



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104159611 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 19

(21) 申请号 201380010493. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 02. 22

A61K 39/395(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/5377(2006. 01)

61/601, 786 2012. 02. 22 US

A61P 35/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 08. 22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2013/000167 2013. 02. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/123588 EN 2013. 08. 29

(71) 申请人 阿莱斯亚生物疗法股份有限公司

地址 加拿大魁北克

(72) 发明人 G·B·特姆勃雷 E·维奥 M·菲林

(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 刘晓东

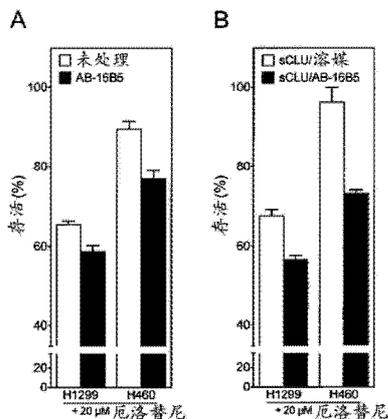
权利要求书2页 说明书20页 附图4页

(54) 发明名称

共使用簇集蛋白抑制剂和 EGFR 抑制剂以治疗癌症

(57) 摘要

表皮生长因子受体 (EGFR) 表达和磷酸化在用抗簇集蛋白抗体治疗的癌细胞中增加。这类治疗还伴随癌细胞的上皮表型复现, 如通过癌细胞表面处增加的 E- 钙黏着蛋白表达所确定。簇集蛋白抑制剂可以因此引起上皮至间充质表型的逆转并回复癌细胞对 EGFR 抑制剂的敏感性。因此提供簇集蛋白抑制剂和 EGFR 的组合以及它们在治疗癌症中的用途。



1. 一种药物组合,包含簇集蛋白抑制剂和 EGFR 抑制剂。
2. 根据权利要求 1 所述的药物组合,其中该簇集蛋白抑制剂能够抑制上皮至间充质转变。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的药物组合,其中该簇集蛋白抑制剂是抗簇集蛋白抗体或其抗原结合片段。
4. 根据权利要求 3 所述的药物组合,其中该抗簇集蛋白抗体或抗原结合片段与人簇集蛋白 β -亚基的 C 末端部分的氨基酸 421 至 443 结合。
5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的药物组合,其中该 EGFR 抑制剂是酪氨酸激酶抑制剂或抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段。
6. 根据权利要求 5 所述的药物组合,其中该酪氨酸激酶抑制剂是吉非替尼、厄洛替尼、伊马替尼、拉帕替尼或神马替尼。
7. 根据权利要求 5 所述的药物组合,其中该酪氨酸激酶抑制剂是吉非替尼。
8. 根据权利要求 5 所述的药物组合,其中该抗体是西妥昔单抗、帕尼单抗、尼妥珠单抗或莫苏珠单抗。
9. 一种治疗癌的方法,包括向患有或疑似患有癌的个体施用簇集蛋白抑制剂和 EGFR 抑制剂。
10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中该簇集蛋白抑制剂能够抑制上皮至间充质转变(EMT)。
11. 根据权利要求 9 或 10 所述的方法,其中该簇集蛋白抑制剂是抗簇集蛋白抗体或其抗原结合片段。
12. 根据权利要求 11 所述的方法,其中该抗簇集蛋白抗体或抗原结合片段与人簇集蛋白 β -亚基的 C 末端部分的氨基酸 421 至 443 结合。
13. 根据权利要求 9 至 12 中任一项所述的方法,其中该 EGFR 抑制剂是酪氨酸激酶抑制剂或抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段。
14. 根据权利要求 13 所述的方法,其中该酪氨酸激酶抑制剂是吉非替尼、厄洛替尼、伊马替尼、拉帕替尼或神马替尼。
15. 根据权利要求 13 所述的方法,其中该酪氨酸激酶抑制剂是吉非替尼。
16. 根据权利要求 13 所述的方法,其中该抗体是西妥昔单抗、帕尼单抗、尼妥珠单抗或莫苏珠单抗。
17. 根据权利要求 9 所述的方法,其中该抗簇集蛋白抑制剂和该 EGFR 抑制剂依次施用。
18. 根据权利要求 16 所述的方法,其中该抗簇集蛋白抑制剂在该 EGFR 抑制剂之前施用。
19. 根据权利要求 9 所述的方法,其中该抗簇集蛋白抑制剂与该 EGFR 抑制剂同时施用。
20. 根据权利要求 9 所述的方法,包括在施用该 EGFR 抑制剂之前检验癌细胞的上皮至间充质表型的逆转。
21. 根据权利要求 9 至 20 中任一项所述的方法,其中该癌是前列腺癌、乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、肝细胞癌、结直肠癌、头颈癌、肺癌、胰腺癌或肾细胞癌。
22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中该乳腺癌是三阴性乳腺癌或基底样乳腺癌。
23. 根据权利要求 21 所述的方法,其中该肺癌是非小细胞肺癌。

24. 根据权利要求 9 至 23 中任一项所述的方法,其中该癌包含表征为抵抗 EGFR 抑制剂的细胞。
25. 根据权利要求 9 至 23 中任一项所述的方法,其中该癌包含表达 EMT 标志物的细胞。
26. 根据权利要求 9 至 25 中任一项所述的方法,其中该抗体或其抗原结合片段包含如 SEQ ID NO. :1、SEQ ID NO. :2、SEQ ID NO. :3、SEQ ID NO. :4、SEQ ID NO. :5、SEQ ID NO. :6、SEQ ID NO. :45、SEQ ID NO. :46、SEQ ID NO. :47、SEQ ID NO. :48、SEQ ID NO. :49 或 SEQ ID NO. :50 中所述的互补性决定区。
27. 根据权利要求 26 所述的方法,其中该抗体或抗原结合区包含如 SEQ ID NO. :1 中所述的 CDRH1、如 SEQ ID NO. :2 中所述的 CDRH2 和如 SEQ ID NO. :3 中所述的 CDRH3。
28. 根据权利要求 26 所述的方法,其中该抗体或抗原结合区包含如 SEQ ID NO. :45 中所述的 CDRH1、如 SEQ ID NO. :46 中所述的 CDRH2 和如 SEQ ID NO. :47 中所述的 CDRH3。
29. 根据权利要求 27 或 28 所述的方法,其中该抗体或抗原结合区包含如 SEQ ID NO. :4 中所述的 CDRL1、如 SEQ ID NO. :5 中所述的 CDRL2、如 SEQ ID NO. :6 中所述的 CDRL3。
30. 根据权利要求 27 或 28 所述的方法,其中该抗体或抗原结合区包含如 SEQ ID NO. :48 中所述的 CDRL1、如 SEQ ID NO. :49 中所述的 CDRL2 和如 SEQ ID NO. :50 中所述的 CDRL3。
31. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的药物组合用于治疗癌用途。
32. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的药物组合在制造用于治疗癌的药剂中的用途。
33. 一种试剂盒,包含簇集蛋白抑制剂和 EGFR 抑制剂。
34. 根据权利要求 33 所述的试剂盒,其中该簇集蛋白抑制剂是抗体或其抗原结合片段。

共使用簇集蛋白抑制剂和 EGFR 抑制剂以治疗癌症

技术领域

[0001] 本发明涉及簇集蛋白抑制剂与表皮生长因子受体 (EGFR) 抑制剂用于治疗癌症的组合。更具体地,本发明涵盖了簇集蛋白抑制剂如抗簇集蛋白抗体恢复癌细胞对 EGFR 抑制剂的敏感性或增强 EGFR 抑制剂作用的用途。

