



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102639564 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 07

(21) 申请号 201080036635. 7

(22) 申请日 2010. 08. 23

(30) 优先权数据

09305777. 6 2009. 08. 21 EP

61/235, 864 2009. 08. 21 US

61/348, 005 2010. 05. 25 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 02. 17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2010/062271 2010. 08. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/020925 EN 2011. 02. 24

(83) 生物保藏信息

CNCM I-4273 2010. 01. 14

CNCM I-3949 2008. 03. 12

(73) 专利权人 皮埃尔法布雷医药公司

地址 法国布洛涅-比扬古

(72) 发明人 L·格奇 A·茹阿诺

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟

(51) Int. Cl.

G07K 16/28 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2007/090807 A1, 2007. 08. 16,

EP 2014681 A1, 2009. 01. 14, 全文.

WO 2009/029591 A2, 2009. 03. 05, 全文.

审查员 赵九永

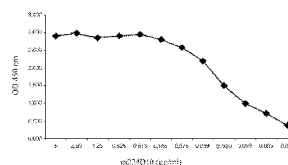
权利要求书3页 说明书31页
序列表17页 附图7页

(54) 发明名称

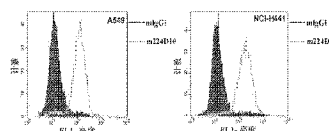
抗-CMET 抗体及其用于癌症的检测和诊断的用途

(57) 摘要

本发明涉及在患者中预后和 / 或诊断增殖性疾病的领域。更为具体地, 本发明涉及能够特异性结合人 cMet 受体的抗体、以及此抗体的氨基酸序列和编码此抗体的核酸序列。本发明同样包括所述抗体用于检测和诊断与 cMet 表达有关的病理性过度增殖性致癌疾病的用途, 以及相应的方法。在某些实施方案中, 所述疾病是与相对于正常提高的 cMet 多肽表达有关的致癌疾病、或者任何与 cMet 过度表达相联系的其它病理。本发明最后还包括产品和 / 或组合物或试剂盒, 其至少包含用于某些癌症的预后或诊断的这种抗体。



1A



1B

1. 一种抗 -c-Met 抗体,其能够特异性结合 c-Met 蛋白,其特征在于其包括:
 - i) 包括至少如下三个根据 IMGT 编号系统所定义的 CDR CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 的重链,其中 CDR-H1 包括序列 SEQ ID No. 55,CDR-H2 包括序列 SEQ ID No. 56,以及 CDR-H3 包括序列 SEQ ID No. 57 ;和
 - ii) 包括至少如下三个根据 IMGT 编号系统所定义的 CDR CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 的轻链,其中 CDR-L1 包括序列 SEQ ID No. 58,CDR-L2 包括序列 SEQ ID No. 59 以及 CDR-L3 包括序列 SEQ ID No. 60。
2. 根据权利要求 1 所述的抗 -c-Met 抗体,其特征在于其包括选自如下的重链:
 - a) 包括如下三个根据 IMGT 编号系统所定义的 CDR 的重链,分别地,具有序列 SEQ ID No. 7 的 CDR-H1,具有序列 SEQ ID No. 2 的 CDR-H2,以及具有序列 SEQ ID No. 8 的 CDR-H3 ;以及
 - b) 包括如下三个根据 IMGT 编号系统所定义的 CDR 的重链,分别地,具有序列 SEQ ID No. 29 的 CDR-H1,具有序列 SEQ ID No. 30 的 CDR-H2,以及具有序列 SEQ ID No. 31 的 CDR-H3。
3. 根据权利要求 1 所述的抗 -c-Met 抗体,其特征在于其包括选自如下的轻链:
 - a) 包括如下三个根据 IMGT 编号系统所定义的 CDR 的轻链,分别地,具有序列 SEQ ID No. 4 的 CDR-L1,具有序列 SEQ ID No. 5 的 CDR-L2,以及具有序列 SEQ ID No. 6 的 CDR-L3 ;以及
 - b) 包括如下三个根据 IMGT 编号系统所定义的 CDR 的轻链,分别地,具有序列 SEQ ID No. 32 的 CDR-L1,具有序列 SEQ ID No. 33 的 CDR-L2,以及具有序列 SEQ ID No. 34 的 CDR-L3。
4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的抗 -c-Met 抗体,其特征在于其选自如下:
 - a) 抗体,包括:
 - 包括如下三个根据 IMGT 所定义的 CDR 的重链,分别地,具有序列 SEQ ID No. 7 的 CDR-H1,具有序列 SEQ ID No. 2 的 CDR-H2 以及具有序列 SEQ ID No. 8 的 CDR-H3 ;以及
 - 包括如下三个根据 IMGT 所定义的 CDR 的轻链,分别地,具有序列 SEQ ID No. 4 的 CDR-L1,具有序列 SEQ ID No. 5 的 CDR-L2 以及具有序列 SEQ ID No. 6 的 CDR-L3 ;以及
 - b) 抗体,包括:
 - 包括如下三个根据 IMGT 所定义的 CDR 的重链,分别地,具有序列 SEQ ID No. 29 的 CDR-H1,具有序列 SEQ ID No. 30 的 CDR-H2 以及具有序列 SEQ ID No. 31 的 CDR-H3 ;以及
 - 包括如下三个根据 IMGT 所定义的 CDR 的轻链,分别地,具有序列 SEQ ID No. 32 的 CDR-L1,具有序列 SEQ ID No. 33 的 CDR-L2 以及具有序列 SEQ ID No. 34 的 CDR-L3。
5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的抗 -c-Met 抗体,其特征在于其选自如下:
 - a) 抗体,包括包含氨基酸序列 SEQ ID No. 13 的重链可变结构域序列和包含氨基酸序列 SEQ ID No. 14 的轻链可变结构域序列 ;以及
 - b) 抗体,包括包含氨基酸序列 SEQ ID No. 40 的重链可变结构域序列和包含氨基酸序列 SEQ ID No. 41 的轻链可变结构域序列。
6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的抗 -c-Met 抗体,其特征在于其是鼠科抗体。
7. 根据权利要求 1-6 中任一项的所述抗 -c-Met 抗体,其特征在于其不阻断配体 HGF 对 c-Met 蛋白的结合。
8. 一种鼠科杂交瘤,其能够分泌如权利要求 1-7 任一项所述的抗 -c-Met 抗体,所述鼠

科杂交瘤选自于 2008 年 3 月 12 日保藏于 CNCM, 法国巴黎巴斯德研究所, 号码为 I-3949 以及于 2010 年 01 月 14 日保藏于 CNCM, 法国巴黎巴斯德研究所, 号码为 I-4273 的杂交瘤。

9. 一种分离的核酸, 其特征在于其选自如下核酸:

- a) 编码如权利要求 1-7 任一项所要求的抗 -c-Met 抗体的核酸, DNA 或 RNA;
- b) a) 中所定义的核酸所对应的 RNA 核酸;
- c) a) 中所定义的核酸的互补核酸。

10. 权利要求 1 至 7 任一项所述的抗 -c-Met 抗体在制备用于体外诊断和 c-Met 表达有关的致癌疾病、或用于体外确定发展和 c-Met 表达有关的致癌疾病的预后的试剂盒中的用途。

11. 权利要求 1 至 7 任一项所述的抗 -c-Met 抗体在制备用于体外检测受试者中 c-Met 表达肿瘤的存在和 / 或位点的试剂盒中的用途, 其中所述用途包括:

- (a) 用如权利要求 1 至 7 中任一项所述的抗 -c-Met 抗体接触来自受试者的样本, 以及
- (b) 检测所述抗 -c-Met 抗体和样本的结合。

12. 权利要求 1 至 7 任一项所述的抗 -c-Met 抗体在制备用于体外确定来自受试者的 c-Met 表达肿瘤中 c-Met 表达水平的试剂盒中的用途, 其中所述用途包括:

- (a') 用如权利要求 1 至 7 任一项所述的抗 -c-Met 抗体接触来自受试者的样本, 以及
- (b') 定量确定抗 -c-Met 抗体在所述样本中结合 c-Met 的水平。

13. 根据权利要求 12 所述的用途, 其中通过免疫组织化学测量 c-Met 表达水平。

14. 权利要求 1 至 7 任一项所述的抗 -c-Met 抗体在制备用于体外诊断受试者中 c-Met 表达肿瘤或体外确定患者中发展 c-Met 表达肿瘤的预后的试剂盒中的用途, 其中所述用途包括:

- (i) 根据权利要求 12 确定 c-Met 表达水平, 以及
- (ii) 比较步骤 (i) 的表达水平和来自正常组织的 c-Met 的参考表达水平。

15. 权利要求 1 至 7 任一项所述的抗 -c-Met 抗体在制备用于体外确定受试者的肿瘤 c-Met 等级的试剂盒中的用途, 其中所述用途包括:

- (1) 根据权利要求 12 确定 c-Met 表达水平, (2) 为所述肿瘤 c-Met 表达水平评分, 以及
- (3) 比较所述评分和获自对照样本的评分。

16. 根据权利要求 15 所述的用途, 其中所述评分包括使用基于两个参数的适当等级, 其中所述两个参数是染色强度和阳性细胞百分比。

17. 根据权利要求 16 所述的用途, 其中所述适当等级是 0 至 3⁺ 的等级, 其中没有肿瘤细胞膜反应性得分为 0, 在 10% 以上肿瘤细胞中强烈完整的反应性得分为 3⁺。

18. 根据权利要求 17 所述的用途, 其中所述适当等级是 0 至 3⁺ 的等级, 其中没有肿瘤细胞膜反应性得分为 0; 在 10% 以上肿瘤细胞中微弱察觉的膜反应性得分为 1⁺; 在 10% 以上肿瘤细胞中从弱到中等完整的膜反应性得分为 2⁺; 以及在 10% 以上肿瘤细胞中强烈完整的反应性得分为 3⁺。

19. 根据权利要求 17 或 18 所述的用途, 其中所述肿瘤是得分为 2⁺ 或 3⁺ 的 c-Met (+)。

20. 权利要求 1 至 7 任一项所述的抗 -c-Met 抗体在制备用于确定致癌疾病对用抗 -c-Met 抗体的治疗是否敏感的试剂盒中的用途, 其中所述用途包括:

- (a) 根据权利要求 19 体外确定受试者的肿瘤 c-Met 等级, 以及

(b) 如果等级是 c-Met (+), 确定致癌疾病对用抗 -c-Met 抗体的治疗敏感。

21. 一种包括至少如权利要求 1 至 7 任一项所述的抗 -c-Met 抗体的试剂盒, 所述抗 -c-Met 抗体是经标记的。

22. 根据权利要求 21 所述的试剂盒, 其用于在受试者中体外检测 c-Met 表达肿瘤的存在和 / 或位点, 所述试剂盒还包括用于检测所述抗 -c-Met 抗体和 c-Met 之间结合范围的试剂。

23. 根据权利要求 21 所述的试剂盒, 其用于在 c-Met 表达肿瘤中体外确定 c-Met 的表达水平, 所述试剂盒还包括用于定量所述抗 -c-Met 抗体和 c-Met 之间结合水平的试剂。

24. 根据权利要求 21 或 22 所述的试剂盒, 其用于体外确定肿瘤的 c-Met 等级, 所述试剂盒还包括:

- i) 用于检测所述抗 -c-Met 抗体和 c-Met 之间结合范围的试剂; 以及
- ii) 用于 c-Met 表达水平评分的阳性和阴性对照样本。

25. 根据权利要求 24 的试剂盒, 其用于体外确定肿瘤的 c-Met 等级, 所述试剂盒还包括专门针对鼠科抗体的多克隆抗体。

26. 根据权利要求 25 的试剂盒, 其中所述专门针对鼠科抗体的多克隆抗体是经标记的。

抗 -cMET 抗体及其用于癌症的检测和诊断的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及在患者中预后和 / 或诊断增殖性疾病的领域。更为具体地,本发明涉及能够特异性结合人 cMet 受体的新型抗体、以及此抗体的氨基酸序列和编码此抗体的核酸序列。本发明同样包括所述抗体用于检测和诊断与 cMet 表达有关的病理性过度增殖性致癌疾病的用途,以及相应的方法。在某些实施方案中,所述疾病是与相对于正常提高的 cMet 多肽表达有关的致癌疾病、或者任何与 cMet 过度表达相联系的其它病理。本发明最后还包括产品和 / 或组合物或试剂盒,其至少包含用于某些癌症预后或诊断的这种抗体。

背景技术

[0002] 受体酪氨酸激酶 (RTK) 靶向的药物,比如曲妥珠单抗、西妥昔单抗、贝伐单抗、伊马替尼和吉非替尼抑制剂,已显示出对靶向此类蛋白质用于治疗某些癌症的兴趣。

[0003] cMet, RTK 亚家族的原型成员,所述亚家族还包括 RON 和 SEA。所述 cMetRTK 亚家族结构上不同于其它 RTK 家族,是唯一已知的肝细胞生长因子 (HGF) 的高亲和性受体,也作离散因子 (SF)。(D. P. Bottaro 等, Science 1991,251,802-804 ;L. Naldini 等人, Eur. Mol. Biol. Org. J. 1991,10 :2867-2878)。cMet 和 HGF 广泛表达于多种组织,通常其表达分别限于上皮和间充质来源的细胞 (M. F. Di Renzo 等人, Oncogene 1991,6 :1997-2003 ; E. Sonnenberg 等人, J. Cell. Biol. 1993,123 :223-235)。他们都是哺乳动物正常发育所需要的,在细胞迁移、形态分化、和三维小管结构的组织以及生长和血管生成方面显得尤其重要 (F. Balducci 等人, Nature 1995,376 :768-771 ;C. Schmidt 等人, Nature. 1995 :373 :699-702 ;Tsarfaty 等, Science 1994,263 :98-101)。然而,cMet 和 HGF 的受控调节在哺乳动物发育、组织的维持和修复中显得重要 (Nagayama T, Nagayama M, Kohara S, Kamiguchi H, Shibuya M, Katoh Y, Itoh J, Shinohara Y., Brain Res. 2004,5 :999(2) :155-66 ;Tahara Y, Ido A, Yamamoto S, Miyata Y, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H., J Pharmacol Exp Ther. 2003,307(1) :146-51),其失调与癌症进展有关。

[0004] 不适当的 cMet 激活导致的异常信号驱动是人类癌症中观察到的最频繁的变化之一,并在肿瘤发生和肿瘤转移中发挥重要作用 (Birchmeier 等人, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003,4 :915-925 ;L. Trusolino and Comoglio P. M., Nat Rev. Cancer. 2002,2(4) :289-300)。

[0005] 可通过配体依赖性和非依赖性机制引发不适当的 cMet 激活,其包括 cMet 的过度表达、和 / 或旁分泌或自分泌激活、或通过功能获得突变 (J. G. Christensen, Burrows J. 和 Salgia R., Cancer Letters. 2005,226 :1-26)。然而,存在或不存在配体,需要 cMet 受体的低聚反应来调节激酶对 ATP 和含酪氨酸的肽底物的结合亲和性和结合动力学 (Hays JL, Watowich SJ, Biochemistry, 2004Aug 17,43 :10570-8)。激活的 cMet 召集信号效应分子至其位于细胞质结构域的多停靠位点,导致多种关键信号通路的激活,包括 Ras-MAPK、PI3K、Src 和 Stat3 (Gao CF, Vande Woude GF, Cell Res. 2005,15(1) :49-51 ;Furge KA, Zhang YW, Vande Woude G F, Oncogene. 2000,19(49) :5582-9)。这些通路对于肿瘤细胞

增殖、侵入和血管生成以及躲避细胞凋亡是必需的 (Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, *Oncogene*, 2000, 19(49) :5582-9 ;Gu H, Neel BG, *Trends Cell Biol.* 2003Mar, 13(3) : 122-30 ;Fan S, Ma YX, Wang JA, Yuan RQ, Meng Q, Cao Y, Laterra JJ, Goldberg ID, Rosen EM, *Oncogene*. 2000Apr 27, 19(18) :2212-23)。此外,相对于其它 RTK, cMet 信号的独特方面在于其被报道和局部粘着复合物和非激酶结合伙伴 (partner) 比如 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白 (Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM, *Cell*. 2001, 107 :643-54)、CD44v6 (Van der Voort R, TaherTE, Wielenga VJ, Spaargaren M, Prevo R, Smit L, David G, Hartmann G, Gherardi E, Pals ST, *J Biol Chem*. 1999, 274(10) :6499-506)、Plexin B1 或脑信号蛋白 (Giordano S, Corso S, Conrotto P, Artigiani S, Gilestro G, Barberis D, Tamagnone L, Comoglio PM, *Nat Cell Biol*. 2002, 4(9) :720-4 ;Conrotto P, Valdembri D, Corso S, Serini G, Tamagnone L, Comoglio PM, Bussolino F, Giordano S, *Blood*. 2005, 105(11) : 4321-9 ;Conrotto P, Corso S, Gamberini S, Comoglio PM, Giordano S, *Oncogene*. 2004, 23 :5131-7) 相互作用,可通过此受体进一步增加细胞功能调节的复杂性。最后,最近的数据说明 cMet 可参与肿瘤对吉非替尼或厄洛替尼的抗性,这表明靶向 EGFR 和 cMet 的化合物的组合可能尤其受到关注 (Engelman JA 等人, *Science*, 2007, 316 :1039-43)。

[0006] 在过去的几年里,已经发展出很多不同的策略来减弱 cMet 在癌细胞系中的信号。这些策略包括 i) 中和抗 cMet 或 HGF/SF 的抗体 (Cao B, Su Y, Oskarsson M, Zhao P, Kort EJ, Fisher RJ, Wang LM, Vande Woude GF, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001, 98(13) :7443-8 ;Martens T, Schmidt NO, Eckerich C, Fillbrandt R, Merchant M, Schwall R, Westphal M, Lamszus K, *Clin Cancer Res*. 2006, 12(20) :6144-52) 或使用 HGF/SF 拮抗剂 NK4 来防止配体结合至 cMet (Kuba K, Matsumoto K, Date K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T, *Cancer Res.*, 2000, 60 :6737-43), ii) 对 cMet 的小 ATP 结合位点抑制剂,其阻断激酶的活性 (Christensen JG, Schreck R, Burrows J, Kuruganti P, Chan E, Le P, Chen J, Wang X, Ruslim L, Blake R, Lipson KE, Ramphal J, Do S, Cui JJ, Cherrington JM, Mendel DB, *Cancer Res*. 2003, 63 :7345-55), iii) 干扰接近多停靠位点的工程 SH2 结构域多肽,以及降低受体或配体表达的 RNAi 或核酶。大多数这些方法显示出 cMet 的选择性抑制,导致肿瘤抑制并表明 cMet 在癌症中的治疗性干预可受到关注。

[0007] 本发明目的在于提供至少一种可用作诊断或预后生物标志物的试剂,其以用于检测和 / 或监测致癌疾病,尤其是那些特征在于 cMet 表达或那些异常 cMet 表达介导的致癌性疾病。

