后将抗体以终浓度 $10\mu\text{g/ml}$ (图 3A 和 3C) 或以不同浓度 (图 3B) 加到盘中并孵育 15 分钟,且然后以终浓度 100ng/ml 加入 MSP 另外 15 分钟。然后按照制造商的方案收集板。抗磷酸-酪氨酸抗体检测的结果显示在图 3A-C 中并证明鼠单克隆抗体阻断 MDA-MB-453 乳腺癌细胞中 MSP 诱导的 RON 磷酸化,MDA-MB-453 细胞中有 RON 磷酸化的剂量依赖性阻断,且抗体阻断 BxPC-3 胰腺癌细胞中 MSP 诱导的 RON 磷酸化。

[0850] 实施例 7

[0851] 抗 RON 抗体阻断非 MSP 依赖性 RON 活性

[0852] 为了测量抗 RON 抗体对非 MSP 依赖性信号传导的阻断潜力,使用 pERK ELISA 测定

(pERK 1/2 免疫测定, R&D Systems 目录号 KCB1018)。磷酸-ERK 是 RON 途径的已知下游信号介质。将 293E 细胞铺板用于转染 (10cm 盘中 3×10^6 个细胞) 并允许在 DMEM/10% FBS 中粘附过夜。第 2 天, 用空载体、编码野生型 RON 的质粒 (图 4A)、或编码 RONCA 的质粒 (组成型活化的 M1254T 激酶结构域突变体; 图 4B) 转染细胞。第 3 天, 将转染的细胞铺板到黑色/透明底的 96-孔组织培养板并用无血清培养基中的抗体以 $30 \mu\text{g/ml}$ 或 $3 \mu\text{g/ml}$ (或 MSP 以 200ng/ml) 处理。第 4 天和第 5 天, 根据制造商的说明书处理板。野生型 RON 和组成型活化的 RON 的结果分别显示在图 4A 和 4B 中, 并证明鼠单克隆抗体阻止 pERK 的磷酸化。这些数据表明抗体阻断非 MSP 依赖性 RON 信号传导。

[0853] 利用 BxPC-3 胰腺癌细胞进行类似实验。在这些实验中, 将细胞直接铺板到黑色/透明底的 96-孔板中, 并且不进行转染步骤。结果显示在图 4C 中。MSP 与抗体一起加到孔时, 观察到抗体的类似的阻断活性 (数据未显示)。

[0854] 实施例 8

[0855] 抗 RON 抗体阻断肿瘤细胞中的 pAKT

[0856] 利用两种肿瘤细胞系评价抗 RON 抗体对肿瘤细胞中 pAKT 信号传导的阻断潜力: BXP3 和 MDA-MB-453。在这些实验中, 在早上将 1 百万个细胞/孔铺板到 6 孔盘中, 然后在 DMEM+1% BSA 中血清饥饿过夜 18 小时。除去培养基并以 DMEM 中的 $10\mu\text{g/ml}$ 加入抗 RON 抗体。在 37°C 孵育细胞 30 分钟。将 MSP 以终浓度 200ng/ml 加入并在 37°C 孵育 30 分钟。制备细胞裂解物并将 $15\mu\text{g}$ 在 10% tris-甘氨酸凝胶上电泳, 转移到硝酸纤维素。用磷酸化-AKT(Ser473) 抗体 (Cell Signalling#9271) (图 5, 上图) 探测蛋白质印迹, 然后剥除并用 AKT 抗体 (Cell Signalling#9272) (图 5, 下图) 再次探测。利用抗体 1P3B2 和 1P4A3 获得的结果显示在图 5 中并证明鼠单克隆抗体阻止 pAKT 在肿瘤细胞的磷酸化。

[0857] 实施例 9

[0858] 抗 RON 抗体结合至 RON 剪接变体

[0859] 为了确定抗 RON 抗体是否与人类 RON 剪接变体 RON δ 160 结合, 用 Hu-RON-P160 (MZ236) 构建体或单独的载体 (模拟品) 转染 293E 细胞。转染后二十四小时, 用 PBS-5mM EDTA 从板除去细胞并用浓度为 $5\mu\text{g/ml}$ 的抗体、随后是轭合到 PE 的抗小鼠二抗染色, 并通过 FACS 分析。FACS 分析的结果显示在图 6 中并证明鼠单克隆抗体结合至 RON δ 160。

[0860] 实施例 10

[0861] 抗 RON 抗体以高亲和力结合至可溶抗原

[0862] 利用标准 ELISA 方案测量抗体与可溶性 RON 结合的能力。简单地说, 将可溶性 RON 蛋白 (R&D Systems, 目录号 1947) 以 PBS 中 1mg/ml 的浓度在 4°C 在 Nunc Maxisorb ELISA 板上包被过夜。用自动洗板器在 PBS、0.05% 吐温 20 中洗涤板 4 次。然后在室温 (RT) 在 PBS+1% BSA 中封闭板 1-2 小时。洗涤后, 将抗体在封闭缓冲液中的连续稀释液加到板中 ($100 \mu\text{l}$ /孔) 并在室温孵育 1-2 小时。再次用自动洗板器洗涤板 4 次 (PBS, 0.05% 吐温 20)。接下来, 在室温以在封闭缓冲液 ($100 \mu\text{l}$ /孔) 中 1:4000 稀释的 HRP-标记的驴抗小鼠多克隆抗体 (Jackson Labs 715-035-130) 的稀释液孵育板 0.5-1 小时。再次用自动洗板器 (PBS, 0.05% 吐温 20) 洗涤板 4 次。在最终洗涤步骤之后, 用 TMB 溶液 (25ml 100mM 醋酸钠, 用柠檬酸调整 pH 至 6, $4\mu\text{l}$ 30% H_2O_2 , $250 \mu\text{l}$ DMSO 中的 42mM TMB) 将板显色 5 分

钟。用 100 μ l H_2SO_4 终止反应。在 Molecular Devices Spectramax M5 上在 450nm 波长读板,且 Softmax pro V5 软件用于分析数据。结果显示在图 7 中并证明抗体以高亲和力结合可溶性 RON。

[0863] 实施例 11

[0864] 抗 RON 抗体结合表达 RON 的细胞

[0865] 由流式细胞术分析 RON 抗体与表达 RON 的 293E 细胞的结合,并计算表观亲和力。用胰蛋白酶将汇合的 293E/ 人类 RON 细胞分离,并用 FACS 缓冲液 (1% FCS, 0.05% 叠氮化钠, 1 $\times$ PBS) 以 0.6×10^7 /ml 重悬。将细胞以 50 μ l/ 孔加到 96- 孔圆底聚丙烯板中。在 FACS 缓冲液中以 2 $\times$ 终浓度进行抗体稀释并以 50 μ l/ 孔加入板中。在 4 $^{\circ}$ C 孵育板 1 小时,然后用 FACS 缓冲液洗涤 3 次。然后将细胞团块重悬在 100 μ l 藻红蛋白 (PE) Fab' 2 片段山羊抗小鼠 IgG Fc γ 二抗 (1/200 稀释的) 中,并在黑暗中以 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。然后用 FACS 缓冲液洗涤细胞 3 次,并用 200 μ l 在 PBS 中的 1% 低聚甲醛固定,并通过 FACS 分析。从结合曲线计算结合的 EC₅₀。结果显示在图 8 中并证明抗体以高亲和力结合表达 RON 的 293 细胞。

[0866] 实施例 12

[0867] 抗 RON 抗体阻断 MSP 与表达 RON 的细胞的结合

[0868] 由流式细胞术分析 RON 抗体阻断 MSP 与表达 RON 的 CHO 细胞结合的能力。用胰蛋白酶将汇合的 CHO/ 人类 RON 细胞分离,用 FACS 缓冲液 (1% FCS, 0.05% 叠氮化钠, 1 $\times$ PBS) 以 0.6×10^7 /ml 重悬。将细胞以 50 μ l/ 孔加到 96- 孔圆底聚丙烯板中。在 FACS 缓冲液中以 2 $\times$ 终浓度进行抗体稀释并以 50 μ l/ 孔加入板。在 4 $^{\circ}$ C 孵育板 1 小时,然后用 FACS 缓冲液洗涤 1 次。将 MSP (1 μ g/ml) 以 50 μ l/ 孔的体积加到细胞团块中并在室温孵育 30 分钟,随后用 FACS 缓冲液洗涤 1 次。在室温将山羊抗人类 MSP (10 μ g/ml) 加到细胞团块中 30 分钟,随后在 FACS 缓冲液中洗涤 2 次。然后将细胞团块重悬在 100 μ l PE Fab' 2 片段驴抗山羊 IgG (H+L) 二抗 (1/200 稀释的) 中,并在黑暗中以室温孵育 30 分钟,然后用 FACS 缓冲液洗涤 2 次。随后用 200 μ l 在 PBS 中的 1% 低聚甲醛固定细胞,并通过 FACS 分析。结果显示在图 9 中并证明抗 RON 抗体减少 MSP 与表达 RON 蛋白的 CHO 细胞结合。

[0869] 实施例 13

[0870] 抗 RON 抗体阻断肿瘤细胞中 MSP 诱导的 pERK 和 pAKT 信号传导

[0871] 为了测量抗体对 MSP 诱导的 pERK 和 pAKT 信号传导的阻断,使用双色红外荧光蛋白质印迹方法。对于这些实验,将细胞以大约 5×10^5 细胞/ 孔铺板到 12- 孔组织培养盘内的完全培养基/10% FBS 中并允许粘附过夜。第二天,将细胞在 DMEM 中血清饥饿 3 小时。然后将抗体以图 10 所示的浓度加到盘中并孵育 15 分钟。然后以终浓度 200ng/ml 加入 MSP 并孵育细胞另外 15 分钟。制备总细胞裂解物并在 10% tris- 甘氨酸凝胶上分析 20 μ g 样品,转移到硝酸纤维素上。

[0872] 为了评估磷酸化 -ERK 水平,用磷酸化 -p44/42Map 激酶 (Thr 202/Tyr204) 兔抗体 (Cell Signalling#9101) 和 p44/42Map 激酶 (L34F12) 小鼠 mAb (Cell Signalling#4696) 同时探测各印迹点。为了评估磷酸 -AKT 水平,用磷酸化 -AKT (Ser473) (587F11) 小鼠 mAb (Cell Signalling#9271) 和 AKT 兔抗体 (Cell Signalling#9272) 同时探测各印迹点。IR 染料标记的二抗用于检测 pERK 和 pAKT 印迹点,并利用 Odyssey 成像仪 (Li-cor Biosciences) 扫描各印迹点。如图 10 和 11 所示的结果证明,抗 RON 抗体减少磷酸化 -ERK (phospho-ERK) 和

磷酸化-AKT 的水平。这表明,抗 RON 抗体能在 MDA-MB-453 细胞中阻断 ERK 和 AKT 信号传导。还在其它肿瘤细胞类型中进行这些实验,并且如图 12 所示,抗 RON 抗体还减少其它肿瘤细胞中的 ERK 和 AKT 信号传导。

[0873] 实施例 14

[0874] 人类 MSP 结合可溶的人类和食蟹猴 RON

[0875] 利用标准 ELISA 方案测量人类 MSP (R&D systems 目录号 4306) 结合可溶性人类和食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) RON (“cyno RON”) 的能力。简单地说,将可溶性人类 RON 蛋白 (R&D Systems, 目录号 1947) 或可溶性 cyno RON 蛋白以 PBS 中 1mg/ml 的浓度在 4℃ 在 Nunc MaxisorbELISA 板上包被过夜。对于 cyno RON ELISA,从 CHO 细胞产生和纯化来自 cyno RON 的相应蛋白序列。用自动洗板器在 PBS、0.05%吐温 20 中洗涤板 4 次。然后在室温 (RT) 在 PBS+1%无蛋白酶的、无 IgG 的 BSA (JacksonLabs 001-000-162) 中封闭板 1-2 小时。洗涤后,将 MSP (R&D Systems 目录号 4306-MS) 在封闭缓冲液中的连续稀释液加到板中 (100 μ l/孔) 并在室温孵育 1-2 小时。再次用自动洗板器 (PBS, 0.05%吐温 20) 洗涤板 4 次。接下来,在室温以在封闭缓冲液中 0.5mg/ml 浓度的生物素化的山羊抗 MSP 多克隆 (R&D Systems BAF 352) 抗体孵育板 0.5-1 小时。在另外的洗涤步骤之后,加入在封闭缓冲液中 1 : 200 稀释的抗生蛋白链菌素-HRP (DY998, R&D Systems) 并在室温孵育 0.5-1 小时。在最终的洗涤步骤之后,用 TMB 溶液 (25ml 100mM 醋酸钠,用柠檬酸调整 pH 至 6, 4ul 30% H₂O₂, 250 μ l DMSO 中的 42mM TMB) 将板显色 5 分钟,并用 100ul H₂SO₄ 终止反应。在 Molecular Devices Spectramax M5 上在 450nm 波长读板,且 Softmax pro V5 软件用于分析数据。如图 13B 和 13C 所示, MSP 结合至 cynoRON 和人类 RON 二者。图 13A 证明,抗 RON 抗体结合至 cynoRON 以及结合至人类 RON。抗体结合实验如实施例 10 所述的进行。

[0876] 实施例 15

[0877] 抗 RON 抗体阻断细胞的侵入

[0878] 为了测量抗体对胎牛血清 (FBS) 诱导的或 MSP 诱导的肿瘤细胞侵入的阻断,使用 8.0 微米基质胶包被的 Fluoroblok™ transwell 插入物 (BD 目录号 354166)。简单地说,在 37℃无 CO₂ 环境中用 500ul PBS 将基质胶包被的插入物再水合 2 小时。在再水合之后,除去 PBS。用胰蛋白酶将已经血清饥饿的肿瘤细胞分离并以 5×10^4 细胞/ml 重悬在无血清培养基中。然后将肿瘤细胞与抗体一起预孵育 30 分钟,随后加入到该测定中。接下来,将 750ul 化学引诱物 (10%热灭活的 FBS 或 200ng/ml MSP) 加到底部小室,并将 500ul 的细胞 +/- 抗体加到顶部小室。将细胞和化学引诱物在 37℃在 5% CO₂ 中孵育 48 小时。孵育后,从顶部小室除去培养基。然后将插入物转移到包含 500ul/孔的 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS) 中的 4ug/ml 钙黄绿素乙酰氧基甲酯 (AM) 的第二个 24 孔板并在 37℃、5% CO₂ 孵育 1 小时。利用 TECAN GENios Pro 荧光读板器在波长 494/517nm (Ex/Em) 读取侵入的细胞的荧光。结果显示在图 14 中并证明抗 RON 抗体可阻断肿瘤细胞的侵入。

[0879] 实施例 16

[0880] 定位抗 RON 抗体

[0881] 将 RON 的 PSI 结构域 (G502-P544) 在大肠杆菌中表达为硫氧还蛋白 (thioredoxin)-融合蛋白。在 NiNTA 琼脂糖 (qiagen) 上、随后通过制备型尺寸排阻色谱 (SEC) 纯化蛋白。这种蛋白用于包被 ELISA 板并利用与上述实施例 10 中抗体对可溶性 RON

的结合的相同方案分析抗体的结合。图 15 显示的结果证明尽管抗 RON 抗体与包含 SEMA 和 PSI 结构域的可溶性 RON 蛋白结合,但抗体不与单独的 PSI 结构域结合。

[0882] 实施例 17

[0883] 抗鼠 RON 抗体结合至 293 细胞上的小鼠 RON

[0884] 由流式细胞术分析 RON 抗体与表达鼠的 RON 的 293E 细胞的结合,并计算表观亲和力。用胰蛋白酶将汇合的 293E/ 鼠 RON 细胞分离,并用 FACS 缓冲液 (1% FCS, 0.05% 叠氮化钠, 1×PBS) 以 0.6×10^7 /ml 重悬。将细胞以 $50 \mu\text{l}$ /孔加到 96-孔圆底聚丙烯板。在 FACS 缓冲液中以 $2 \times$ 终浓度进行抗体稀释并以 $50 \mu\text{l}$ /孔加入板。在 4℃ 孵育板 1 小时,然后用 FACS 缓冲液洗涤 3 次。然后将细胞团块重悬在 $100 \mu\text{l}$ PE Fab' 2 片段山羊抗小鼠 IgG Fcγ 二抗 (1/200 稀释的) 中,并在黑暗在 4℃ 孵育 1 小时。然后用 FACS 缓冲液洗涤细胞 3 次,并用 $200 \mu\text{l}$ PBS 中的 1% 低聚甲醛固定,并通过 FACS 分析。从结合曲线计算结合的 EC₅₀。数据显示在图 16 中并证明抗体以高亲和力结合表达鼠 RON 的细胞。

[0885] 实施例 18

[0886] 抗鼠 RON 抗体阻断 pAKT 信号传导

[0887] 为了确定抗鼠 RON 抗体是否还能阻断 RON 信号传导,在表达鼠 RON 的 CHO 细胞系中测量 pAKT 信号传导。在 MSP 存在或不存在和不同浓度的抗鼠 RON 抗体的条件下培养细胞。利用实施例 13 中所述的方案评价磷酸化 AKT 的水平。结果显示在图 17 中。RON 抗体存在时磷酸化 -AKT 的水平减少表明抗鼠 RON 抗体阻断 pAKT 信号传导。

[0888] 实施例 19

[0889] 抗鼠 RON 抗体微弱地结合人类 RON

[0890] 为了确定抗鼠 RON 抗体是否还结合人类 RON,将鼠和人类的 RON 蛋白表达在 293 细胞中。利用如以上在实施例 8 和 16 中所述的 FACS 分析确定抗体与表达 RON 的细胞的结合。图 18 中显示的结果证明抗鼠 RON 抗体结合至鼠和人类 RON 蛋白二者,但对鼠 RON 具有更大亲和力。

[0891] 实施例 20

[0892] RON 在多种人类肿瘤细胞系上表达和传达信号

[0893] 由流式细胞术分析 RON 抗体与表达 RON 的肿瘤的结合。在这些实验中,用胰蛋白酶将汇合的肿瘤细胞分离,并用 FACS 缓冲液 (1% FCS, 0.05% 叠氮化钠, 1×PBS) 以 0.6×10^7 /ml 重悬。将细胞以 $50 \mu\text{l}$ /孔加到 96-孔圆底聚丙烯板中。在 FACS 缓冲液中以 $2 \times$ 终浓度进行抗体稀释并以 $50 \mu\text{l}$ /孔加入板。在 4℃ 孵育板 1 小时,然后用 FACS 缓冲液洗涤 2 次。然后将细胞团块重悬在 $100 \mu\text{l}$ PE Fab' 2 片段山羊抗小鼠 IgG Fcγ 二抗 (1/200 稀释的) 中,并在黑暗在室温孵育 30 分钟。然后用 FACS 缓冲液洗涤细胞 2 次,并用 $200 \mu\text{l}$ PBS 中 1% 低聚甲醛固定,并通过 FACS 分析。细胞上 RON 表达的相对水平从 MFI 确定。结果概述在图 19 所示的表格中。检验的大多数人类肿瘤细胞系表达 RON。另外,确定 MSP 诱导的 pAKT 和 pERK 水平的实验如实施例 13 所述的进行。图 19 显示 MSP 诱导的 pAKT 和 pERK 相对于未处理的样品中 pAKT 和 pERK 成倍增加。MSP 诱导的 pAKT 和 pERK 的高水平表明这些肿瘤细胞系中的许多肿瘤细胞系的 RON 信号。

[0894] 实施例 21

[0895] 抗 RON 抗体减慢肿瘤生长

[0896] 为了确定抗 RON 抗体对肿瘤生长的作用,观察了抗人类 RON 抗体对乳腺肿瘤模型的作用。将 MDA-MB-231 细胞 (ATCC) 乳腺癌细胞保持在 37℃、5% CO₂ 环境中并培养在包含 10% FBS、无抗生素的 RPMI-1640 培养基中。用悬浮在与基质胶基质 (BD) 1 : 1 混合的 200 μ l 培养基 (无血清) 中的 5×10^6 细胞对 7 周大的雌性 CB17SCID 小鼠 (CB17-Prkdcscid/NCrCr1) 皮下 (SC) 接种到右肋中。每周至少两次记录体重和肿瘤测量值 (长度 (L) 和宽度 (W))。利用下式计算肿瘤体积 : $L \times W^2 / 2 = \text{mm}^3$ 。当大多数肿瘤达到 150-300mmW (第 29 天) 时,将小鼠分到治疗组和对照组。肿瘤在各组间是大小匹配的。从第 29 天开始,以 40mg/kg 经腹膜内 (IP) 注射施用 1P3B2,每周两次,共 13 个剂量。按照相同时间表向对照组 IP 施用 (10ml/kg) 无菌盐水 (0.9%)。此外,在第 29 天和第 50 天向对照组静脉内 (IV) 施用 (10ml/kg) 柠檬酸盐赋形剂 (10mM 柠檬酸缓冲液, pH 5.5、135mM 氯化钠)。对照组的给药模拟本研究中所用的最严格的给药方案,并反映此处未提及的本研究中包含的其它组的方案。