背景技术

[0002] 化疗抗性的形成和侵袭至其他继发部位是实体瘤恶变的共同特征。众所周知化疗药耐药性的形成由参与药物和凋亡抗性的蛋白质过量表达引起。还相当充分地记录了侵袭过程。肿瘤侵袭由增加的癌细胞运动性和造成胞外基质中蛋白质降解的基因表达引起。存在以下日益增加的证据:化疗抗性和肿瘤侵袭可能通过称作上皮至间充质转变 (EMT) 的生物学过程共享共同的起点。最近研究已经展示,转化生长因子 β (TGF β) 可能是 EMT 的关键介体。尽管这些进展,很少治疗途径可用于抑制化疗抗性形成和癌症向其他器官的扩散。最近文献中也已经出现,发生 EMT 的某些肿瘤细胞去分化并采取干细胞样特性 (癌干细胞或 CSC)。如同正常干细胞那样,CSC 内在抵抗化疗和放疗。因此,靶向 EMT 和 CSC 维持过程的特定调节物代表了一种增加针对化疗药的反应并防止癌症复发的非常有前景的治疗策略。

[0003] 利用充分表征细胞系作为 EMT 的模型,鉴定了引起 EMT 后上调的蛋白质。发现这些蛋白质中的一种蛋白质 (称作簇集蛋白的分泌型蛋白质 (sCLU)) 在 EMT 期间受到刺激,并且本身可以促进 EMT 过程 (Lenferink 等人,2009)。产生了与 sCLU 相互作用的几种高亲和力抗体,其中,在基于细胞的测定法中对它们阻断 EMT 的能力测试时,中和 EMT 的这些抗体均与 sCLU 蛋白中的相同关键氨基酸序列结合。这个发现表明 sCLU 的特定区域负责介导其促进 EMT 的活性。通过阻断 sCLU 中的 EMT- 表位,抗体,尤其命名为 16B5 的抗体,可以阻断 EMT,如通过与癌细胞孵育时维持上皮细胞标志物 (E- 钙黏着蛋白) 的膜表达示例。另外,使用前列腺癌和胰腺癌肿瘤的人异体移植物动物研究显示,阻断肿瘤相关性 sCLU 的活性导致针对标准化疗药物如多西紫杉醇和吉西他滨的反应增加,如通过肿瘤生长显著减少所测量。总之,这些结果显示,用能够与 sCLU 中特定区域相互作用的抗体阻断 EMT 导致肿瘤生长抑制和针对细胞毒药物的反应增加 (见以编号 W02007/030930 公开的国际申请号 PCT/CA 2006/001505 和以编号 W02011/063523 公开的国际申请号 PCT/CA 2010/0001882,所述文献的完整内容通过引用的方式结合在此

[0004] 肺癌是最常见癌症之一和世界范围内死亡的主导原因,每年诊断超过 1 百万病例并且非小细胞肺癌 (NSCLC) 占多于 80% 的全部肺癌。尽管诊断方案和治疗方案的最新改善,大部分患者诊断患有其中中位数存活保持不良的晚期 NSCLC (Adamo 等人,2009)。

[0005] NSCLC 中的最重要靶之一是表皮生长因子受体 (EGFR) (受体酪氨酸激酶的 ErbB 家族的一个成员,其中所述受体酪氨酸激酶是在癌细胞的增殖和存活中发挥重要作用的细胞膜受体)。它是一种巨大的跨膜糖蛋白,充当 EGF 和几种另外内源性配体的受体。它具有三个结构域,由胞外区、跨膜结构域和胞内酪氨酸激酶 (TK) 结构域组成。在功能上,配体

与 EGFR 结合诱导受体二聚化,导致促进自身磷酸化和胞内 TK 结构域激活的结构变化。因此,EGFR 激活影响影响细胞增殖、侵袭性、运动性、存活和凋亡的多个下游信号传导途径,包括 Ras/Raf/ 促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和磷脂酰肌醇 -3'-激酶 (PI3K)/Akt 途径 (Shigematsu 等人,2005)。

[0006] 虽然 EGFR 普遍表达,但是它经常在肿瘤细胞中被修饰。这些修饰包括基因扩增、配体和 / 或受体过量表达和激活性突变。EGFR 或其原发性配体的过量表达或失调是许多种人实体肿瘤 (包括肺癌) 的特征。在 NSCLC 中,43% 至 83% 的肿瘤过量表达 EGFR (Adamo 等人,2009)。针对 EGFR 如靶向胞外结构域的单克隆抗体的几种试剂或小分子能够抑制 TK 活性。

[0007] EGFR 在转移性 NSCLC 中的状态和针对化疗的反应是众多争论的主题。尽管大比例的肿瘤存在增加的 EGFR 表达,但是一些临床研究已经显示这是一线疗法中反应的低劣预测物 (Barr 等人,2008)。另外,尽管与单独化疗相比,用顺铂、长春瑞滨和西妥昔单抗 (EGFR 单克隆抗体) 一线治疗的患者中存在轻微但明显的反应,但是在西妥昔单抗和 EGFR 过量表达之间不存在相关性 (Mirshahidi 和 Hsueh,2010)。总体上,在 NSCLC 中采用 EGFR 抑制剂的海量临床结果表明,受体的状态在一线疗法中不重要,直至一份最近研究报道这样的结果,所述结果显示与单独化疗相比,用西妥昔单抗和化疗治疗的存在高 EGFR 表达的患者显示总生存期增加 (Pirker 等人,2012)。从这些结果显而易见,存在涉及肿瘤中 EGFR 的其他机制,这些机制影响 NSCLC 患者对 EGFR 抑制剂的反应。

[0008] EGFR 的可能影响抑制剂反应的另外特征是允许小分子与该受体的 TK 活性结合的那些特征。一些小分子已经被开发并批准用于癌症适应症,包括吉非替尼和厄洛替尼 (模拟 ATP 与该区域结合,因此阻止胞内信号传导的两种小分子)。然而,发现这些抑制剂在一线疗法中均在 NSCLC 中无活性,但是在二线和三线环境下实现明显的临床反应 (Mirshahidi 和 Hsueh,2010)。有趣地,EGFR 过量表达对患者反应无影响,但是发现,EGFR 和某些其他基因中的激活性突变是关键。例如,发现激活性突变导致用吉非替尼治疗的患者中无进展性生存期显著增加 (Costanzo 等人,2011)。此外,用厄洛替尼治疗的也在称作 KRAS 的基因中具有突变的 NSCLC 患者显示不反应 (Herbst 和 Sandler,2008)。因此,患者选择对试图理解他们是否将成为 EGFR TK 抑制剂的反应个体至关重要。

[0009] 如上文描述,EMT 可以对肿瘤细胞将对治疗作出反应的方式具有极大影响并且癌细胞保持上皮状的能力对这种反应至关重要。在基于细胞的研究中,具有增加的上皮细胞标志物 E-钙黏着蛋白表达的细胞对 EGFR 抑制剂更敏感 (Barr 等人,2008)。与这些观察结果一致,在 E-钙黏着蛋白表达和厄洛替尼敏感性之间存在相关性 (Yauch 等人,2005)。在肿瘤水平,已经显示恢复 E-钙黏着蛋白表达增加对 EGFR 抑制剂的敏感性 (Witta 等人,2006)。然而,迄今尚未在临床试验中清晰检验 EMT 和 EGFR 状态之间的联系。然而,鉴于在 EGFR 过量表达和针对 EGFR 抑制剂的反应之间缺少相关性和缺少激活性 EGFR 突变对其反应的影响,以下情况是可能的:另外的影响如 EMT 可能直接参与增加 NSCLC 患者中 EGFR 抑制剂的功效。

[0010] 本申请提供一种采用抗体治疗的方法,其中所述抗体通过抑制表达 EGFR 的肿瘤中的 sCLU 阻断 EMT。这些肿瘤中的 EGFR 状态可能包括 EGFR 基因扩增或 EGFR 配体的扩增。另外,肿瘤细胞可能包括因 EGFR 和 EGFR 蛋白质配偶物而增加的自分泌信号传导。EGFR 状

态可能还包括 EGFR 中造成受体显示增加的活性的激活性突变。在另一个实施例中,肿瘤可能对 EGFR 抑制剂敏感或抵抗,所述 EGFR 抑制剂包括针对 EGFR 的单克隆抗体或消除 EGFR 活性的小分子抑制剂。另外,EGFR 状态可能还包括先前为 EGFR 表达阴性的已经获得 EGFR 的肿瘤。