[0008] 之前尚未报道过开发可用作诊断或预后工具的有价值的抗体的尝试。此处所述的是满足此原则的新型抗体。

发明内容

[0009] 通过如下详细的描述和实施例,本发明的其它特征和优点将变得清楚。

[0010] 第一方面,本发明的受试者是分离的抗体、或其功能片段或衍生物之一,其以高度的亲和性结合至 cMet 受体 (cMet) 优选人类 cMet,并可因此用于诊断由 cMet 表达介导的病理性过度增殖致癌疾病的方法。

[0011] 所述表达“功能片段和 / 或衍生物”将随后在本说明书中详细定义。

[0012] 此处必须了解,本发明不涉及天然形式的抗体,就是说他们不处于其天然环境中,但他们能够自天然来源通过纯化分离或获得、或者通过遗传重组、或者通过化学合成获得,然后他们可以包含非天然氨基酸,正如将在此后描述。

[0013] 更加具体地,根据本发明的另一方面,涉及能够特异性结合至 cMet 的分离的抗体、或其功能片段或衍生物之一的权利,其尤其能够结合 cMet,所述抗体特征在于其包括至少一个选自包括氨基酸序列 SEQ ID No. 1 至 12 或 29 至 39 的 CDR 的互补决定区 (CDR),或者包括至少一个最佳比对之后其序列和序列 1 至 12 或 29 至 39 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的 CDR。

[0014] 抗体的“功能片段”表示,尤其是,抗体片段,比如片段 Fv、scFv(sc = 简单链)、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fc 或双特异抗体、或任何半衰期延长的片段。本说明书中将随后详细描述这种功能片段。

[0015] 抗体的“衍生化合物”或“衍生物”表示,尤其是,由肽支架和为了保留其被识别的能力的至少一个原始抗体 CDR 组成的结合蛋白。这种本领域技术人员公知的衍生化合物,将随后在本说明书中详细描述。

[0016] 更优选,本发明包括根据本发明通过遗传重组或化学合成获得的抗体、其衍生化合物或其功能片段。

[0017] 根据优选实施方案,本发明的抗体、或其衍生化合物或功能片段,特征在于其由单克隆抗体组成。

[0018] “单克隆抗体”理解为表示来自早期同种抗体群的抗体。更具体地,除了以最小比例可以发现的少数可能天然存在的突变外,群的各个抗体是一致的。换言之,单克隆抗体由来自单细胞克隆(例如杂交瘤、转染有编码同种抗体的 DNA 分子的真核宿主细胞、转染有编码同种抗体的 DNA 分子的原核宿主细胞等)生长的同种抗体组成,通常其由一类且仅一类及亚类的重链和仅一种类型的轻链表征。单克隆抗体是高度特异性的,并针对单一抗原。此外,和制备多克隆抗体(其通常包括针对多种决定簇、或表位的多种抗体)对比,各单克隆抗体针对单个抗原表位。

[0019] 此处必须了解,本发明不涉及天然形式的抗体,即,他们不取自其天然环境,但他们通过自天然来源纯化分离或获得、或者通过遗传重组或者通过化学合成获得,因此他们可以带有非天然氨基酸,正如将在此后描述的。

[0020] 在本发明的第一和优选实施方案中,将根据 IMGT 编号系统定义抗体的 CDR。

[0021] 无论抗原受体、链的类型、或物种如何,IMGT 独特编号限于用来比较可变结构域(Lefranc M. -P., Immunology Today 18,509(1997)/Lefranc M. -P., TheImmunologist, 7,132-136(1999)/Lefranc, M. -P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. 和 Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27,55-77(2003))。在 IMGT 独特编号中,保守的氨基酸总是具有相同的位点,例如半胱氨酸 23(第一 -CYS)、色氨酸 41(保守的 -TRP)、疏水氨基酸 89、半胱氨酸 104(第二 -CYS)、苯丙氨酸或色氨酸 118(J-PHE 或 J-TRP)。IMGT 独特编号提供框架区的标准界限(FR1-IMGT:位点 1 至 26、FR2-IMGT:39 至 55、FR3-IMGT:66 至 104 以及 FR4-IMGT:118 至 128)以及互补决定区的标准界限:CDR1-IMGT:27 至 38、CDR2-IMGT:56 至 65 以及 CDR3-IMGT:105 至 117。正如间隔代表未占据的位点,CDR-IMGT 长度(显示于括号之间,并由点隔开,如(8.8.13))成为重要

的信息。在二维图示中使用 IMGT 独特编号,指定为 IMGT Colliers de Perles(Ruiz,M. 和 Lefranc,M.-P., Immunogenetics,53,857-883(2002)/Kaas,Q. 和 Lefranc,M.-P., Current Bioinformatics,2,21-30(2007)),以及三维结构于 IMGT/3D 结构-DB 中(Kaas,Q., Ruiz,M. 和 Lefranc,M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res.,32, D208-D210(2004))。

[0022] 存在三个重链 CDR 和三个轻链 CDR。术语 CDR 此处用于表示,根据情况,一个或多个、或甚至全部这些区,所述区含有大部分和结合有关的氨基酸残基,其中所述结合是通过抗体对其识别的抗原或表位的亲和性。

[0023] 更具体地,根据第一方面,本发明涉及能够特异性结合 c-Met 蛋白的分离的抗体、或其功能片段或衍生物,其包括 i) 包括至少如下根据 IMGT 编号系统所定义的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 之一的重链,其中 CDR-H1 包括序列 SEQ ID No. 55, CDR-H2 包括序列 SEQ ID No. 56,以及 CDR-H3 包括序列 SEQ ID No. 57;和/或 ii) 包括至少如下根据 IMGT 编号系统所定义的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 之一的轻链,其中 CDR-L1 包括序列 SEQ ID No. 58, CDR-L2 包括序列 SEQ ID No. 59 以及 CDR-L3 包括序列 SEQ ID No. 60。

[0024] 在优选实施方案中,本发明涉及分离的抗体、或其功能片段或衍生物,其能够特异性结合 c-Met 蛋白,特征在于其包括 i) 包括至少如下三个根据 IMGT 编号系统所定义的 CDR CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 的重链,其中 CDR-H1 包括序列 SEQ ID No. 55, CDR-H2 包括序列 SEQ ID No. 56,以及 CDR-H3 包括序列 SEQ ID No. 57;和/或 ii) 包括至少如下三个根据 IMGT 编号系统所定义的 CDR CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 的轻链,其中 CDR-L1 包括序列 SEQ ID No. 58, CDR-L2 包括序列 SEQ ID No. 59 以及 CDR-L3 包括序列 SEQ ID No. 60。

[0025] 为了清楚,本发明的一致序列 SEQ ID No. 55 至 60 总结于下表 1。

[0026] 表 1

[0027]

	SEQ ID No.	序列 (IMGT)
CDR-H1	55	GYX ₁ X ₂ TSX ₃ YX ₄
CDR-H2	56	INX ₅ X ₆ X ₇ GX ₈ X ₉
CDR-H3	57	X ₁₀ RX ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ Y
CDR-L1	58	X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ Y
CDR-L2	59	X ₂₃ X ₂₄ S
CDR-L3	60	QQX ₂₅ NSX ₂₆ PX ₂₇ T

[0028] 其中:

[0029] X₁:S 或 T X₂:I 或 F X₃:A 或 - X₄:F 或 W

[0030] X₅:Y 或 P X₆:D 或 S X₇:- 或 N X₈:T 或 R

[0031] X₉:N 或 T X₁₀:T 或 A X₁₁:D 或 R X₁₂:R 或 V

[0032] X₁₃:T 或 G X₁₄:F 或 Y X₁₅:A 或 L X₁₆:- 或 M

[0033] X_{17} : - 或 D X_{18} : Q 或 - X_{19} : R 或 S X_{20} : I 或 S

[0034] X_{21} : Y 或 V X_{22} : N 或 S X_{23} : Y 或 D X_{24} : A 或 T

[0035] X_{25} : S 或 W X_{26} : W 或 N X_{27} : L 或 P

[0036] “-”表示“缺失”(此位点氨基酸残基删除)

[0037] 根据具体实施方案,本发明的抗体、或其功能片段或衍生物之一,特征在于其包括包含如下三个根据 IMGT 所定义的 CDR(分别为 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3)的重链,其中 CDR-H1 包括序列 SEQ ID No. 7, CDR-H2 包括序列 SEQ ID No. 2, 以及 CDR-H3 包括序列 SEQ ID No. 8。

[0038] 根据具体实施方案,本发明的抗体、或其功能片段或衍生物之一,特征在于其包括包含如下三个根据 IMGT 所定义的 CDR(分别为 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3)的轻链,其中 CDR-L1 包括序列 SEQ ID No. 4, CDR-L2 包括序列 SEQ ID No. 5, 以及 CDR-L3 包括序列 SEQ ID No. 6。

[0039] 根据具体实施方案,本发明的抗体、或其功能片段或衍生物之一,特征在于其包括包含如下三个根据 IMGT 编号系统所定义的 CDR(分别为 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3)的重链,其中 CDR-H1 包括序列 SEQ ID No. 29, CDR-H2 包括序列 SEQ ID No. 30, 以及 CDR-H3 包括序列 SEQ ID No. 31。

[0040] 根据具体实施方案,本发明的抗体、或其功能片段或衍生物之一,特征在于其包括包含如下三个根据 IMGT 编号系统所定义的 CDR(分别为 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3)的轻链,其中 CDR-L1 包括序列 SEQ ID No. 32, CDR-L2 包括序列 SEQ ID No. 33, 以及 CDR-L3 包括序列 SEQ ID No. 34。

[0041] 换言之,本发明还可以描述为抗体、或其功能片段或衍生物,特征在于其包括选自如下的重链:

[0042] a) 包含如下三个根据 IMGT 编号系统所定义的 CDR 的重链,分别地,具有序列 SEQ ID No. 7 的 CDR-H1,具有序列 SEQ ID No. 2 的 CDR-H2,以及具有序列 SEQ ID No. 8 的 CDR-H3; 以及 b) 包含如下三个根据 IMGT 编号系统所定义的 CDR 的重链,分别地,具有序列 SEQ ID No. 29 的 CDR-H1,具有序列 SEQ ID No. 30 的 CDR-H2,以及具有序列 SEQ ID No. 31 的 CDR-H3。

[0043] 本发明还可以描述为抗体、或其功能片段或衍生物,特征在于其包括选自如下的轻链:

[0044] a) 包含如下三个根据 IMGT 编号系统所定义的 CDR 的轻链,分别地,具有序列 SEQ ID No. 4 的 CDR-L1,具有序列 SEQ ID No. 5 的 CDR-L2,以及具有序列 SEQ ID No. 6 的 CDR-L3; 以及 b) 包含如下三个根据 IMGT 编号系统所定义的 CDR 的轻链,分别地,具有序列 SEQ ID No. 32 的 CDR-L1,具有序列 SEQ ID No. 33 的 CDR-L2,以及具有序列 SEQ ID No. 34 的 CDR-L3。

[0045] 在另一个实施方案中,互补决定区、或 CDR 表示如 Kabat 等人定义的免疫球蛋白的重链和轻链的高度可变区(Kabat 等人, Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., U. S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, 及其随后的版本)。有三个重链 CDR 和三个轻链 CDR。此处,术语“CDR”用于表示,取决于具体情况,一种或更多种、或甚至所有区,所述区含有大部分和结合有关的氨基酸残基,其中所述结合是通过抗体对其识别的抗原或表位的亲和性。

[0046] 根据另一个具体实施方案,本发明的抗体、或其功能片段或衍生物之一,特征在于

其包括包含如下三个根据 Kabat 编号系统所定义的 CDR (分别为 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3) 的重链,其中 CDR-H1 包括序列 SEQ ID No. 9, CDR-H2 包括序列 SEQ ID No. 10,以及 CDR-H3 包括序列 SEQ ID No. 3。

[0047] 根据另一个具体实施方案,本发明的抗体、或其功能片段或衍生物之一,特征在于其包括包含如下三个根据 Kabat 编号系统所定义的 CDR (分别为 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3) 的轻链,其中 CDR-L1 包括序列 11, CDR-L2 包括序列 12,以及 CDR-H3 包括序列 6。

[0048] 根据另一个具体实施方案,本发明的抗体、或其功能片段或衍生物之一,特征在于其包括包含如下三个根据 Kabat 编号系统所定义的 CDR (分别为 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3) 的重链,其中 CDR-H1 包括序列 SEQ ID No. 35, CDR-H2 包括序列 SEQ ID No. 36,以及 CDR-H3 包括序列 SEQ ID No. 37。

[0049] 根据另一个具体实施方案,本发明的抗体、或其功能片段或衍生物之一,特征在于其包括包含如下三个根据 Kabat 编号系统所定义的 CDR (分别为 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3) 的轻链,其中 CDR-L1 包括序列 SEQ ID No. 38, CDR-L2 包括序列 SEQ ID No. 39,以及 CDR-H3 包括序列 SEQ ID No. 34。

[0050] 另一种定义根据本发明抗体 CDR 的方法可以包括根据 IMGT 和 Kabat 确定各 CDR 的常见残基。

[0051] 根据另一个实施方案,本发明的抗体、或其功能片段或衍生物之一,特征在于其包括包含序列 SEQ ID No. 1、2 或 3 三个 CDR 中的至少一个的重链,或者包括至少一个最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 1、2 或 3 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列。

[0052] 更具体地,本发明的抗体、或其功能片段或衍生物之一,特征在于其包括包含序列 SEQ ID No. 4、5 或 6 三个 CDR 中的至少一个的轻链,或者包括至少一个最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 4、5 或 6 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列。

[0053] 在优选方式中,本发明的抗体、或其功能片段或衍生物之一,特征在于其包括包含如下三个 CDR (分别为 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3) 的重链,其中:

[0054] -CDR-H1 包括序列 SEQ ID No. 1、7、9、29、或 35,或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 1、7、9、29、或 35 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列;

[0055] -CDR-H2 包括序列 SEQ ID No. 2、10、30 或 36,或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 2、10、30 或 36 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列;以及

[0056] -CDR-H3 包括序列 SEQ ID No. 3、8、31 或 37,或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 3、8、31 或 37 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列。

[0057] 甚至更具体地,本发明的抗体、或其功能片段或衍生物之一,特征在于其包括包含如下三个 CDR (分别为 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3) 的轻链,其中:

[0058] -CDR-L1 包括序列 SEQ ID No. 4、11、32、或 38,或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 4、11、32、或 38 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列;

[0059] -CDR-L2 包括序列 SEQ ID No. 5、12、33 或 39,或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 5、12、33 或 39 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列;以及

[0060] -CDR-L3 包括序列 SEQ ID No. 6 或 34,或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 6 或 34 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列。

[0061] 在另一个实施方案中,本发明还可以描述为抗体、或其功能片段或衍生物,特征在于其选自如下:

[0062] a) 抗体、或其功能片段或衍生物,包括:

[0063] - 包含如下三个根据 IMGT 所定义的 CDR 的重链,分别地具有序列 SEQ ID No. 7 的 CDR-H1,具有序列 SEQ ID No. 2 的 CDR-H2,以及具有序列 SEQ ID No. 8 的 CDR-H3,以及

[0064] - 包含如下三个根据 IMGT 所定义的 CDR 的轻链,分别地具有序列 SEQ ID No. 4 的 CDR-L1,具有序列 SEQ ID No. 5 的 CDR-L2,以及具有序列 SEQ ID No. 6 的 CDR-L3,以及

[0065] b) 抗体、或其功能片段或衍生物,包括:

[0066] - 包含如下三个根据 IMGT 所定义的 CDR 的重链,分别地具有序列 SEQ ID No. 29 的 CDR-H1,具有序列 SEQ ID No. 30 的 CDR-H2,以及具有序列 SEQ ID No. 31 的 CDR-H3,以及

[0067] - 包含如下三个根据 IMGT 所定义的 CDR 的轻链,分别地具有序列 SEQ ID No. 32 的 CDR-L1,具有序列 SEQ ID No. 33 的 CDR-L2,以及具有序列 SEQ ID No. 34 的 CDR-L3。

[0068] 在本说明书中,术语“多肽”、“多肽序列”、“肽”和“附着至抗体化合物或其序列的蛋白质”是可互换的。

[0069] 必须了解,此处本发明不涉及天然形式的抗体,即,他们不取自其天然环境,但他们自天然来源通过纯化分离或获得、或者通过遗传重组或者通过化学合成获得,因此他们可以带有非天然氨基酸,正如将在此后描述的。

[0070] 为了更加地清楚,必须了解,在如下表述中,以及更具体地在表 3a 和 4a 中,称为 224D10 的抗体的 CDR,将通过 IMGT 编号、kabat 编号和通过常规编号进行定义。

[0071] 常规编号重组对如 IMGT 和 Kabat 编号系统所定义的 CDR 而言常见的各 CDR 残基部分。

[0072] IMGT 编号系统定义如所定义的根据 IMGT 系统的 CDR,而 kabat 编号系统定义如上所定义的根据 kabat 系统的 CDR。

[0073] 更具体地,CDR-H1 由常规编号系统中的 SEQ ID No. 1 (TSAYF)、IMGT 编号系统中的 SEQ ID No. 7 (GYSITSAYF) 以及 kabat 编号系统中的 SEQ ID No. 9 (TSAYFWS) 组成。

[0074] CDR-H2 由常规和 IMGT 编号系统中的 SEQ ID No. 2 (INYDGTN) 以及 kabat 编号系统中的 SEQ ID No. 10 (FINYDGTNNYNPSLKN) 组成。

[0075] CDR-H3 由常规和 kabat 编号系统中的 SEQ ID No. 3 (DRTFAY) 以及 IMGT 编号系统中的 SEQ ID No. 8 (TRDRTFAY) 组成。

[0076] 对于轻链,CDR-L1 由常规和 IMGT 编号系统中的 SEQ ID No. 4 (QRIYNY) 以及 kabat 编号系统中的 SEQ ID No. 11 (RASQRIYNYLH) 组成。

[0077] 关于 CDR-L2,其由常规和 IMGT 编号系统中的 SEQ ID No. 5 (YAS) 以及 kabat 编号系统中的 SEQ ID No. 12 (YASQSIG) 组成。

[0078] 最后,CDR-L3 由各三种编号系统中的 SEQ ID No. 6 (QQSNSWPLT) 组成。

[0079] 本领域技术人员可以轻易针对抗体 221C9 进行相同操作。

[0080] 同时,为了更加清楚,必须了解在如下表述中,以及更具体地在表 3b 和 4b 中,称为 221C9 的抗体的 CDR,将通过 IMGT 编号和 kabat 编号进行定义。

[0081] 在本发明的意思中,两条核酸或氨基酸序列之间的“一致性百分比”表示最佳比对后获得的待比较的两条序列之间一致的核苷酸或氨基酸残基的百分比。此百分比是纯统