[0897] 在每个数据点, Student's T 检验 (单向、双尾) 用于确定 1P3B2 测试组的平均肿瘤体积与对照组的平均肿瘤体积的统计显著性。结果图示在图 20 中并显示 1P3B2- 处理的小鼠中的肿瘤显著地小于盐水处理的小鼠中的肿瘤。这种数据证明,抗人类 RON 抗体减少肿瘤生长。

[0001]

序列表

<110> Biogen Idec MA Inc.
Huet, Heather
Veronique, Bailly
Ellen, Garber
Graff, Christilyn
Miklasz, Steven

<120> RON 抗体及其用途

<130> 2159.129PC01

<140> To Be Assigned

<141> 2009-01-22

<150> 61/022,779

<151> 2008-01-22

<160> 153

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1400

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Glu Leu Leu Pro Pro Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Pro Ala Lys Pro Ala Ala Gly Glu Asp Trp Gln Cys Pro Arg Thr
20 25 30

Pro Tyr Ala Ala Ser Arg Asp Phe Asp Val Lys Tyr Val Val Pro Ser
35 40 45

Phe Ser Ala Gly Gly Leu Val Gln Ala Met Val Thr Tyr Glu Gly Asp
50 55 60

Arg Asn Glu Ser Ala Val Phe Val Ala Ile Arg Asn Arg Leu His Val
65 70 75 80

Leu Gly Pro Asp Leu Lys Ser Val Gln Ser Leu Ala Thr Gly Pro Ala
85 90 95

Gly Asp Pro Gly Cys Gln Thr Cys Ala Ala Cys Gly Pro Gly Pro His
100 105 110

[0002]

Gly Pro Pro Gly Asp Thr Asp Thr Lys Val Leu Val Leu Asp Pro Ala
 115 120 125

Leu Pro Ala Leu Val Ser Cys Gly Ser Ser Leu Gln Gly Arg Cys Phe
 130 135 140

Leu His Asp Leu Glu Pro Gln Gly Thr Ala Val His Leu Ala Ala Pro
 145 150 155 160

Ala Cys Leu Phe Ser Ala His His Asn Arg Pro Asp Asp Cys Pro Asp
 165 170 175

Cys Val Ala Ser Pro Leu Gly Thr Arg Val Thr Val Val Glu Gln Gly
 180 185 190

Gln Ala Ser Tyr Phe Tyr Val Ala Ser Ser Leu Asp Ala Ala Val Ala
 195 200 205

Ala Ser Phe Ser Pro Arg Ser Val Ser Ile Arg Arg Leu Lys Ala Asp
 210 215 220

Ala Ser Gly Phe Ala Pro Gly Phe Val Ala Leu Ser Val Leu Pro Lys
 225 230 235 240

His Leu Val Ser Tyr Ser Ile Glu Tyr Val His Ser Phe His Thr Gly
 245 250 255

Ala Phe Val Tyr Phe Leu Thr Val Gln Pro Ala Ser Val Thr Asp Asp
 260 265 270

Pro Ser Ala Leu His Thr Arg Leu Ala Arg Leu Ser Ala Thr Glu Pro
 275 280 285

Glu Leu Gly Asp Tyr Arg Glu Leu Val Leu Asp Cys Arg Phe Ala Pro
 290 295 300

Lys Arg Arg Arg Arg Gly Ala Pro Glu Gly Gly Gln Pro Tyr Pro Val
 305 310 315 320

Leu Arg Val Ala His Ser Ala Pro Val Gly Ala Gln Leu Ala Thr Glu
 325 330 335

Leu Ser Ile Ala Glu Gly Gln Glu Val Leu Phe Gly Val Phe Val Thr
 340 345 350

[0003]

Gly Lys Asp Gly Gly Pro Gly Val Gly Pro Asn Ser Val Val Cys Ala
355 360 365

Phe Pro Ile Asp Leu Leu Asp Thr Leu Ile Asp Glu Gly Val Glu Arg
370 375 380

Cys Cys Glu Ser Pro Val His Pro Gly Leu Arg Arg Gly Leu Asp Phe
385 390 395 400

Phe Gln Ser Pro Ser Phe Cys Pro Asn Pro Pro Gly Leu Glu Ala Leu
405 410 415

Ser Pro Asn Thr Ser Cys Arg His Phe Pro Leu Leu Val Ser Ser Ser
420 425 430

Phe Ser Arg Val Asp Leu Phe Asn Gly Leu Leu Gly Pro Val Gln Val
435 440 445

Thr Ala Leu Tyr Val Thr Arg Leu Asp Asn Val Thr Val Ala His Met
450 455 460

Gly Thr Met Asp Gly Arg Ile Leu Gln Val Glu Leu Val Arg Ser Leu
465 470 475 480

Asn Tyr Leu Leu Tyr Val Ser Asn Phe Ser Leu Gly Asp Ser Gly Gln
485 490 495

Pro Val Gln Arg Asp Val Ser Arg Leu Gly Asp His Leu Leu Phe Ala
500 505 510

Ser Gly Asp Gln Val Phe Gln Val Pro Ile Gln Gly Pro Gly Cys Arg
515 520 525

His Phe Leu Thr Cys Gly Arg Cys Leu Arg Ala Trp His Phe Met Gly
530 535 540

Cys Gly Trp Cys Gly Asn Met Cys Gly Gln Gln Lys Glu Cys Pro Gly
545 550 555 560

Ser Trp Gln Gln Asp His Cys Pro Pro Lys Leu Thr Glu Phe His Pro
565 570 575

[0004]

His Ser Gly Pro Leu Arg Gly Ser Thr Arg Leu Thr Leu Cys Gly Ser
 580 585 590

Asn Phe Tyr Leu His Pro Ser Gly Leu Val Pro Glu Gly Thr His Gln
 595 600 605

Val Thr Val Gly Gln Ser Pro Cys Arg Pro Leu Pro Lys Asp Ser Ser
 610 615 620

Lys Leu Arg Pro Val Pro Arg Lys Asp Phe Val Glu Glu Phe Glu Cys
 625 630 635 640

Glu Leu Glu Pro Leu Gly Thr Gln Ala Val Gly Pro Thr Asn Val Ser
 645 650 655

Leu Thr Val Thr Asn Met Pro Pro Gly Lys His Phe Arg Val Asp Gly
 660 665 670

Thr Ser Val Leu Arg Gly Phe Ser Phe Met Glu Pro Val Leu Ile Ala
 675 680 685

Val Gln Pro Leu Phe Gly Pro Arg Ala Gly Gly Thr Cys Leu Thr Leu
 690 695 700

Glu Gly Gln Ser Leu Ser Val Gly Thr Ser Arg Ala Val Leu Val Asn
 705 710 715 720

Gly Thr Glu Cys Leu Leu Ala Arg Val Ser Glu Gly Gln Leu Leu Cys
 725 730 735

Ala Thr Pro Pro Gly Ala Thr Val Ala Ser Val Pro Leu Ser Leu Gln
 740 745 750

Val Gly Gly Ala Gln Val Pro Gly Ser Trp Thr Phe Gln Tyr Arg Glu
 755 760 765

Asp Pro Val Val Leu Ser Ile Ser Pro Asn Cys Gly Tyr Ile Asn Ser
 770 775 780

His Ile Thr Ile Cys Gly Gln His Leu Thr Ser Ala Trp His Leu Val
 785 790 795 800

Leu Ser Phe His Asp Gly Leu Arg Ala Val Glu Ser Arg Cys Glu Arg
 805 810 815

[0005]

Gln	Leu	Pro	Glu	Gln	Gln	Leu	Cys	Arg	Leu	Pro	Glu	Tyr	Val	Val	Arg
			820					825					830		
Asp	Pro	Gln	Gly	Trp	Val	Ala	Gly	Asn	Leu	Ser	Ala	Arg	Gly	Asp	Gly
		835					840					845			
Ala	Ala	Gly	Phe	Thr	Leu	Pro	Gly	Phe	Arg	Phe	Leu	Pro	Pro	Pro	His
	850					855					860				
Pro	Pro	Ser	Ala	Asn	Leu	Val	Pro	Leu	Lys	Pro	Glu	Glu	His	Ala	Ile
865					870				875					880	
Lys	Phe	Glu	Tyr	Ile	Gly	Leu	Gly	Ala	Val	Ala	Asp	Cys	Val	Gly	Ile
				885					890					895	
Asn	Val	Thr	Val	Gly	Gly	Glu	Ser	Cys	Gln	His	Glu	Phe	Arg	Gly	Asp
			900					905					910		
Met	Val	Val	Cys	Pro	Leu	Pro	Pro	Ser	Leu	Gln	Leu	Gly	Gln	Asp	Gly
		915				920						925			
Ala	Pro	Leu	Gln	Val	Cys	Val	Asp	Gly	Glu	Cys	His	Ile	Leu	Gly	Arg
	930				935						940				
Val	Val	Arg	Pro	Gly	Pro	Asp	Gly	Val	Pro	Gln	Ser	Thr	Leu	Leu	Gly
945					950					955					960
Ile	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Leu	Ala	Thr	Ala	Leu	
			965					970					975		
Val	Phe	Ser	Tyr	Trp	Trp	Arg	Arg	Lys	Gln	Leu	Val	Leu	Pro	Pro	Asn
			980					985					990		
Leu	Asn	Asp	Leu	Ala	Ser	Leu	Asp	Gln	Thr	Ala	Gly	Ala	Thr	Pro	Leu
		995					1000					1005			
Pro	Ile	Leu	Tyr	Ser	Gly	Ser	Asp	Tyr	Arg	Ser	Gly	Leu	Ala	Leu	
	1010					1015					1020				
Pro	Ala	Ile	Asp	Gly	Leu	Asp	Ser	Thr	Thr	Cys	Val	His	Gly	Ala	
	1025					1030					1035				

[0006]

Ser Phe 1040	Ser Asp Ser Glu Asp 1045	Glu Ser Cys Val Pro 1050	Leu Leu Arg
Lys Glu 1055	Ser Ile Gln Leu Arg 1060	Asp Leu Asp Ser Ala 1065	Leu Leu Ala
Glu Val 1070	Lys Asp Val Leu Ile 1075	Pro His Glu Arg Val 1080	Val Thr His
Ser Asp 1085	Arg Val Ile Gly Lys 1090	Gly His Phe Gly Val 1095	Val Tyr His
Gly Glu 1100	Tyr Ile Asp Gln Ala 1105	Gln Asn Arg Ile Gln 1110	Cys Ala Ile
Lys Ser 1115	Leu Ser Arg Ile Thr 1120	Glu Met Gln Gln Val 1125	Glu Ala Phe
Leu Arg 1130	Glu Gly Leu Leu Met 1135	Arg Gly Leu Asn His 1140	Pro Asn Val
Leu Ala 1145	Leu Ile Gly Ile Met 1150	Leu Pro Pro Glu Gly 1155	Leu Pro His
Val Leu 1160	Leu Pro Tyr Met Cys 1165	His Gly Asp Leu Leu 1170	Gln Phe Ile
Arg Ser 1175	Pro Gln Arg Asn Pro 1180	Thr Val Lys Asp Leu 1185	Ile Ser Phe
Gly Leu 1190	Gln Val Ala Arg Gly 1195	Met Glu Tyr Leu Ala 1200	Glu Gln Lys
Phe Val 1205	His Arg Asp Leu Ala 1210	Ala Arg Asn Cys Met 1215	Leu Asp Glu
Ser Phe 1220	Thr Val Lys Val Ala 1225	Asp Phe Gly Leu Ala 1230	Arg Asp Ile
Leu Asp 1235	Arg Glu Tyr Tyr Ser 1240	Val Gln Gln His Arg 1245	His Ala Arg
Leu Pro 1250	Val Lys Trp Met Ala 1255	Leu Glu Ser Leu Gln 1260	Thr Tyr Arg

[0007]

Phe Thr Thr Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp
1265 1270 1275

Glu Leu Leu Thr Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Arg His Ile Asp Pro
1280 1285 1290

Phe Asp Leu Thr His Phe Leu Ala Gln Gly Arg Arg Leu Pro Gln
1295 1300 1305

Pro Glu Tyr Cys Pro Asp Ser Leu Tyr Gln Val Met Gln Gln Cys
1310 1315 1320

Trp Glu Ala Asp Pro Ala Val Arg Pro Thr Phe Arg Val Leu Val
1325 1330 1335

Gly Glu Val Glu Gln Ile Val Ser Ala Leu Leu Gly Asp His Tyr
1340 1345 1350

Val Gln Leu Pro Ala Thr Tyr Met Asn Leu Gly Pro Ser Thr Ser
1355 1360 1365

His Glu Met Asn Val Arg Pro Glu Gln Pro Gln Phe Ser Pro Met
1370 1375 1380

Pro Gly Asn Val Arg Arg Pro Arg Pro Leu Ser Glu Pro Pro Arg
1385 1390 1395

Pro Thr
1400

<210> 2
<211> 1378
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 2

Met Gly Leu Pro Leu Pro Leu Leu Gln Ser Ser Leu Leu Leu Met Leu
1 5 10 15

Leu Leu Arg Leu Ser Ala Ala Ser Thr Asn Leu Asn Trp Gln Cys Pro
20 25 30

Arg Ile Pro Tyr Ala Ala Ser Arg Asp Phe Ser Val Lys Tyr Val Val

[0008]

35	40	45
Pro Ser Phe Ser Ala Gly Gly Arg Val Gln Ala Thr Ala Ala Tyr Glu 50 55 60		
Asp Ser Thr Asn Ser Ala Val Phe Val Ala Thr Arg Asn His Leu His 65 70 75 80		
Val Leu Gly Pro Asp Leu Gln Phe Ile Glu Asn Leu Thr Thr Gly Pro 85 90 95		
Ile Gly Asn Pro Gly Cys Gln Thr Cys Ala Ser Cys Gly Pro Gly Pro 100 105 110		
His Gly Pro Pro Lys Asp Thr Asp Thr Leu Val Leu Val Met Glu Pro 115 120 125		
Gly Leu Pro Ala Leu Val Ser Cys Gly Ser Thr Leu Gln Gly Arg Cys 130 135 140		
Phe Leu His Glu Leu Glu Pro Arg Gly Lys Ala Leu His Leu Ala Ala 145 150 155 160		
Pro Ala Cys Leu Phe Ser Ala Asn Asn Asn Lys Pro Glu Ala Cys Thr 165 170 175		
Asp Cys Val Ala Ser Pro Leu Gly Thr Arg Val Thr Val Val Glu Gln 180 185 190		
Gly His Ala Ser Tyr Phe Tyr Val Ala Ser Ser Leu Asp Pro Glu Leu 195 200 205		
Ala Ala Ser Phe Ser Pro Arg Ser Val Ser Ile Arg Arg Leu Lys Ser 210 215 220		
Asp Thr Ser Gly Phe Gln Pro Gly Phe Pro Ser Leu Ser Val Leu Pro 225 230 235 240		
Lys Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Ile Lys Tyr Val Tyr Ser Phe His Ser 245 250 255		
Gly Asp Phe Val Tyr Phe Leu Thr Val Gln Pro Ile Ser Val Thr Ser 260 265 270		

[0009]

Pro Pro Ser Ala Leu His Thr Arg Leu Val Arg Leu Asn Ala Val Glu
275 280 285

Pro Glu Ile Gly Asp Tyr Arg Glu Leu Val Leu Asp Cys His Phe Ala
290 295 300

Pro Lys Arg Arg Arg Arg Gly Ala Pro Glu Gly Thr Gln Pro Tyr Pro
305 310 315 320

Val Leu Gln Ala Ala His Ser Ala Pro Val Asp Ala Lys Leu Ala Val
325 330 335

Glu Leu Ser Ile Ser Glu Gly Gln Glu Val Leu Phe Gly Val Phe Val
340 345 350

Thr Val Lys Asp Gly Gly Ser Gly Met Gly Pro Asn Ser Val Val Cys
355 360 365

Ala Phe Pro Ile Tyr His Leu Asn Ile Leu Ile Glu Glu Gly Val Glu
370 375 380

Tyr Cys Cys His Ser Ser Asn Ser Ser Ser Leu Leu Ser Arg Gly Leu
385 390 395 400

Asp Phe Phe Gln Thr Pro Ser Phe Cys Pro Asn Pro Pro Gly Gly Glu
405 410 415

Ala Ser Gly Pro Ser Ser Arg Cys His Tyr Phe Pro Leu Met Val His
420 425 430

Ala Ser Phe Thr Arg Val Asp Leu Phe Asn Gly Leu Leu Gly Ser Val
435 440 445

Lys Val Thr Ala Leu His Val Thr Arg Leu Gly Asn Val Thr Val Ala
450 455 460

His Met Gly Thr Val Asp Gly Arg Val Leu Gln Val Glu Ile Ala Arg
465 470 475 480

Ser Leu Asn Tyr Leu Leu Tyr Val Ser Asn Phe Ser Leu Gly Ser Ser
485 490 495

Gly Gln Pro Val His Arg Asp Val Ser Arg Leu Gly Asn Asp Leu Leu

[0010]

500	505	510
Phe Ala Ser Gly Asp Gln Val	Phe Lys Val Pro Ile	Gln Gly Pro Gly
515	520	525
Cys Arg His Phe Leu Thr Cys Trp Arg Cys Leu Arg Ala Gln Arg Phe		
530	535	540
Met Gly Cys Gly Trp Cys Gly Asp Arg Cys Asp Arg Gln Lys Glu Cys		
545	550	555
Pro Gly Ser Trp Gln Gln Asp His Cys Pro Pro Glu Ile Ser Glu Phe		
565	570	575
Tyr Pro His Ser Gly Pro Leu Arg Gly Thr Thr Arg Leu Thr Leu Cys		
580	585	590
Gly Ser Asn Phe Tyr Leu Arg Pro Asp Asp Val Val Pro Glu Gly Thr		
595	600	605
His Gln Ile Thr Val Gly Gln Ser Pro Cys Arg Leu Leu Pro Lys Asp		
610	615	620
Ser Ser Ser Pro Arg Pro Gly Ser Leu Lys Glu Phe Ile Gln Glu Leu		
625	630	635
Glu Cys Glu Leu Glu Pro Leu Val Thr Gln Ala Val Gly Thr Thr Asn		
645	650	655
Ile Ser Leu Val Ile Thr Asn Met Pro Ala Gly Lys His Phe Arg Val		
660	665	670
Glu Gly Ile Ser Val Gln Glu Gly Phe Ser Phe Val Glu Pro Val Leu		
675	680	685
Thr Ser Ile Lys Pro Asp Phe Gly Pro Arg Ala Gly Gly Thr Tyr Leu		
690	695	700
Thr Leu Glu Gly Gln Ser Leu Ser Ile Ala Thr Ser Arg Ala Ala Leu		
705	710	715
Val Asn Gly Thr Gln Cys Arg Leu Glu Gln Val Asn Glu Glu Gln Ile		
725	730	735

[0011]

Leu Cys Val Thr Pro Pro Gly Ala Gly Thr Ala Arg Val Pro Leu His
740 745 750

Leu Gln Ile Gly Gly Ala Glu Val Pro Gly Ser Trp Thr Phe His Tyr
755 760 765

Lys Glu Asp Pro Ile Val Leu Asp Ile Ser Pro Lys Cys Gly Tyr Ser
770 775 780

Gly Ser His Ile Met Ile His Gly Gln His Leu Thr Ser Ala Trp His
785 790 795 800

Phe Thr Leu Ser Phe His Asp Gly Gln Ser Thr Val Glu Ser Arg Cys
805 810 815

Ala Gly Gln Phe Val Glu Gln Gln Arg Arg Cys Arg Leu Pro Glu
820 825 830

Tyr Val Val Arg Asn Pro Gln Gly Trp Ala Thr Gly Asn Leu Ser Val
835 840 845

Trp Gly Asp Gly Ala Ala Gly Phe Thr Leu Pro Gly Phe Arg Phe Leu
850 855 860

Pro Pro Pro Ser Pro Leu Arg Ala Gly Leu Val Glu Leu Lys Pro Glu
865 870 875 880

Glu His Ser Val Lys Val Glu Tyr Val Gly Leu Gly Ala Val Ala Asp
885 890 895

Cys Val Thr Val Asn Met Thr Val Gly Gly Glu Val Cys Gln His Glu
900 905 910

Leu Arg Gly Asp Val Val Ile Cys Pro Leu Pro Pro Ser Leu Gln Leu
915 920 925

Gly Lys Asp Gly Val Pro Leu Gln Val Cys Val Asp Gly Gly Cys His
930 935 940

Ile Leu Ser Gln Val Val Arg Ser Ser Pro Gly Arg Ala Ser Gln Arg
945 950 955 960

Ile Leu Leu Ile Ala Leu Leu Val Leu Ile Leu Leu Val Ala Val Leu

[0012]