[0011] 当表达 sCLU 的 NSCLC 细胞系暴露于抗簇集蛋白抗体时,EGFR 的表达和活化均增加。同时,依靠用抗簇集蛋白抗体抑制 EMT,NSCLC 细胞系还显示增加的 E-钙黏着蛋白表达。总之,用与 EGFR 抑制剂组合的簇集蛋白抑制剂治疗的 NSCLC 患者可以显示针对 EGFR 抑制剂的反应增加。

[0012] 发明简述

[0013] 本发明总体上涉及用于癌症治疗簇集蛋白抑制剂和 EGFR 抑制剂的组合。

[0014] 本发明的方法涵盖向有需要的个体施用能够抑制上皮至间充质转变 (EMT) 的簇集蛋白抑制剂和 EGFR 抑制剂。EGFR 抑制剂也可以与簇集蛋白抑制剂分开、同时或依次施用。

[0015] 特别当观察到、检测到或疑似存在 EGFR 抗性时,可以施用簇集蛋白抑制剂。

[0016] 本发明的方法还包括施用簇集蛋白抑制剂以便阻止 EGFR 抗性或以使癌细胞对 EGFR 抑制剂敏化。

[0017] 附图简述

[0018] 图 1. 肺癌细胞系表达簇集蛋白。该图显示源自 NSCLC 的几个细胞系中簇集蛋白 mRNA 表达的 RT-PCR 分析 (上半图)。作为对照,还扩增来自肌动蛋白的 mRNA (下半图) 以确保每个反应中等量的起始物质。

[0019] 图 2. 肺癌细胞系表达簇集蛋白 (sCLU)。该图显示对肺癌细胞系分泌的 sCLU 的定量。这些量用 sCLU-特异性 ELISA 测量并以 ng/ml 表述。

[0020] 图 3. h16B5 增加肺癌细胞系中的 E-钙黏着蛋白表达。该图显示与 sCLU 抑制剂 (h16B5) 孵育时 A549NSCLC 细胞的上皮特征增加。左图显示与对照 IgG 孵育 48 小时的细胞,而右图显示相同条件下与 h16B5 孵育的细胞。

[0021] 图 4. 用 h16B5 处理 NSCLC 细胞导致增加的 EGFR 表达。在对照溶媒或 h16B5 存在的情况下,在从 A549 或 H226 细胞制备的完整细胞裂解物中使用 EGFR-特异性抗体测量 EGFR 表达。

[0022] 图 5. 用 h16B5 处理 NSCLC 细胞导致增加的 EGFR 磷酸化。在对照溶媒或 h16B5 存在的情况下,在从 A549 或 H226 细胞制备的完整细胞裂解物中使用磷酸酪氨酸特异性抗体测量 EGFR 磷酸化。

[0023] 图 6. 用 h16B5 处理 NSCLC 细胞导致增加的 EGFR 磷酸化。在对照溶媒、h16B5 或对照 IgG 存在的情况下,在从 A549 或 H226 细胞制备的完整细胞裂解物中使用磷酸酪氨酸特异性抗体测量 EGFR 磷酸化。

[0024] 图 7. h16B5 与厄洛替尼的组合导致增强的抗肿瘤作用。在 h16B5 与厄洛替尼的组合存在的情况下,在重组簇集蛋白存在或不存在时确定 H1299 癌细胞和 H460 癌细胞的存活。

[0025] 发明详述

[0026] 上皮的生长因子受体 (EGFR) 在几种类型的上皮癌中过量表达。EGFR 遗传变异的

存在可以造成肿瘤对 EGFR 抑制剂更敏感。然而,对 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 具有初始反应的患者在平均一年内复发。虽然已经显示 EGFR 外显子 9 中的缺失或 L858R 突变导致有利的临床转归,但是继发性分子事件如突变 T790M、L747S 和 / 或 D761Y 与耐药性和肿瘤复发相关。也已经显示二者均独立于 EGFR 而激活 PI3/AKT 途径的 MET 受体扩增和 IGF1R 信号传导激活驱动继发耐药性。

[0027] 申请人已经出乎意料地发现,在用簇集蛋白抑制剂处理的癌细胞中 EGFR 表达和磷酸化增加。用簇集蛋白抑制剂处理癌细胞还伴随癌细胞的上皮表型复现,如通过细胞表面处增加的 E-钙黏着蛋白表达所显示。

[0028] 因而,簇集蛋白抑制剂不仅可以引起 EMT 表型的逆转,它们还可以恢复癌细胞对 EGFR 抑制剂的敏感性。

[0029] 本发明总体上涉及用于癌症治疗簇集蛋白抑制剂和 EGFR 抑制剂的组合。

[0030] 该药物组合可以特别地包含与药物可接受载体结合的簇集蛋白抑制剂和与药物可接受载体结合的 EGFR 抑制剂。

[0031] 本发明的方法涵盖向有需要的个体施用簇集蛋白抑制剂和 EGFR 抑制剂。EGFR 抑制剂可以与簇集蛋白抑制剂分开、同时或依次施用。

[0032] 特别当观察到、检测到或疑似存在 EGFR 抗性时,可以施用簇集蛋白抑制剂。

[0033] 本发明的方法还包括施用簇集蛋白抑制剂以便阻止 EGFR 抗性或以使癌细胞对 EGFR 抑制剂敏化。

[0034] 在本发明的一个方面,簇集蛋白抑制剂可以在 EGFR 抑制剂之前施用。例如,簇集蛋白抑制剂可以在施用 EGFR 抑制剂之前数小时至几日或几个月施用。在本发明的另一个方面,簇集蛋白抑制剂也可以在每次用 EGFR 抑制剂治疗的相同时间(例如,相同日)或在每次用 EGFR 抑制剂治疗之间施用。

[0035] 根据本发明,簇集蛋白抑制剂可以在施用 EGFR 抑制剂之前以多个剂量例如,每日、每隔 1 日,一周 1 次、一周 2 次等施用。

[0036] 该方法也可以包含在施用 EGFR 抑制剂之前检验癌细胞的上皮至间充质表型逆转。EMT 状态可以例如通过测量选自 E-钙黏着蛋白、RAB25、整联蛋白 β 6、波形纤维蛋白、ZEB1 和 SIP1 的一种或多种基因 / 蛋白质的表达水平确定。

[0037] 簇集蛋白抑制剂可以通过它们损害簇集蛋白表达、分泌或簇集蛋白活性的能力来鉴定。

[0038] 簇集蛋白抑制剂的示例性实施例包括例如因其干扰分泌型簇集蛋白 (sCLU) 或 TGF- β 的 EMT 促进作用的能力而鉴定的那些。例如,可以在 TGF- β 或 sCLU 存在的情况下用推定性簇集蛋白抑制剂处理癌细胞(例如,4T1:乳腺癌细胞,DU145:前列腺癌细胞等)并且可以如下文描述那样评估 EMT 的标志物。可以将能够增加上皮标志物表达和 / 或减少间充质标志物表达的推定性化合物鉴定为合适的簇集蛋白抑制剂。

[0039] 可替代地,可以在推定性簇集蛋白抑制剂存在的情况下评估癌细胞的运动性。例如,可以在 TGF- β 或 sCLU 存在的情况下用推定性簇集蛋白抑制剂处理癌细胞并且可以如在 PCT/CA 2006/001505 例如中所述那样实施伤口愈合测定法或黑墨运动性测定法。可以将能够在这些类型的测定法中抑制或减少癌细胞运动性的推定性化合物鉴定为合适的簇集蛋白抑制剂。应当理解其他技术可以用来鉴定合适的簇集蛋白抑制剂。