计学的,并且两条序列之间的差异沿着其长度随机分布。两条核酸或氨基酸序列的比较传统上在他们最佳比对之后通过比较序列来进行,所述比较能够通过节段或通过使用“比对窗”进行。可以进行用于比较的序列的最佳比对,除了手工比较,通过 Smith 和 Waterman 的局部同源算法 (1981) (Ad. App. Math. 2 :482)、通过 Neddleman 和 Wunsch (1970) (J. Mol. Biol. 48 :443) 的局部同源算法、通过 Pearson 和 Lipman 的相似性搜索方法 (1988) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA85 :2444)、或通过使用这些算法的计算机软件 (Wisconsin 遗传软件包中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr. Madison, WI, 或者通过比较软件 BLAST NR 或 BLAST P)。

[0082] 两条核酸或氨基酸序列之间的一致性百分比可以通过比较两条最佳 - 比对的序列来确定,其中待比较的核酸或氨基酸序列,同用于两序列间最佳比对的参考序列相比,有增加或删除。通过确定两条序列间一致的氨基酸或核苷酸残基的位点数,将一致位点的数目除以比对窗中整个位点数,结果乘以 100 获得两条序列间的一致性百分比,来计算一致性百分比。

[0083] 例如, BLAST 程序, 网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html> 上可获得的“BLAST 2 序列”(Tatusova 等人, “Blast 2 sequences—a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”, FEMS Microbiol., 1999, Lett. 174 : 247-250), 可配合使用缺省参数 (尤其地, 参数“空位开放罚分”:5, 以及“空位扩展罚分”:2, 选择矩阵例如程序推荐的“BLOSUM 62”矩阵); 直接通过程序计算待比较的两条序列间的一致性百分比。

[0084] 对于和参考氨基酸序列表现出至少 80%, 优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的氨基酸序列, 优选的实例包括那些含有参考序列、某些修饰、尤其是至少一个氨基酸的删除、增加或置换、截短或延长的序列。在一个或多个保守或非保守氨基酸置换的情况下, 置换优选是置换的氨基酸被“等价”氨基酸代替。此处, 表述“等价氨基酸”意图表示任何可能被置换成结构氨基酸中的一个的氨基酸, 而不改变相应抗体的生物活性, 那些具体实例如下描述。

[0085] 可以通过其和置换其氨基酸的结构同源性, 或通过可能产生的各种抗体间的生物活性的比较结果, 来确定等价氨基酸。

[0086] 作为非限定性实例, 如下表 2 总结了可能实施的可能置换而不导致相应的修饰抗体显著的生物活性改变; 在相同条件下, 相反的置换在天然中是可能的。

[0087] 表 2

[0088]

原始残基	置换
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu

Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

[0089] 本领域技术人员知道,在本领域目前的状态中,六个 CDR 之间最大的可变性(长度和组成)发现于三个重链 CDR,更具体地,此重链的 CDR-H3。

[0090] 在具体的实施方案中,本发明涉及鼠科抗体、或其衍生物或功能片段。

[0091] 本发明的另一个实施方案中,公开了抗体 224D10、或其功能片段或衍生物之一,其包括包含如下三个基于 CDR “常规”定义的 CDR 的重链:

[0092] - 序列 SEQ ID No. 1 的 CDR-H1 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 1 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列的 CDR-H1;

[0093] - 序列 SEQ ID No. 2 的 CDR-H2 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 2 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列的 CDR-H2;以及

[0094] - 序列 SEQ ID No. 3 的 CDR-H3 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 3 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列的 CDR-H3,以及

[0095] 包括如下三个 CDR 的轻链:

[0096] - 序列 SEQ ID No. 4 的 CDR-L1 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 4 具有至少

80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列的 CDR-L1；

[0097] - 序列 SEQ ID No. 5 的 CDR-L2 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 5 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列的 CDR-L2；以及

[0098] - 序列 SEQ ID No. 6 的 CDR-L3 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 6 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列的 CDR-L3。

[0099] 本发明的另一个实施方案公开了抗体 224D10、或其功能片段或衍生物之一，其包括包含如下三个基于 IMGT 编号系统的 CDR 的轻链：

[0100] - 序列 SEQ ID No. 7 的 CDR-H1 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 7 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列的 CDR-H1；

[0101] - 序列 SEQ ID No. 2 的 CDR-H2 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 2 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列的 CDR-H2；以及

[0102] - 序列 SEQ ID No. 8 的 CDR-H3 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 8 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列的 CDR-H3，以及

[0103] 包括如下三个 CDR 的轻链：

[0104] - 序列 SEQ ID No. 4 的 CDR-L1 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 4 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列的 CDR-L1；

[0105] - 序列 SEQ ID No. 5 的 CDR-L2 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 5 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列的 CDR-L2；以及

[0106] - 序列 SEQ ID No. 6 的 CDR-L3 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 6 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列的 CDR-L3。

[0107] 本发明的另一个实施方案公开了抗体 224D10、或其功能片段或衍生物之一，其包括包含如下三个基于 Kabat 编号系统的 CDR 的重链：

[0108] - 序列 SEQ ID No. 9 的 CDR-H1 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 9 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列的 CDR-H1；

[0109] - 序列 SEQ ID No. 10 的 CDR-H2 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 10 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列的 CDR-H2；以及

[0110] - 序列 SEQ ID No. 3 的 CDR-H3 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 3 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列的 CDR-H3，以及

[0111] 包括如下三个 CDR 的轻链：

[0112] - 序列 SEQ ID No. 11 的 CDR-L1 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 11 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列的 CDR-L1；

[0113] - 序列 SEQ ID No. 12 的 CDR-L2 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 12 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列的 CDR-L2；以及

[0114] - 序列 SEQ ID No. 6 的 CDR-L3 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 6 具有至少 80%、优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列的 CDR-L3。

[0115] 所述抗体 224D10、或其功能片段或衍生物之一，根据本发明特征在于其包括，根据“常规”编号系统：

[0116] - 包括序列 SEQ ID No. 1 的 CDR-H1、序列 SEQ ID No. 2 的 CDR-H2 和序列 SEQ ID No. 3 的 CDR-H3 的重链；以及

[0117] - 包括序列 SEQ ID No. 4 的 CDR-L1、序列 SEQ ID No. 5 的 CDR-L2 和序列 SEQ ID No. 6 的 CDR-L3 的轻链。

[0118] 在另一个实施方案中,所述抗体 224D10、或其功能片段或衍生物之一,根据本发明特征在于其包括,根据 IMGT 编号系统:

[0119] - 包括序列 SEQ ID No. 7 的 CDR-H1、序列 SEQ ID No. 2 的 CDR-H2 和序列 SEQ ID No. 8 的 CDR-H3 的重链;以及

[0120] - 包括序列 SEQ ID No. 4 的 CDR-L1、序列 SEQ ID No. 5 的 CDR-L2 和序列 SEQ ID No. 6 的 CDR-L3 的轻链。

[0121] 在另一个实施方案中,所述抗体 224D10、或其功能片段或衍生物之一,根据本发明特征在于其包括,根据 Kabat 编号系统:

[0122] - 包括序列 SEQ ID No. 9 的 CDR-H1、序列 SEQ ID No. 10 的 CDR-H2 和序列 SEQ ID No. 3 的 CDR-H3 的重链;以及

[0123] - 包括序列 SEQ ID No. 11 的 CDR-L1、序列 SEQ ID No. 12 的 CDR-L2 和序列 SEQ ID No. 6 的 CDR-L3 的轻链。

[0124] 根据另一个实施方案,本发明抗体 224D10、或其衍生化合物或功能片段,其特征在于其包括包含氨基酸序列 SEQ ID No. 13 或最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 13 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的序列的重链可变结构域序列;和 / 或其中其包括包含氨基酸序列 SEQ ID No. 14 或最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 14 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的序列的轻链可变结构域序列。

[0125] 更具体地,本发明的抗体,其衍生化合物或其功能片段,包括:

[0126] a) 包括最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 13 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的氨基酸序列的重链可变结构域,和 / 或最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 14 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的轻链可变结构域;以及

[0127] b) 特征在于所述抗体、或其功能片段或衍生物,

[0128] - 能够特异性结合至 c-Met 蛋白,以及,优选地

[0129] - 不阻断配体 HGF 对 c-Met 蛋白的结合。

[0130] 在本发明的另一个实施方案中,其公开了抗体 221C9,或其功能片段或衍生物之一,包括包含如下三个 CDR 的重链:

[0131] - 序列 SEQ ID No. 29 的 CDR-H1 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 29 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的序列的 CDR-H1;

[0132] - 序列 SEQ ID No. 30 的 CDR-H2 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 30 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的序列的 CDR-H2;以及

[0133] - 序列 SEQ ID No. 31 的 CDR-H3 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 31 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的序列的 CDR-H3,以及

[0134] 包括如下三个 CDR 的轻链:

[0135] - 序列 SEQ ID No. 32 的 CDR-L1 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 32 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的序列的 CDR-L1;

[0136] - 序列 SEQ ID No. 33 的 CDR-L2 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 33 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的序列的 CDR-L2;以及

[0137] - 序列 SEQ ID No. 34 的 CDR-L3 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 34 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的序列的 CDR-L3。

[0138] 本发明的另一个实施方案公开了抗体 221C9, 或其功能片段或衍生物之一, 包括包含如下三个 CDR 的轻链:

[0139] - 序列 SEQ ID No. 35 的 CDR-H1 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 35 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的序列的 CDR-H1;

[0140] - 序列 SEQ ID No. 36 的 CDR-H2 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 36 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的序列的 CDR-H2; 以及

[0141] - 序列 SEQ ID No. 37 的 CDR-H3 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 37 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的序列的 CDR-H3, 以及

[0142] 包括如下三个 CDR 的轻链:

[0143] - 序列 SEQ ID No. 38 的 CDR-L1 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 38 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的序列的 CDR-L1;

[0144] - 序列 SEQ ID No. 39 的 CDR-L2 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 39 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的序列的 CDR-L2; 以及

[0145] - 序列 SEQ ID No. 34 的 CDR-L3 或者最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 34 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的序列的 CDR-L3。

[0146] 换言之, 分离的抗体 221C9, 或其功能片段或衍生物之一, 根据本发明其特征在于其包括, 根据 IMGT 编号系统:

[0147] - 包括序列 SEQ ID No. 29 的 CDR-H1、序列 SEQ ID No. 30 的 CDR-H2 和序列 SEQ ID No. 31 的 CDR-H3 的重链; 以及

[0148] - 包括序列 SEQ ID No. 32 的 CDR-L1、序列 SEQ ID No. 33 的 CDR-L2 和序列 SEQ ID No. 34 的 CDR-L3 的轻链。

[0149] 在另一个实施方案中, 分离的抗体 221C9, 或其功能片段或衍生物之一, 根据本发明其特征在于其包括, 根据 Kabat 编号系统:

[0150] - 包括序列 SEQ ID No. 35 的 CDR-H1、序列 SEQ ID No. 36 的 CDR-H2 和序列 SEQ ID No. 37 的 CDR-H3 的重链; 以及

[0151] - 包括序列 SEQ ID No. 38 的 CDR-L1、序列 SEQ ID No. 39 的 CDR-L2 和序列 SEQ ID No. 34 的 CDR-L3 的轻链。

[0152] 根据另一个实施方案, 本发明的抗体 221C9, 或其衍生物或功能片段, 特征在于其包括包含氨基酸序列 SEQ ID No. 40 或最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 40 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的序列的重链可变结构域序列; 和 / 或其中其包括包含氨基酸序列 SEQ ID No. 41 或最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 41 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的序列的轻链可变结构域序列。

[0153] 更具体地, 本发明的抗体, 其衍生物或功能片段, 包括:

[0154] a) 包括最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 40 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的氨基酸序列的重链可变结构域序列, 和 / 或最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 41 具有至少 80%、优选 85%、90%、95% 和 98% 一致性的轻链可变结构域序列; 以及

[0155] b) 特征在于所述抗体、或其功能片段或衍生物,

[0156] - 能够特异性结合至 c-Met 蛋白, 以及, 优选地

[0157] - 不阻断配体 HGF 对 c-Met 蛋白的结合。

[0158] 换言之, 本发明还可以描述为抗体、或其功能片段或衍生物, 特征在于其选自如下:

[0159] a) 抗体、或其功能片段或衍生物, 其包括包含氨基酸序列 SEQ ID No. 13 的重链可变结构域序列和包含氨基酸序列 SEQ ID No. 14 的轻链可变结构域序列; 以及 b) 抗体、或其功能片段或衍生物, 其包括包含氨基酸序列 SEQ ID No. 40 的重链可变结构域序列和包含氨基酸序列 SEQ ID No. 41 的轻链可变结构域序列。

[0160] 如上所示, 本发明还涉及任何衍生自本发明所述抗体的化合物。

[0161] 更具体地, 本发明的抗体、或其衍生化合物或功能片段, 特征在于所述衍生化合物由包含肽支架的结合蛋白组成, 所述肽支架上嫁接有至少一个 CDR, 以这种方式来保留所有或部分原始抗体的抗体决定簇识别特性。

[0162] 本发明所述的一个或更多个六个 CDR 之中的序列还可以出现在各种免疫球蛋白支架上。在这种情况下, 蛋白质序列使得能够重新建造适合嫁接 CDR 折叠的肽骨架, 使其保留其抗体决定簇抗原-识别特性。

[0163] 通常, 本领域技术人员知道如何确定在其上嫁接至少一个来自原始抗体的 CDR 的蛋白质支架类型。更具体地, 已知, 要选择这样的支架必须满足如下尽可能多的原则 (Skerra A., J. Mol. Recogn., 2000, 13:167-187):

[0164] - 系统发育保守性;

[0165] - 已知的三维结构 (如, 例如, 通过晶体学、NMR 光谱或本领域技术人员公知的任何其它技术);

[0166] - 尺寸小;

[0167] - 很少或没有转录后修饰; 和 / 或

[0168] - 易于生产、表达和纯化。

[0169] 这种蛋白质支架的来源可以是, 但不限于, 选自如下的结构: 纤维连接蛋白和优选 III 型纤维连接蛋白结构域 10、脂质运载蛋白、抗运载蛋白 (anticalin) (Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 74(4):257-75)、来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 蛋白 A 的结构域 B 的蛋白 Z、硫氧还蛋白 A 或带有重复基序比如“锚蛋白重复” (Kohl 等人, PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705)、“狢狢蛋白重复”、“富有-亮氨酸重复”和“三角形四肽重复 (tetratricopeptide repeat)”的蛋白质。

[0170] 来自毒素的支架, 比如, 例如来自蝎子、昆虫、植物、软体动物等的毒素, 以及神经 NO 合成酶 (PIN) 的蛋白抑制剂也应当提及。

[0171] 这种杂交构建的一个实例, 绝非限制, 是将抗-CD4 抗体的 CDR-H1 (重链), 即 13B8.2, 插入到 PIN 的一个环中, 如此获得的新结合蛋白保留了和原始抗体相同的结合特性 (Bes 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 343(1), 334-344)。基于纯粹说明性的基础, 将抗-溶菌酶 VHH 抗体的 CDR-H3 (重链) 嫁接至新致癌菌素的一个环上, 也可以提及 (Nicaise 等人, Protein Science, 2004, 13(7):1882-1891)。

[0172] 最后, 如上所述, 这种肽支架可包括从 1 至 6 个来自原始抗体的 CDR。优选, 但不需要, 本领域技术人员将选择至少一个来自重链的 CDR, 后者被认为主要和抗体的特异性有

关。选择一个或更多个相关的 CDR 其将随后选择合适的公知技术对于本领域技术人员而言是显而易见的 (Bes 等人, FEBS letters 508, 2001, 67-74)。

[0173] 本发明从而涉及抗体、或其衍生化合物或功能片段, 特征在于肽支架选自这样的蛋白质 : a) 系统发育上保守性良好, b) 坚固的结构, c) 具有公知的三维分子组织, d) 尺寸小和 / 或 e) 包括可以通过删除和 / 或插入进行修饰但不改变稳定特性的区。

[0174] 根据优选实施方案, 本发明的抗体、或其衍生化合物或功能片段, 特征在于所述肽支架选自如下 i) 来自纤维连接蛋白, 优选 III 型纤维连接蛋白结构域 10、脂质运载蛋白、抗运载蛋白、来自金黄色葡萄球菌蛋白 A 的结构域 B 的蛋白 Z、硫氧还蛋白 A 或带有重复基序比如“锚蛋白重复” (Kohl 等人, PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705)、“狢狢蛋白重复”、“富有 - 亮氨酸重复”和“三角形四肽重复”的蛋白的支架, 或 iii) 神经 NO 合成酶 (PIN) 的蛋白抑制剂。

[0175] 本发明的另一方面涉及上述抗体的功能片段。

[0176] 更具体地, 本发明针对抗体、或其衍生化合物或功能片段, 特征在于所述功能片段选自片段 Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、scFv-Fc 或双特异抗体、或任何半衰期延长的片段比如聚乙二醇化的片段。

[0177] 根据本发明的这种抗体功能片段由, 例如, 片段 Fv、scFv (sc = 简单链)、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fc 或双特异抗体、或任何通过化学修饰, 比如增加聚亚烷基二醇, 如聚乙二醇 (聚乙二醇化) (聚乙二醇化的片段涉及 Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEG 和 Fab'-PEG) 或通过并入脂质体、微球体或 PLGA 延长半衰期的片段组成, 所述片段具有至少一个本发明特有的 CDR, 其尤其能够, 以全部或甚至部分的方式, 展现其所来自的抗体的活性。

[0178] 优选, 所述功能片段将包括或包含其所来自的抗体的可变重链或轻链的部分序列, 所述部分序列足以保留和其所来自的所述抗体相同的结合特异性和足够的亲和性, 优选至少等于 1/100, 更优选至少 1/10 其所来自的抗体。

[0179] 这种功能片段将含有至少 5 个氨基酸, 优选 6、7、8、10、15、25、50 或 100 个其所来自的抗体序列的保守氨基酸。

[0180] 优选这些功能片段将属于 Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fc 或双特异抗体类型, 其通常具有和其所产生的抗体相同的结合特异性。根据本发明, 本发明抗体的片段可以通过方法比如酶消化, 包括胃蛋白酶或木瓜蛋白酶、和 / 或通过化学还原的二硫桥切割从上述抗体获得。所述抗体片段还可以通过本领域技术人员公知的重组遗传技术或通过如自动肽合成仪 (比如 Applied BioSystems 等销售的那些) 的方式进行的肽合来获得。

[0181] 为了更加清楚, 下表 3a 总结了本发明抗体 224D10 对应的各种氨基酸序列。

[0182] 表 3a (其中 Mu. = 鼠科)

[0183]

抗体	CDR 编号	重链	轻链	SEQ ID NO.
224D10	常规	CDR-H1		1
		CDR-H2		2
		CDR-H3		3
			CDR-L1	4
			CDR-L2	5
			CDR-L3	6
	IMGT	CDR-H1		7
		CDR-H2		2
		CDR-H3		8
			CDR-L1	4
			CDR-L2	5
			CDR-L3	6
	Kabat	CDR-H1		9
		CDR-H2		10
		CDR-H3		3
			CDR-L1	11
			CDR-L2	12
			CDR-L3	6
		Mu.可变结构域		13
			Mu.可变结构域	14

[0184] 为了更加清楚,下表 3b 总结了本发明抗体 221C9 对应的各种氨基酸序列。

[0185] 表 3b(其中 Mu. = 鼠科)