965	970	975
Ala Val Ala Leu Ile Phe Asn Ser Arg Arg Arg Lys Lys Gln Leu Gly 980	985	990
Ala His Ser Leu Ser Pro Thr Thr Leu Ser Asp Ile Asn Asp Thr Ala 995	1000	1005
Ser Gly Ala Pro Asn His Glu Glu Ser Ser Glu Ser Arg Asp Gly 1010	1015	1020
Thr Ser Val Pro Leu Leu Arg Thr Glu Ser Ile Arg Leu Gln Asp 1025	1030	1035
Leu Asp Arg Met Leu Leu Ala Glu Val Lys Asp Val Leu Ile Pro 1040	1045	1050
His Glu Gln Val Val Ile His Thr Asp Gln Val Ile Gly Lys Gly 1055	1060	1065
His Phe Gly Val Val Tyr His Gly Glu Tyr Thr Asp Gly Ala Gln 1070	1075	1080
Asn Gln Thr His Cys Ala Ile Lys Ser Leu Ser Arg Ile Thr Glu 1085	1090	1095
Val Gln Glu Val Glu Ala Phe Leu Arg Glu Gly Leu Leu Met Arg 1100	1105	1110
Gly Leu His His Pro Asn Ile Leu Ala Leu Ile Gly Ile Met Leu 1115	1120	1125
Pro Pro Glu Gly Leu Pro Arg Val Leu Leu Pro Tyr Met Arg His 1130	1135	1140
Gly Asp Leu Leu Arg Phe Ile Arg Ser Pro Gln Arg Asn Pro Thr 1145	1150	1155
Val Lys Asp Leu Val Ser Phe Gly Leu Gln Val Ala Cys Gly Met 1160	1165	1170
Glu Tyr Leu Ala Glu Gln Lys Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala 1175	1180	1185

[0013]

Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Ser Phe Thr Val Lys Val Ala Asp
1190 1195 1200

Phe Gly Leu Ala Arg Gly Val Leu Asp Lys Glu Tyr Tyr Ser Val
1205 1210 1215

Arg Gln His Arg His Ala Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Leu
1220 1225 1230

Glu Ser Leu Gln Thr Tyr Arg Phe Thr Thr Lys Ser Asp Val Trp
1235 1240 1245

Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Leu Thr Arg Gly Ala Pro
1250 1255 1260

Pro Tyr Pro His Ile Asp Pro Phe Asp Leu Ser His Phe Leu Ala
1265 1270 1275

Gln Gly Arg Arg Leu Pro Gln Pro Glu Tyr Cys Pro Asp Ser Leu
1280 1285 1290

Tyr His Val Met Leu Arg Cys Trp Glu Ala Asp Pro Ala Ala Arg
1295 1300 1305

Pro Thr Phe Arg Ala Leu Val Leu Glu Val Lys Gln Val Val Ala
1310 1315 1320

Ser Leu Leu Gly Asp His Tyr Val Gln Leu Thr Ala Ala Tyr Val
1325 1330 1335

Asn Val Gly Pro Arg Ala Val Asp Asp Gly Ser Val Pro Pro Glu
1340 1345 1350

Gln Val Gln Pro Ser Pro Gln His Cys Arg Ser Thr Ser Lys Pro
1355 1360 1365

Arg Pro Leu Ser Glu Pro Pro Leu Pro Thr
1370 1375

<210> 3
<211> 345
<212> DNA
<213> 人工

<220>

[0014]

<223> M14-H06 的合成 VH 序列

<400> 3

```

gaagttcaat tgttagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct ccttacatta tgtcttgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttcttct atcgtttctt ctggtggctg gactacttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acagccacat attactgtgc gagaggccga      300
ctatttgact actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct caagc                        345

```

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M14-H06 的合成 VH 序列

<400> 4

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Val Ser Ser
        115

```

[0015]

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> M14-H06 的合成 VH 序 CDR1 序列

<400> 5

Pro Tyr Ile Met Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> M14-H06 的合成 VH CDR2 序列

<400> 6

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

Gly

<210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> M14-H06 的合成 VH CDR3 序列

<400> 7

Gly Arg Leu Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 8
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> M14-H06 的合成 VL 序列

<400> 8
 cagagcgtct tgactcagac accctcgggtg tccgtggccc ccggacagac ggccaggata 60
 acctgtgagg gaaacaacat tcgagggtcaa agtgtgcatt ggtaccagca gaagccaggc 120

[0016]

caggcccctg tagtggtcgt ctttgatgac accgaccggc cctcaaggat tcctgagcga 180
ttctctggct ccaagtctgg gaacacggcc accctgacca tcatcagggt cgaggccggg 240
gatgaggccg actattactg tcagggtgtgg gatagttcta gtgatcattt tgtcttcgga 300
actgggacca cggtcaccgt ccta 324

<210> 9
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M14-H06 的合成 VL 序列

<400> 9

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

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

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

Asp Asp Thr Asp Arg Pro Ser Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Lys Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ile Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

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

Phe Val Phe Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Leu
100 105

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M14-H06 的合成 VL CDR1 序列

<400> 10

[0017]

Glu Gly Asn Asn Ile Arg Gly Gln Ser Val His
1 5 10

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M14-H06 的合成 VL CDR2 序列

<400> 11

Asp Asp Thr Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M14-H06 的合成 VL CDR3 序列

<400> 12

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Phe Val
1 5 10

<210> 13
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> M15-E10 的合成 VH 序列

<400> 13
gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt 60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtacttta tgatgtgggt tcgccaagct 120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttct atctatcctt ctggtggcga tactacttat 180
gctgactccg ttaaaggteg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtat attactgtgc ccgatggggt 300
atagtgggag ttccgaatgc ttttgatatc tggggccaag ggacaatggt caccgtctca 360
agc 363

<210> 14
<211> 121

[0018]

<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M15-E10 的合成 VH 序列

<400> 14

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Trp Gly Ile Val Gly Val Pro Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M15-E10 的合成 VH CDR1 序列

<400> 15

Lys Tyr Phe Met Met
1 5

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

[0019]

<220>

<223> M15-E10 的合成 VH CDR2 序列

<400> 16

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

Gly

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M15-E10 的合成 VH CDR3 序列

<400> 17

Trp Gly Ile Val Gly Val Pro Asn Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 18

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> M15-E10 的合成 VL 序列

<400> 18

gacattcaga tgaccagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagggtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtcc ggacattggc acctatttaa attggtatca acagaaacca 120

aggaaagccc ctcaactcct gatctatgct gcatccagtt taaaaagtg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacacta cccctctcac cttcgcccaa 300

gggacacgac tagagcttaa a 321

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M15-E10 的合成 VL 序列

[0020]

<400> 19

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Pro Asp Ile Gly Thr Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M15-E10 的合成 VL CDR1 序列

<400> 20

Arg Ala Ser Pro Asp Ile Gly Thr Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M15-E10 的合成 VL CDR2 序列

<400> 21

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

[0021]

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> M15-E10 的合成 VL CDR3 序列

<400> 22

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 23
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> M16-C07 的合成 VH 序列

<400> 23
 gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt 60
 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct gattaccaga tggagtgggt tcgccaagct 120
 cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttat atctattctt ctggtggcaa gactgtttat 180
 gctgactccg ttaaaggteg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagacttccg 300
 agagtgggag ctaccatcat aaatgactac tggggccagg gaaccciggt caccgtctca 360
 agc 363

<210> 24
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> M16-C07 的合成 VH 序列

<400> 24

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

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

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

[0022]

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

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

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

Ala Arg Leu Pro Arg Val Gly Ala Thr Ile Ile Asn Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M16-C07 的合成 VH CDR1 序列

<400> 25

Asp Tyr Gln Met Glu
1 5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M16-C07 的合成 VH CDR2 序列

<400> 26

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

Gly

<210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

[0023]

<220>

<223> M16-C07 的合成 VH CDR3 序列

<400> 27

Leu Pro Arg Val Gly Ala Thr Ile Ile Asn Asp Tyr
 1 5 10

<210> 28

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> M16-C07 的合成 VL 序列

<400> 28

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtcg aggtattagc agctctttag cctggatatca gcagaaacca 120
 gggagagccc ctaagtcct aatctatgct gcatccagtt tccatactgg ggtcccgta 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgtgacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagactttg ctacttacta ttgtcaacag acggacagtt ttccgctcac cttcggcgga 300
 gggaccaagg tggaatcaa a 321

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M16-C07 的合成 VL 序列

<400> 29

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

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

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

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

[0024]

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

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

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

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M16-C07 的合成 VL CDR1 序列

<400> 30

Arg Ala Ser Arg Gly Ile Ser Ser Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M16-C07 的合成 VL CDR2 序列

<400> 31

Ala Ala Ser Ser Phe His Thr
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M16-C07 的合成 VL CDR3 序列

<400> 32

Gln Gln Thr Asp Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 33
<211> 348
<212> DNA
<213> 人工

[0025]

<220>

<223> M23-F10 的合成 VH 序列

<400> 33

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccgatt cactttctct aattacatga tgggttggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttcttct atctattttt ctggtggcaa gacttattat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtac      300
agctggttcg acccctgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcaagc                  348

```

<210> 34

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M23-F10 的合成 VH 序列

<400> 34

```

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

```

[0026]

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M23-F10 的合成 VH CDR1 序列

<400> 35

Asn Tyr Met Met Gly
1 5

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M23-F10 的合成 VH CDR2 序列

<400> 36

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

Gly

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M23-F10 的合成 VH CDR3 序列

<400> 37

Gly Tyr Ser Trp Phe Asp Pro
1 5

<210> 38
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> M23-F10 的合成 VL 序列

<400> 38
gacatccaga tgaccacgac tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

[0027]

atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctggtag cctggatatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccccgac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 39
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M23-F10 的合成 VL 序列

<400> 39

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M23-F10 的合成 VL CDR1 序列

[0028]

<400> 40

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M23-F10 的合成 VL CDR2 序列

<400> 41

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M23-F10 的合成 VL CDR3 序列

<400> 42

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Arg Thr
 1 5

<210> 43

<211> 369

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> M80-B03 的合成 VH 序列

<400> 43

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt	60
tcttgcgctg ctcccgatt cactttctct tggtagcgta tgacttgggt tcgccaagct	120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttcttat atctcttctt ctggtggctg gactcattat	180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac	240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagccctctt	300
ggcttctacg agcgagtcgc ttatgctttt gatatctggg gccaaaggac aatggtcacc	360
gtctcaagc	369

[0029]

<210> 44
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> M80-B03 的合成 VH 序列

<400> 44

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Pro Leu Gly Phe Tyr Glu Arg Val Ala Tyr Ala Phe Asp Ile
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 45
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> M80-B03 的合成 VH CDR1 序列

<400> 45

Trp Tyr Arg Met Thr
 1 5

<210> 46
 <211> 17

[0030]

<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M80-B03 的合成 VH CDR2 序列

<400> 46

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

Gly

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M80-B03 的合成 VH CDR3 序列

<400> 47

Pro Leu Gly Phe Tyr Glu Arg Val Ala Tyr Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 48
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> M80-B03 的合成 VL 序列

<400> 48
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcgcc 60
atcacttgcc gcgcaagtca gagcatcgac acctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccaagt tggaagatgg ggtcccatca 180
agattcagtg gcagtggaac tgggacagat ttactctca ccatcagaag tctgcaacct 240
gaagattitg caagttattt ctgtcaacag agctactcta gtccagggat cactttcggc 300
cctgggacca aggtggagat caaa 324

<210> 49
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工

<220>

[0031]

<223> M80-B03 的合成 VL 序列

<400> 49

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Lys Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Thr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Ile Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M80-B03 的合成 VL CDR1 序列

<400> 50

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

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M80-B03 的合成 VL CDR2 序列

<400> 51

Ala Ala Ser Lys Leu Glu Asp

[0032]

1 5

<210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> M80-B03 的合成 VL CDR3 序列

<400> 52

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

<210> 53
 <211> 405
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 1P3B2 的合成 VH 序列

<400> 53

atgggttgga tctgtatctt tctcttcctc gtgtcagtaa ctacaggtgt ccactctgag 60

gtccagctgc agcagtcctgg acctgagctg gagaagcctg gcgcttcagt gaaaatatcc 120

tgcaaggctt ctggttactc attcactggc tacaacatga actgggtgaa gcagagcaat 180

ggagagagcc ttgagtggat tggagatatt gatccttact atggtggtac taggtacaac 240

cagaagttca agggcaaggc cacattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300

caactcaaga gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtgcaag agaggggagg 360

ggttttgctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 405

<210> 54
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1P3B2 的合成 VH 序列

<400> 54

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

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

[0033]

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asp Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Arg 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 Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Thr Val Ser Ala
 115

<210> 55
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1P3B2 的合成 VH CDR1 序列
 <400> 55

Gly Tyr Asn Met Asn
 1 5

<210> 56
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1P3B2 的合成 VH CDR2 序列
 <400> 56

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

Gly

<210> 57

[0034]

<211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1P3B2 的合成 VH CDR3 序列

<400> 57

Glu Gly Arg Gly Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 58
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 1P3B2 的合成 VL 序列

<400> 58
 atgaggggccc ctgctcagtt ccttgggttg ctgctgctgt ggcttacagg tgccagatgt 60
 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 120
 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agttatttag catggtatca gaagaaacag 180
 ggaaaatctc ctcaactcct ggtctataat gcaaaaacct cagtagaagg tgtgccatca 240
 aggttcagtg gcagtggatc aggcatacag ttttctctga agatcaatag cctgcagcct 300
 gaagattttg ggagttatta ctgtcactgt caacatcatt atgttactct tccgacgttc 360
 ggtggaggca ccaagctgga aatcaaa 387

<210> 59
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1P3B2 的合成 VL 序列

<400> 59

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 Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30

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

[0035]

Tyr Asn Ala Lys Thr Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ile Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys His Cys Gln His His Tyr Gly Thr
85 90 95

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

<210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P3B2 的合成 VL CDR1 序列

<400> 60

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P3B2 的合成 VL CDR2 序列

<400> 61

Asn Ala Lys Thr Ser Val Glu
1 5

<210> 62
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P3B2 的合成 VL CDR3 序列

<400> 62

His Cys Gln His His Tyr Gly Thr Leu Pro Thr
1 5 10

[0036]

<210> 63
 <211> 405
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

<223> 1P4A3 的合成 VH 序列

<400> 63
 atgggatgga gctgggtctt tctcttaatc ctatcagtaa ctacaggtgt ccactctgag 60
 gtccagctgc agcagtctgg acctgagctg gagaagcctg gcgcttcagt gatgatatcc 120
 tgcaaggctt ctggttactc attcactggc tacaacatga actgggtgaa gcagagcact 180
 ggcaagagcc ttgagtggat tggagatatt gatccttact atgatggtac taggtacaac 240
 cagaagttca agggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 cagctcaaga gcctgacatc tgaagactct gcagtctatt actgtacaag agagggaaga 360
 gggtttgctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 405

<210> 64
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> 1P4A3 的合成 VH 序列

<400> 64

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

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

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Thr Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asp Ile Asp Pro Tyr Tyr Asp Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

[0037]

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

Thr Val Ser Ala
115

<210> 65
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P4A3 的合成 VH CDR1 序列

<400> 65

Gly Tyr Asn Met Asn
1 5

<210> 66
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P4A3 的合成 VH CDR2 序列

<400> 66

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

Gly

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P4A3 的合成 VH CDR3 序列

<400> 67

Glu Gly Arg Gly Phe Ala Tyr
1 5

<210> 68
<211> 381
<212> DNA
<213> 人工

[0038]

<220>

<223> 1P4A3 的合成 VL 序列

<400> 68

```

atgaggtccc cagctcagtt ccttgggttg ctgctgctgt ggcttacagg tgccagatgt      60
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc      120
atcacatgtc gagcaagtga gaatatattac agttatttag catggtatca gcagaaacag      180
ggaaaatctc ctcagctcct ggtctataat gcaaaaacct tagcaggagg tgtgccatca      240
aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga agatcaacag cctgcagcct      300
gaagattttg ggagttatta ttgtcaacat tattatggta ctcctctcac gttcgggtgct      360
gggaccaagc tggagctgaa a                                          381

```

<210> 69

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1P4A3 的合成 VL 序列

<400> 69

```

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

```

```

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65           70          75          80

```

```

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Tyr Gly Thr Pro Leu
85           90          95

```

```

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

```

[0039]

<210> 70
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1P4A3 的合成 VL CDR1 序列

<400> 70

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 71
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1P4A3 的合成 VL CDR2 序列

<400> 71

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Gly
 1 5

<210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1P4A3 的合成 VL CDR3 序列

<400> 72

Gln His Tyr Tyr Gly Thr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 73
 <211> 417
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 1P5B10 的合成 VH 序列

<400> 73

atgggatgca gctgggtaat gctcttcctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt ccactctgag 60
 gtccagctac aacagtctgg acctgaactg gtgaagcctg gagcttcaat gaagatatcc 120
 tgcagggctg ctggtttctc attcactggc tacaccatga actgggtgaa gcagagccat 180
 ggaaaagagcc ttgagtggat tggacttatt aatcttaaca atggtggtac tagccacaac 240

[0040]

cagaagttca agggcaaggc cacattaact gtagacaagt catccagcac agcctacatg 300
gagctcctca gtctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtgcaag atgggttacgt 360
cgtgggggct atgctatgga ctactgggggt caaggaattt cagtcaccgt ctcctca 417

<210> 74
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P5B10 的合成 VH 序列

<400> 74

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

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

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Asn Leu Asn Asn Gly Gly Thr Ser His 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 Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Ile Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 75
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P5B10 的合成 VH CDR1 序列

[0041]

<400> 75

Gly Tyr Thr Met Asn
1 5

<210> 76

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1P5B10 的合成 VH CDR2 序列

<400> 76

Leu Ile Asn Leu Asn Asn Gly Gly Thr Ser His Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 77

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1P5B10 的合成 VH CDR3 序列

<400> 77

Trp Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 78

<211> 381

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 1P5B10 的合成 VL 序列

<400> 78

```

atggtgtcct cagctcagtt ccttgtatatt ttgcttttct ggattccagc ctccagaggt      60
gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt      120
ttctcctgca gggccagtca gaacattggc acaagcatac actggtatca gcaaagaaca      180
aatggttctc caaggcttct cataaagtat gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc      240
aggtttagtg gcagtggatc agggacagat ttactctta gcatcaacag tgtggagtct      300
gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa agtgatagct ggccactcac gtttgggtgct      360

```

[0042]

gggaccaagc tggagctgaa a

381

<210> 79

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1P5B10 的合成 VL 序列

<400> 79

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1P5B10 的合成 VL CDR1 序列

<400> 80

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Thr Ser Ile His
1 5 10

<210> 81

<211> 7

[0043]

<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P5B10 的合成 VL CDR2 序列

<400> 81

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P5B10 的合成 VL CDR3 序列

<400> 82

Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 83
<211> 417
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 1P4A12 的合成 VH 序列

<400> 83
atgggatgca gctgtgtaat gctcttcctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt ccgctctgag 60
gtccagctgc aacagtctgg acctgagctg gtgaagcctg gagcttcaat gaagatatcc 120
tgcaaggctt ctggttactc attcactggc tacacatga actgggtgaa gcagagccat 180
ggaaagaagc ttgagtggat tggacttatt aatccttaca atggtgggac tatctacaac 240
cagaagttca agggcaaggc cacattaact gtagacaagt catccagcac agcctacatg 300
gagctcctca gtctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtgcaag atggttacga 360
cgtgggggct atgctatgga ctactggggg caaggagcct cagtcaccgt ctcctca 417

<210> 84
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P4A12 的合成 VH 序列

[0044]

<400> 84

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

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

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Lys Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 85

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1P4A12 的合成 VH CDR1 序列

<400> 85

Gly Tyr Thr Met Asn
 1 5

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1P4A12 的合成 VH CDR2 序列

<400> 86

[0045]

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

Gly

<210> 87
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1P4A12 的合成 VH CDR3 序列

<400> 87

Trp Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 88
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 1P4A12 的合成 VL 序列

<400> 88
 atggtgtcct cagctcagtt ccttgtatatt ttgcttttct ggattccagc ctccagaggt 60
 gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt 120
 ttctcctgca gggccagtca gagcattggc acaagcatac actggtatca gcaaagaaca 180
 aatggttctc caaggttct cataaagttt gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc 240
 aggttttagtg gcagtggatc agggacagat ttactctta gcatcaacag tgtggagtct 300
 gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa agtgatagct ggccactcac gttegggtgt 360
 gggaccaagc tggaggtgaa a 381