[0040] 簇集蛋白抑制剂特别由本发明涵盖,例如包括,抗簇集蛋白抗体或其抗原结合片段。

[0041] 根据本发明,簇集蛋白抑制剂包括能够抑制 EMT 的抗簇集蛋白抗体或抗原结合片段(例如,在癌细胞中)。

[0042] 常使用的 EMT 的分子标志物例如包括,减少的 E-钙黏着蛋白、细胞角蛋白和 β - 联蛋白(膜中)表达和 / 或增加的 Snail、Slug、Twist、ZEB1、ZEB2、N-钙黏着蛋白、波形纤维蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白、基质金属蛋白酶等表达(见例如, Kalluri 和 Weinberg, *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 第 1420-1428 页; 2009; Fassina 等人, *Modern Pathology*, 25; 第 86-99 页; 2012; Lee 等人, *JCB*; 172; 第 973-981 页; 2006)。EMT 表型也可以通过增加的移行、侵入能力或失巢凋亡 / 凋亡抵抗性区分。可以因此通过上皮标志物的减少和间充质标志物或 EMT 表型的出现检出正在发生上皮至间充质转变的细胞。

[0043] 标志物的表达可以总体上通过比较它们在一个状态下与另一个状态相比的细胞表达水平(在基因水平或在蛋白质水平(例如,包括细胞表面表达)来确定。例如,可以与非癌细胞相比确定癌细胞中一种或多种特异性标志物的表达水平。可选地,可以与对 EGFR 抑制剂敏感的癌细胞相比,确定抵抗 EGFR 抑制剂的癌细胞中一种或多种特异性标志物的表达水平。另外,可以评价一种或多种特异性标志物的表达水平高于统计上代表对照的值。

[0044] 将从这种治疗获益的个体包括患有癌(即,上皮癌)的那些,所述癌包括前列腺癌、乳腺癌(例如,三阴性或基底样乳腺癌)、子宫内膜癌、卵巢癌、肝细胞癌、结直肠癌、头颈癌(例如,头颈鳞状细胞癌)、肺癌(例如,非小细胞肺癌)、胰腺癌、肾细胞癌等(包括这些癌症的晚期形式或转移形式)。

[0045] 可以用来实施本发明的抗簇集蛋白抗体的示例性实施例包括能够与人簇集蛋白 - 亚基的 C 末端部分的氨基酸 421 和 443 结合的那些。由本发明涵盖的抗体或抗原结合片段的更具体实施例包括在以编号 WO 2007/030930 公开的国际申请号 PCT/CA 2006/001505 和以编号 WO2011/063523 公开的国际申请号 PCT/CA 2010/0001882 中描述的那些。

[0046] 本发明特别地涵盖具有至少一个与鉴定为 16B5、21B12、20E11、16C11 和 11E2 的抗体的互补性决定区相同的互补性决定区(CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2 和 / 或 CDRL3)的抗体和抗原结合片段。更具体地,本发明特别地涵盖抗体和抗原结合片段,所述抗体和抗原结合片段具有与鉴定为 16B5、21B12、20E11、16C11 和 11E2 的那些(还见 PCT/CA 2006/001505)相同或者与鉴定为人源化 16B5(h16B5)、人源化 21B12(h21B12)、h16B5VL 共有序列 1、h16B5VL 共有序列 2、h16B5VL 共有序列 3、h16B5VH 共有序列 1、h16B5VH 共有序列 2、h16B5VH 共有序列 3、h21B12VL 共有序列 1、h21B12VL 共有序列 2、h21B12VL 共有序列 3、h21B12VH 共有序列 1、h21B12VH 共有序列 2 或 h21B12VH 共有序列 3 的那些(还见 PCT/CA 2010/0001882)相同的轻链和 / 或重链。

[0047] 鉴定为 20E11、16C11 和 11E2 的抗体的轻链可变区和 / 或重链可变区的氨基酸序列在 SEQ ID NOs. :62-67 中提出,其中预测的互补决定区以粗体显示。

[0048] 抗体和抗原结合片段的其他示例性实施例包括可以与本文中所鉴定的抗体竞争的那些

[0049] 本发明涵盖具有本文所述特征的单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体(分离株)以及抗原结合片段。再次还涵盖了包含单克隆抗体、嵌合抗体、人源化

抗体或人抗体之间的轻链和 / 或重链排列的抗体或抗原结合片段。

[0050] 本发明的抗体或抗原结合片段因此可以包含人恒定区的氨基酸和 / 或人抗体的框架氨基酸。

[0051] 术语“抗体”指完整抗体、单克隆抗体或多克隆抗体。术语“抗体”还涵盖多特异性抗体如双特异性抗体。人抗体通常由各自包含可变区和恒定区的两条轻链和两条重链构成。轻链可变区包含 3 个 CDR, 它们在本文中被鉴定为旁侧分布有框架区的 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3。重链可变区包含 3 个 CDR, 它们在本文中被鉴定为旁侧分布有框架区的 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3。

[0052] 如本文所用, 术语“抗原结合片段”, 指抗体的一个或多个片段, 所述片段保留与抗原结合的能力 (例如, KAAG1、分泌形式的 KAAG1 或其变体)。已经显示抗体的抗原结合功能可以由完整抗体的片段执行。涵盖于术语抗体的“抗原结合片段”内部的结合片段的例子包括 (i) Fab 片段, 一种由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H1 结构域组成的单价片段; (ii) $F(ab')_2$ 片段, 一种包含由二硫键在铰链区连接的两个 Fab 片段的双价片段; (iii) 由 V_H 和 C_H1 结构域组成的 Fd 片段; (iv) 由抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的 Fv 片段; (v) 由 V_H 结构域组成的 dAb 片段 (Ward 等人, (1989) Nature 341:544-546); 和 (vi) 分离的互补性决定区 (CDR), 例如 V_H CDR3。另外, 虽然 Fv 片段的两个结构域 V_L 和 V_H 由独立基因编码, 但是使用重组方法, 可以将它们通过能够使这两个结构域作为单条蛋白链产生的合成性接头连接, 在所述单条多肽链中 V_L 区和 V_H 区配对以形成单价分子 (称作单链 Fv (scFv); 见例如 Bird 等人 (1988) Science 242:423-426; 和 Huston 等人 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883)。这种单链抗体也意在涵盖于术语抗体的“抗原结合片段”范围内。另外, 抗原结合片段包括结合结构域免疫球蛋白融合蛋白, 其包括: (i) 与免疫球蛋白铰链区多肽融合的结合结构域多肽 (如重链可变区、轻链可变区、或经接头肽与轻链可变区融合的重链可变区)、(ii) 与铰链区融合的免疫球蛋白重链 CH2 恒定区、和 (iii) 与 CH2 恒定区融合的免疫球蛋白重链 CH3 恒定区。可以通过用丝氨酸残基替换一个或多个半胱氨酸残基修饰铰链区, 从而防止二聚化。这类结合结构域免疫球蛋白融合蛋白进一步在 US 2003/0118592 和 US 2003/0133939 中公开。使用本领域技术人员已知的常规技术, 获得这些抗体片段, 并且按照与完整抗体相同的方式筛选所述片段的有用性。

[0053] 典型的抗原结合位点由可变区组成, 所述可变区由轻链免疫球蛋白和重链免疫球蛋白的配对形成。抗体可变区的结构是非常一致的并且显示非常相似的结构。这些可变区一般由相对同源的以称作互补决定区 (CDR) 的 3 个高变区间插的框架区 (FR) 组成。抗原结合片段的总体结合活性经常由 CDR 的序列决定。FR 经常在 CDR 的三个维度的正确定位和对齐方面发挥作用以便最佳抗原结合。

[0054] 本发明的抗体和 / 或抗原结合片段可以源自例如小鼠、大鼠或任何其他哺乳动物或源自其他来源, 如通过重组 DNA 技术。

[0055] 其他簇集蛋白抑制剂可以包括例如并且不限于 siRNA (例如, 靶向簇集蛋白的 RNA) 和反义 RNA (例如, 靶向簇集蛋白的 RNA)。

[0056] 反义 RNA 的示例性实施例例如包括在美国专利号 7, 569, 551 (所述文献的完整内容通过引用的方式结合在此) 中描述的那些并且特别地包括 OGX-011 (又称作, custirsen 钠, OncoGenex, 还见 SEQ ID NO. :61)。