[0186]

抗体	CDR 编号	重链	轻链	SEQ ID NO.
221C9	IMGT	CDR-H1		29
		CDR-H2		30
		CDR-H3		31
			CDR-L1	32
			CDR-L2	33
			CDR-L3	34
	Kabat	CDR-H1		35
		CDR-H2		36
		CDR-H3		37
			CDR-L1	38
			CDR-L2	39
			CDR-L3	34
		Mu.可变结构域		40
			Mu.可变结构域	41

[0187] 根据另一方面,本发明涉及能够分泌根据本发明的单克隆抗体的鼠科杂交瘤,尤其是于2008年3月12日保藏于CNCM,法国巴黎巴斯德研究所(Institut Pasteur,Paris,France)号码为I-3949的鼠科来源杂交瘤。所述杂交瘤通过融合Balb/C经免疫的小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞Sp 2/O-Ag 14细胞系而获得。

[0188] 单克隆抗体,此处是指224D10,或其衍生化合物或片段,特征在于所述抗体由2008年3月12日保藏于CNCM号码为I-3949的杂交瘤分泌,其显然构成了本发明的部分。

[0189] 根据另一方面,本发明涉及能够分泌根据本发明的单克隆抗体的鼠科杂交瘤,尤其是于2010年1月14日保藏于CNCM,法国巴黎巴斯德研究所(Institut Pasteur,Paris,France)号码为I-4273的鼠科来源杂交瘤。所述杂交瘤通过融合Balb/C经免疫的小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞Sp 2/O-Ag 14细胞系而获得。

[0190] 单克隆抗体,此处是指221C9,或其衍生化合物或片段,特征在于所述抗体由2010年1月14日保藏于CNCM号码为I-4273的杂交瘤分泌,其显然构成了本发明的部分。

[0191] 本发明新的方面涉及分离的核酸,其特征在于其选自如下核酸:

[0192] a) 编码根据本发明的抗体或其衍生化合物或功能片段的核酸,DNA或RNA;

[0193] b) 包括包含选自如下序列的DNA序列的核酸:序列SEQ ID No. 15至26和42至52、或最佳比对之后和序列SEQ ID No. 15至26和42至52具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%一致性的序列;

[0194] c) 包括DNA序列的核酸,其中所述DNA序列包含序列SEQ ID No. 27、28、53和/或54、或最佳比对之后和序列SEQ ID No. 27、28、53和/或54具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%一致性的序列;

[0195] d) 如a)、b)或c)中所定义的核酸对应的RNA核酸;

[0196] e) 如a)、b)和c)中所定义的核酸的互补核酸;以及

[0197] f) 能够在高度严格的条件下,和序列 SEQ ID No. 15 至 28 和 42 至 54、或最佳比对之后和序列 SEQ ID No. 15 至 28 和 42 至 54 具有至少 80%,优选 85%、90%、95%和 98%一致性的序列、或其互补序列的至少一个 CDR 杂交的,至少 18 个核苷酸的核酸。

[0198] 下表 4a 总结了本发明抗体 224D10 对应的各种核苷酸序列。

[0199] 表 4a

[0200]

抗体	CDR 编号	重链	轻链	SEQ ID NO.
224D10	常规	CDR-H1		15
		CDR-H2		16
		CDR-H3		17
			CDR-L1	18
			CDR-L2	19
			CDR-L3	20
	IMGT	CDR-H1		21
		CDR-H2		16
		CDR-H3		22
			CDR-L1	18
			CDR-L2	19
			CDR-L3	20
	Kabat	CDR-H1		23
		CDR-H2		24
		CDR-H3		17
			CDR-L1	25
			CDR-L2	26
			CDR-L3	20
		Mu.可变结构域		27
			Mu.可变结构域	28

[0201] 下表 4b 总结了本发明抗体 221C9 对应的各种核苷酸序列。

[0202] 表 4b

[0203]

抗体	CDR 编号	重链	轻链	SEQ ID NO.
221C9	IMGT	CDR-H1		42
		CDR-H2		43
		CDR-H3		44
			CDR-L1	45
			CDR-L2	46
			CDR-L3	47
	Kabat	CDR-H1		48
		CDR-H2		49
		CDR-H3		50
			CDR-L1	51
			CDR-L2	52
			CDR-L3	47
		Mu.可变结构域		53
			Mu.可变结构域	54

[0204] 术语“核酸”、“核序列”、“核酸序列”、“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“多核苷酸序列”和“核苷酸序列”在本说明书中可互换使用,表示,无论有无修饰,确定核酸的片段或区域的精确核苷酸序列,其含有或不含有天然核苷酸,是双链 DNA、单链 DNA 或所述 DNA 的转录产物。

[0205] 此处还应当包括,本发明不涉及处于其天然染色体环境中,即,天然状态的核苷酸序列。本发明的序列是经分离和 / 或纯化的,即,他们直接或间接地取样,例如通过拷贝,其环境至少部分经过修饰。此处还应当提及,通过重组遗传学,通过,例如宿主细胞的方式、或通过化学合成获得分离的核酸。

[0206] “和优选序列最佳比对之后表现出至少 80%, 优选 85%、90%、95% 和 98% 百分比一致性的核序列”表示,就参考核序列而言,显示出某些修饰,比如,尤其是,删除、截短、延长、嵌合融合和 / 或置换,尤其是点 (突变) (punctual) 的核序列。优选,这些是编码和参考序列相同氨基酸序列的序列,这涉及遗传密码的简并、或优选在高度严格的条件下,倾向于和,尤其是那些如下定义的,参考序列特异性杂交的互补序列。

[0207] 在高度严格的条件下杂交表示这样的条件,即其涉及以这样的方式选择温度和离子强度:其允许在两条互补 DNA 片段之间维持杂交。基于纯粹说明性的基础,出于确定上述多核苷酸片段的的目的,杂交步骤高度严格的条件优选如下。

[0208] DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交以两步进行:(1) 在含有 5×SSC(1×SSC 相当于 0.15M NaCl+0.015M 柠檬酸钠的溶液)、50%甲酰胺、7%十二烷基硫酸钠 (SDS)、10×Denhardt's、5%硫酸葡聚糖和 1%鲑鱼精子 DNA 的磷酸缓冲液 (20mM, pH 7.5) 中,于 42℃下预杂交 3 小时;(2) 在取决于探针长度的温度下进行 20 小时第一杂交(即:42℃对应探针 > 100 个核苷酸长度),随后是在 2×SSC+2% SDS 中,20℃下进行两个 20 分钟的洗涤,在 0.1×SSC+0.1% SDS 中,20℃下进行一个 20 分钟的洗涤。在 0.1×SSC+0.1% SDS 中,在对应探针 > 100 个核苷酸长度的 60℃下进行 30 分钟的最终洗涤。根据 Sambrook 等中描述的方法,本领域技

术人员可以为更长或更短的寡核苷酸,调整特定尺寸多核苷酸的上述高度严格的杂交条件(Molecular cloning:a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory ;第三版, 2001)。

[0209] 本发明涉及包括本发明所述核酸的载体。

[0210] 本发明尤其是指包含这种核苷酸序列的克隆和 / 或表达载体。

[0211] 本发明的载体优选包含允许核苷酸序列在指定宿主细胞中表达和 / 或插入的元件。所述载体因此必须包含启动子、转录起始和终止信号、以及合适的转录调节区。其必须能够在宿主细胞中以稳定的方式维持,并任选地具有指导翻译的蛋白分泌的特定信号。根据所用宿主细胞,本领域技术人员选择并优化这些多种元件。出于此目的,核苷酸序列可以插入至所选宿主中的自我复制载体或所选宿主的整合载体。

[0212] 通过本领域技术人员通常使用的方法制备这种载体,可以通过标准方法比如脂质转染、电穿孔、热激或化学方法将产生的克隆引入合适的宿主。

[0213] 所述载体是,例如,质粒或病毒来源的载体。为了克隆或表达本发明的核苷酸序列其用于转化宿主细胞。

[0214] 本发明还包括转化有或包括本发明所述载体的宿主细胞。

[0215] 宿主细胞可以在原核或真核系统中选择,比如细菌细胞,例如,还有酵母细胞或动物细胞,尤其是哺乳动物细胞。也可用昆虫或植物细胞。

[0216] 除人类外,本发明还涉及具有根据本发明的转化细胞的动物。

[0217] 本发明的另一方面涉及生产本发明的抗体、或其功能片段之一的方法,特征在于所述方法包括如下步骤:

[0218] a) 在培养基中以及合适的培养条件下培养根据本发明的宿主细胞;以及

[0219] b) 回收从培养基质或从所述培养的细胞中产生的所述抗体、或其功能片段之

[0220] 本发明的转化细胞对于用于制备本发明的重组多肽的方法是有用的。用于制备重组形式的根据本发明的多肽的方法,特征在于所述方法使用本发明的载体和 / 或转化有载体的细胞,也包括在本发明内。优选,转化有本发明的载体的细胞在允许表达前述多肽和允许回收所述重组肽的条件下进行培养。

[0221] 如已经提及的,宿主细胞可以选自原核或真核系统。尤其是,有可能识别有助于在这种原核或真核系统中分泌的本发明核苷酸序列。携带这种序列的根据本发明的载体因此可以优选用于生产待分泌的重组蛋白。事实上,他们存在于细胞培养物上清中而不是宿主细胞内的事实将有助于这些目标重组蛋白的纯化。

[0222] 也可通过化学合成制备本发明的多肽。这样的制备方法之一也是本发明的目的。本领域技术人员知道化学合成的方法,比如固相技术(参见尤其是 Steward 等人,1984, Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, Ill, 2nded.) 或部分固相技术,通过浓缩片段或通过溶液中常规的合成。通过化学合成获得的以及能够含有相应的非天然氨基酸的多肽也包括在本发明内。可能通过本发明方法获得的抗体、其衍生物或功能片段,也包括在本发明内。

[0223] 使用本发明的抗体作为生物标志物也得以公开。所述方法可用于检测或诊断多种和 cMet 表达有关的过度增殖性致癌疾病,例如,但不限于,前列腺癌、骨肉瘤、肺癌、乳腺癌、子宫内膜癌、胶质母细胞瘤、结肠癌、胃癌、肾癌或任何其它和 cMet 表达有关的癌症。本

领域普通技术人员将意识到,和具体疾病有关的抗体表达水平将依预先存在的情况的性质和 / 或严重程度不同而有不同。

[0224] 以本领域技术人员公知的任何常规方式(如局部、肠胃外、肌肉内等)施用本发明的抗体,将提供极为有用的方法,用于在样本中检测发育不良的细胞以及允许临床医师监测患者的治疗方案,其中所述患者经受和 cMet 表达有关或介导的过度增殖性疾病的治疗。

[0225] 在另一个实施方案中,本发明涉及用于和 cMet 表达有关的致癌疾病的体内成像的药物组合物,其包括标记的且在体内结合 cMet 的上述单克隆抗体或其片段;和可药用载体。

[0226] 本发明的抗体、或其功能片段或衍生物,将在多种医疗或研究目的中找到用武之地,包括和 cMet 表达有关的多种病理的检测、诊断、分期。

[0227] 确定分期具有潜在的预后价值,并为最佳治疗的设计提供原则。Simpson 等人, J. Clin. Oncology 18:2059(2000)。通常,乳腺癌的病理分期,例如,优于临床分期,因为前者提供更准确的预后。然而,如果和病理分期同样准确,那么将优选临床分期,因为其不依赖于介入性过程来获取组织用于病理评价。

[0228] 当和合适的标记或其它合适的可检测的生物分子或化学物质一同使用时,本发明的抗体尤其可用于体外和体内诊断和预后应用。

[0229] 用于免疫分析的标记通常对于本领域技术人员是公知的,且包括酶、放射性同位素、以及荧光、发光和发色物质,包括有色颗粒比如胶体金或乳胶颗粒。合适的免疫分析包括酶联免疫吸附分析(ELISA)。各种类型的标记和将标记偶联至本发明抗体的方法对于本领域技术人员是公知的,比如如下所述。

[0230] 如此处所用,术语“和 cMet 表达有关的致癌疾病”意图包括这样的疾病和其它病症,其中在患病的受试者中出现高水平或异常低水平的 cMet(异常)已被证实或疑似和疾病的病理生理或造成疾病恶化因素有关。或者,可通过,例如,在患有所述疾病的受试者的感染细胞或组织中细胞表面的 cMet 水平增加或提高的 cMet 酪氨酸磷酸化,来证明这种疾病。例如,可使用本发明抗体 224D10 检测 cMet 水平的提高。此外,其涉及表现出相对自主性生长的细胞,从而他们表现出异常的生长表型,特征在于明显丧失细胞增殖控制。或者,细胞可表达正常水平的 cMet,但被视为异常增殖。

[0231] 在某些实施方案中,“提高的表达”当涉及 cMet 时,其涉及蛋白或基因的表达水平,其说明相对于对照而言表达在统计学上显著提高(通过 RNA 表达或蛋白表达测量的)的蛋白或基因的表达水平。

[0232] 更具体地,考虑本发明的抗体、或其功能片段或衍生物,用于体外诊断和 cMet 表达有关的致癌疾病、或体外确定和 cMet 表达有关的致癌疾病发展的预后,例如,和 cMet 表达有关的癌症的用途。

[0233] 根据本发明的另一个广泛的方面,关注诊断病理性过度增殖性致癌疾病或在患者中对和 cMet 表达有关的病理性疾病敏感性的方法,包括在样本中确定是否存在 cMet 携带细胞,以及基于是否存在所述 cMet 携带细胞诊断病理性疾病或对病理性疾病的敏感性。使用本发明抗体的诊断用途,包括原发性肿瘤、癌症转移。所述抗体可以以免疫偶联物的形式、或以标记抗体的形式存在的,用来获得可检测和 / 或可量化信号。

[0234] 更具体地,根据本发明的优选目的是在受试者中体外检测 c-Met 表达肿瘤是否存

在或其位点的过程,其中所述过程包括步骤(a)用根据本发明的抗体、或其功能片段或衍生物接触来自受试者的样本,以及(b)检测所述抗体和样本的结合。所述目的的另一方面是c-Met表达的后续方面,其作为在临床试验期间对c-Met靶向治疗的响应,以及更具体地,当c-Met受体的下调和或降解成为受试化合物作用机制的组成之一时。

[0235] 对于技术人员显而易见地,检测本发明抗体的结合可以通过多种分析来揭示。尽管用于进行分析的任何方法和本发明是兼容的,作为实例,可以提及FACS、ELISA或IHC。

[0236] 如此处所用,术语“样本”意图表示任何生物液体、细胞、组织、器官或其部分,其包括或潜在包括赘生细胞,比如来自含有或疑似含有赘生细胞的结肠、胃、直肠、乳腺、卵巢、前列腺、肾、肺、血液、脑或其它器官或组织的细胞。术语包括存在于个体的样本以及从个体获得的或来自个体的样本。例如,样本可以是活检获得标本的组织切片、或置于组织培养中或适应组织培养的细胞。样本还可以是亚细胞组分或提取物、或粗的或基本纯的核酸分子或蛋白质制备物。

[0237] 临床样本意图包括从受试者获得的各种样本类型,并可用于本发明的程序,比如例如,确定或检测cMet表达水平的诊断或监测测试。定义包括通过外科去除获得的固体组织样本、病理标本、保存的样本、或活检标本、组织培养物或来自这些的细胞及其后代、以及从任何这些来源制备的切片或涂片。非限定性实例是从乳腺组织、淋巴结、结肠、胰腺、前列腺等获得的样本。定义还包括生物来源的液体样本,并可涉及其中悬浮的细胞或细胞碎片、或涉及液体培养基及其溶解物。

[0238] 根据本发明的另一方面,涉及在来自受试者的cMet表达肿瘤中体外确定cMet表达水平的方法,其中所述方法包括步骤(a')用根据本发明的抗体、或其功能片段或衍生物接触来自受试者的样本,以及(b')定量确定在所述样本中抗体结合c-Met的水平。

[0239] 对本领域技术人员是显而易见的,可以以多种方式定量抗体结合c-Met的水平,比如通过各种分析。尽管用于进行分析的任何方法和本发明是兼容的,引入用来实施根据ELISA技术的免疫酶过程的优选方法,是通过免疫荧光、通过免疫组织化学或放射免疫法(RIA)技术或等同技术。

[0240] 优选,生物样本通过生物液体,比如人类来源的血清、全血、细胞、组织样本或活检,形成的。所述样本,可例如包括,活检组织,其可以方便地用来分析和cMet表达有关的病理性过度增殖性致癌疾病的存在。

[0241] 一旦确定了cMet存在于测试样本中的量,其结果可以和对照样本的值比较,所述对照样本的值是以和测试样本相似的方式获得的,但是其来自未患有或不存在和cMet表达有关的病理性过度增殖性致癌疾病的个体。如果cMet水平在测试样本中显著提高,可得出这样的结论,其所来自的受试者患有或将发展为所述疾病的可能性增加。

[0242] 本发明涉及,更具体地,在受试者中体外诊断cMet表达肿瘤或体外确定cMet表达肿瘤发展预后的方法,其中所述方法包括步骤(i)如上述确定cMet表达水平,以及(ii)比较步骤(i)的表达水平和来自正常组织或非表达cMet组织的cMet参考表达水平。

[0243] 如本申请中所用“诊断”疾病意图包括,例如,诊断或检测和cMet表达有关或介导的病理性高度增殖性致癌疾病的存在、监测疾病的进展、以及鉴定或检测预示和cMet表达有关的疾病的细胞或样本。

[0244] 如本申请中所用“预后”表示疾病复发或预测可能发展或发生疾病的可能性。例

如,如果来自受试者的样本用本发明抗体染色呈阳性,那么对那个受试者的“预后”优于 cMet 染色呈阴性的样本。以合适的等级,针对 cMet 表达水平给样本评分,如将在此后详细描述。

[0245] 然而,本发明的另一方面还涉及,针对将诱导 c-Met 降解作为其作用机制之一的治疗性化合物,监测 c-Met 表达。在 c-Met 表达于细胞膜上的情况下,将成为重要的工具来评价临床试验和“个性化”治疗期间的治疗效果。

[0246] cMet 表达水平优选,相对于对照细胞或样本中的水平(也作“参考水平”或“参考表达水平”),进行比较或测量。“参考水平”、“参考表达水平”、“对照水平”和“对照”在本说明书中是可互换的。广义上讲,“对照水平”表示在相比较的对照细胞中测量的分开的基线水平,其通常是没有疾病或癌症的。其可能来自相同的个体或来自另一个个体,所述个体是正常的或不存在和获得患病或测试样本的个体相同的疾病。在本发明的内容中,术语“参考水平”涉及 cMet 表达的“对照水平”,用于评价患者癌细胞获得样本中 cMet 表达的测试水平。例如,当 cMet 在患者生物样本中的水平高于 cMet 参考水平时,所述细胞将被认为具有 cMet 的高水平表达、或过度表达。可以通过很多方法确定参考水平。表达水平可因此确定 cMet 携带细胞或作为替代除表达 cMet 的细胞的数目以外的 cMet 表达水平。因此,可以通过 cMet 参考比例排除各患者的参考水平,其中所述参考比例可以通过任何确定此处所述参考水平的方法确定。