<210> 89
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 1P4A12 的合成 VL 序列

<400> 89

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly

[0046]

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

<210> 90
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P4A12 的合成 VL CDR1 序列

<400> 90

Arg Ala Ser	Gln Ser Ile Gly Thr	Ser Ile His
1	5	10

<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P4A12 的合成 VL CDR2 序列

<400> 91

Phe Ala Ser	Glu Ser Ile Ser
1	5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT

[0047]

<213> 人工

<220>

<223> 1P4A12 的合成 VL CDR3 序列

<400> 92

Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 93

<211> 423

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 1P2E7 的合成 VH 序列

<400> 93

```

atgagagtgc tgattctttt gtggctgttc acagccttcc ctggtatcct gtctgatgtg      60
cagcttcagg agtcgggacc tggcctgggtg aaaccttctc agtctctgtc cctcacctgc      120
actgtcactg gcgactcaat caccagtgat tatgcctgga actggatccg gcagtttcca      180
ggaaacaaac tggagtggat gggctacata agctacagtg gtagcactag ctacaaccca      240
tctctcaaaa gtcgattctc tatactcga gacacatcca agaaccagtt cttcctgcag      300
ttgaattctg tgactactga ggactcagcc acatattact gtgcaagagg ggggttctac      360
tataggtacg ccgggcctgg gtttgcttat tggggccaag ggactctggt cactgtctct      420
gca                                          423

```

<210> 94

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1P2E7 的合成 VH 序列

<400> 94

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

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

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

[0048]

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

Lys Ser Arg Phe Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Phe Tyr Tyr Arg Tyr Ala Gly Pro Gly Phe Ala Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 95
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P2E7 的合成 VH CDR1 序列

<400> 95

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5

<210> 96
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P2E7 的合成 VH CDR2 序列

<400> 96

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

<210> 97
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P2E7 的合成 VH CDR3 序列

<400> 97

[0049]

Gly Gly Phe Tyr Tyr Arg Tyr Ala Gly Pro Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 98
<211> 396
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 1P2E7 的合成 VL 序列

<400> 98
atgatgagtc ctgcccagtt cctgtttctg ttagtgctct cgattcagga aatcaacggt 60
gatgttgtga tgaccagac tccactcaact ttgtcggta ccattggaca accagcttcc 120
atctcttgca agtcaagtca gagcctctta tataactaatg gaaaaaccta tttgaattgg 180
ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaaa cgcctaactct atctgggtgtc taaattggac 240
tctggagtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 300
agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattactgct tgcagagtac acattttccg 360
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 396

<210> 99
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P2E7 的合成 VL 序列

<400> 99

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

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

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

[0050]

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
85 90 95

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

<210> 100

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1P2E7 的合成 VL CDR1 序列

<400> 100

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 101

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1P2E7 的合成 VL CDR2 序列

<400> 101

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1P2E7 的合成 VL CDR3 序列

<400> 102

Leu Gln Ser Thr His Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 103

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1P3B2.2 的重链可变结构域的合成信号序列

[0051]

<400> 103

Met Gly Trp Ile Cys Ile Phe Leu Phe Leu Val Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 104

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1P3B2.2 的轻链可变结构域的合成信号序列

<400> 104

Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys
20

<210> 105

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1P4A3.3 的重链可变结构域的合成信号序列

<400> 105

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

Val His Ser

<210> 106

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1P4A3.3 的轻链可变结构域的合成信号序列

<400> 106

Met Arg Ser Pro Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

[0052]

Gly Ala Arg Cys
20

<210> 107
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P5B10.3 的重链可变结构域的合成信号序列

<400> 107

Met Gly Cys Ser Trp Val Met Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 108
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P5B10.3 的轻链可变结构域的合成信号序列

<400> 108

Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro
1 5 10 15

Ala Ser Arg Gly
20

<210> 109
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P4A12.2 的重链可变结构域的合成信号序列

<400> 109

Met Gly Cys Ser Cys Val Met Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val Arg Ser

[0053]

<210> 110
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P4A12.2 的轻链可变结构域的合成信号序列

<400> 110

Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro
1 5 10 15

Ala Ser Arg Gly
20

<210> 111
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P2E7.3 的重链可变结构域的合成信号序列

<400> 111

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile
1 5 10 15

Leu Ser

<210> 112
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 1P2E7.3 的轻链可变结构域的合成信号序列

<400> 112

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

Glu Ile Asn Gly
20

<210> 113
<211> 1291
<212> PRT
<213> 智人

[0054]

<400> 113

Met Glu Leu Leu Pro Pro Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Pro Ala Lys Pro Ala Ala Gly Glu Asp Trp Gln Cys Pro Arg Thr
20 25 30

Pro Tyr Ala Ala Ser Arg Asp Phe Asp Val Lys Tyr Val Val Pro Ser
35 40 45

Phe Ser Ala Gly Gly Leu Val Gln Ala Met Val Thr Tyr Glu Gly Asp
50 55 60

Arg Asn Glu Ser Ala Val Phe Val Ala Ile Arg Asn Arg Leu His Val
65 70 75 80

Leu Gly Pro Asp Leu Lys Ser Val Gln Ser Leu Ala Thr Gly Pro Ala
85 90 95

Gly Asp Pro Gly Cys Gln Thr Cys Ala Ala Cys Gly Pro Gly Pro His
100 105 110

Gly Pro Pro Gly Asp Thr Asp Thr Lys Val Leu Val Leu Asp Pro Ala
115 120 125

Leu Pro Ala Leu Val Ser Cys Gly Ser Ser Leu Gln Gly Arg Cys Phe
130 135 140

Leu His Asp Leu Glu Pro Gln Gly Thr Ala Val His Leu Ala Ala Pro
145 150 155 160

Ala Cys Leu Phe Ser Ala His His Asn Arg Pro Asp Asp Cys Pro Asp
165 170 175

Cys Val Ala Ser Pro Leu Gly Thr Arg Val Thr Val Val Glu Gln Gly
180 185 190

Gln Ala Ser Tyr Phe Tyr Val Ala Ser Ser Leu Asp Ala Ala Val Ala
195 200 205

Ala Ser Phe Ser Pro Arg Ser Val Ser Ile Arg Arg Leu Lys Ala Asp
210 215 220

[0055]

Ala Ser Gly Phe	Ala Pro Gly Phe Val	Ala Leu Ser Val	Leu Pro Lys
225	230	235	240
His Leu Val Ser	Tyr Ser Ile Glu Tyr	Val His Ser Phe	His Thr Gly
	245	250	255
Ala Phe Val Tyr	Phe Leu Thr Val	Gln Pro Ala Ser	Val Thr Asp Asp
	260	265	270
Pro Ser Ala Leu	His Thr Arg Leu	Ala Arg Leu Ser	Ala Thr Glu Pro
	275	280	285
Glu Leu Gly Asp	Tyr Arg Glu Leu	Val Leu Asp Cys	Arg Phe Ala Pro
	290	295	300
Lys Arg Arg Arg	Arg Gly Ala Pro	Glu Gly Gly Gln	Pro Tyr Pro Val
	305	310	315
Leu Gln Val Ala	His Ser Ala Pro	Val Gly Ala Gln	Leu Ala Thr Glu
	325	330	335
Leu Ser Ile Ala	Glu Gly Gln Glu	Val Leu Phe Gly	Val Phe Val Thr
	340	345	350
Gly Lys Asp Gly	Gly Pro Gly Val	Gly Pro Asn Ser	Val Val Cys Ala
	355	360	365
Phe Pro Ile Asp	Leu Leu Asp Thr	Leu Ile Asp Glu	Gly Val Glu Arg
	370	375	380
Cys Cys Glu Ser	Pro Val His Pro	Gly Leu Arg Arg	Gly Leu Asp Phe
	385	390	395
Phe Gln Ser Pro	Ser Phe Cys Pro	Asn Pro Pro Gly	Leu Glu Ala Leu
	405	410	415
Ser Pro Asn Thr	Ser Cys Arg His	Phe Pro Leu Leu	Val Ser Ser Ser
	420	425	430
Phe Ser Arg Val	Asp Leu Phe Asn	Gly Leu Leu Gly	Pro Val Gln Val
	435	440	445
Thr Ala Leu Tyr	Val Thr Arg Leu	Asp Asn Val Thr	Val Ala His Met

[0056]

450	455	460
Gly Thr Met Asp Gly Arg Ile Leu Gln Val Glu Leu Val Arg Ser Leu 465	470	475 480
Asn Tyr Leu Leu Tyr Val Ser Asn Phe Ser Leu Gly Asp Ser Gly Gln 485	490	495
Pro Val Gln Arg Asp Val Ser Arg Leu Gly Asp His Leu Leu Phe Ala 500	505	510
Ser Gly Asp Gln Val Phe Gln Val Pro Ile Gln Gly Pro Gly Cys Arg 515	520	525
His Phe Leu Thr Cys Gly Arg Cys Leu Arg Ala Trp His Phe Met Gly 530	535	540
Cys Gly Trp Cys Gly Asn Met Cys Gly Gln Gln Lys Glu Cys Pro Gly 545	550	555 560
Ser Trp Gln Gln Asp His Cys Pro Pro Lys Leu Thr Glu Glu Pro Val 565	570	575
Leu Ile Ala Val Gln Pro Leu Phe Gly Pro Arg Ala Gly Gly Thr Cys 580	585	590
Leu Thr Leu Glu Gly Gln Ser Leu Ser Val Gly Thr Ser Arg Ala Val 595	600	605
Leu Val Asn Gly Thr Glu Cys Leu Leu Ala Arg Val Ser Glu Gly Gln 610	615	620
Leu Leu Cys Ala Thr Pro Pro Gly Ala Thr Val Ala Ser Val Pro Leu 625	630	635 640
Ser Leu Gln Val Gly Gly Ala Gln Val Pro Gly Ser Trp Thr Phe Gln 645	650	655
Tyr Arg Glu Asp Pro Val Val Leu Ser Ile Ser Pro Asn Cys Gly Tyr 660	665	670
Ile Asn Ser His Ile Thr Ile Cys Gly Gln His Leu Thr Ser Ala Trp 675	680	685

[0057]

His Leu Val Leu Ser Phe His Asp Gly Leu Arg Ala Val Glu Ser Arg
 690 695 700

Cys Glu Arg Gln Leu Pro Glu Gln Gln Leu Cys Arg Leu Pro Glu Tyr
 705 710 715 720

Val Val Arg Asp Pro Gln Gly Trp Val Ala Gly Asn Leu Ser Ala Arg
 725 730 735

Gly Asp Gly Ala Ala Gly Phe Thr Leu Pro Gly Phe Arg Phe Leu Pro
 740 745 750

Pro Pro His Pro Pro Ser Ala Asn Leu Val Pro Leu Lys Pro Glu Glu
 755 760 765

His Ala Ile Lys Phe Glu Tyr Ile Gly Leu Gly Ala Val Ala Asp Cys
 770 775 780

Val Gly Ile Asn Val Thr Val Gly Gly Glu Ser Cys Gln His Glu Phe
 785 790 795 800

Arg Gly Asp Met Val Val Cys Pro Leu Pro Pro Ser Leu Gln Leu Gly
 805 810 815

Gln Asp Gly Ala Pro Leu Gln Val Cys Val Asp Gly Glu Cys His Ile
 820 825 830

Leu Gly Arg Val Val Arg Pro Gly Pro Asp Gly Val Pro Gln Ser Thr
 835 840 845

Leu Leu Gly Ile Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Val Ala Ala Leu Ala
 850 855 860

Thr Ala Leu Val Phe Ser Tyr Trp Trp Arg Arg Lys Gln Leu Val Leu
 865 870 875 880

Pro Pro Asn Leu Asn Asp Leu Ala Ser Leu Asp Gln Thr Ala Gly Ala
 885 890 895

Thr Pro Leu Pro Ile Leu Tyr Ser Gly Ser Asp Tyr Arg Ser Gly Leu
 900 905 910

Ala Leu Pro Ala Ile Asp Gly Leu Asp Ser Thr Thr Cys Val His Gly

[0058]

915	920	925
Ala Ser Phe Ser Asp Ser Glu Asp Glu Ser Cys Val Pro Leu Leu Arg 930	935	940
Lys Glu Ser Ile Gln Leu Arg Asp Leu Asp Ser Ala Leu Leu Ala Glu 945	950	955 960
Val Lys Asp Val Leu Ile Pro His Glu Arg Val Val Thr His Ser Asp 965	970	975
Arg Val Ile Gly Lys Gly His Phe Gly Val Val Tyr His Gly Glu Tyr 980	985	990
Ile Asp Gln Ala Gln Asn Arg Ile Gln Cys Ala Ile Lys Ser Leu Ser 995	1000	1005
Arg Ile Thr Glu Met Gln Gln Val Glu Ala Phe Leu Arg Glu Gly 1010	1015	1020
Leu Leu Met Arg Gly Leu Asn His Pro Asn Val Leu Ala Leu Ile 1025	1030	1035
Gly Ile Met Leu Pro Pro Glu Gly Leu Pro His Val Leu Leu Pro 1040	1045	1050
Tyr Met Cys His Gly Asp Leu Leu Gln Phe Ile Arg Ser Pro Gln 1055	1060	1065
Arg Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Ser Phe Gly Leu Gln Val 1070	1075	1080
Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Glu Gln Lys Phe Val His Arg 1085	1090	1095
Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Ser Phe Thr Val 1100	1105	1110
Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Leu Asp Arg Glu 1115	1120	1125
Tyr Tyr Ser Val Gln Gln His Arg His Ala Arg Leu Pro Val Lys 1130	1135	1140

[0059]

Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Tyr Arg Phe Thr Thr Lys
1145 1150 1155

Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Leu Thr
1160 1165 1170

Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Arg His Ile Asp Pro Phe Asp Leu Thr
1175 1180 1185

His Phe Leu Ala Gln Gly Arg Arg Leu Pro Gln Pro Glu Tyr Cys
1190 1195 1200

Pro Asp Ser Leu Tyr Gln Val Met Gln Gln Cys Trp Glu Ala Asp
1205 1210 1215

Pro Ala Val Arg Pro Thr Phe Arg Val Leu Val Gly Glu Val Glu
1220 1225 1230

Gln Ile Val Ser Ala Leu Leu Gly Asp His Tyr Val Gln Leu Pro
1235 1240 1245

Ala Thr Tyr Met Asn Leu Gly Pro Ser Thr Ser His Glu Met Asn
1250 1255 1260

Val Arg Pro Glu Gln Pro Gln Phe Ser Pro Met Pro Gly Asn Val
1265 1270 1275

Arg Arg Pro Arg Pro Leu Ser Glu Pro Pro Arg Pro Thr
1280 1285 1290

<210> 114
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> M93-D02 的合成 VH 序列

<400> 114
gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt 60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct atttactgga tgtcttgggt tcgccaagct 120
cctggtaaag gtttgagtg gggtttctct atcggtcctt ctggtggcat gactgcttat 180
gctgactcgc ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240

[0060]

ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtat attactgtgc aaggggtagc 300

agctggtacg ccgcgtacca ttactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcaagc 360

<210> 115

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M93-D02 的合成 VH 序列

<400> 115

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ser Ser Trp Tyr Ala Ala Tyr His Tyr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 116

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M93-D02 的合成 VH CDR1 序列

<400> 116

[0061]

Ile Tyr Trp Met Ser
1 5

<210> 117
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M93-D02 的合成 VH CDR2 序列

<400> 117

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

Gly

<210> 118
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M93-D02 的合成 VH CDR3 序列

<400> 118

Gly Ser Ser Trp Tyr Ala Ala Tyr His Tyr Tyr
1 5 10

<210> 119
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> M93-D02 的合成 VL 序列

<400> 119
gacatccaga tgacccagtc tccagactcc ctggtgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60
atcaactgca ggtccagcca gagtgtttta tacagttcca acaataagaa gtacttagct 120
tggtaccagc agaaagcagg acagccccct aagtgtctca ttactgggc atctaccgg 180
gcatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtc tgcaggctga agatgtggca gtttatttct gtcagcaata ttataggact 300
cctccgacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaa 339

[0062]

<210> 120
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M93-D02 的合成 VL 序列

<400> 120

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Arg Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 121
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M93-D02 的合成 VL CDR1 序列

<400> 121

Arg Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

[0063]

<210> 122
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> M93-D02 的合成 VL CDR2 序列

<400> 122

Trp Ala Ser Thr Arg Ala Ser
 1 5

<210> 123
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> M93-D02 的合成 VL CDR3 序列

<400> 123

Gln Gln Tyr Tyr Arg Thr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 124
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> M96-C05 的合成 VH 序列

<400> 124
 gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt ctgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt 60
 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cggtactata tgaagtgggt tcgccaagct 120
 cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggcgc tactggttat 180
 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actetaagaa tactctctac 240
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gggacggtat 300
 tactatgata gtagtgagga ctactggggc cagggcaccc tggtcaccgt ctcaagc 357

<210> 125
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

[0064]

<223> M96-C05 的合成 VH 序列

<400> 125

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Arg Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 126

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M96-C05 的合成 VH CDR1 序列

<400> 126

Arg Tyr Tyr Met Lys
1 5

<210> 127

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M96-C05 的合成 VH CDR2 序列

[0065]

<400> 127

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

Gly

<210> 128

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M96-C05 的合成 VH CDR3 序列

<400> 128

Arg Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Asp Tyr
1 5 10

<210> 129

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> M96-C05 的合成 VL 序列

<400> 129

gacatccaga tgacccagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacactg ccccgtcac ttctggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 130

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M96-C05 的合成 VL 序列

<400> 130

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

[0066]

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 131

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M96-C05 的合成 VL CDR1 序列

<400> 131

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 132

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M96-C05 的合成 VL CDR2 序列

<400> 132

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 133

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

[0067]

<220>

<223> M96-C05 的合成 VL CDR3 序列

<400> 133

Gln Gln Ser Tyr Thr Ala Pro Leu Thr Phe
1 5 10

<210> 134

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> M97-D03 的合成 VH 序列

<400> 134

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt 60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cgttaccaga tgtggtgggt tcgccaagct 120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctctt atctctcctt ctggtggcaa gacttggtat 180
gctgactcgg ttaaaggtcg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagttttg 300
agtggcatat tacggggaaa ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctca 360
agc 363

<210> 135

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M97-D03 的合成 VH 序列

<400> 135

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

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

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

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

[0068]

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

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

Ala Lys Val Leu Ser Gly Ile Leu Arg Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 136
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M97-D03 的合成 VH CDR1 序列

<400> 136

Arg Tyr Gln Met Trp
1 5

<210> 137
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M97-D03 的合成 VH CDR2 序列

<400> 137

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

Gly

<210> 138
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M97-D03 的合成 VH CDR3 序列

[0069]

<400> 138

Val Leu Ser Gly Ile Leu Arg Gly Asn Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 139

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> M97-D03 的合成 VL 序列

<400> 139

gacatccaga tgaccagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gactgttacc agcaacttag cctggtagca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggg gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgcgacagag ttactctca tcatcagcag catgcagtct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggctctcac tttcggcgga 300
gggacccagg tggacatcaa a 321

<210> 140

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> M97-D03 的合成 VL 序列

<400> 140

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Val Thr Ser Asn
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Ala Thr Glu Phe Thr Leu Ile Ile Ser Ser Met Gln Ser
65 70 75 80

[0070]

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Gln Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 141
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M97-D03 的合成 VL CDR1 序列

<400> 141

Arg Ala Ser Gln Thr Val Thr Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 142
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M97-D03 的合成 VL CDR2 序列

<400> 142

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 143
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M97-D03 的合成 VL CDR3 序列

<400> 143

Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 144
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> M98-E12 的合成 VH 序列

[0071]

<400> 144
 gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt ctgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt 60
 tcttgcgtg cttccgatt cactttctct cgttacctta tgatttgggt tcgccaagct 120
 cctggtaaag gtttgagtg ggtttcttct atcgtttctt ctggtggctc tacttggtat 180
 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240
 ttgcagatga acagcttaag ggtgaggac acggccgtgt attactgtgc gagacaccgt 300
 ggatatagtg gccaaactaaa ctactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctcaagc 357

<210> 145
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> M98-E12 的合成 VH 序列

<400> 145

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

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

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

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

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

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

Ala Arg His Arg Gly Tyr Ser Gly Gln Leu Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 146
 <211> 5

[0072]

<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M98-E12 的合成 VH CDR1 序列

<400> 146

Arg Tyr Leu Met Ile
1 5

<210> 147
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M98-E12 的合成 VH CDR2 序列

<400> 147

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

Gly

<210> 148
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M98-E12 的合成 VH CDR3 序列

<400> 148

His Arg Gly Tyr Ser Gly Gln Leu Asn Tyr
1 5 10

<210> 149
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> M98-E12 的合成 VL 序列

<400> 149
gacatccaga tgaccagtc tccatctctc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcgcc 60
atcacttgcc ggcgaagtc gagcatcgac acctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccaagt tggaagacgg ggtcccatca 180