[0057] EGFR 抑制剂的示例性实施例包括酪氨酸激酶抑制剂,例如,吉非替尼、厄洛替尼、伊马替尼、拉帕替尼或神马替尼 (semazinin)。EGFR 抑制剂的其他示例性实施例例如包括单克隆抗体,如西妥昔单抗、帕尼单抗、尼妥珠单抗或莫苏珠单抗 (metuzumab)。

[0058] 将从用本发明药物组合治疗获益的其他个体包括患有抵抗一种或多种 EGFR 抑制剂的肿瘤的那些个体。可以在施用药物组合之前选择这类个体。

[0059] 可以通过评价临床参数如肿瘤复发或通过测量抵抗性的分子标志物 (例如, EGFR 中或 EGFR 途径 (RAS/MAPK、磷脂酶 C、磷脂酰肌醇 3- 激酶 /AKT、SRC/FAK 途径等) 和 / 或 EMT 标志物中的突变、扩增), 确定 EGFR 抑制剂抵抗性。

[0060] 检验 EGFR 抑制剂抵抗性因此可以包括确定 EGFR 中突变 (例如, 酪氨酸激酶结构域中的突变、截短突变、插入) 的存在, 确定 EGFR 扩增。

[0061] 如本文所用“药物可接受载体”或“药用载体”是本领域已知的并且包括但不限于 0.01-0.1M 或 0.05M 磷酸盐缓冲液或 0.8% 盐水。另外, 这类药物可接受载体可以是水溶液或非水溶液、悬液和乳液。非水溶剂的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油和可注射用有机酯如油酸乙酯。含水载体包括水、醇 / 水溶液、乳剂或悬液, 包括盐水和缓冲的介质。肠胃外溶媒包括氯化钠溶液、Ringer 右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸化 Ringer 液或不挥发性油。静脉内溶媒可以包括流体和营养补充物、电解质补充物, 如基于 Ringer 右旋糖的那些等。防腐剂和其他添加物也可以存在, 如, 例如抗微生物药、抗氧化剂、络合剂、惰性气体等。

[0062] 本文所述的实验用 16B5 的人源化形式 (h16B5) 实施。

实施例

[0063] 实例 1

[0064] NSCLC 细胞系表达 sCLU

[0065] 我们希望确定簇集蛋白是否在源自 NSCLC 肿瘤细胞系中表达。作为第一步骤, 从每个细胞系制备总 RNA 并用作模板以采用随机引发的寡核苷酸制备 cDNA。使用本领域技术人员已知的方法, 用人簇集蛋白基因特异性寡核苷酸实施 RT-PCR。5' - 引物 (ogs1788) 由 SEQ ID NO:57 中所示的序列编码并且 3' - 引物 (ogs1721) 由 SEQ ID NO:58 中所示的序列编码。PCR 产物是 1412bp 长度。作为每个反应中总 RNA 量的对照, 采用对人持家基因肌动蛋白特异的寡核苷酸进行平行 RT-PCR 反应。5' - 引物 (ogs387) 由 SEQ ID NO:59 中所示的序列编码并且 3' - 引物 (ogs965) 由 SEQ ID NO:60 中所示的序列编码。PCR 产物是 746bp 长度。如图 1 中所示, 除一个细胞系之外, 分析的全部 NSCLC 细胞系均含有编码簇集蛋白的 mRNA, 所述 mRNA 以不同的水平检测到。如预期, 肌动蛋白存在于全部 RNA 样品中, 这表明在每个 RT-PCR 反应中存在大约等量的起始总 RNA。这项分析中使用的细胞系是: 泳道 1, A549; 泳道 2, EKVX; 泳道 3, HOP-62; 泳道 4, HOP-92; 泳道 5, H322M; 泳道 6, H226; 泳道 7, H23; 泳道 8, H460; 和泳道 9, H522。

[0066] 平行地, 我们确定 sCLU 是否由 NSCLC 细胞系分泌。A549、H226、H292、H460 和 H1299 细胞从 ATCC (马纳萨斯, VA) 购买并根据制造商的说明书培养。在在培养下几日后并且当细胞达到汇合时, 收集来自每个细胞系的条件培养基用于分析。获得设计成测量人簇集蛋白的商业 ELISA 试剂盒 (BioVendor LLC, Candler, NC) 并且根据制造商的说明书实施分析。

如图 2 的表中所显示,全部 5 种培养基样品均含有范围从 13.6ng/mL 至大于 100ng/mL 水平的 sCLU,例外是具有低于 10ng/mL 水平的 H226 细胞系。

[0067] 总之,这些结果显示,源自 NSCLC 患者的癌细胞系大量分泌 sCLU 并且具有响应于抗体(如 h16B5)的潜力,其中所述抗体抑制 sCLU 的 EMT 诱导活性。

[0068] 实施例 2

[0069] NSCLC 细胞与 h16B5 的孵育导致上皮细胞标志物 E-钙黏着蛋白的表达增加

[0070] 我们还通过使用免疫荧光法监测 A549 细胞表面上的 E-钙黏着蛋白表达,检查 E-钙黏着蛋白的表达。简而言之,将细胞接种在盖玻片上并且与 10g/ml 的对照 IgG 或 h16B5 孵育 48 小时。在这个孵育后,将细胞用多聚甲醛固定并且与小鼠抗人 E-钙黏着蛋白抗体(制造商)孵育 1 小时。在洗涤后,将 E-钙黏着蛋白染色的细胞与缀合至罗丹明红-X 的第二抗体孵育。将盖玻片封装并且通过荧光显微术可视化特异性 E-钙黏着蛋白染色。如图 3 中所示,A549 细胞在它们的细胞表面上具有 E-钙黏着蛋白的低表达并且与非特异性 IgG 孵育 48 小时不增加这种蛋白质的水平(见左图)。相反,细胞与 h16B5 孵育造成 A549 细胞表面上 E-钙黏着蛋白染色的强度明显增加(见右图)。这表示细胞的上皮特征是极高的。

[0071] 实施例 3

[0072] 用 h16B5 抑制 sCLU 引起 NSCLC 细胞中 EGFR 表达和磷酸化的增加

[0073] 在这个实例中,我们检验了使用 h16B5 抑制 EMT 是否导致对 NSCLC 细胞系中 EGFR 的状态的任何影响。为了解决这个问题,将条件优化以测量这些细胞中受体的表达和磷酸化。已知 EGFR 在暴露于其配体(包括 EGF)后非常迅速地磷酸化。与这种磷酸化平行相伴,受体内化并再循环以及其从细胞表面丧失存在。选择分泌相对高水平 sCLU 的两个细胞系 A549 和 H226 用于这项分析。将细胞接种在多孔板中并用 10 μ g/ml h16B5、10 μ g/ml 对照 IgG 或溶媒 PBS 处理 48 小时。在这种孵育后,将细胞用 EGF(10ng/mL)处理并将细胞在不同时间收获并转化成裂解物。这些裂解物由 SDS-PAGE 电泳,将蛋白质转移至尼龙膜并且用于蛋白质印迹中以检验 EGFR 的表达或磷酸化。为了测量 EGFR 的表达,使用一种命名为克隆 1005 的商业抗体(Santa Cruz, Biotech, Santa Cruz, CA),而用命名为克隆 4G10 的抗磷酸酪氨酸抗体 Millipore, Etobicoke, ON) 监测 EGFR 的磷酸化。如图 4 中所示,如预期,用溶媒对照处理 48 小时、随后用 EGF 处理的 A549 细胞显示 EGFR 表达下降,所述 EGFR 表达在 10 分钟后迅速恢复(上半图:比较泳道 1 与泳道 2)。相反,用 h16B5 抗 sCLU 抗体处理的 A549 细胞保护细胞免于 EGF 诱导的受体降解(上半图:比较泳道 5 与泳道 6)。为了控制每条泳道中蛋白质的量,将膜用抗肌动蛋白抗体(克隆 AC-15, Sigma, Oakville, ON)再印迹,其中所述肌动蛋白在凝胶上分离的不同样品之间等量表达。使用相同方案检验另一个 NSCLC 细胞系 H226(下半图)和并且观察到的结果与采用 A549 细胞时观察到的那些结果相似。在这种情况下,当细胞用对照处理 48 小时时,EGF 诱导的 EGFR 降解甚至更明显(下半图,泳道 1-4)。在细胞用 h16B5 处理的情况下,未见 EGFR 减少(下半图,泳道 5-8)。这再次显示用抗体抑制 sCLU 导致 EGFR 表达的维持。因此,这些研究结果表明,细胞将显示增加的 EGFR 抑制剂敏感性。