[0247] 例如,对照可以是预定的值,其可以采取各种形式。其可以是单个的截止值(cut-off 值),比如中位数或均值。所述“参考水平”可以是单个数字,均等地适用于每个患者,或参考水平可以根据具体的患者亚群而不同。因此,例如,对于相同的癌症,年长的男性和年轻的男性相比,可能具有不同的参考水平,以及对于相同的癌症,女性和男性相比,可能具有不同的参考水平。或者,所述“参考水平”可以通过测量 cMet 在来自和待测试赘生细胞的组织相同组织的非致癌癌症细胞中的表达水平来确定。而且,所述“参考水平”可能是 cMet 在患者赘生细胞中相对于在相同患者非肿瘤细胞中 cMet 水平的特定比例。所述“参考水平”也可以是体外培养细胞的 cMet 水平,其可以经操作来模拟肿瘤细胞、或可以以任何其它方式操作产生准确确定参考水平的表达水平。另一方面,可以基于可比较的组建立“参考水平”,比如在不具有升高的 cMet 水平的组和具有升高的 cMet 水平的组中。可比较的组的另一个实例是具有特定疾病、病症或症状的组以及没有疾病的组。可以安排预定值,例如,当测试群体等(或不等)分至各组,比如低-风险组、中等-风险组和高-危组、或分至四分之一或五分之一,最低的四分之一或五分之一是具有最低风险或最高量 cMet 的个体,且最高的四分之一或五分之一是具有最高风险或最低量 cMet 的个体。

[0248] 也可以通过比较患有相同癌症的患者群体中 cMet 水平确定参考水平。可以通过,例如,柱状图分析来完成,其中整个患者群体以图形呈现,其中第一个轴代表 cMet 水平,第二个轴代表群体中其肿瘤细胞表达给定水平 cMet 的患者数目。可以通过鉴定具有相同或相似 cMet 水平的群体亚群来确定两个或更多个分开的患者组。然后可以基于最能区分这些分组的水平来确定参考水平。参考水平还可以代表两个或更多个标志物的水平,其中之一是 cMet。可以通过,例如,各标志物水平值的比,表示两个或更多个标志物。

[0249] 同样,表面上看起来健康的群体将具有和认为患有和 cMet 表达有关的疾病的群体不同的“正常”范围。因此,所选的预定值可考虑个体落入的类别。本领域普通技术人员

可以只用常规实验选择合适的范围和类别。通过“升高的”、“增加的”表示高于所选的对照。通常,对照将基于合适的年龄段内表面上看起来健康的正常个体。

[0250] 还应了解,根据本发明的对照可能是,除了预定值外,和实验材料平行检测的材料样本。实例包括同时从相同受试者获得的组织或细胞,例如,单个活检标本的部分、或来自受试者单细胞样本的部分。

[0251] 在患有 cMet 介导的疾病的患者的临床诊断或监测中,和来自正常受试者或非-癌组织相应生物样本中的水平比较,检测到 cMet 表达细胞或 cMet 表达水平提高,通常表示患者具有或疑似显示有 cMet 介导的疾病。

[0252] 根据上述,本发明提供用于预测对癌症的易感性的方法,其包括检测组织样本中的 cMet 表达水平,其存在表示对癌症易感,其中 cMet 表达的程度和易感性程度有关。因此,在具体的实施方案中,检验在,例如,前列腺组织、骨肉瘤组织、肺组织、胰腺组织、结肠组织、乳腺组织、胶质母细胞瘤组织、卵巢组织、或任何疑似表达 cMet 的细胞的其它组织中的 cMet 的表达,在样本中出现 cMet 表示癌症易感性或组织特异性肿瘤的出现或存在。

[0253] 还提供了评价肿瘤侵袭性的方法。在一个实施方案中,用于在个体中一段时间内观察恶性肿瘤进展的方法,包括确定肿瘤样本中细胞表达的 cMet 的水平,比较这样确定的水平和在不同时间从相同个体取出的等价组织样本中表达的 cMet 水平,其中肿瘤样本中一段时间内 cMet 表达的程度提供癌症进展的信息。

[0254] 在另一个实施方案中,本申请提供用于确定受试者合适的治疗方案的方法。具体地,本发明抗体对于在个体中监测恶性肿瘤的改善是非常有用的,尤其在这样的情况其中用不与本发明抗体竞争结合 cMet 的 cMet 抗体治疗受试者。根据本发明存在或不存在或 cMet 水平变化可表示受试者倾向于患有和 cMet 相关的癌症复发或进行性、或持久性癌症。因此,通过测量表达 cMet 的细胞数目的增加或各种组织或细胞中 cMet 浓度变化,有可能确定目的在于改善和 cMet 有关的恶性肿瘤的特定治疗方案是否有效。

[0255] 本发明的另一个目的是和 cMet 表达有关的致癌疾病体内成像的方法。例如,这种方法可用于出现致癌疾病症状的患者。如果患者具有,例如提高的 cMet 表达水平,那么所述患者可能患有癌性疾病。同时,所述方法可用于在患者中监测对治疗的进展和/或响应,所述患者之前诊断患有 cMet 介导的癌症。根据上述目的,本发明提高体内成像试剂,其包括根据本发明的抗体、或其功能片段或衍生物,优选标记的,尤其是放射标记的,及其在医学成像中的用途。因此,根据本发明的一般方法发挥作用,是通过向患者施用成像有效量的成像试剂(比如上述标记的单克隆抗体)和可药用载体,然后结合样本中存在的 cMet 之后检测试剂。在某些实施方案中,所述方法是通过施用包括靶向部分和活性部分的成像有效量的成像试剂发挥作用的。以在哺乳动物比如人类中诊断用途的有效量施用成像试剂,然后检测成像试剂的定位和积累。可通过放射性核素成像、放射性闪烁摄影术、核磁共振成像、计算机断层扫描、正电子发射断层扫描、计算机轴断层扫描、X-射线或磁共振成像法、荧光检测和化学发光检测来检测成像试剂的定位和积累。

[0256] 关于靶向抗肿瘤治疗的发展,采用免疫组织学技术的诊断给出,原位,受体表达水平的信息,从而使得能够选择需要这种治疗的患者,所述患者疑似要接受根据受体表达水平的治疗。

[0257] 对于使用单克隆抗体的免疫治疗,对治疗的响应取决于受体靶向的表达水平,正

如用曲妥珠单抗的治疗,其中,随着人化抗-Her2 单克隆抗体曲妥珠单抗的出现,确定乳腺癌中 Her2 的过度表达现今具有主要的临床重要性。显示出 Her2 过度表达,是用曲妥珠单抗治疗的前提条件,其通过特异性靶向 Her2 过度表达的癌细胞来发挥作用。准确的 Her2 测试目的在于保证没有给非-过度表达的肿瘤的患者施加昂贵的和潜在毒性的曲妥珠单抗治疗,以及保证每个可能受益于曲妥珠单抗的患者接受合适的治疗。

[0258] 曲妥珠单抗的教导关注选择过度表达 Her2 的患者,其显示当采用使用单克隆抗体的治疗时确定受体表达水平的益处,以及对发展,同时相比较治疗性单克隆抗体,可用于患者选择的单克隆抗体的益处。

[0259] 结果,本发明涉及体外确定受试者肿瘤 cMet 等级的方法,其中所述方法包括步骤(1)如上述确定 cMet 表达水平,(2)为所述肿瘤 cMet 表达水平评分,以及(3)比较所述评分和对照样本获得的评分。

[0260] “cMet 等级”在本发明含义内,涉及将肿瘤划分至 cMet 阳性(cMet(+))或 cMet 阴性(cMet(-))类别,其基于 cMet 基因的表达水平的确定,如通过任何方法所测量的,比如免疫组织化学(IHC)、原位荧光杂交(FISH)、比色原位杂交(CISH)、基因芯片或其它本领域技术人员公知的。

[0261] 在优选实施方案中,当组织样本是福尔马林固定和石蜡包埋的,用于诊断的抗体应能够结合靶向受体。

[0262] 更具体地,通过免疫组织化学(IHC)测量 cMet 表达水平。

[0263] 作为实例,在从 0 到 3⁺ 的抗体染色水平等级上,针对 cMet 表达水平给样本评分,其中,以四个强度逐渐提高的半定量等级,0 是阴性,以及 1⁺-3⁺ 代表阳性染色。得分 1⁺-3⁺ 可以重新编码为阳性,因为各阳性评分和零分(阴性)比较时,可能和显著降低的复发和致命性疾病风险有关,但是阳性评分中提高的强度可能提供额外的风险降低。任何常规的危害分析方法可用于评价 cMet 预后值。代表性的分析方法包括 Cox 回归分析,这是用于,在删失情形下,存活或时间-对-事件数据建模的半参数方法(Hosmer 和 Lemeshow, 1999; Cox, 1972)。相对于其它存活分析,如寿命表或 Kaplan-Meier, Cox 允许在模型中纳入预测变量(协变量)。用常规分析方法,如, Cox 可能检验关于原发性肿瘤中 cMet 表达等级和时间-对-发生(疾病复发(无疾病存活时间、或时间对转移性疾病)或时间对因疾病死亡(整个存活时间))的关系的假说。Cox 回归分析也被视为 Cox 比例风险分析。这种方法是检验肿瘤标志物对患者存活时间预后值的标准方法。当用于多变量模型时,平行测试多种变量的作用,从而可以确定具有独立预后值的各变量,即最有用的标志物。术语肿瘤的阳性或阴性“cMet 等级”(用作 cMet(+) 或 cMet(-))分别涉及 0 分或 1⁺-3⁺ 分。

[0264] 在诊断或监测癌症期间可给样本“评分”,比如例如乳腺癌。以其最简单的形式,通过免疫组织化学目测检验样本判断的,评分可确信无疑地是阴性或阳性。更加定量的评分涉及判断两个参数取样细胞的染色强度和染色细胞(“阳性”)的百分比。基于这两个参数,可以指定数值来反应阳性染色的提高水平。Allred 等人(Allred, Harvey 等人 1998)已经描述了获得这种的一种途径,其中涉及在从 0(阴性)至 3⁺ 的等级上评分两个参数,并综合各参数的评分获得总分。等级中的结果具有可能的评分 0、2、3、4、5、6、7 或 8(注意到在 Allred 等级中 1 分是不可能的)。一个多少更简单些的评分方法,以从 0 至 3⁺ 的组合等级,整合了核染色强度以及显示核染色的细胞比例。各评分方法均可用于在细胞核中评分

激活的 Stat5 的强度和染色比例。用于本说明书的术语肿瘤的阳性或阴性“cMet 等级”分别涉及在简化等级上对应着评分 0 或 1⁺-3⁺ 的 cMet 表达水平。

[0265] 通常,根据本发明的测试或分析结果可以以任何各种格式体现。结果可以以定性形式体现。例如,测试报告可仅表示是否测试了特定的多肽,也许还表明检测限。结果可以以半定量形式体现。例如,可以确定各种范围,以及范围可以指定为提供定量信息的特定程度的评分(如 1⁺ 至 3⁺)。这种评分可体现各种因素,如在其中检测到 cMet 的细胞数目、信号强度(其可表示 cMet 或 cMet 携带细胞的表达水平)等。结果可以以定量形式体现,如,作为在其中检测到多肽(cMet)的细胞百分比、作为蛋白浓度等。如对于本领域普通技术人员是显而易见的,测试提供的输出类型将依据测试的技术限制以及和多肽检测有关的生物重要性而不同。例如,在某些多肽的情况下,纯定性输出(如在特定检测水平是否检测到多肽)提供重要的信息。在其它情况下,更加定量的输出(如待测试样本中多肽表达水平相对于正常水平的比例)是必要的。

[0266] 在更优选实施方案中,cMet 表达水平评分的等级从 0 至 3⁺,基于对反应产物强度和阳性细胞百分比的评价。为了更加清楚,随后表 5 总结了这些参数。只有完整的圆周的侵袭性肿瘤的膜反应性应当考虑,并通常认为是“铁丝织网”外观。根据目前的指南,样本被 cMet IHC 评分为交界性肿瘤的(评分 2⁺ 或以上)必须认为是 cMet(+) 的,并需要经历进一步评价。应当通过 FISH 或任何其它方法拒绝、重复或确认 IHC 分析,如果,作为非限定性实例,对照不符合预期、伪影参与大部分样本以及样本具有正常乳腺导管(内对照)的强的膜阳性,这表明过度的抗原复原。

[0267] 表 5

	c-Met 等级	IHC 描述
	0	在 10%以下肿瘤细胞中没有反应性或膜反应性
[0268]	1 ⁺	10%以上的肿瘤细胞中检测到微弱的/几乎难以察觉的膜反应性。细胞仅在部分膜中有免疫反应。
	2 ⁺	10%以上的肿瘤细胞中可见从弱到中等的完全的膜反应性
	3 ⁺	10%以上的肿瘤细胞中可见强烈的完全的反应性

[0269] 一个根据本发明的方法的更优选实施方案中,所述评分包括使用基于两个参数的适当的等级,其中所述参数为染色强度和阳性细胞百分比。

[0270] 在优选实施方案中,本发明的方法涉及适当等级是 0 至 3⁺ 的等级,其中没有肿瘤细胞膜反应性得分为 0,在 10%以上肿瘤细胞中强烈完整的反应性得分为 3⁺。

[0271] 更具体地,如上所述,所述适当等级是 0 至 3 的等级,其中肿瘤细胞没有膜反应性得分为 0;在 10%以上肿瘤细胞中微弱察觉的膜反应性得分为 1⁺;在 10%以上肿瘤细胞中从弱到中等完整的膜反应性得分为 2⁺;以及在 10%以上肿瘤细胞中强烈完整的反应性得分为 3⁺。

[0272] 在本发明的具体方面中,肿瘤是得分为 2⁺ 的 cMet(+).

[0273] 在本发明的具体方面中,肿瘤是得分为 3⁺ 的 cMet(+).

[0274] 在本发明的另一个具体方面中,肿瘤是得分为 2⁺ 或 3⁺ 的 cMet(+).

[0275] 根据本发明,还描述了确定致癌疾病对用抗 -cMet 抗体、或其片段或衍生物的治疗是否敏感的方法。其中所述方法包括步骤 (a) 如上述,体外确定受试者的肿瘤 cMet 等级,以及 (b) 如果等级是 cMet (+),确定致癌疾病对用抗 -cMet 抗体、或其片段或衍生物的治疗敏感。

[0276] 在本发明的另一方面中,考虑用于这种诊断或预后方法的试剂盒,所述试剂盒包括本发明的抗体。

[0277] 以一种方便的方式为便利起见,以预定量带有说明书用于进行诊断分析的带有说明书的预定量试剂包装试剂组合的组合套装,如试剂盒,也包括在本发明范围内。所述试剂盒包含用于体外检测和定量 cMet 的抗体,如在 ELISA 或 Western 免疫印迹中。本发明所述抗体可以在试剂盒中提供,用于体外检测和定量 cMet,如在 ELISA 或 Western 免疫印迹中。当抗体用酶标记时,试剂盒将包括底物和酶所需的辅因子(如底物前体,其提供可检测的发色团或荧光团)。此外,可包括其它添加剂比如稳定剂、缓冲液(如封闭缓冲液或裂解缓冲液)等。这种试剂盒可包括容器,其经划分来容纳一个或更多个容器比如瓶、管等,这种容器盛放本发明独立的组件。例如,一个容器可包含结合至不溶或部分可溶载体的一抗。第二容器可包含可溶、可检测 - 标记的二抗,以冻干形式或溶液中。容器还可含有第三容器,其盛放可检测标记的第三抗体,以冻干形式或溶液中。这种性质的试剂盒可用于本发明的三明治分析。标签或包装插页可提供组成的描述以及体外预期或诊断用途的说明。

[0278] 各种试剂的相对量可以在很大范围内变化,以供试剂溶液的浓缩,其大大优化了检测的灵敏度。具体地,可以包括赋形剂的干粉,通常冻干粉,形式提供试剂,经溶解提供具有合适浓度的试剂溶液。

[0279] 在本发明的另一方面中,提供此处详述的单克隆抗体或其结合片段,其标记有可检测部分,从而其可包装于和用于,例如,试剂盒中,来诊断或鉴定具有前述抗原的细胞。这种标记的非限定性实例包括荧光团比如异硫氰酸荧光素;发色团、放射性核素、或酶。这种标记抗体或结合片段可用于,例如,抗原的组织学定位、ELISA、细胞分选以及用于检测或定量 cMet 和此抗原携带细胞的其它免疫技术。

[0280] 试剂盒还提供用于凋亡分析、用于从细胞中纯化或免疫沉淀 cMet 的阳性对照。为了分离和纯化 cMet,试剂盒可包含偶联至珠(如琼脂糖珠)的此处所述抗体或其抗原结合片段。可以提供试剂盒,其包含用于体外检测和定量 cMet 的抗体,如在 ELISA 或 Western 免疫印迹中。如同制造品,试剂盒包括容器以及容器上或附着的标签或包装插页。容器容纳包括至少一种本发明抗 -cMet 抗体或其结合片段的组合物。可包括其它容器,其包含,如稀释剂和缓冲液、对照抗体。标签或包装插页可提供组成的描述以及体外预期或诊断用途的说明。

[0281] 更具体地,本发明涉及通过本领域技术人员公知的任何方法确定肿瘤 cMet 等级的试剂盒。优选实施方案中,正如将在实施例中描述,本发明涉及通过 IHC 方法确定肿瘤 cMet 等级的试剂盒。

[0282] 在一个具体实施方案中,本发明由包括至少抗 -c-Met 抗体、或其功能片段或衍生物的试剂盒组成,如上所述,所述抗体优选经标记。

[0283] 必须了解,本领域技术人员可以使用任何标记方法比如,例如,使用上述标记。

[0284] 在一个优选实施方案中,用于在受试者中体外检测 c-Met 表达肿瘤的存在和 / 或

位点的本发明的试剂盒,还包括用于检测所述抗-c-Met 抗体和 c-Met 之间结合范围的试剂。

[0285] 在另一个优选实施方案中,用于在 c-Met 表达肿瘤中体外确定 c-Met 的表达水平的本发明的试剂盒,还包括用于定量所述标记抗体和 c-Met 之间结合水平的试剂。

[0286] 在另一个实施方案中,用于体外确定肿瘤的 c-Met 等级的本发明的试剂盒还包括:

[0287] i) 用于检测所述标记抗体和 c-Met 之间结合范围的试剂;以及

[0288] ii) 用于 c-Met 表达水平评分的阳性和阴性对照样本。

[0289] 用于体外确定肿瘤的 c-Met 等级的所述试剂盒还包括专门针对鼠科抗体的多克隆抗体,优选所述专门针对鼠科抗体的多克隆抗体是经标记的。

附图说明

[0290] 本发明的其它特征和优点将通过实施例和附图显示于随后的描述中,图注如下所示。

[0291] 图 1A 和 1B:通过 m224D10Mab 的 c-Met ELISA(图 A) 和 FACS(图 B) 识别。

[0292] 图 2:[¹²⁵I]-HGF 结合抑制实验。总的 [¹²⁵I]-HGF 特异性结合(以%表示)在半对数图上作图表示为配体浓度的函数。特异性结合值是在三份中进行的实验的平均值。