[0073]

agattcagtg gcagtggaac tgggacagat ttcactctca ccatcagaag tctgcaacct 240
 gaagattttg caagttatatt ctgtcaacag agctactcta gtccagggat cactttcggc 300
 cctgggacca aggtggagat caaa 324

<210> 150
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> M98-E12 的合成 VL 序列

<400> 150

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Lys Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Thr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

Ile Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 151
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> M98-E12 的合成 VL CDR1 序列

<400> 151

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

[0074]

<210> 152
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M98-E12 的合成 VL CDR2 序列

<400> 152

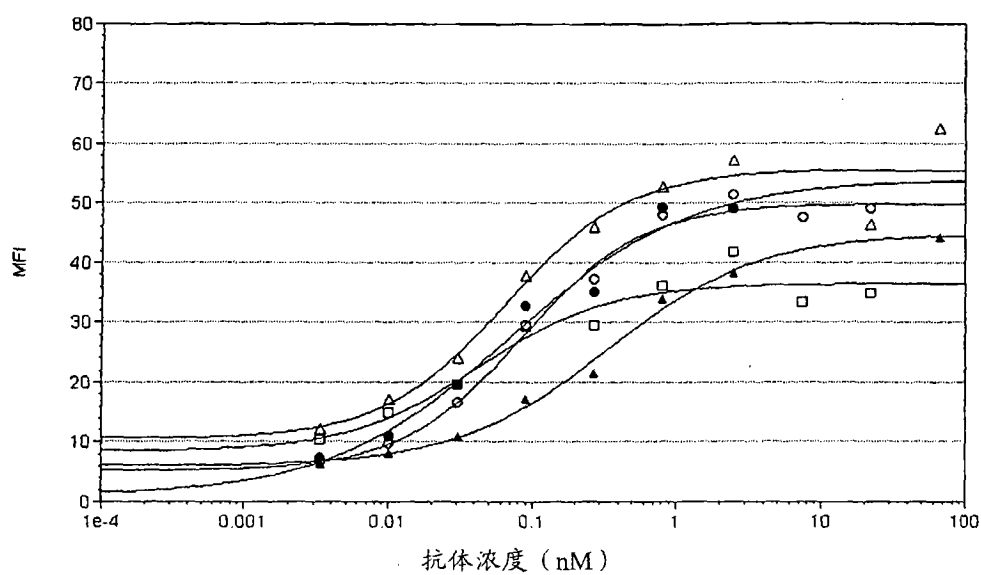
Ala Ala Ser Lys Leu Glu Asp
1 5

<210> 153
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> M98-E12 的合成 VL CDR3 序列

<400> 153

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



实心三角形, 1P5B10; 实心圆形, 1P4A3; 空心圆形, 1P2E7; 空心方块, 1P3B2.2; 空心三角形, 1P4A12. 用标准4-P等式拟合数据曲线。

图 1 抗体结合 SW480 细胞的代表性 FACS 结合曲线

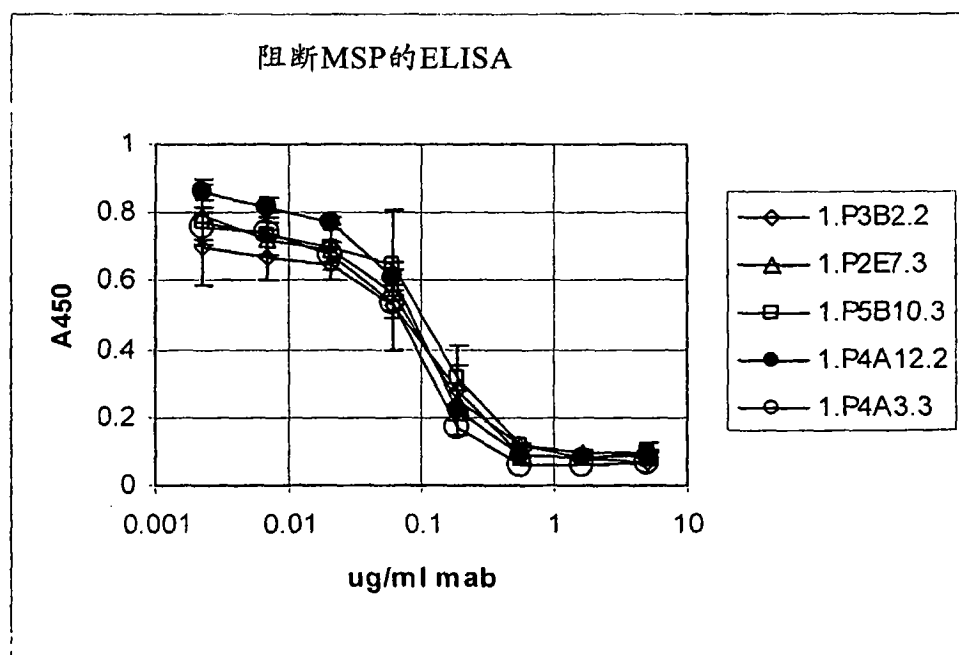


图 2A

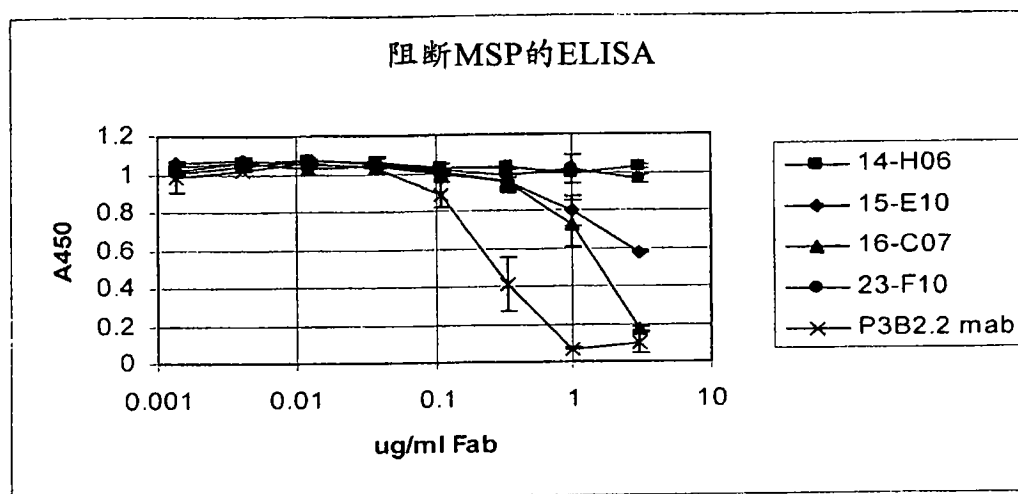


图 2B

抗RON抗体阻断MDA-MB-453 BrCa细胞中的pRON

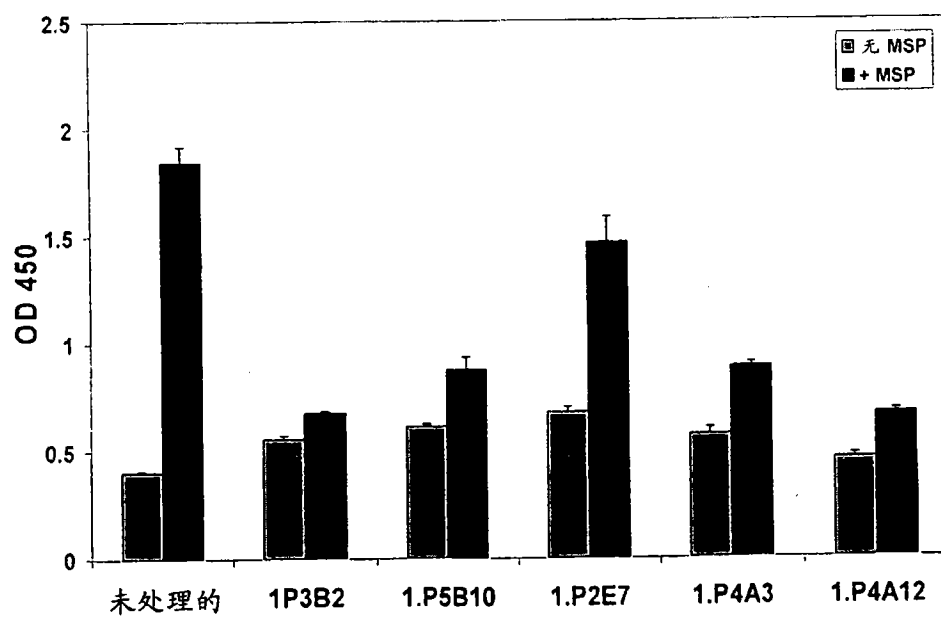


图 3A

pRON抗体阻断是剂量依赖性的

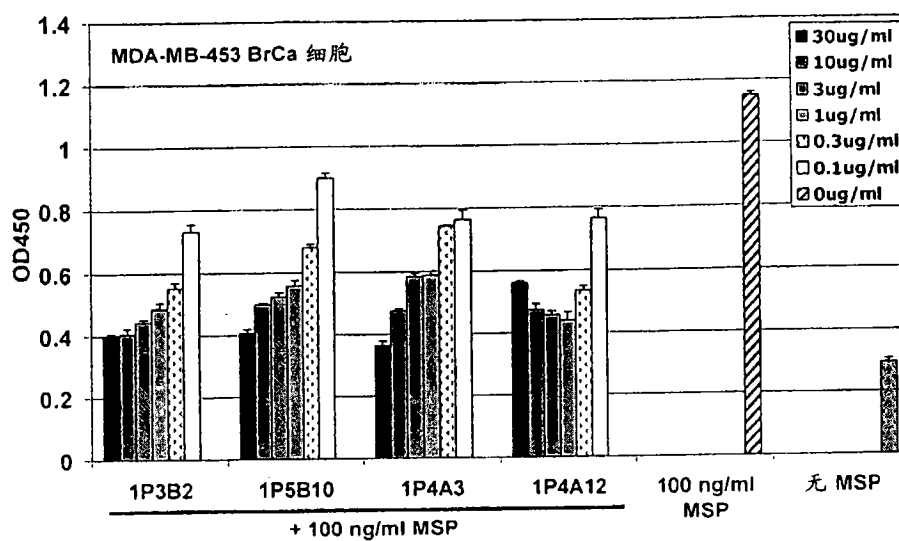


图 3B

抗RON抗体阻断BxPC-3胰腺癌细胞中的pRON

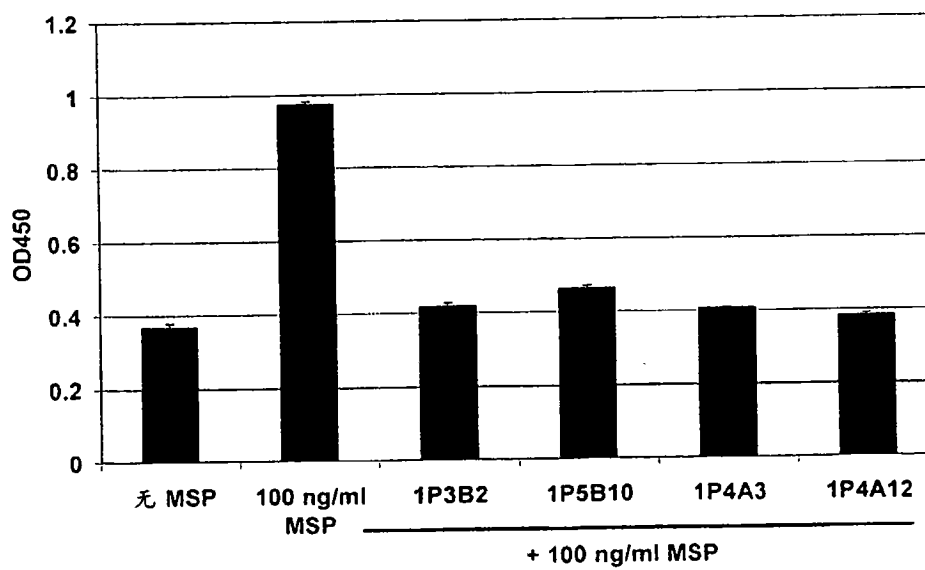


图 3C

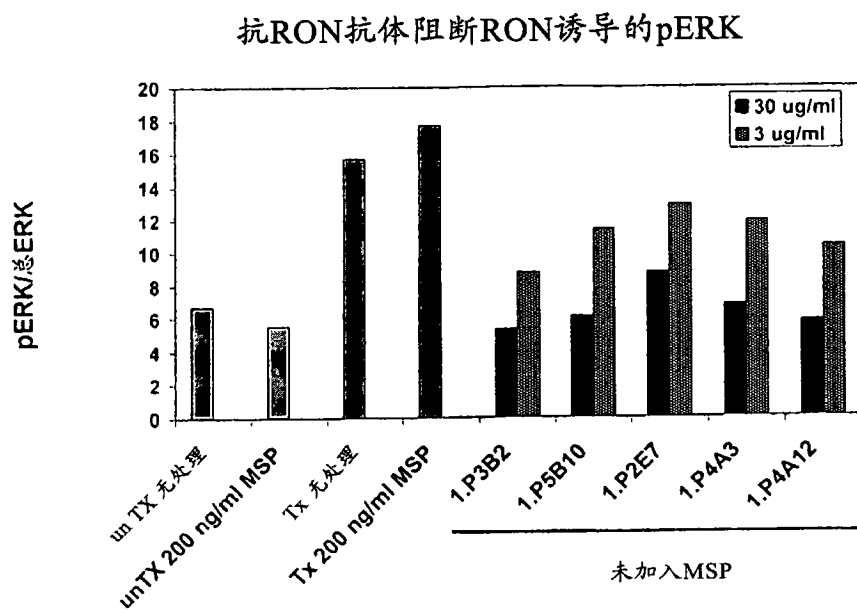


图 4A

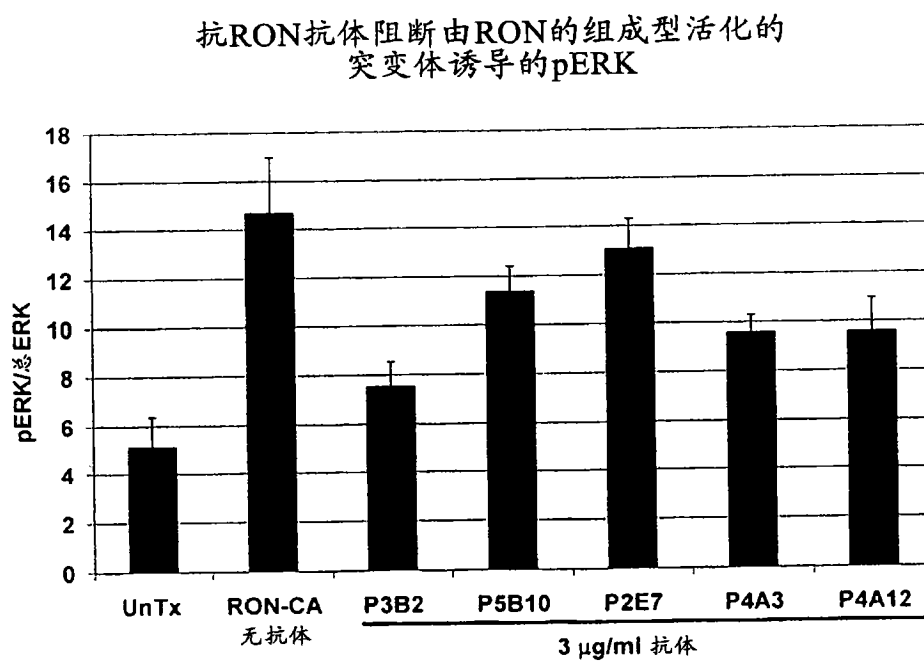


图 4B

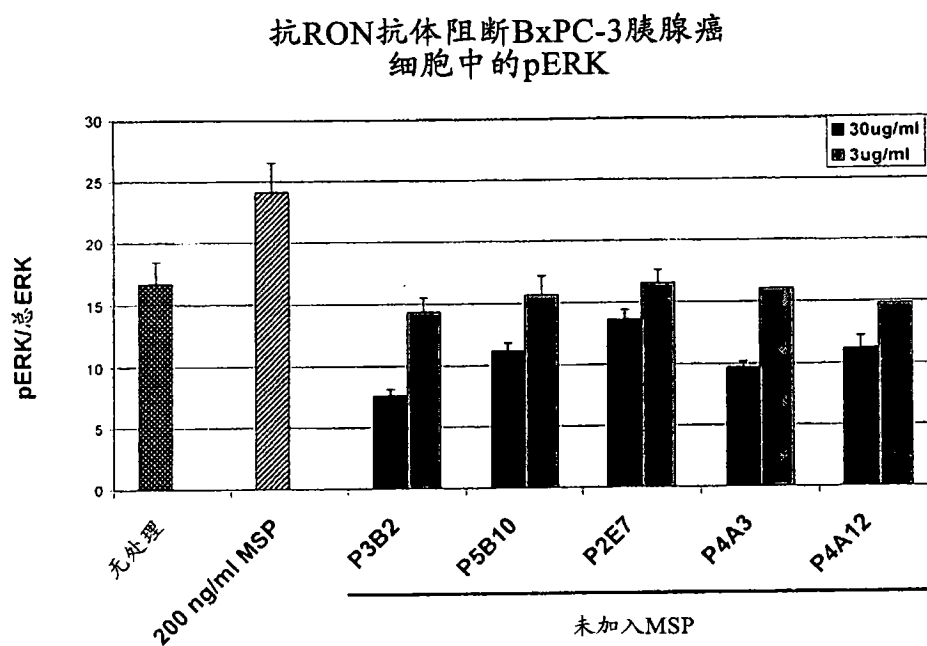
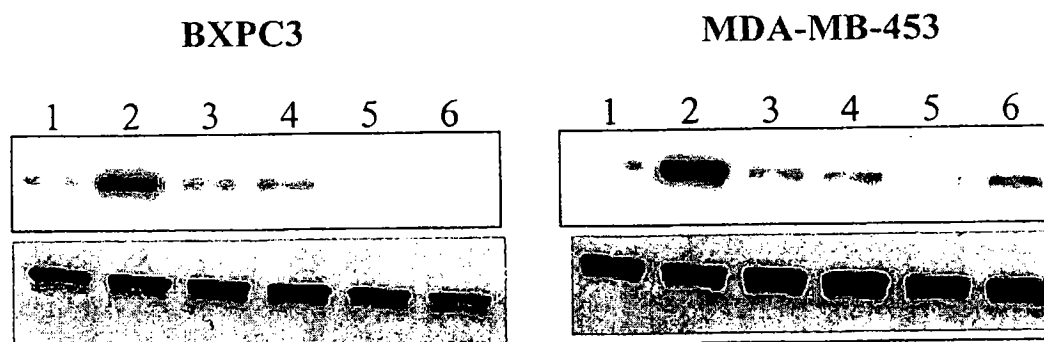