[0074] 还检验了这些细胞中 EGFR 的激活。在这个实例中,膜用仅与酪氨酸磷酸化形式的受体相互作用的抗体印迹。在 A549 细胞中,如预期,在 EGF 不存在的情况下未见 EGFR 的磷

酸化（见图 5，上半图，泳道 1 和泳道 5）。然而，当细胞用 EGF 处理时，检测到磷酸化酪氨酸残基的出现，甚至在 2 分钟后也是如此（上半图，泳道 2 和泳道 6）。与未处理的细胞相比，用 h16B5 处理 48 小时的细胞显示 EGFR 上更高量的磷酸化酪氨酸残基。EGFR 磷酸化的这种差异重现于 H226 细胞中（见图 5，下半图，比较泳道 2-4 与泳道 6-8）。作为另外的对照，A549 细胞在暴露于 EGF 之前还用对照抗体处理 48 小时（图 6）。再次，EGFR 磷酸化的量的变化仅见于用 h16B5 处理的细胞中（比较泳道 2、3（对照）和泳道 8、9（IgG）与泳道 5、6（h16B5））。

[0075] 总之，我们的结果显示肺癌细胞中阻断 EMT 影响这些细胞中的 EGFR 状态。具体而言，用单克隆抗体如 h16B5 抑制 sCLU 诱导 EMT 的活性是借以改变这些癌细胞中 EGFR 状态的机制之一。我们显示，用 h16B5 处理的肺癌细胞具有增加的 E-钙黏着蛋白表达并且因此更有上皮性质。预期 EGFR 敏感性增加与通过用抗体阻断 sCLU 而抑制 EMT 的组合增加 EGFR 抑制剂的功效。最后，预期表达 EGFR 并发生 EMT 的任何癌细胞均以类似于肺癌细胞的方式响应于 sCLU 的抑制剂，如单克隆抗体。

[0076] 实施例 4

[0077] 用于在 h16B5 存在的情况下增加癌细胞对 EGFR 抑制剂的敏感性的方法

[0078] 通过用抗簇集蛋白抗体阻断 sCLU 而抑制癌细胞中的 EMT，导致细胞表面上增加的 EGFR 表达或增加的 EGFR 磷酸化或这两种情况。因此期望 EGFR 的抑制剂在其中用簇集蛋白抑制剂抑制 EMT 的条件下具有增加的功效。

[0079] 例如，将癌细胞系接种在多孔平板中并且当接近于汇合时，将细胞用抗簇集蛋白抗体（例如，h16B5）处理以抑制 EMT。它可以有用于先验地以已知诱导物如 sCLU、TGF β 、EGFR 的配体（如 EGF）或其他相似分子诱导 EMT。

[0080] 还将 EGFR 抑制剂（例如，阻断配体与受体结合或阻止 EGFR 二聚化的单克隆抗体、TK 抑制剂等）与抗簇集蛋白抗体一起或稍后（例如，数小时后）添加至各孔。在某种情况下，可以将 EGFR 抑制剂在抗簇集蛋白抗体之前添加至各孔。

[0081] EGFR 抑制剂可以按范围从 1fmol/L 至 100 毫摩尔/L 的不同浓度添加。为了确定用 h16B5 抑制 sCLU 时 EGFR 抑制剂的细胞毒性是否增加，使用标准方案如增殖测定法、侵袭测定法、凋亡测定法或迁移测定法确定剩余细胞的数目。适用于这种测定法的癌细胞包括抗 EGFR 抑制剂的癌细胞或表达野生型 EGFR、含有激活性突变的 EGFR、EGFR 基因扩增和其中可能改变 EGFR 状态的其他情况的癌细胞。

[0082] 也可以在充分建立的癌症模型体内测试簇集蛋白抑制剂和 EGFR 抑制剂组合。例如，将表达 EGFR 的人癌细胞系注射在免疫受损的小鼠中并允许其生长直至植入肿瘤异体移植物。动物用与（同时或依次施用的）EGFR 抑制剂组合的抗簇集蛋白抗体（例如，16B5、h16B5 或其他抗体）治疗以阻断 EMT。通过各种方法监测肿瘤的生长，所述方法包括用仪器如卡钳直接测量尺寸。在肿瘤细胞经基因修饰以表达荧光分子或生物发光分子的情况下，用来测量肿瘤生长的其他方法可能包括荧光法或生物发光法。在另一种情况下，可以使用正电子发射断层摄影术（PET）或计算机断层成像（CT）扫描方法监测肿瘤生长。在这些测定法中，簇集蛋白抑制剂和 EGFR 抑制剂可以通过不同途径反复施用，所述途径包括静脉内、皮下、肌肉内或经口途径。常见剂量将从 1 微克/kg 至 100mg/kg。

[0083] 基于这种方法的应用，将可能显示，采用与 EGFR 抑制剂组合的阻断 EMT 的药物

(如 16B5、h16B5 或其他) 的治疗将导致与单独使用任一种治药剂相比, 增强的抗肿瘤作用。

[0084] 在这个例子中, 我们显示与 sCLU 的抑制剂 (如 h16B5) 组合施用, 可以增加对癌细胞对 EGFR 抑制剂的反应。已知表达野生型 EGFR 的两个 NCSLC 细胞系 H1299 和 H460 (Akashi 等人, 2008) 用 sCLU (0.25g/ml)、TGF β (2nM) 或这两种蛋白质的组合处理 48 小时以刺激 EMT。在这种诱导后, 将细胞用厄洛替尼 (20 μ M) 处理 96 小时并且使用 **CellTiter-Glo®** 发光细胞生存力测定法 (Promega, Madison, WI), 确定细胞的数目。作为对照, 不用 sCLU 或 TGF β 诱导另外的细胞。如图 7A 中所示, H1299 细胞比 H460 细胞对厄洛替尼更敏感。厄洛替尼与 h16B5 的组合导致细胞数目进一步减少 (分别是 10.2% 和 13.8% 更少的 H1299 和 H460 细胞), 表明阻断内源表达的 sCLU 的活性 (见图 2) 增强厄洛替尼杀死 EGFR 阳性肺癌细胞的能力。我们还在受 sCLU 或 TGF β 诱导以发生 EMT 的细胞中比较对厄洛替尼的反应。如图 7B 中所示, 刺激 EMT 不改变细胞对厄洛替尼的反应性。然而, 在这些条件下, 与不发生 EMT 的细胞相比, 细胞数目的减少在 h16B5 存在的情况下更大 (对于 H1299 细胞和 H460 细胞, 分别是 16.1% 和 24.0%)。这表示当抑制 EMT 时, 细胞中厄洛替尼 - 反应的增加更大。值得注意的是, 观察到厄洛替尼反应性的增加在更抵抗这种 EGFR 抑制剂的 H460 细胞中更大。最后这个结果显示了用 h16B5 抑制 sCLU 作为治疗抵抗 EGFR 抑制剂的肺癌患者的策略的潜力。

[0085] 实施例 5

[0086] 药物组合用于在其他癌症适应症中使用

[0087] 已知为三阴性 (即, 缺少雌激素受体和孕酮受体表达并且不存在 HER2- 表达) 的乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 或基底样乳腺癌细胞系用与吉非替尼组合的抗簇集蛋白抗体或用单独的吉非替尼处理。通过标准测定法在几日时间范围内测量细胞生长。