[0293] 图 3A 和 3B:用同种型对照(图 3A) 和 m224D10Mab(图 3B) 染色的,来自 U87-MG 异种移植肿瘤的石蜡-包埋切片的 IHC 分析。

[0294] 图 4:通过 m221C9Mab 的 c-Met 的 FACS 识别。

[0295] 图 5A 和 5B:m221C9Mab 对固定化的二聚体(A) 和单体(B) c-Met 蛋白的滴定曲线。

[0296] 图 6:用 m224D10 进行的,来自表达各种水平 c-Met 的乳腺(A) 和胃(B) 肿瘤组织的石蜡-包埋切片的 IHC 染色。

[0297] 图 7:用 m221C9 进行的,来自表达各种水平 c-Met 的乳腺(A) 和胃(B) 肿瘤组织的石蜡-包埋切片的 IHC 染色。

[0298] 图 8:相继注射 Mab 11E1 和 224D10 的传感图,在流动池 2 上,通过抗-标签-His 抗体激活 CM5 传感芯片,于 201.7RU 捕获 c-Met-Fc。

[0299] 图 9:相继注射 Mab 224G11 和 224D10 的传感图,在流动池 2 上,通过抗-标签-His 抗体激活 CM5 传感芯片,于 203.4RU 捕获 c-Met-Fc。

[0300] 图 10:相继注射 Mab 5D5 和 224D10 的传感图,在流动池 2 上,通过抗-标签-His 抗体激活 CM5 传感芯片,于 203.6RU 捕获 c-Met-Fc。

[0301] 图 11:七个抗-cMet 抗体的表位作图。箭头表示此研究进行的三个实验。灰色方形表示未与 224D10 进行测试的抗体。

[0302] 图 12:和 m221C9Mab 的 HGF 竞争分析。

具体实施方式

[0303] 实施例 1:能够用于诊断目的的抗 cMet 抗体的产生和选择

[0304] - 免疫步骤

[0305] 为了产生抗-cMet 抗体,用在其质膜上表达 cMet 的 CHO 转染细胞系对 8 周龄的

BALB/c 小鼠皮下免疫 3 至 5 次 (20×10^6 细胞 / 剂量 / 小鼠)、或 2 至 3 次用 cMet 胞外结构域融合蛋白 ($10\text{--}15 \mu\text{g}$ / 剂量 / 小鼠) (R&D Systems, Catalog#358MT) 或混合完全弗氏佐剂的这种重组蛋白的片段免疫,用于第一次免疫以及不完全弗氏佐剂用于余下的免疫。还进行小鼠接受 CHO-cMet 细胞和重组蛋白的混合操作。细胞融合的前三天,小鼠用重组蛋白或片段通过腹腔注射或静脉内注射进行增强。然后收集小鼠的肾,和 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞 (ATCC) 融合,进行 HAT 选择。通常,为了制备单克隆抗体或其功能片段,尤其是鼠科来源的,可能涉及尤其是手册《抗体》中描述的技术 (Harlow 和 Lane, Antibodies :A Laboratory Manual, ColdSpring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) 或涉及 Kohler 和 Milstein 描述的制备杂交瘤的技术 (Nature, 256 :495-497, 1975)。

[0306] -224D10 的筛选步骤

[0307] 获得的杂交瘤首先通过 ELISA 对 cMet 重组蛋白进行筛选。简单来说,重组人 c-Met-Fc 蛋白 (R&D systems) 在 Immulon II 96-孔板上 4°C 下包被过夜,用 0.5% 明胶溶液封闭 1 小时的步骤后,在 37°C 下加入一次 10^5 剂量范围的 m224G10 抗体再持续 1 小时。然后洗涤板,在 37°C 下加入羊抗鼠 (Jackson) 特异性 IgG HRP 持续 1 小时。用 MTB 底物溶液进行反应显色。然后通过 FACS 分析针对表达中等至高水平 c-Met 的 A459 和 NCI-H441 细胞系进行第二次筛选,以确保其产生能够识别肿瘤细胞上天然受体的抗体。出于此目的, 2×10^5 细胞和浓度范围未偶联的 224D10Mab 或 9G4 (IgG1 同种型对照 Mab) 在 4°C 下孵育 20 分钟,在补充有 1% BSA 和 0.01% NaN_3 的磷酸缓冲盐 (PBS) 中洗涤三次之后,细胞和二抗羊抗鼠 Alexa488 (1/500 稀释) 在 4°C 下孵育 20 分钟。在补充有 1% BSA 和 0.1% NaN_3 的 PBS 中再洗涤三次之后,通过 FACS (Facsclibur, Becton-Dickinson) 分析细胞。至少评价 5000 个细胞来计算荧光强度平均值。

[0308] 扩增、克隆这两个测试中阳性反应者,回收、纯化并筛选一系列缺乏和放射标记 HGF 竞争的杂交瘤。实际上,在用治疗性抗体治疗的患者中,患者选择和作为生物标志物通常需要诊断抗体遵循靶向受体的行为。关于后者,要考虑的主要原则是诊断抗体必须结合和治疗性抗体所识别的不同的表位。中和抗生长因子受体的治疗性抗体的目的之一是抑制配体结合。在这方面,选择诊断抗体期间,那些不干扰配体结合的可以选择。为了测试这种特性,进行抗体和放射标记 HGF 的竞争分析。简单来说,和重组 c-Met-Fc 蛋白 (R&D) 4°C 下包被过夜之前,蛋白 A FlashPlate 96-孔微孔板 (Perkin Elmer) 在 PBS 中用 0.5% 明胶进行封闭 (室温 2 小时)。游离残基蛋白 A 位点再用无关 hIgG 室温下饱和 2 小时。各步骤后用 PBS 洗涤板。对于竞争分析,在各种浓度的待测试抗 -c-Met 单克隆抗体或 PBS pH 7.4 中从 0.1pM 至 $1 \mu\text{M}$ 的 HGF (R&D Systems) 存在下,测量在 200pM [^{125}I]-HGF (特异性活性 $\sim 2,000\text{Ci}/\text{mmol}$) 和固定化 c-Met 的结合。引入这样的抗体作为实验的阳性对照,其由于具有置换 HGF 的能力而得知 (224G11、11E1 和 5D5)。5D5Mab 是通过 Genentech 产生的抗体,在 ATCC 作为杂交瘤可以获得。鼠科 IgG1,描述为 9G4,用作同种型对照。板然后在室温孵育 6 小时,并在 Packard Top 计数显微镜闪烁计数器上计数。在 $1 \mu\text{M}$ HGF 存在时确定非特异性结合。

[0309] 最后,在来自表达 c-Met 的肿瘤异种移植的石蜡-包埋的切片上,选择满足上述三个原则 (i) ELISA 测试中 c-Met 识别, ii) 结合天然的 c-Met, 以及 iii) 和放射标记的配体没有竞争) 的 Mab 用于最终的 c-Met 识别测试。对于这种评价,来自 U87-MG 异种移植的

肿瘤切片进行脱蜡、再水化、以及置于 $1\times$ 靶复原缓冲液 (Target Retrieval Buffer $1\times$) 中 (Dako S1699) 在 98°C 下沸浴中预热 30 分钟用于在 98°C 下热诱导的表位复原,然后在靶复原缓冲液中再持续 30 分钟。在 Tris 缓冲盐 -0.05% 吐温 20 (TBS-T) (Dako S3006) 中洗涤三次之后,内源性过氧化物酶的活性用过氧化物酶封闭试剂 (Dako K4007) 封闭 5 分钟。在加入待测试的 c-Met 小鼠单克隆抗体 ($5\mu\text{g/ml}$) 之前,用 TBS-T 洗涤切片并用封闭试剂 (UltraVblock-TA-125UB-LabVision) 孵育 5 分钟。小鼠 IgG1/kappa ($5\mu\text{g/ml}$, X0931, Dako) 用作阴性对照。然后在 4°C 下切片孵育过夜,用 TBS-T 洗涤并用生物素化连接通用 (biotinylated link universal) (LSAB+, Dako K0679) 在室温下孵育 15 分钟。用 TBS-T 洗涤后,切片用链霉亲和素-过氧化物酶复合物通用 (LSAB+, Dako K0679) 孵育 15 分钟。二氨基联苯胺用于棕色反应产物的显色。

[0310] 一系列融合之后,鼠科 224D10 (m224D10) 抗体鉴定为用于诊断 c-Met 阳性肿瘤的候选。如图 1 所示,m224D10 能够在 ELISA 分析中 (图 1A),以及在已知表达 c-Met 的 A549 和 NCI-H441 细胞系表面上 (图 1B) 识别 c-Met。

[0311] 然后在放射标记的 HGF-置换测试中测试 m224D10。图 2 中,总的 $[^{125}\text{I}]$ -HGF 特异性结合在半对数图上作图表示为配体浓度的函数,抑制 50% 的放射性配体结合 (IC_{50}) 所需的各种抑制剂浓度从获得的 S 形竞争曲线上作图确定。如所期望的,非放射标记 HGF 能够完全置换 $[^{125}\text{I}]$ -HGF 对固定化 c-Met 的结合,其中对照抗体 9G4 不显示任何 HGF 阻断活性。抗-c-Met Mab 224G11、11E1 和 5D5,用作阳性对照,能够抑制 $[^{125}\text{I}]$ -HGF 对固定化 c-Met 的结合, IC_{50} 值分别为 3.6nM 、 42nM 和 4.4nM 。Mab m224D 10 不能置换 $[^{125}\text{I}]$ -HGF,且被选择用于免疫组织化学 (IHC) 研究。

[0312] 图 3B 中显示的结果说明 m224G10 能够在已知尤其对 c-Met 靶向治疗敏感的 U87-MG 异种抑制肿瘤上识别 c-Met。如所期望的,IgG1 同种型对照没有观察到染色 (图 3A)。基于这些结果,进行实验来确定是否 224D10Mab 能够用于给肿瘤 c-Met 评分。

[0313] -221C9 筛选步骤

[0314] 获得的杂交瘤首先通过 ELISA 对二聚体或单体 cMet 重组蛋白进行筛选。简单来说,重组人 c-Met (二聚体或单体) 蛋白在 Immulon II 96-孔板上 4°C 下包被过夜,用 0.5% 明胶溶液封闭 1 小时的步骤后,在 37°C 下加入纯的杂交瘤上清再持续 1 小时。然后洗涤板,在 37°C 下加入羊抗鼠 (Jackson) 特异性 IgG HRP 持续 1 小时。用 MTB 底物溶液进行反应显色。然后通过 FACS 分析针对表达中等至高水平 c-Met 的 A549 细胞系进行第二次筛选,以确保其产生能够识别肿瘤细胞上天然受体的抗体。出于此目的, 2×10^5 细胞和 $10\mu\text{g/ml}$ m221C9 或 m10D9 (IgG1 同种型对照 Mab) 在 4°C 下孵育 20 分钟。在补充有 1% BSA 和 0.01% NaN_3 的磷酸缓冲盐 (PBS) 中洗涤三次之后,细胞和二抗羊抗鼠 Alexa 488 ($1/500$ 稀释) 在 4°C 下孵育 20 分钟。在补充有 1% BSA 和 0.1% NaN_3 的 PBS 中再洗涤三次之后,通过 FACS (FacsCalibur, Becton-Dickinson) 分析细胞。至少评价 5000 个细胞来计算荧光强度平均值。

[0315] 扩增、克隆、同种型和扩展这两个测试中阳性杂交瘤。收集新杂交瘤上清。确定其 IgG 含量。在五株人类肿瘤细胞系 (A549、BXPC3、MCF7、U87MG 和 HepG2) 的盘上进行互补细胞计数分析。所有这些细胞系由 ATCC 提供。获得的数据见于图 4, MFI 值见于此后的表 6。

[0316] 表 6

[0317]

来自在五株肿瘤人类细胞系 (ATCC) 的 用 221C9 Mab 进行的细胞计数分析 (MFI) 的数据					
	A549	BXPC-3	MCF7	U87MG	HepG2
仅细胞	13.98	11.87	9.87	9.10	10.52
二抗	11.98	13.23	11.10	11.20	15.85
同种型对照	11.83	14.77	12.06	11.56	18.12
221C9	243.59	375.57	31.95	71	233.58

[0318] 用纯化的 221C9 抗体进行互补实验。进行对单体 c-Met 蛋白和二聚体 c-Met 蛋白的一抗滴定。

[0319] 滴定曲线见于图 5。观察到对 c-Met 受体形式相似的亲和性。为进行这些 ELISA, 人二聚体 c-Met 蛋白 (R&D systems, cat#358MT) 以 0.25 μ g/ml 的浓度在 PBS 中 4°C 下包被过夜。用 0.5% 明胶溶液 (Costar#3690) 对板进行 37°C 下 2 小时的饱和之后, 杂交瘤上清在 37°C 下孵育 1 小时。一旦用 PBS 漂洗, 在 ELISA 缓冲液 (PBS 中 0.1% 明胶 / 0.05% 吐温 20) 中以 1/5000 稀释, 将抗 - 鼠 HRP- 抗体 (Jackson ImmunoResearch, catalog#115-035-164) 加入至各孔, 板在 37°C 下孵育 1 小时。PBS 中洗涤 3 次后, 通过加入 50 μ l TMB 底物 (Uptima) 除去过氧化物酶活性。反应在室温下持续 5 分钟。通过加入 50 μ l / 孔 1M H_2SO_4 溶液终止反应, 450nm 下在读板机上读取。对单体 c-Met 进行相同类型的操作, 但是此种情况下, 在 5 μ g/ml 下包被蛋白。

[0320] 最后, 221C9Mab 满足上述 2 个原则 (i) ELISA 测试中 c-Met 识别, ii) 结合表达于人类肿瘤细胞系表面的天然 c-Met。

[0321] 实施例 2 : 用 m224D10 和 m221C9Mab 针对 c-Met 表达给组织评分

[0322] 使用上述规程, 用 m224D10 和 m221C9Mab 分别对表达不同水平 c-Met 的一系列石蜡 - 包埋的人肿瘤组织进行染色。

[0323] 显示于图 6 的 m224D10 结果和显示于图 7 的 m221C9 结果说明, 在两种肿瘤类型中, m224D10 和 m221C9 能够区分具有不同水平 c-Met 的人类肿瘤。使用这些抗体, 肿瘤可以评分为 :

[0324] -0 或 neg : 阴性肿瘤, 其中没有膜染色或观察到 10% 以下膜阳性细胞,

[0325] -1⁺ : 10% 以上的肿瘤细胞中几乎难以察觉的染色,

[0326] -2⁺ : 10% 以上的肿瘤细胞中观察到中等的完全的膜染色,

[0327] -3⁺ : 10% 以上的肿瘤细胞中强烈的完全的膜染色。

[0328] 实施例 3 : 224D10 竞争实验

[0329] 如上已经写到, 诊断 Mab 还可用作治疗性抗体的“响应标志物”, 所述治疗性抗体诱导靶向受体的下调。考虑到这点, 取血液或活检 (标本) 可以在治疗的患者中进行, 并分析 c-Met 等级。出于此目的, 待使用的诊断抗体必须识别和治疗性抗体所识别的不同的表位。由于治疗性抗体通常能够置换 HGF, 选择不合配体置换竞争的诊断抗体可用作所有治疗

性 Mab 的响应标志物。

[0330] 在本实施例中,进行 224D10 和很多治疗性 Mab 之间的竞争实验来说明 224D10 可用作响应标志物。

[0331] 在 biacore 实验中研究了治疗性抗-c-MetMab 11E1、227H1、224G11 和 5D5Mab(其是单臂 5D5 的鼠科形式,可在 ATCC 作为杂交瘤从商业上获得)。简单来说,在流动池 1 和 2 上,通过按照供应商说明书使用胺偶联试剂盒共价偶联抗多组氨酸 Mab 来激活 CM5 传感芯片。运行缓冲液是 HBS-EP 缓冲液。在 25℃ 下以 30 μ l/min 流速进行实验。HGF-R/Fc 嵌合蛋白在运行缓冲液中以 10 μ g/ml 的浓度使用,并经流动池 2 注射 1 分钟。通常,捕获 190RU 附近的 c-Met-Fc。流动池 1 作为参考用于估计 Mab 的非特异性结合。第一 Mab(20 μ g/ml) 经两个流动池注射 2 分钟。然后经两个流动池注射二抗(20 μ g/ml)。记录差异 Fc2-Fc1 共振信号。在各循环最后,通过经两个流动池注射半分钟甘氨酸 pH 1.5 再生缓冲液弃掉 c-Met 和 Mab 蛋白来再生传感芯片。

[0332] 用 11E1 作为一抗和 224D10 作为二抗进行第一实验(见图 8)。本实验显示 11E1 和 224D10 结合至两个在 c-Met-Fc 分子表面远隔的表位区域。用 224G11 作为一抗和 224D10 作为二抗进行第二实验(见图 9)。本实验显示 224G11 和 224D10 也结合至两个远隔的区域。用 5D5 作为一抗和 224D10 作为二抗进行第三实验(见图 10)。再次,本实验显示 5D5 和 224D10 结合至两个远隔的区域。总之,224D10 结合至 c-Met 分子上和 11E1、224G11 和 5D5 结合位点远隔的区域。因为,用相同类型的 biacore 操作获得的初步数据,显示来自辉瑞的 13.3.2 抗 c-Met 抗体属于和 11E1 相同的表位图组(图 11),我们可以猜测 224D10 和 13.3.2 可以同时结合至相同的 c-Met 分子上,即便这种组合并没有测试过。相似地,对于属于和 224G11 相同的表位组的 227H1(图 11),可能 227H1 和 224D10 抗体可同时结合至 c-Met。最后,属于和 5D5 相同的表位组(图 11)的 223C4,可能和 224D10 同时结合至 c-Met。

[0333] 实施例 4:在 221C9 抗体存在下进行的 HGF 竞争实验

[0334] 为了进一步描述诊断 Mab,进行 HGF 竞争分析。在分开的饱和(1 $\times$ PBS 中 0.5%明胶)板上制备第一反应混合物,其包括 c-Met 蛋白、有或没有待测试 Mab 存在。对鼠科抗体(参考和待研究 Mab)进行系列 1:2 稀释(从在 12 个柱上 40 μ g/ml 开始)。然后,除了仅含有 ELISA 稀释剂(0.1%明胶、0.05%吐温 20 于 PBS 1 $\times$ 中)的阴性对照系外,加入 0.8 μ g/ml rh c-Met-Fc 蛋白(RDSystems,ref.358-MT/CF)。匀浆之后,用 PBS 中 0.3 μ g/ml rhHGF 溶液将竞争样本加载至 HGF- 包被的板上(RDSystems,ref.294-HGN/CF)。孵育和若干次洗涤后,用羊抗人 IgG-HRP(Jackson,ref.109-035-098)检测结合的 c-Met 蛋白。一旦结合,TMB 底物加入至板中。加入 H₂SO₄ 酸溶液终止反应,在 450nm 下使用酶标仪获得光密度读数。