图 4C

抗RON抗体阻断肿瘤细胞中的pAKT



1 未处理的
2 MSP
3 P3B2
4 P3B2 + MSP
5 P4A3
6 P4A3 + MSP

图 5

抗体与转染了hu-RON-p160的293E细胞结合的FACS

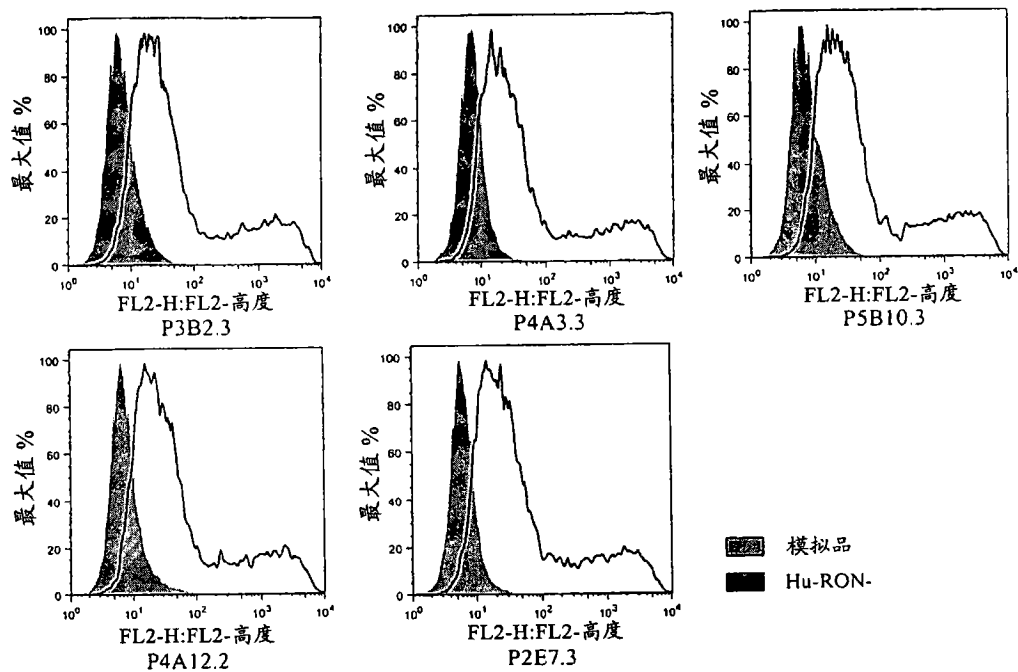


图 6

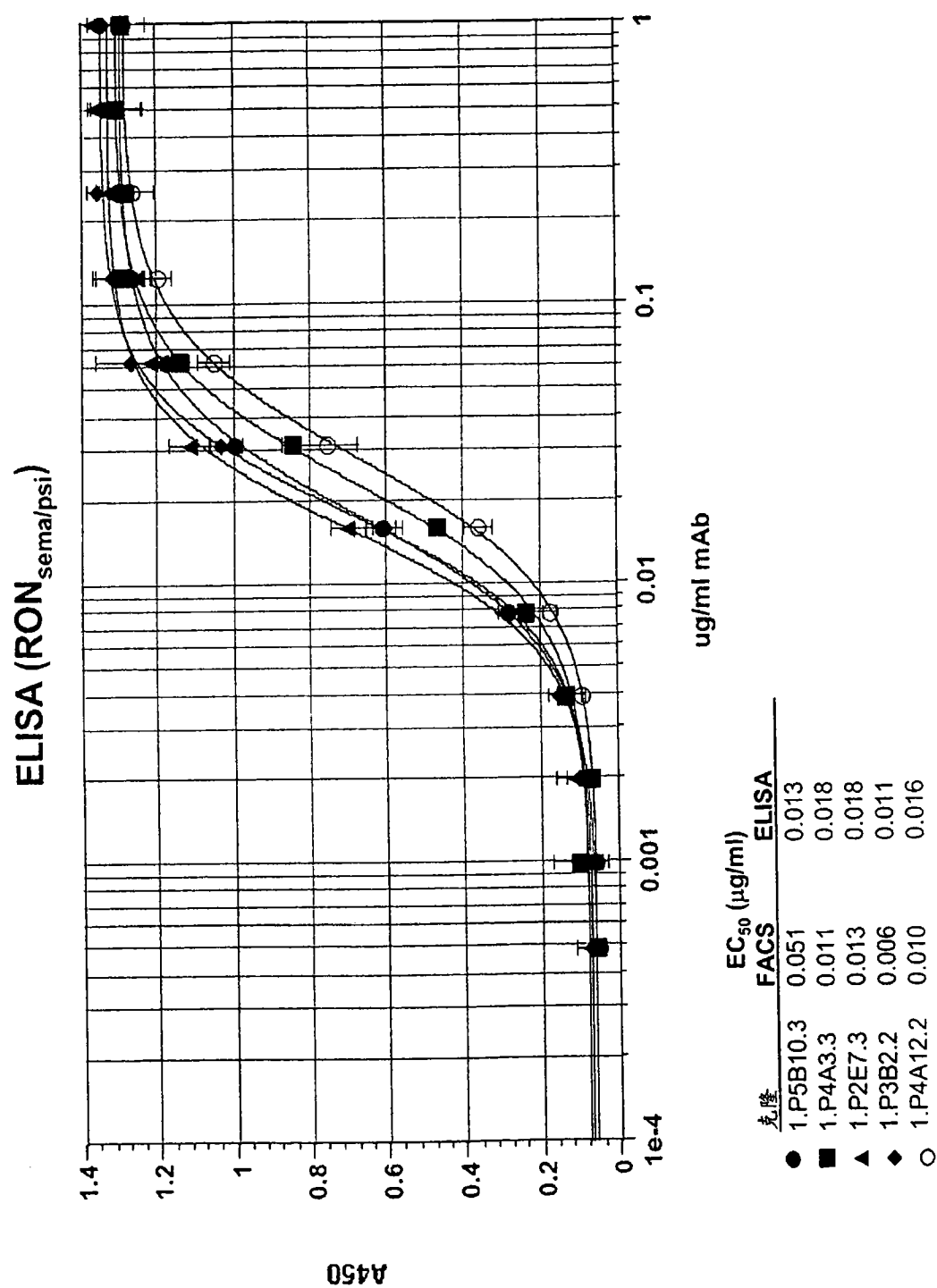


图 7

FACS: 与293-RON细胞的结合

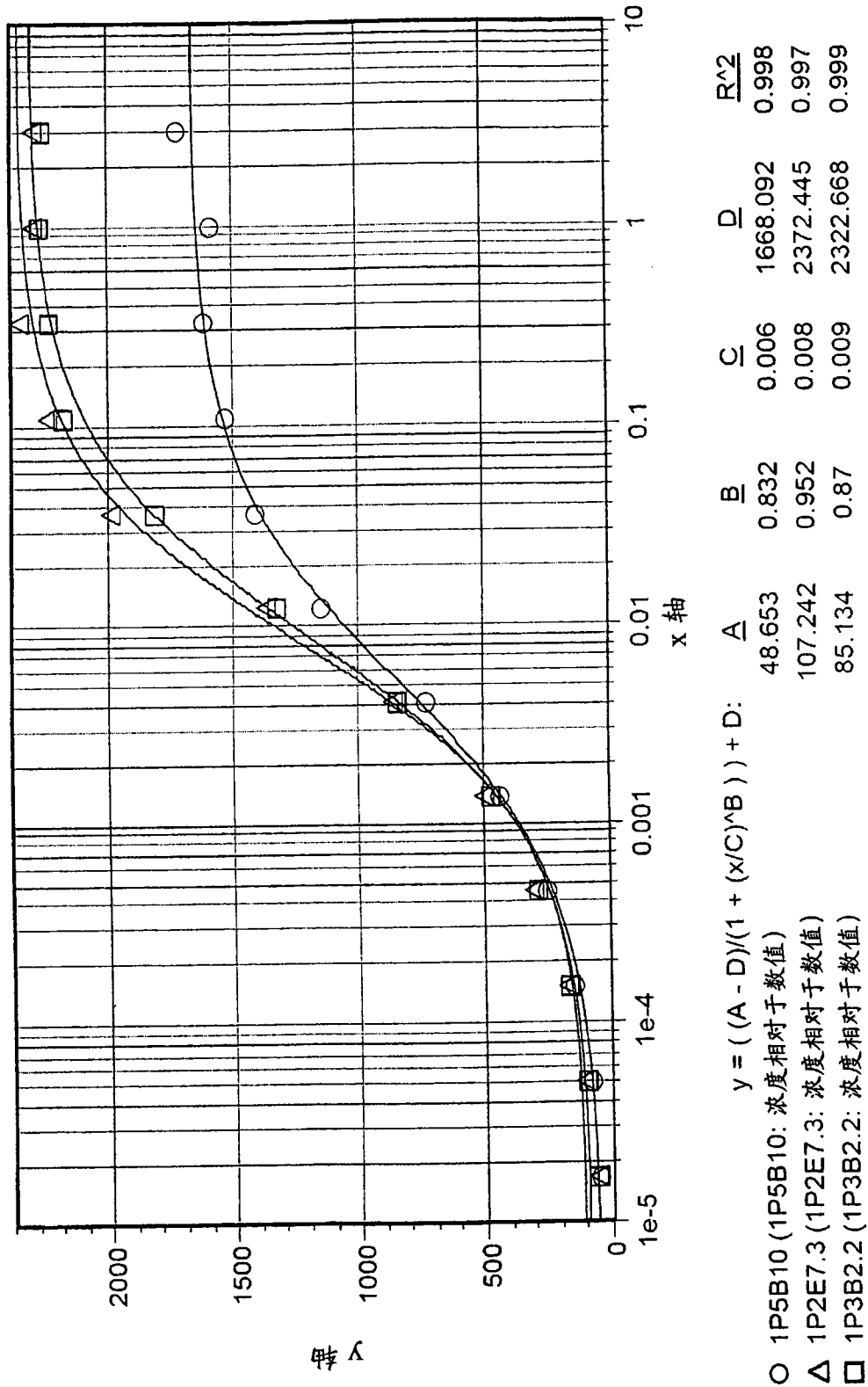


图 8

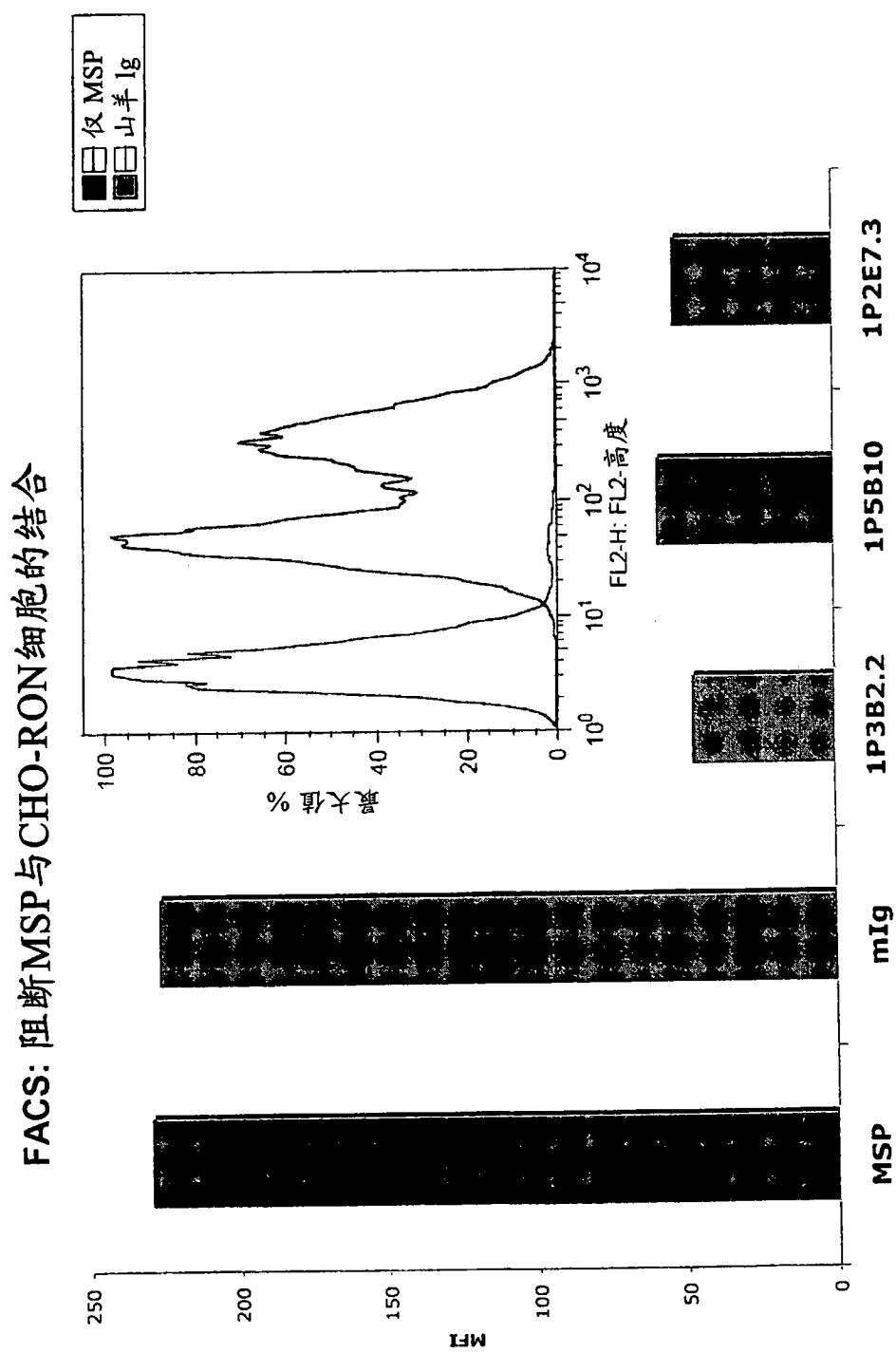


图 9

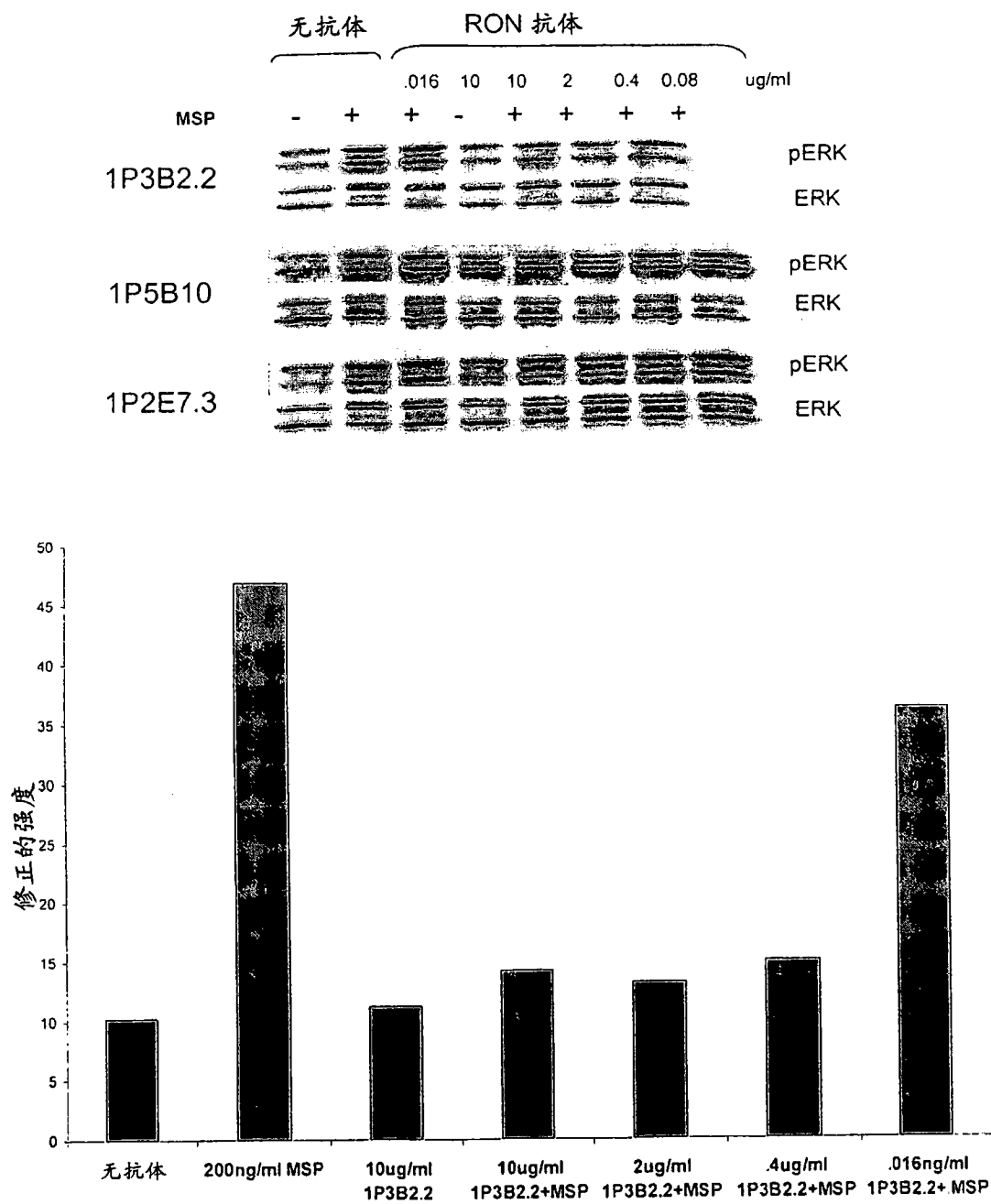


图 10

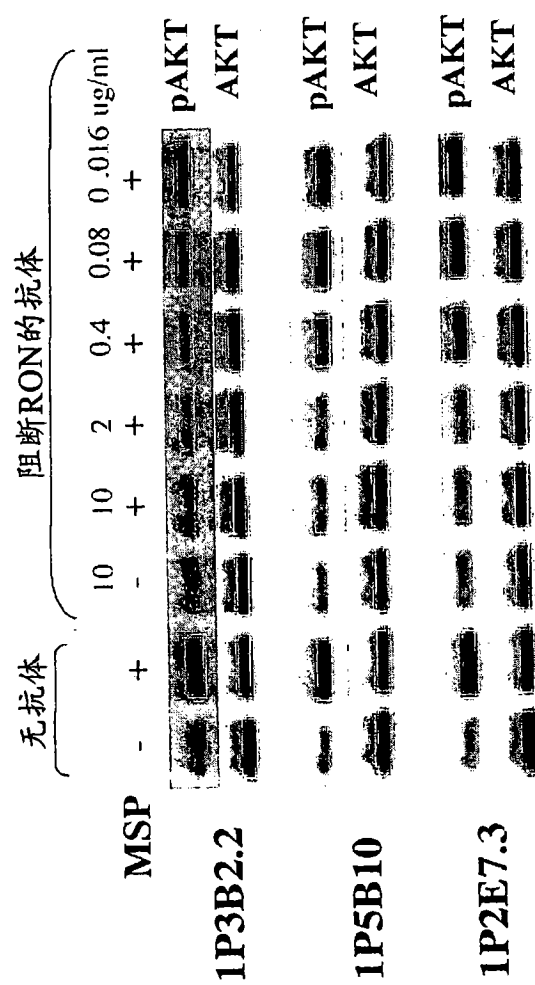


图 11A