[0088] 这个实验显示抗簇集蛋白抗体与吉非替尼的组合比单独的吉非替尼更有效抑制肿瘤细胞生长 (数据未显示)。

[0089] 可以使用与实例 1-5 中描述的那些技术相似的技术测试其他簇集蛋白抑制剂和 / 或 EGFR 抑制剂组合。

[0090] 序列表

[0091] SEQ ID NO. :1

[0092] 16B5 CDRH1:GFNIKDIYMH

[0093] SEQ ID NO. :2

[0094] 16B5 CDRH2:RIDPAYGNTKYDPKFQG

[0095] SEQ ID NO. :3

[0096] 16B5 CDRH3:RYDTAMDY

[0097] SEQ ID NO. :4

[0098] 16B5 CDRL1:KSSQSLLNSRTRKKNYLA

[0099] SEQ ID NO. :5

[0100] 16B5 CDRL2:WASTRES

[0101] SEQ ID NO. :6

[0102] 16B5 CDRL3:KQSYNLWT

[0103] SEQ ID NO. :7

- [0104] h16B5 人源化重链可变区
- [0105] QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDIYMHVWQQAPGKGLEWMGRIDPAYGNTKYDPKFQGRVT
ITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRYDTAMDYWGQGTlvtvss
- [0106] SEQ ID NO. :8
- [0107] h16B5 人源化轻链可变区
- [0108] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSNRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS
GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGQGTKLEIK
- [0109] SEQ ID NO. :9
- [0110] h16B5 的完整重链免疫球蛋白序列
- [0111] QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDIYMHVWQQAPGKGLEWMGRIDPAYGNTKYDPKFQGRVT
ITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCArRYDTAMDYwgqgtlvtvsSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVEC
PPCAPPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS
VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0112] SEQ ID NO. :10
- [0113] h16B5 的完整轻链免疫球蛋白序列
- [0114] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSNRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS
GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGQGTKLEIKVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0115] SEQ ID NO. :11
- [0116] 21B12 CDRH1:GYTFTNYGMH
- [0117] SEQ ID NO. :12
- [0118] 21B12 CDRH2:WINTYTGEPTYADDFKG
- [0119] SEQ ID NO. :13
- [0120] 21B12 CDRH3:DGFLYFFDY
- [0121] SEQ ID NO. :14
- [0122] 21B12 CDRL1:KSSQSLLYSSNQKNYLA
- [0123] SEQ ID NO. :15
- [0124] 21B12 CDRL2:WASTRES
- [0125] SEQ ID NO. :16
- [0126] 21B12 CDRL3:QQYYIYPRT
- [0127] SEQ ID NO. :17
- [0128] h21B12 人源化重链可变区
- [0129] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTNYGMHWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDGFLYFFDYWGQGTlvtvss
- [0130] SEQ ID NO. :18
- [0131] h21B12 人源化轻链可变区
- [0132] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS

GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYIYPRTFGQGTKLEIK

[0133] SEQ ID NO. :19

[0134] h21B12 的完整重链免疫球蛋白序列

[0135] QVQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGYTFTNYGMHWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGPEPTYADDFKGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARdGFLYFFDYWGQGLTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVE
CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV
SVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0136] SEQ ID NO. :20

[0137] h21B12 的完整轻链免疫球蛋白序列

[0138] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS
GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYIYPRTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0139] SEQ ID NO. :21

[0140] h16B5 的重链的完整核苷酸序列

[0141] ATGGACTGGACCTGGCGGATCCTGTTCCCTGGTGGCCGCTGCTACCGGCACCCACGCCAGGTGCAGCTG
GTGCAGTCTGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCCACCGTCAAGATCAGCTGCAAGGTGTCCGGCTTCAACATCAA
GGACATCTACATGCACTGGGTGCAGCAGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGATGGGCCGGATCGACCCTGCCTACG
GCAACACCAAGTACGACCCTAAGTTCAGGGCCGGGTGACCATCACCGCCGACACCTCCACCGACACCGCCTACATG
GAACTGTCTCCCTGCGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGAGATACGACACCGCCATGGATTA
GGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCCGCTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCA
GGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGG
AACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG
CGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCA
AGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGGCCACCGTGGCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCA
GTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGGA
CGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTACGCTCCTCACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCA
GCCCGGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCC
TGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACTACAAGACC
ACACCTCCCATGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
GGGGAACGTCTTCTCATGTCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAATGA

[0142] SEQ ID NO. :22

[0143] h21B12 的重链的完整核苷酸序列

[0144] ATGGACTGGACCTGGCGGATCCTGTTTCTGGTGGCCGCTGCTACCGGCACACACGCCAGGTGCAGCTG
GTGCAGTCCGGCTCCGAGCTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTAC

CAACTACGGCATGCACTGGGTGCGCCAGGCACCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCG
 GCGAGCCTACCTACGCCGACGACTTCAAGGGCAGATTCGTGTTCTCCCTGGACACCTCCGTGTCCACCGCCTACCTG
 CAGATCTCCTCCCTGAAGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACGGCTTCCTGTACTTCTTCGACTA
 CTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCTGCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTGCT
 CCCGGTCCACCTCTGAGTCTACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCC
 TGAACTCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTC
 CTCCGTGGTGACAGTGCCTTCTCCAACCTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACA
 CCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGAAGTGCTGCGTGGAGTGCCCTCCTTGTCTGCTCCTCCTGTGGCTGGCCCT
 AGCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGT
 GGACGTGTCCCACGAGGACCCCTGAGGTGCAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCA
 AGCCTCGGGAGGAA CAGTTC AACTCCACCTTCCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAAC
 GGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCTATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGG
 CCAGCCTCGCGAGCCTCAGGTGTACACCTGCCTCCCTCCCGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCT
 GTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACA ACTACAAG
 ACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGTGGCA
 GCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGACAGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGT
 CTCCTGGCAAGTGA

[0145] SEQ ID NO. :23

[0146] H16B5 的轻链的完整核苷酸序列

[0147] ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCACTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGCGACATCGTG
 ATGACCCAGTCCCCGACTCCCTGGCCGTGTCCCTGGGCGAGAGGCCACCATCAACTGCAAGTCTCCAGTCCCT
 GCTGAACTCCCGGACCCGGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCT
 ACTGGGCCTCCACCCGGGAGTCCGGCGTGCCTGACCGGTTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTACCCTGACC
 ATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTA CTACTGCAAGCAGTCTTACAACCTGTGGACCTTCGGCCAGGG
 CACCAAGCTGGAGATCAAGCGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
 CTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAAC
 GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC
 CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
 CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

[0148] SEQ ID NO. :24

[0149] h21B12 的轻链的完整核苷酸序列

[0150] ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCACTCCCTGCTGCTGTGGATCTCTGGCGCCTACGGCGACATCGTG
 ATGACCCAGTCCCCGACTCTCTGGCTGTGTCCCTGGGCGAGCGGGCCACCATCAACTGCAAGTCTCCAGTCCCT
 GCTGTACTCCTCCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCT
 ACTGGGCCTCCACCCGGGAATCTGGCGTGCCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTACCCTGACC
 ATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTA CTACTGCCAGCAGTACTACATCTACCCTCGGACCTTCGGCCA
 GGGCACC AAGCTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCACTTCCCCCTTCCGACGAGCAGCTGA
 AGTCCGGCACCGCCTCTGTGGTGTGCCTGCTGAACA ACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGAC
 AACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTACCCGAGCAGGACTCCAAGGACTCTACCTACTCCCTGTCTCTC

CACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTCTCCCCTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGA

[0151] SEQ ID NO. :25 (鼠 16B5VL)

[0152] DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNLSRTRKKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGKLEFK

[0153] SEQ ID NO. :26 (h16B5VL 共有 1)