[0335] 用 221C9 在有或无 c-Met-Fc 重组蛋白存在下进行实验(见图 12)。本实验显示 221C9 能够和 c-Met 竞争结合其固定化配体受体。然而 20 μ g/ml 221C9 存在时,仅观察到部分 c-Met 结合。

[0001]

序列表

<110> 皮埃尔法布雷医药公司 (PIERRE FABRE MEDICAMENT)

<120> 抗-cMet抗体及其用于癌症的检测和诊断的用途

<130> D27752

<140> PCT/EP2010/062271

<141> 2010/08/23

<150> EP 09305777.6

<151> 2009-08-21

<150> US 61/235,864

<151> 2009-08-21

<150> US 61/348,005

<151> 2010-05-25

<160> 60

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠 (mus musculus)

<400> 1

Thr Ser Ala Tyr Phe
1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

Ile Asn Tyr Asp Gly Thr Asn
1 5

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

Asp Arg Thr Phe Ala Tyr
1 5

[0002]

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 4

Gln Arg Ile Tyr Asn Tyr
1 5

<210> 5
<211> 3
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 5

Tyr Ala Ser
1

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 6

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 7

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala Tyr Phe
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 8

Thr Arg Asp Arg Thr Phe Ala Tyr
1 5

[0003]

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 9

Thr Ser Ala Tyr Phe Trp Ser
1 5

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 10

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

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 11

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

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 12

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 5

<210> 13

<211> 115

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 13

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

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

[0004]

Tyr Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

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

Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

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

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

Val Ser Ala
115

<210> 14
<211> 107
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 14

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

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

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

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
85 90 95

[0005]

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

<210> 15
<211> 15
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 15
accagtgcctt atttc 15

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 16
ataaactacg acggtaccaa t 21

<210> 17
<211> 18
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 17
gatcggacct ttgcttat 18

<210> 18
<211> 18
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 18
caaagaatttt acaactac 18

<210> 19
<211> 9
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 19
tatgcttcc 9

<210> 20
<211> 27
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 20
caacagagta acagctggcc tctcacg 27

[0006]

<210> 21	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 小鼠	
<400> 21	
ggctacacca tcaccagtgc ttatttc	27
<210> 22	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 小鼠	
<400> 22	
acaagagatc ggacctttgc ttat	24
<210> 23	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 小鼠	
<400> 23	
accagtgcctt atttctggag c	21
<210> 24	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 小鼠	
<400> 24	
ttcataaact acgacgttac caataactac aacctatctc tcaaaaat	48
<210> 25	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 小鼠	
<400> 25	
agggccagtc aaagaattta caactaccta cac	33
<210> 26	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 小鼠	
<400> 26	
tatgcttccc agtccatctc t	21
<210> 27	
<211> 345	

[0007]

<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 27
gatctacagc ttcaggagtc aggacctggc ctctgtgaaac cttctcagtc tctgtctctc 60
acctgcctcig tcactggcta ctccatcacc agtgccttatt tctggagctg gatccggcag 120
tttccaggaa acaaaactgga atggatgggc ttcataaact acgacggtac caataactac 180
aacccatctc tcaaaaatcg aatctccate actcgtgata catctaagaa ccagtttttc 240
ctgaggttga attctgtgac tactgacgac acagctacgt attactgtac aagagatcgg 300
acctttgcctt attggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345

<210> 28
<211> 321
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 28
gatattgtgt taactcagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagagtcagt 60
ctttcctgca gggccagtc aagaattttac aactacctac actggtatca acaaaaatca 120
catgagtcctc caaggetttct catcaagtat gettcccagt ccatctctgg gateccctcc 180
aggltcagtg gcagtggtctc agggacagat ttcatcttca ctatcaacag tglggagact 240
gaagatttttg gaatgtattt ctgtcaacag agtaacagct ggcctctcac gttcgggtgt 300
gggaccaagc tggagctgag a 321

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 29

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
1 5

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 30

Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr
1 5

[0008]

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 31

Ala Arg Arg Val Gly Tyr Leu Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 32

Ser Ser Val Ser Tyr
1 5

<210> 33
<211> 3
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 33

Asp Thr Ser
1

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 34

Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 35

Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 36

[0009]

<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 36

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

Thr

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 37

Arg Val Gly Tyr Leu Met Asp Tyr
1 5

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 38

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

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 39

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 40
<211> 117
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 40

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

[0010]

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

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

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

Arg Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Ala Lys Ser Ser Ile Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Val Gly Tyr Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Ala Pro Gln
115

<210> 41
<211> 106
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 41

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

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

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

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

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr

[0011]

	85	90	95
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys			
100		105	
<210> 42			
<211> 24			
<212> DNA			
<213> 小鼠			
<400> 42			
ggctacacct tcaccagcta ctgg			24
<210> 43			
<211> 24			
<212> DNA			
<213> 小鼠			
<400> 43			
attaatccta gcaacggteg tact			24
<210> 44			
<211> 30			
<212> DNA			
<213> 小鼠			
<400> 44			
gcaagaaggg ttggttacct catggactac			30
<210> 45			
<211> 15			
<212> DNA			
<213> 小鼠			
<400> 45			
tcaagtgtaa gttac			15
<210> 46			
<211> 9			
<212> DNA			
<213> 小鼠			
<400> 46			
gacacatcc			9
<210> 47			
<211> 27			
<212> DNA			
<213> 小鼠			

[0012]

<400> 47 cagcagtgga atagtaaccc acccacg	27
<210> 48 <211> 15 <212> DNA <213> 小鼠	
<400> 48 agctactgga tgcac	15
<210> 49 <211> 51 <212> DNA <213> 小鼠	
<400> 49 gagattaatc ctagcaacgg tegtactcac tacaatgaga agttcaggac c	51
<210> 50 <211> 24 <212> DNA <213> 小鼠	
<400> 50 agggttggtt acctcatgga ctac	24
<210> 51 <211> 30 <212> DNA <213> 小鼠	
<400> 51 agtgccagct caagtgtgtaag ttacatgcac	30
<210> 52 <211> 21 <212> DNA <213> 小鼠	
<400> 52 gacacatcca aactggettc t	21
<210> 53 <211> 351 <212> DNA <213> 小鼠	
<400> 53 caggccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagctg	60

[0013]

tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg	120
cctggacaag gccttgagtg gattggagag attaatccta gcaacggteg tactcactac	180
aatgagaagt tcaggaccaa ggccacactg actgttgcca aatcctccat cacagcctac	240
atgcaactca gcaccctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaagggtt	300
ggttacctca tggactactg gggtaagga acctcagtea ccgctcctca g	351

<210> 54
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 54 caaattgttc tcacceagtc tccageaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc	60
atgacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgcaact ggtaccagca gaagtcaggc	120
acctccccca aaagattgat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcgc	180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcagcat ggaggtgaa	240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgga aatagtaacc caccacggtt cgggtgctggg	300
accaagctgg agctgaaa	318

<210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 来自CDR-H1的序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa是S或T

<220>
 <221> misc_fcature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa是I或F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa是A或缺失

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)

[0014]

<223> Xaa是F或W

<400> 55

Gly Tyr Xaa Xaa Thr Ser Xaa Tyr Xaa
1 5

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 来自CDR-H2的序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa是Y或P

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa是D或S

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa是N或缺失

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa是T或R

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa是N或T

<400> 56

Ile Asn Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa
1 5

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 来自CDR-H3的序列

[0015]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa是T或A

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa是D或R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa是R或V

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa是T或G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa是F或Y

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa是A或L

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa是M或缺失

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa是D或缺失

<400> 57

Xaa	Arg	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Tyr
1			5						10

<210> 58
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 来自CDR-L1的序列

<220>
 <221> misc_feature

[0016]

<222> (1).. (1)
<223> Xaa是Q或缺失

<220>
<221> misc_feature
<222> (2).. (2)
<223> Xaa是R或S

<220>
<221> misc_feature
<222> (3).. (3)
<223> Xaa是I或S

<220>
<221> misc_feature
<222> (4).. (4)
<223> Xaa是Y或V

<220>
<221> misc_feature
<222> (5).. (5)
<223> Xaa是N或S

<400> 58

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr
1 5

<210> 59
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 来自CDR-L2的序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1).. (1)
<223> Xaa是Y或D

<220>
<221> misc_feature
<222> (2).. (2)
<223> Xaa是A或T

<400> 59

Xaa Xaa Ser
1

<210> 60
<211> 9
<212> PRT

[0017]