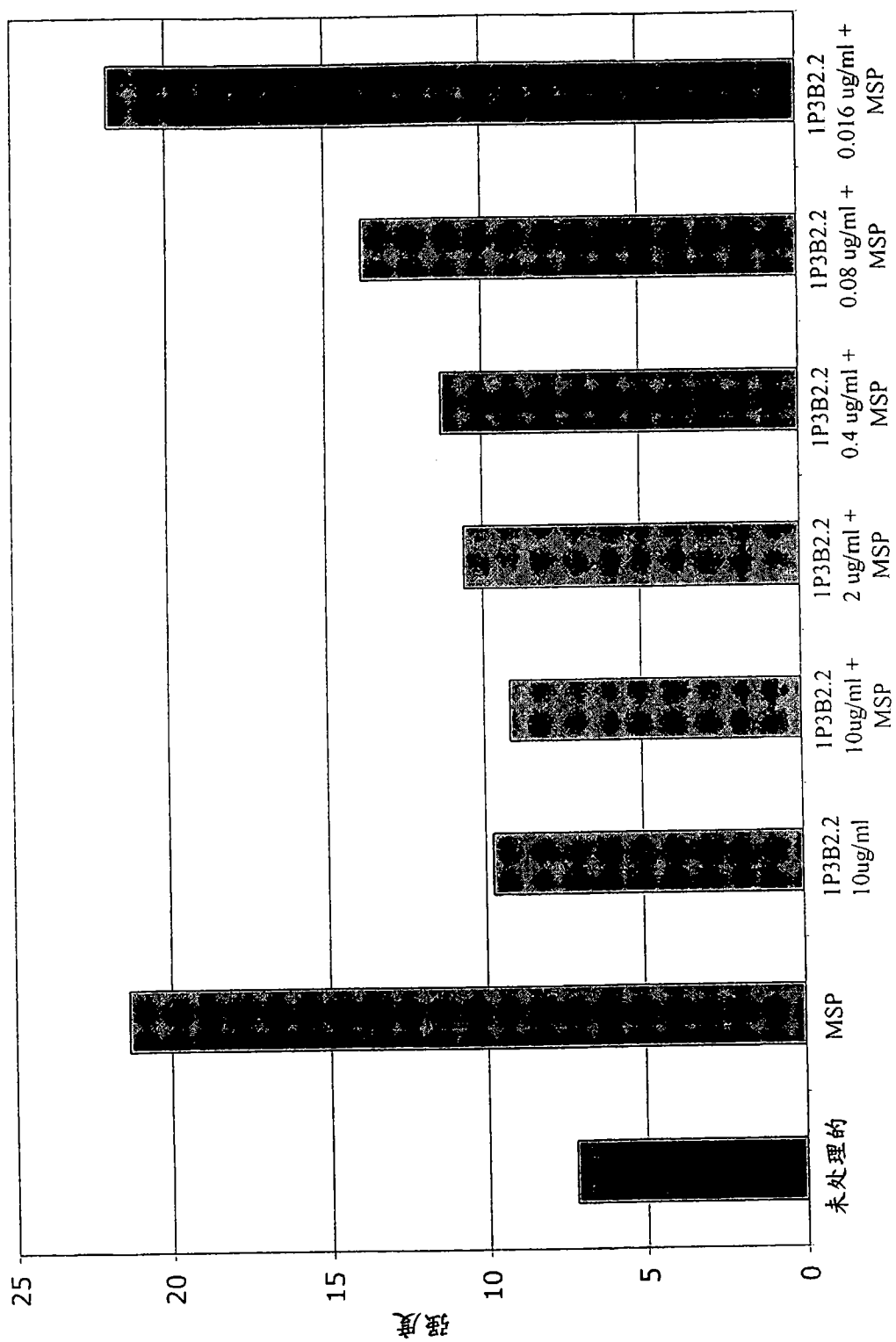


图 11B

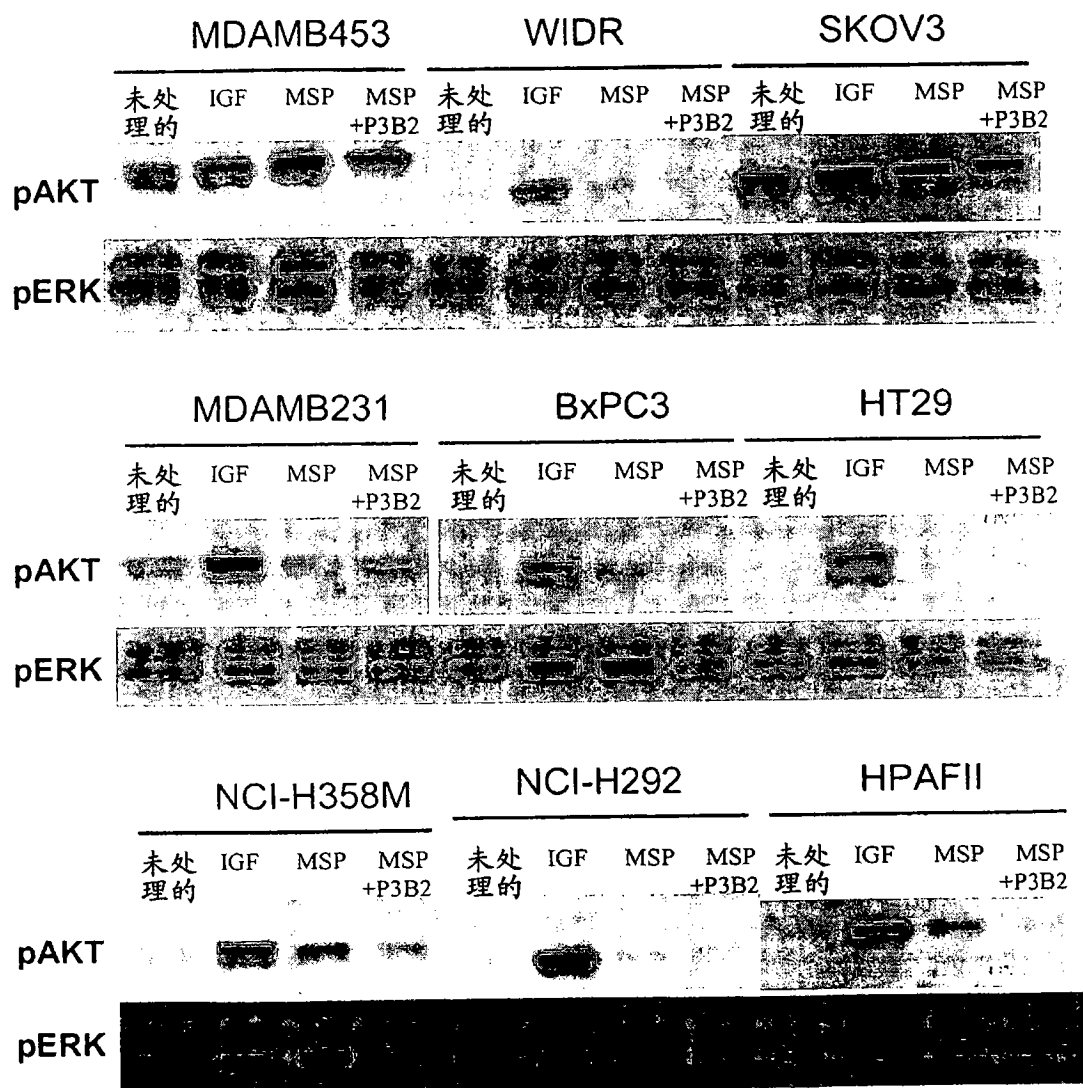
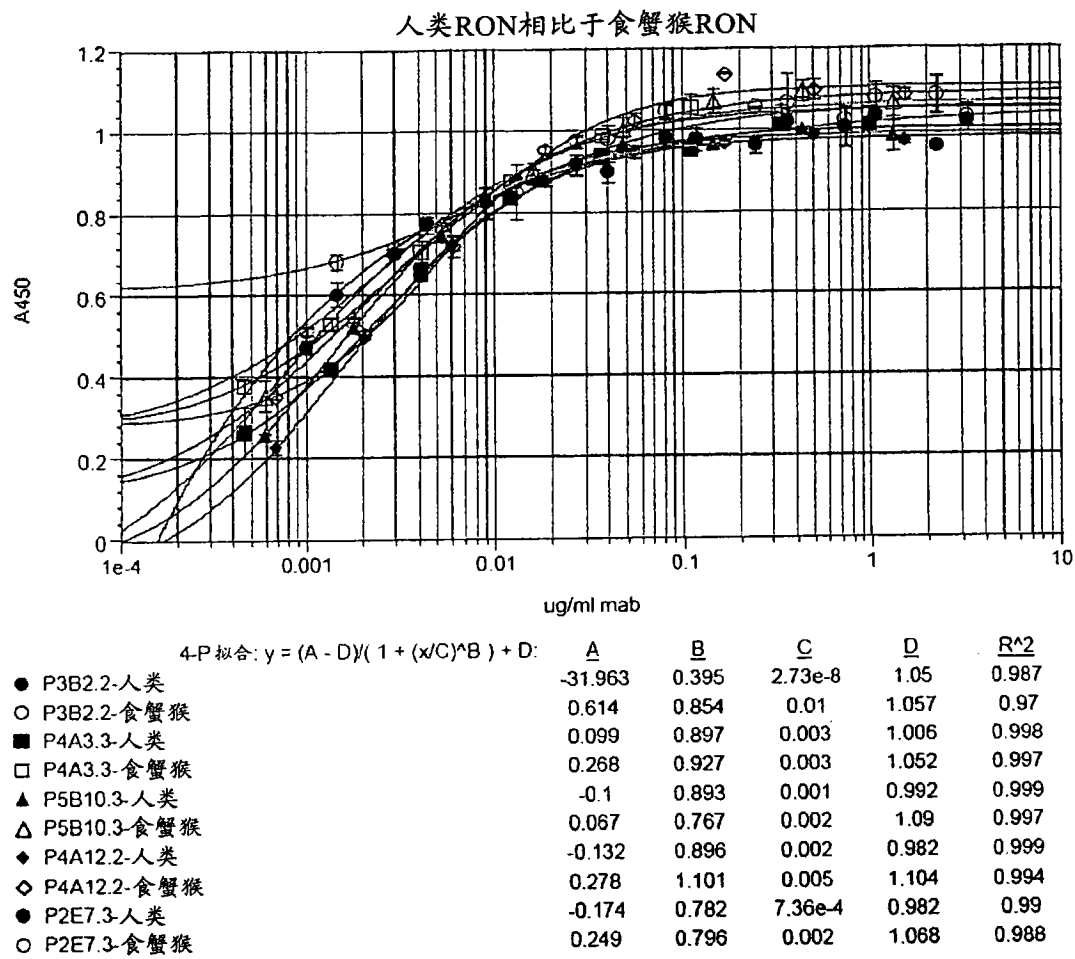


图 12



曲线拟合选择-固定加权值: 1

图 13A

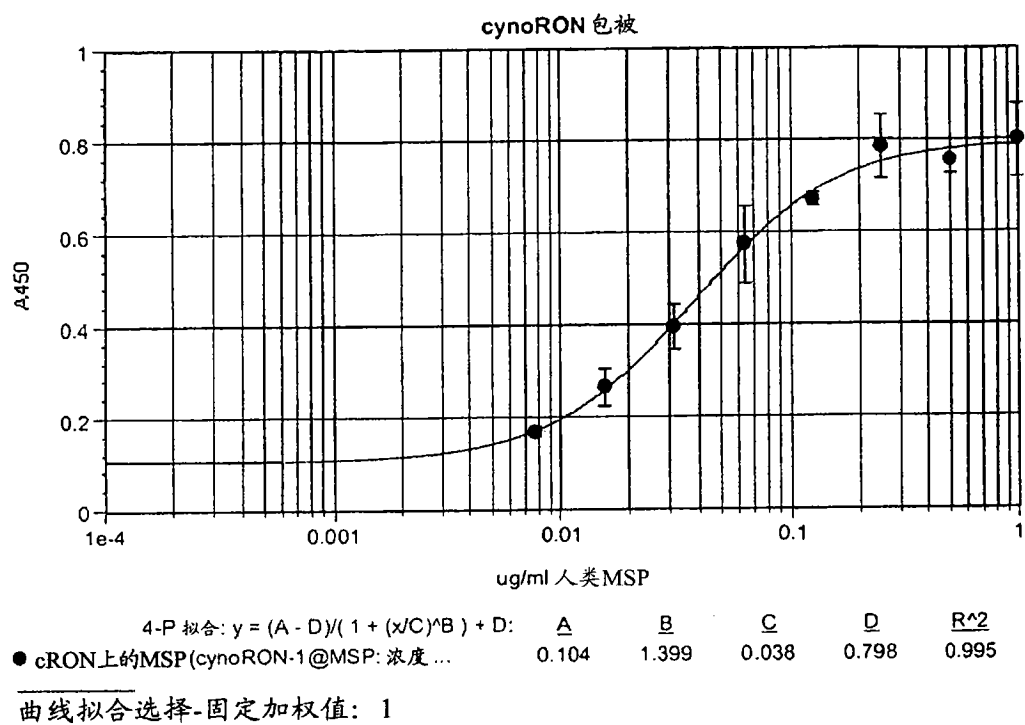


图 13B

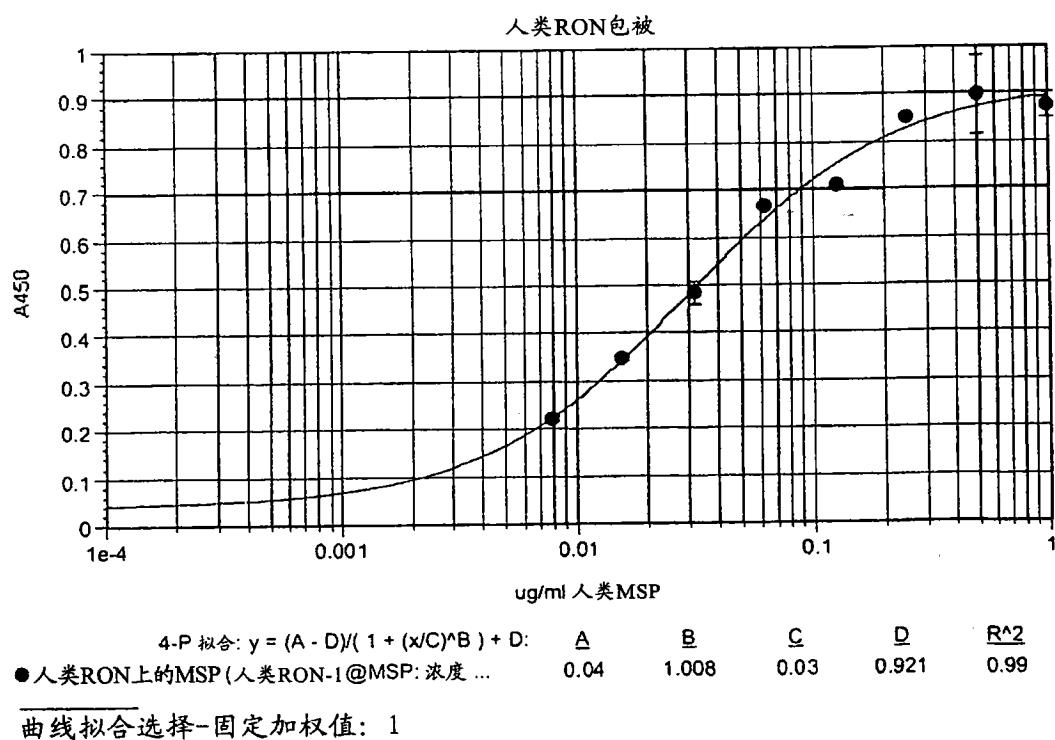


图 13C

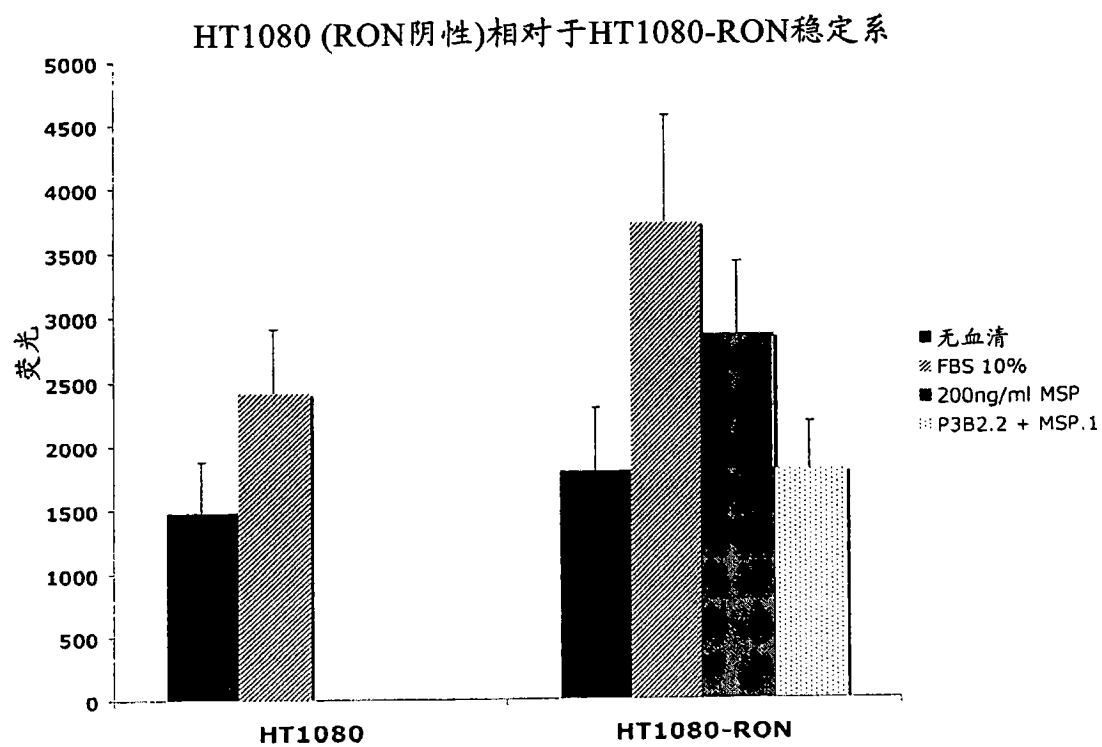


图 14A

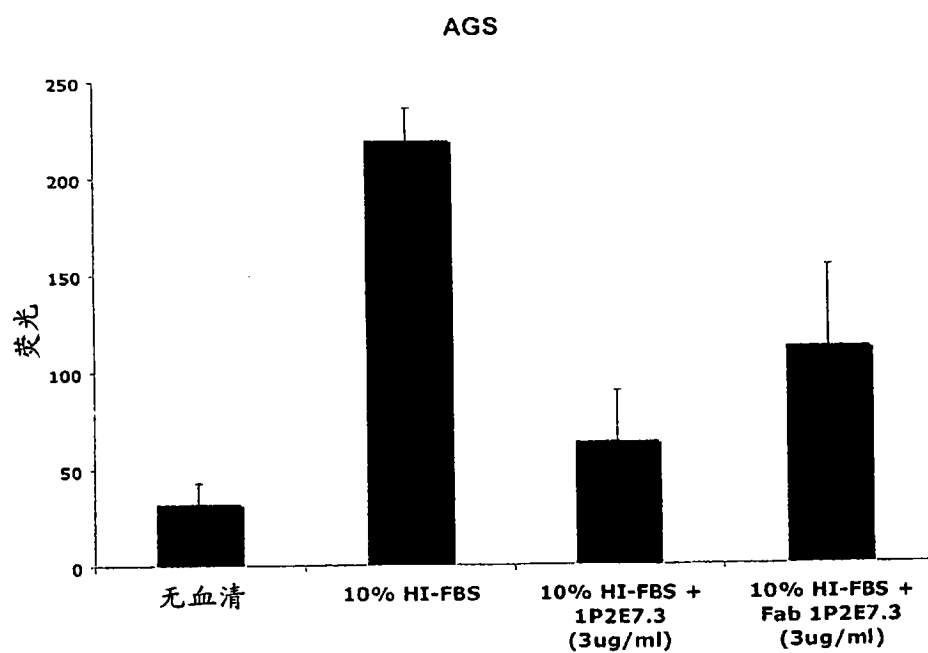


图 14B

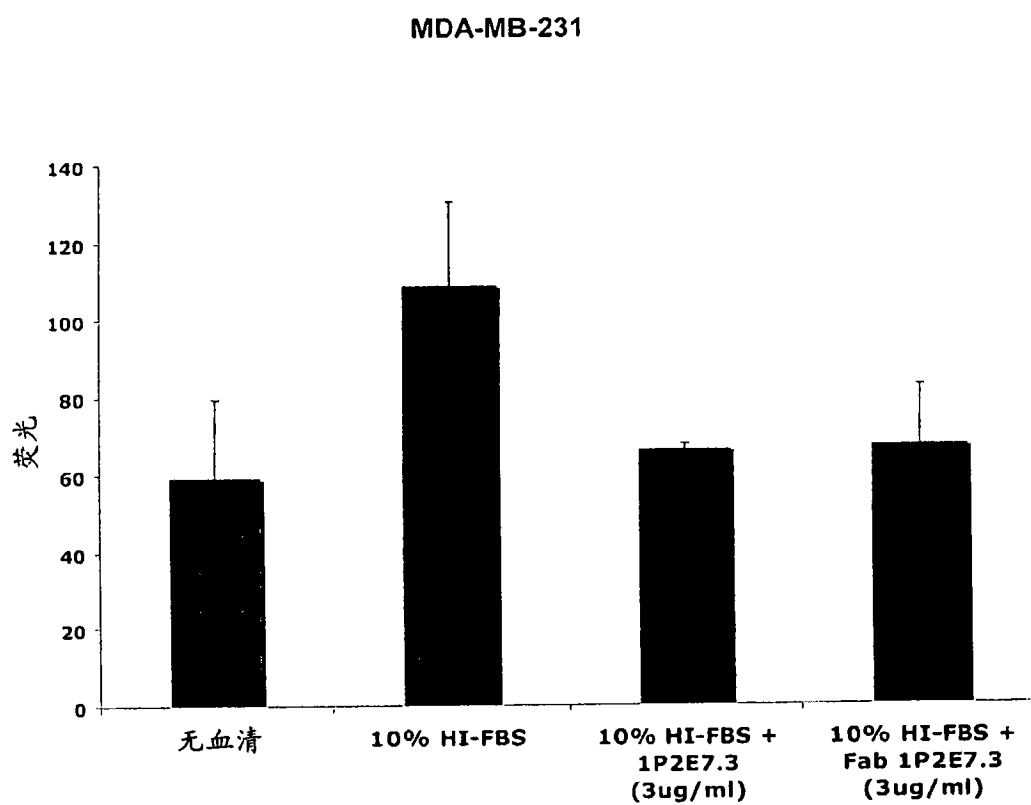
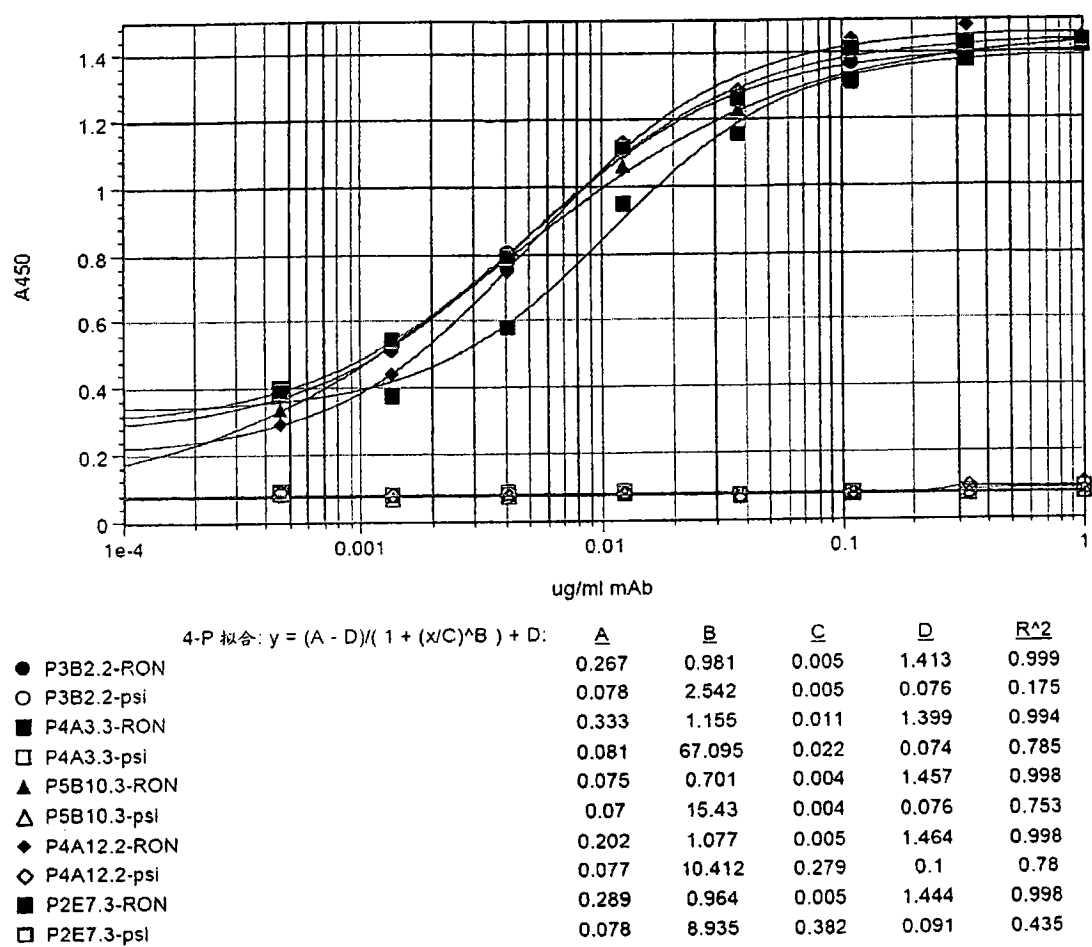


图 14C

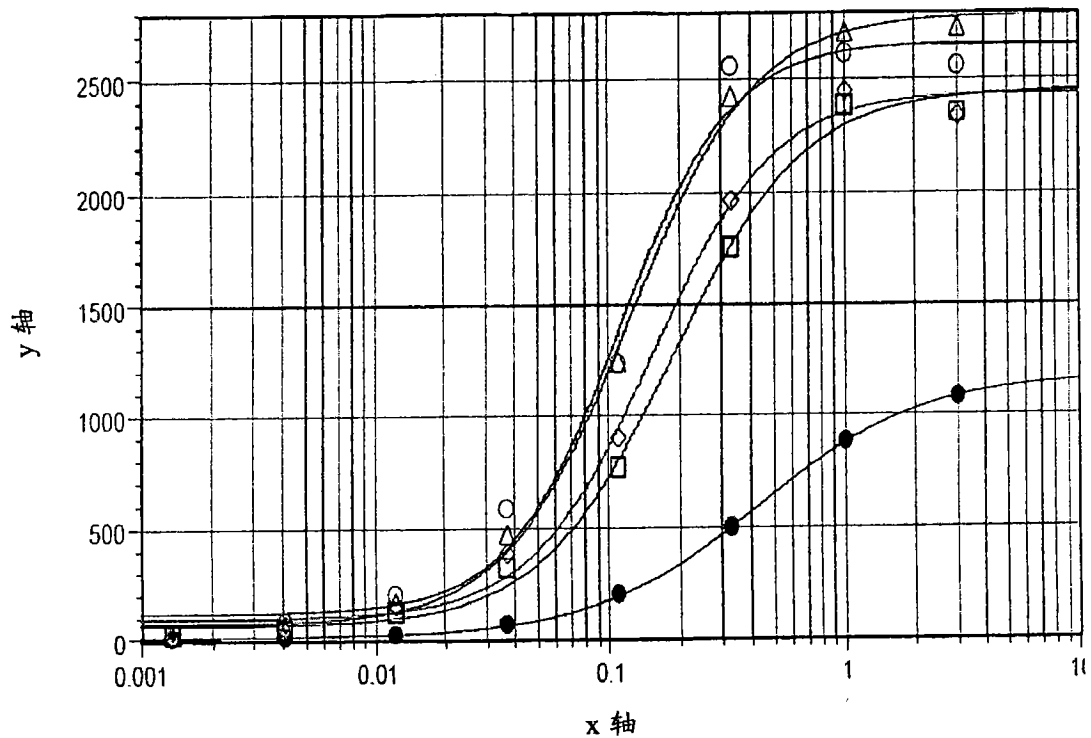


曲线拟合选择-固定加权值: 1

图 15

实验#1

图#1



$$y = ((A - D) / (1 + (x/C)^B)) + D$$

	A	B	C	D	R ²
○ 98E12 (98E12: 浓度相对于数值)	118.09	1.843	0.111	2665.625	0.989
● 15E10 (15E10: 浓度相对于数值)	9.447	1.246	0.428	1180.282	1
◇ 93D02 (93D02: 浓度相对于数值)	94.379	1.701	0.153	2442.88	0.995
△ 96C05 (96C05_2: 浓度相对于数值)	68.785	1.648	0.123	2790.832	0.998
□ 97D03 (97D03: 浓度相对于数值)	62.277	1.557	0.185	2454.191	0.997

图 16

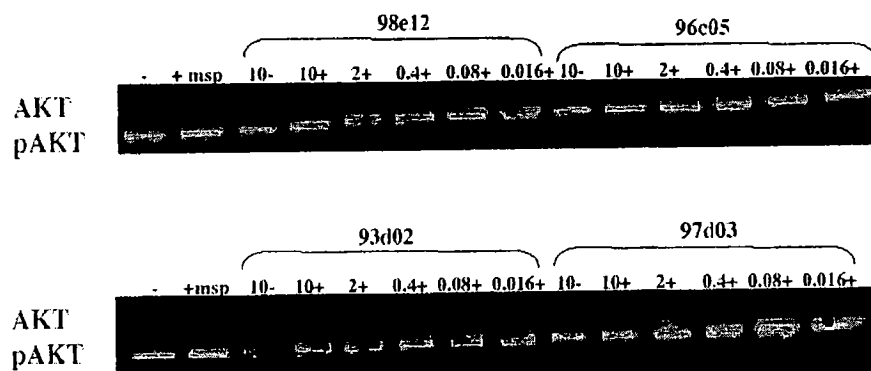


图 17A

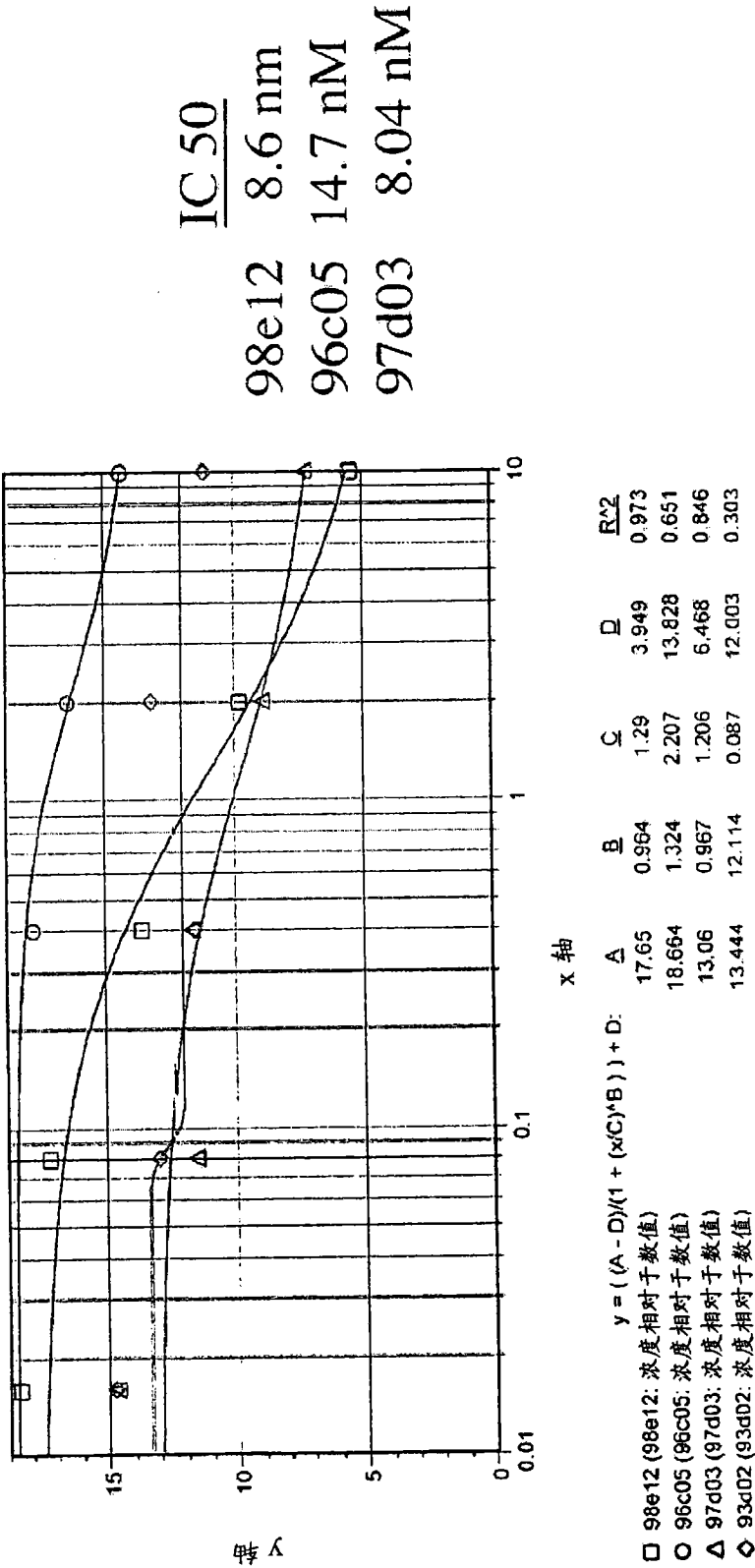
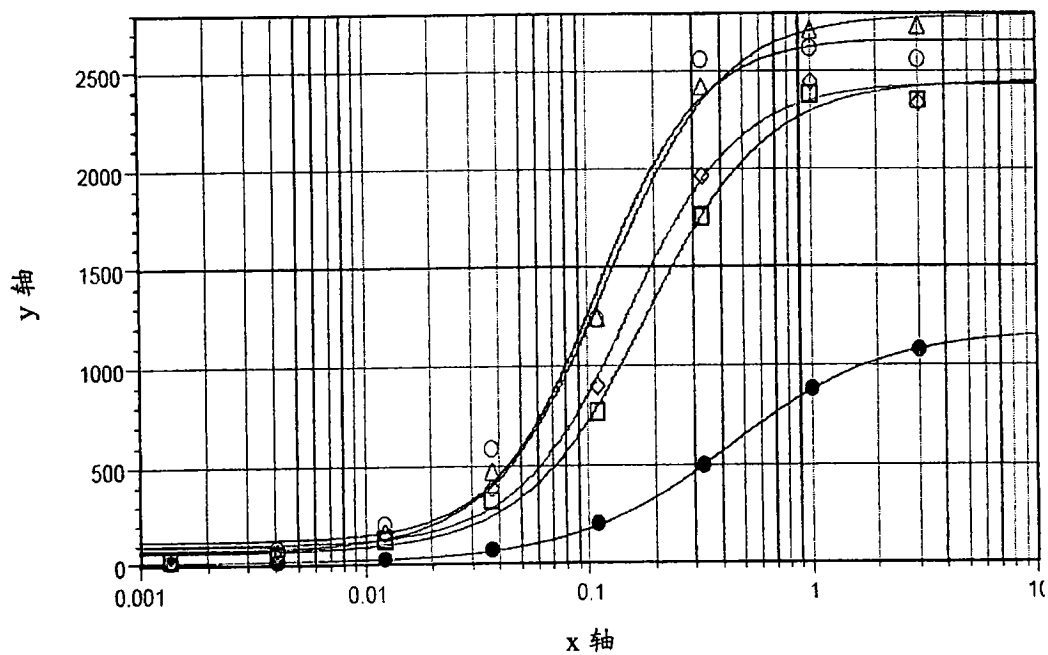


图 17B

实验#1

图#1

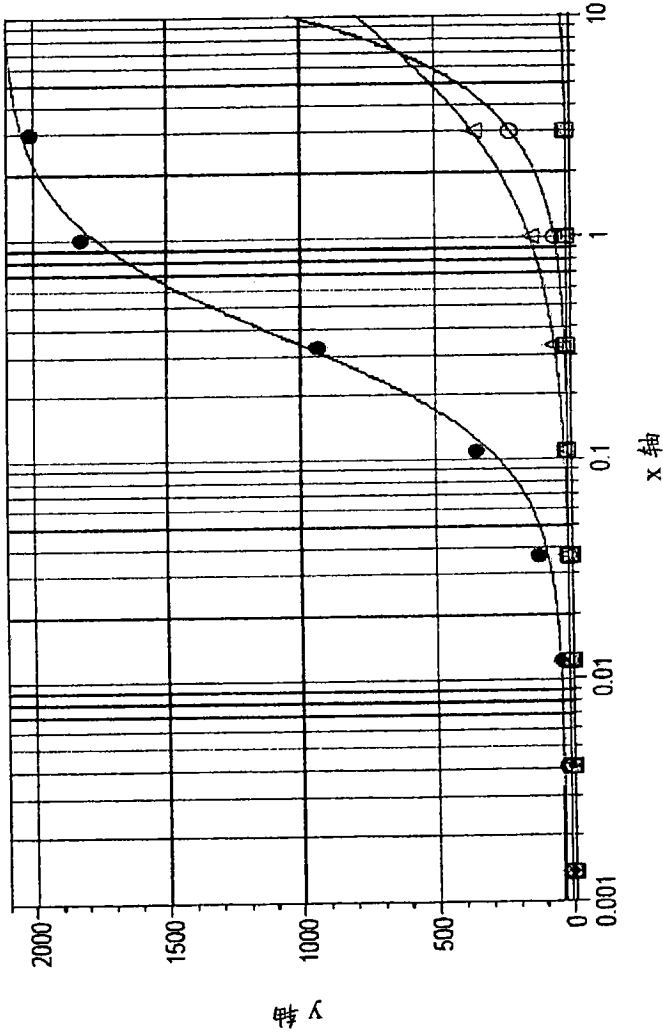


	$y = ((A - D)/(1 + (x/C)^B)) + D$				
	A	B	C	D	R ²
○ 98E12 (98E12: 浓度相对于数值)	118.09	1.843	0.111	2665.625	0.989
● 15E10 (15E10: 浓度相对于数值)	9.447	1.246	0.428	1180.282	1
◇ 93D02 (93D02: 浓度相对于数值)	94.379	1.701	0.153	2442.88	0.995
△ 96C05 (96C05_2: 浓度相对于数值)	68.785	1.648	0.123	2790.832	0.998
□ 97D03 (97D03: 浓度相对于数值)	62.277	1.557	0.185	2454.191	0.997

图 18A

实验#1

图#2



	$\underline{A}$	$\underline{B}$	$\underline{C}$	$\underline{D}$	$\underline{R^2}$
$y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$					
○ 98E12 (98_hu: 浓度相对于数值)	5.891	1.355	93.012	21868.71	0.999
● 15E10 (15_hu: 浓度相对于数值)	31.915	1.59	0.369	2113.498	0.998
◇ 93D02 (93_hu: 浓度相对于数值)	4.083	1.174	301.638	1072.154	0.996
△ 96C05 (96_hu: 浓度相对于数值)	3.265	0.963	12.608	1766.205	1
□ 97D03 (97_hu: 浓度相对于数值)	4.086	1.343	145.978	802.568	0.996

癌症类型	细胞系	RON	增加倍数 pAKT	增加倍数 pERK
肺癌	NCI-H292	+	1.8	
	NCI-H358M	+++	2.57	
	NCI-H322M	++	1.76	6.2
胃癌	AGS	++	2.08	2.3
	NCI-N87	++	0.87	1.2
	Snu-5	+	1.02	1
前列腺癌	Snu-16	+	1.73	1.3
	PC-3	++	5.19	19.3
	DU-145	++	2.5	

癌症类型	细胞系	RON	增加倍数 pAKT	增加倍数 pERK
结肠癌	HT29	+++	5.04	1.8
	SW620	++	-	1.8
	SW480	+++	1.45	1.9
纤维肉瘤	HT1080	-		
	HT1080-RON	++++	10.78	
	BXPC3	+++	3.42	
胰腺癌	HPAF-II	+++	2.71	
	ASPC-1	++	2.03	
	SKOV3	++	1.05	
卵巢癌	MCF10A	++	30.73	1.4
乳腺癌	MDAMB231	+	0.88	
	BT474	+		1.5
	BT474	+/-	0.94	
	MDAMB453	+++	2.42	19.3
	SKBR3	++++	1.57	6.2

图 19

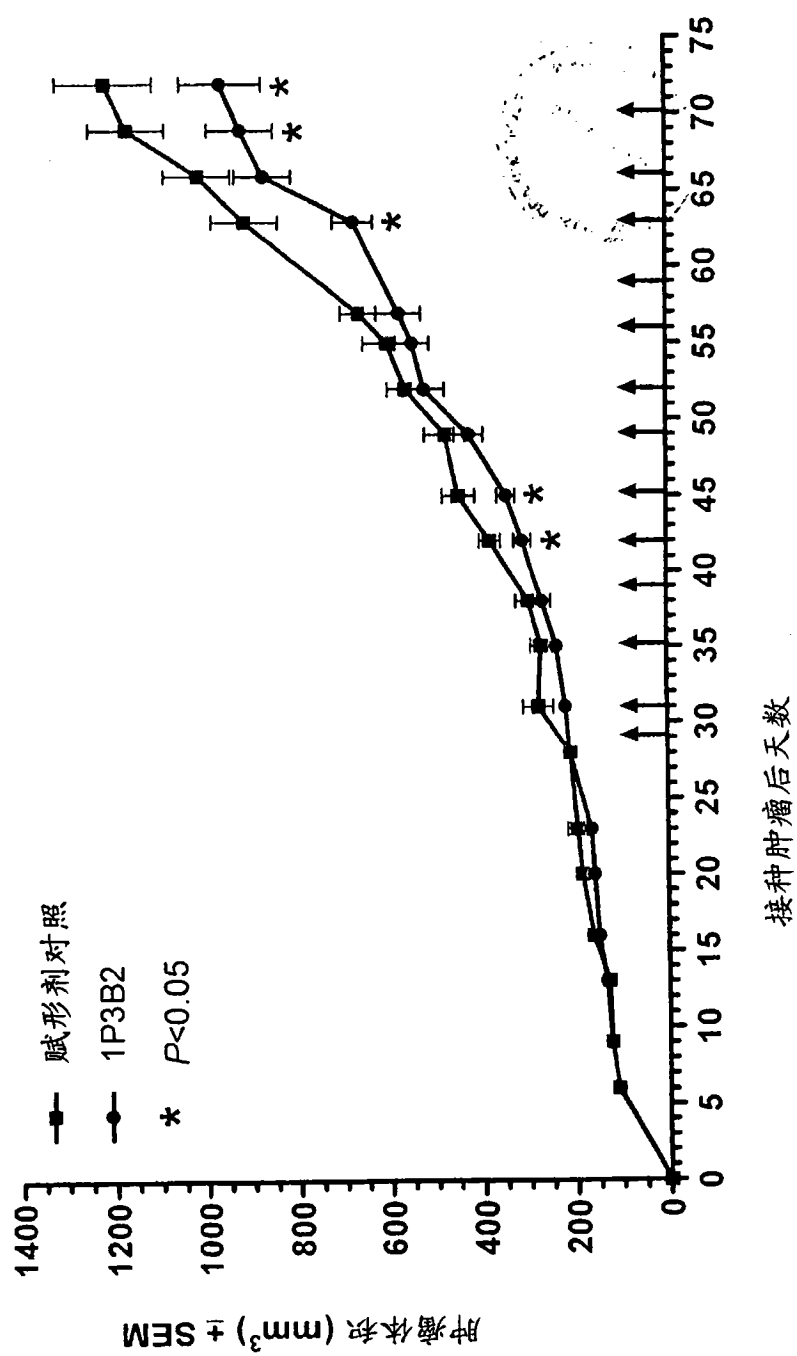


图 20