<213> 人工序列

<220>

<223> 来自CDR-L3的序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa是S或W

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa是W或N

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa是L或P

<400> 60

Gln Gln Xaa Asn Ser Xaa Pro Xaa Thr
1 5

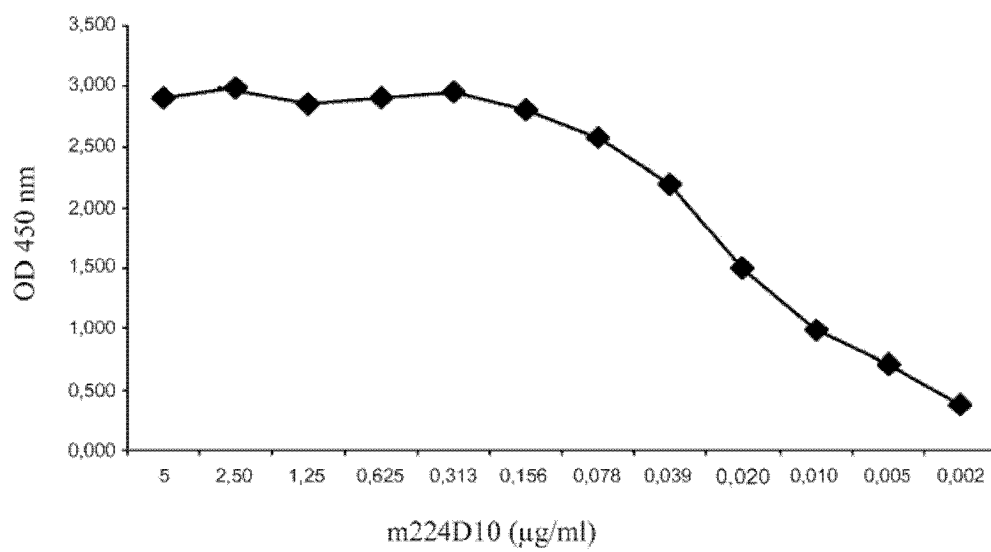


图 1A

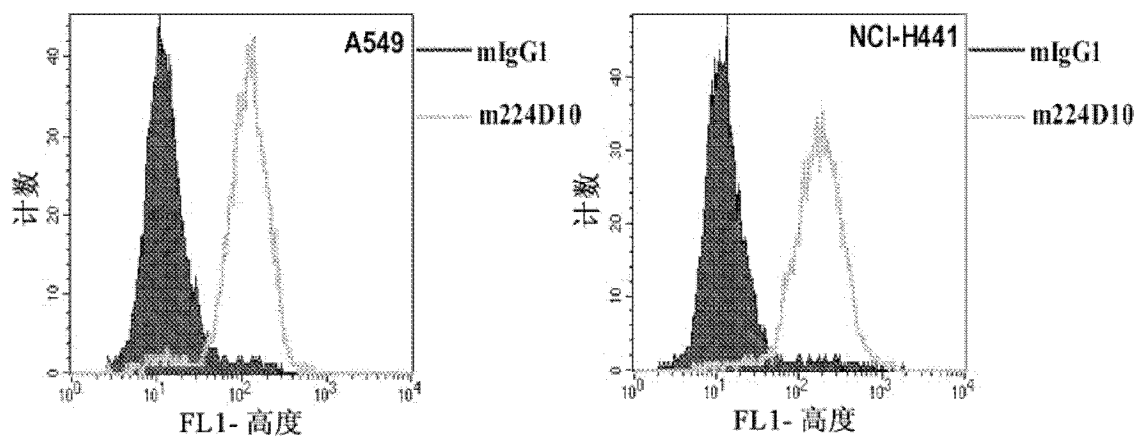


图 1B

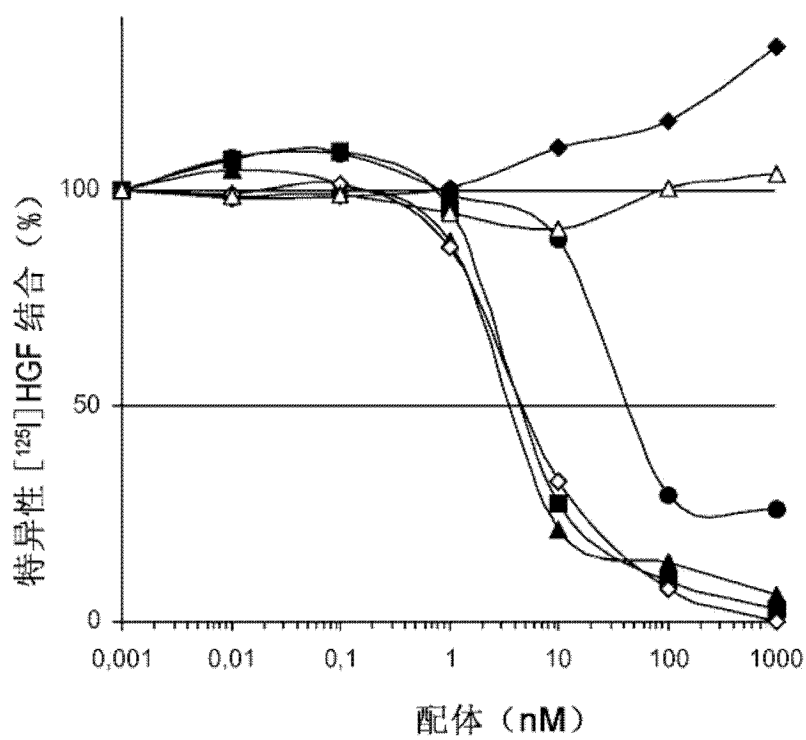


图 2

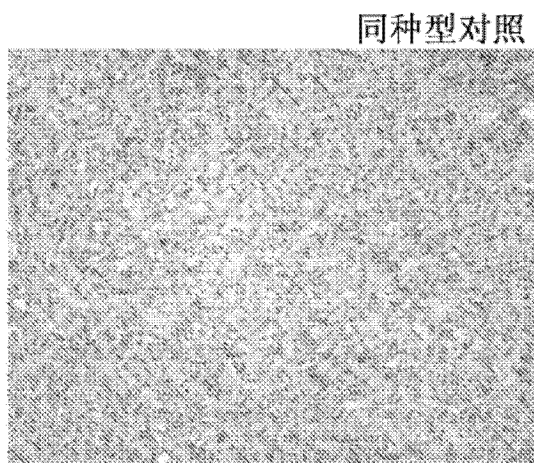


图 3A

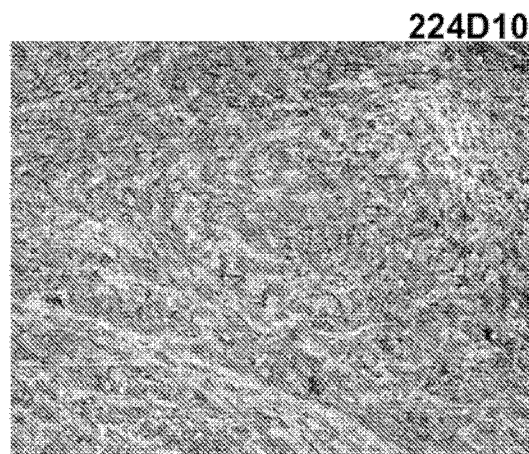


图 3B

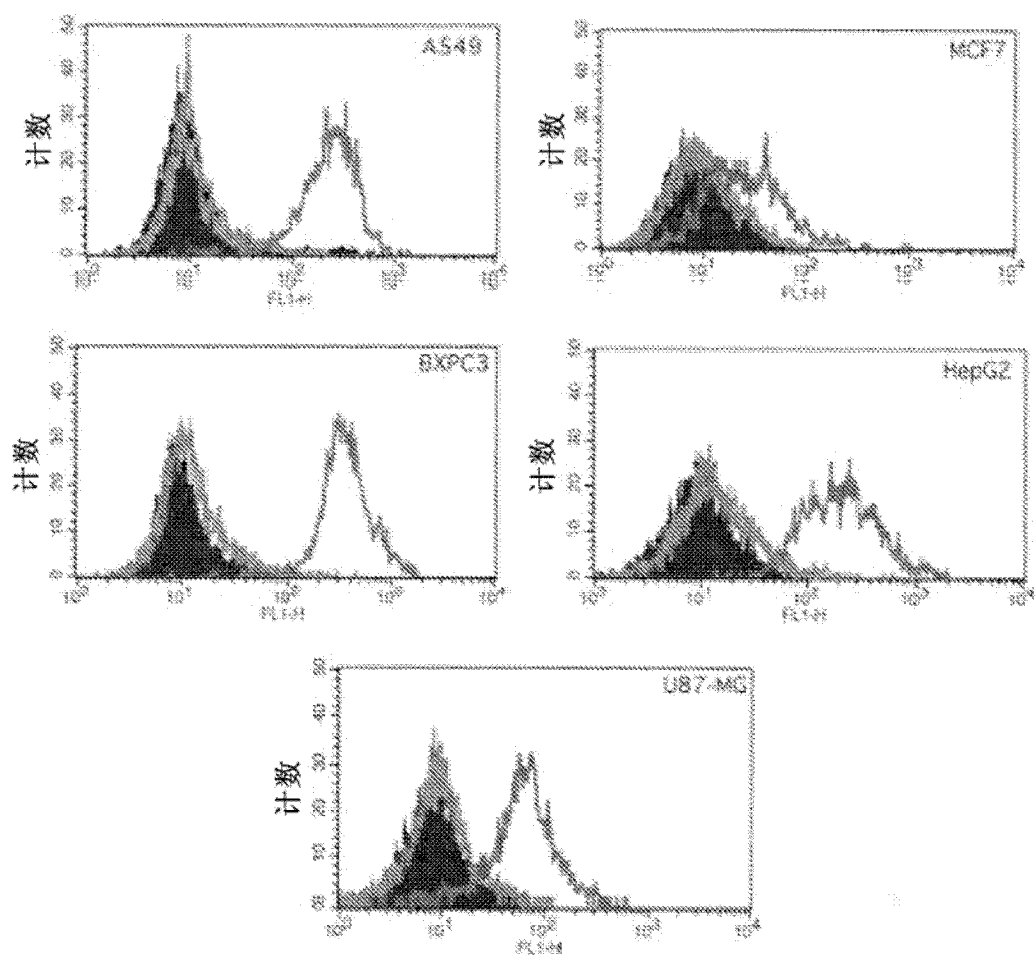


图 4

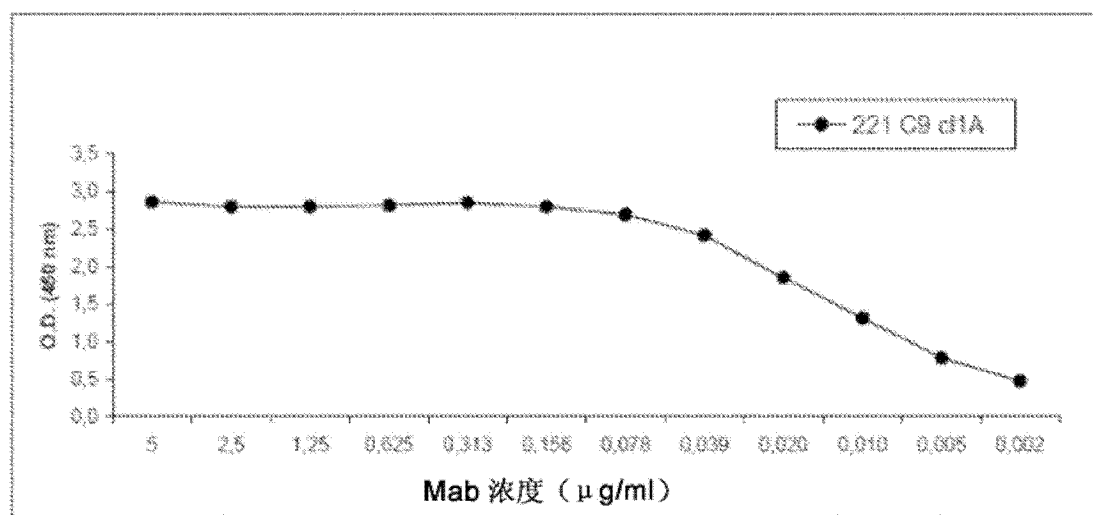


图 5A

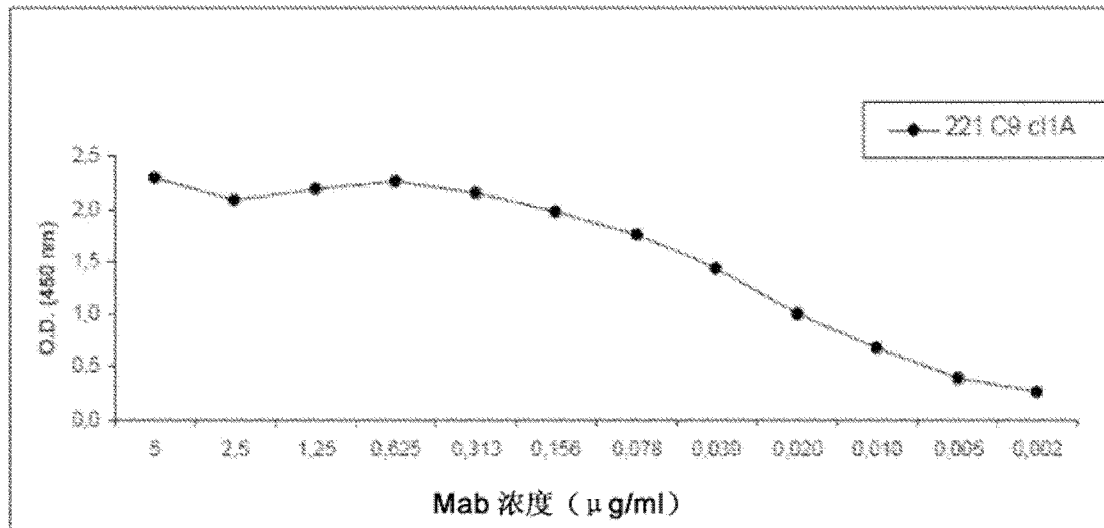
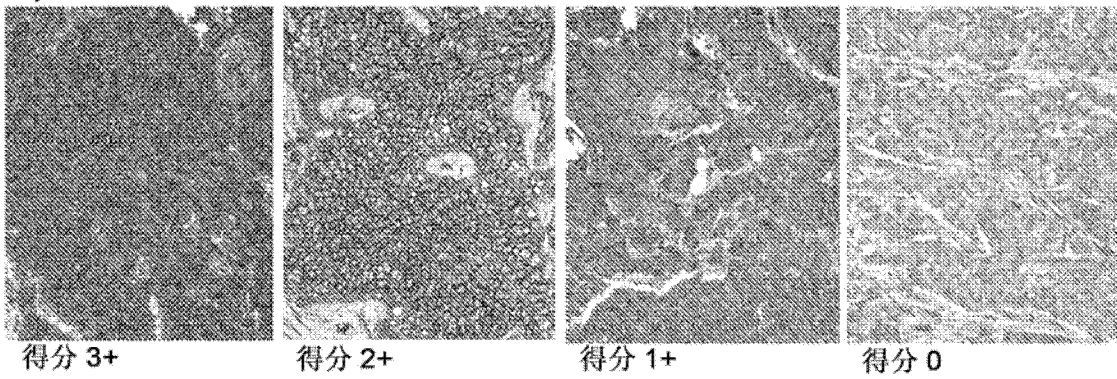


图 5B

A) 乳腺癌



B) 胃癌

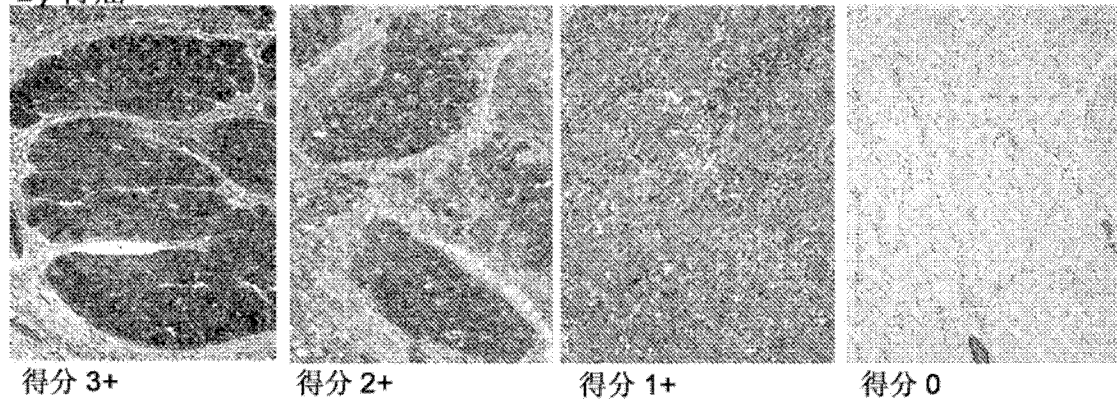
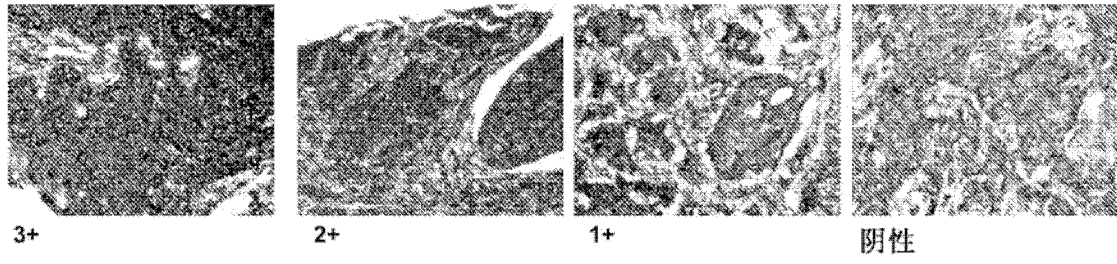


图 6

A) 乳腺癌



B) 胃癌

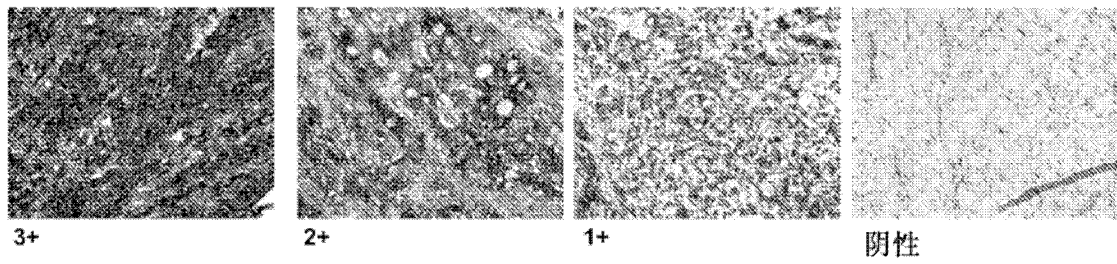


图 7

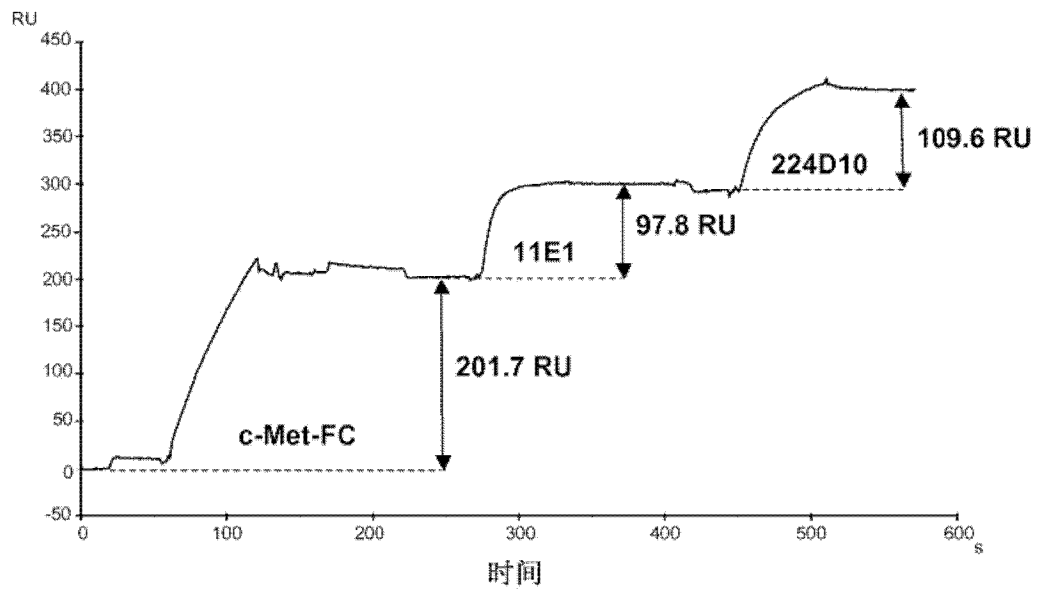


图 8

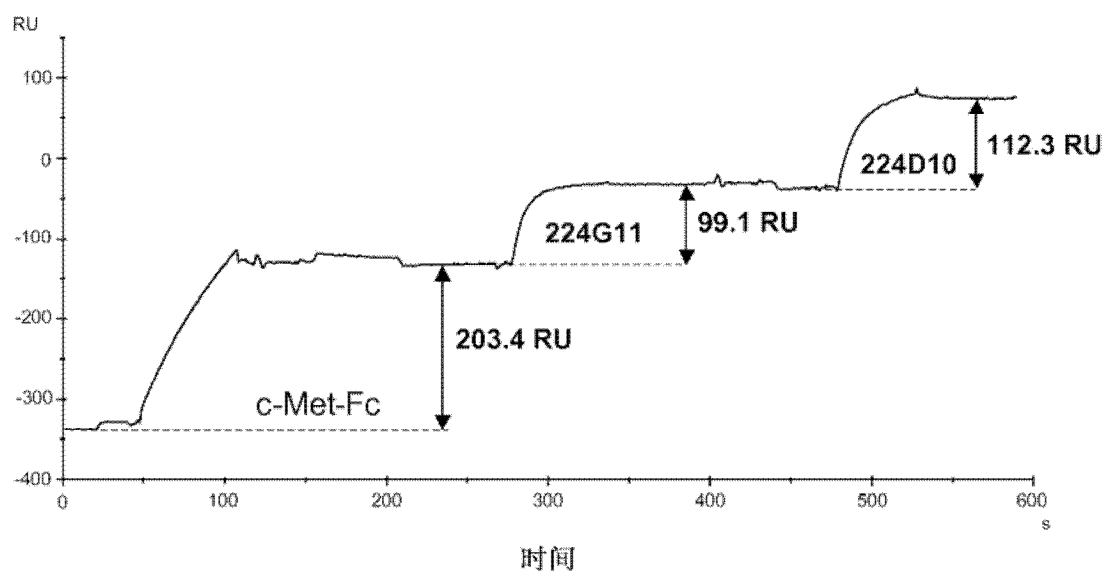


图 9

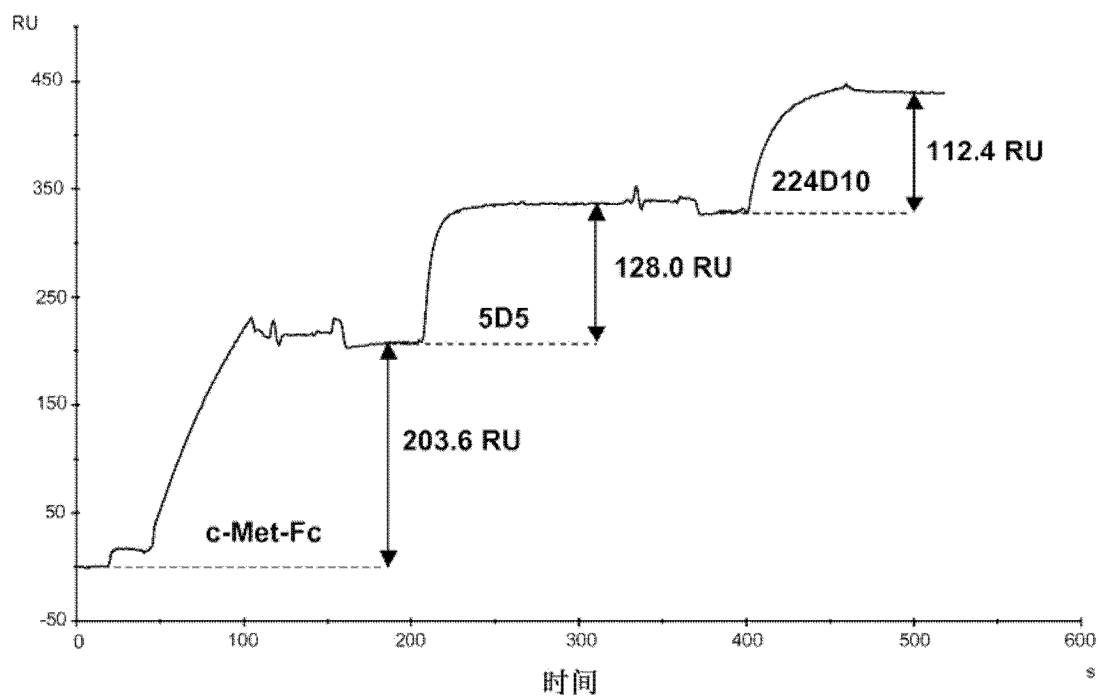


图 10

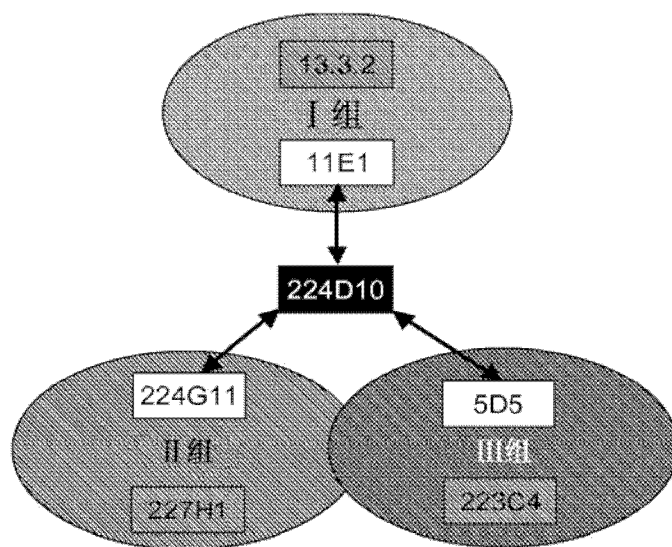


图 11

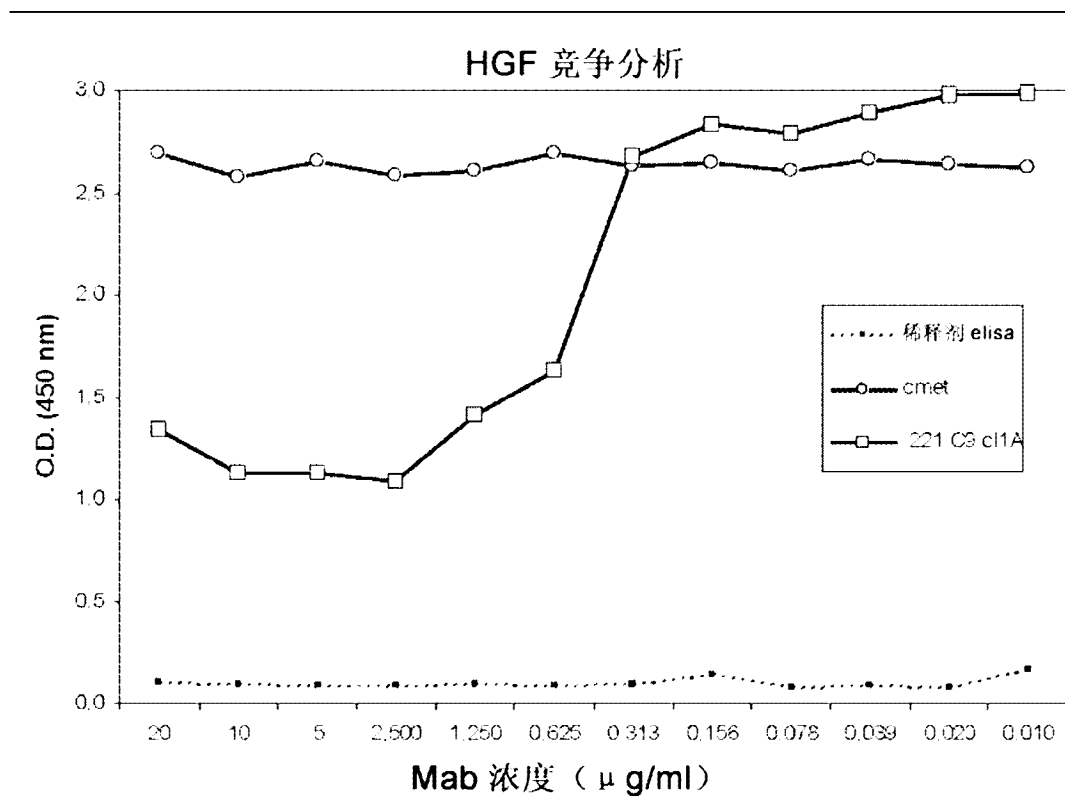


图 12