[0154] DIVMXQSPXSLAVSXGEXXTXXCKSSQSLNLSRTRKKNYLAWYQQKPGQXPKLLIYWASTRESGVPDRFXGSGSGTDFTLTISSXQAEDXAVYYCKQSYNLWTFGXGKLEKX ;

[0155] 与 SEQ ID NO. :25 中所述多肽中的相应氨基酸相比, X 是一个氨基酸置换。

[0156] SEQ ID NO. :27 (h16B5VL 共有 2)

[0157] DIVMX_{a1}QSPX_{a2}SLAVSX_{a3}GEX_{a4}X_{a5}TX_{a6}X_{a7}CKSSQSLNLSRTRKKNYLAWYQQKPGQX_{a8}PKLLIYWASTRESGVPDRFX_{a9}GSGSGTDFTLTISSX_{a10}QAEDX_{a11}AVYYCKQSYNL-WTFGX_{a12}GKLEKX_{a13}K

[0158] X_{a1} 是中性亲水氨基酸, 例如, T 或 S ;

[0159] X_{a2} 是 D 或 S ;

[0160] X_{a3} 是疏水性氨基酸, 例如, L 或 A ;

[0161] X_{a4} 是碱性氨基酸, 例如, R 或 K ;

[0162] X_{a5} 是疏水性氨基酸, 例如, A 或 V ;

[0163] X_{a6} 是疏水性氨基酸, 例如 I 或 M ;

[0164] X_{a7} 是 N 或 S ;

[0165] X_{a8} 是 P 或 S ;

[0166] X_{a9} 是中性亲水氨基酸, 例如, S 或 T ;

[0167] X_{a10} 是疏水性氨基酸, 例如, L 或 V ;

[0168] X_{a11} 是疏水性氨基酸, 例如, V 或 L ;

[0169] X_{a12} 是 Q 或 G 并且 ;

[0170] X_{a13} 是 I 或 F。

[0171] SEQ ID NO. :28 (h16B5VL 共有 3)

[0172] DIVMX_{a1}QSPX_{a2}SLAVSX_{a3}GEX_{a4}X_{a5}TX_{a6}X_{a7}CKSSQSLNLSRTRKKNYLAWYQQKPGQX_{a8}PKLLIYWASTRESGVPDRFX_{a9}GSGSGTDFTLTISSX_{a10}QAEDX_{a11}AVYYCKQSYNL-WTFGX_{a12}GKLEKX_{a13}K

[0173] X_{a1} 是 T 或 S ; X_{a2} 是 D 或 S ; X_{a3} 是 L 或 A ; X_{a4} 是 R 或 K ; X_{a5} 是 A 或 V ; X_{a6} 是 I 或 M ; X_{a7} 是 N 或 S ; X_{a8} 是 P 或 S ; X_{a9} 是 S 或 T ; X_{a10} 是 L 或 V ; X_{a11} 是 V 或 L ; X_{a12} 是 Q 或 G 并且 ; X_{a13} 是 I 或 F。

[0174] SEQ ID NO. :29 (鼠 16B5VH)

[0175] EVQLQQSGAELVKPGASVRLSCTTSGFNKDIYMHVWVKRPEQGLEWIGRIDPAYGNTKYDPKFQGGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCARRYDTAMDYWGQGTSTVTVSS

[0176] SEQ ID NO. :30 (h16B5VH 共有 1)

[0177] XVQLXQSGAEXXKPGAXVXXSCXXSGFNKDIYMHVWXQPXXGLEWXGRIDPAYGNTKYDPKFQGXXTITADTSXXTAYXXLSSLXSEDVAVYYCArRYDTAMDYWGQGTXTVTVSS ;

[0178] 与 SEQ ID NO. :29 中所述多肽中的相应氨基酸相比, X 是一个氨基酸置换。

[0179] SEQ ID NO. :31 (h16B5VH 共有 2)

[0180] X_{b1} VQLX_{b2}QSGAEX_{b3}X_{b4}KPGAX_{b5}VX_{b6}X_{b7}SCX_{b8}X_{b9}SGFNICKDIYMHVWX_{b10}QX_{b11}PX_{b12}X_{b13}GLEWX_{b14}GRIDPAYGNTKYDPKFQGX_{b15}X_{b16}TITADTSX_{b17}X_{b18}TAYX_{b19}X_{b20}LSSLX_{b21}SEDT-AVYYCARRYDTAMDYWGQGTGX_{b22}VTVSS ;

[0181] X_{b1} 是 Q 或 E ;

[0182] X_{b2} 是 V 或 Q ;

[0183] X_{b3} 是疏水性氨基酸,例如, V 或 L ;

[0184] X_{b4} 是 K 或 V ;

[0185] X_{b5} 是中亲水氨基酸,例如, T 或 S ;

[0186] X_{b6} 是碱性氨基酸,例如 K 或 R ;

[0187] X_{b7} 是疏水性氨基酸,例如 I 或 L ;

[0188] X_{b8} 是 K 或 T ;

[0189] X_{b9} 是 V 或 T ;

[0190] X_{b10} 是碱性氨基酸,例如 Q 或 K ;

[0191] X_{b11} 是 A 或 R ;

[0192] X_{b12} 是 G 或 E ;

[0193] X_{b13} 是碱性氨基酸,例如 K 或 Q ;

[0194] X_{b14} 是疏水性氨基酸,例如 M 或 I ;

[0195] X_{b15} 是碱性氨基酸,例如 R 或 K ;

[0196] X_{b16} 是疏水性氨基酸,例如 V 或 A ;

[0197] X_{b17} 是中亲水氨基酸,例如 T 或 S ;

[0198] X_{b18} 是例如 D 或 N ;

[0199] X_{b19} 是疏水性氨基酸,例如 M 或 L ;

[0200] X_{b20} 是 E 或 Q ;

[0201] X_{b21} 是 R 或 T 并且 ;

[0202] X_{b22} 是 L 或 S。

[0203] SEQ ID NO. :32(h16B5VH 共有 3)

[0204] X_{b1} VQLX_{b2}QSGAEX_{b3}X_{b4}KPGAX_{b5}VX_{b6}X_{b7}SCX_{b8}X_{b9}SGFNICKDIYMHVWX_{b10}QX_{b11}PX_{b12}X_{b13}GLEWX_{b14}GRIDPAYGNTKYDPKFQGX_{b15}X_{b16}TITADTSX_{b17}X_{b18}TAYX_{b19}X_{b20}LSSLX_{b21}SEDT-AVYYCARRYDTAMDYWGQGTGX_{b22}VTVSS ;

[0205] X_{b1} 是 Q 或 E ; X_{b2} 是 V 或 Q ; X_{b3} 是 V 或 L ; X_{b4} 是 K 或 V ; X_{b5} 是 T 或 S ; X_{b6} 是 K 或 R ; X_{b7} 是 I 或 L ; X_{b8} 是 K 或 T ; X_{b9} 是 V 或 T ; X_{b10} 是 Q 或 K ; X_{b11} 是 A 或 R ; X_{b12} 是 G 或 E ; X_{b13} 是 K 或 Q ; X_{b14} 是 M 或 I ; X_{b15} 是 R 或 K ; X_{b16} 是 V 或 A ; X_{b17} 是 T 或 S ; X_{b18} 是 D 或 N ; X_{b19} 是 M 或 L ; X_{b20} 是 E 或 Q ; X_{b21} 是 R 或 T 并且 ; X_{b22} 是 L 或 S。

[0206] SEQ ID NO. :33(鼠 21B12VL)

[0207] DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQRPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFT
GSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYIYPRTFGGGTKLEIK

[0208] seq id no. :34(h21B12VL 共有 1)

[0209] DIVMX_CQSPXSLAVSXGEXXTXXCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQXPGQXPKLLIYWASTRESGVPDRF
XGSGSGTDFTLTISSXXAEDXAVYYCQQYYIYPRTFGXGTKLEIK

- [0210] 与 SEQ ID NO. :33 中所述多肽中的相应氨基酸相比, X 是一个氨基酸置换。
- [0211] seq id no. :35 (h21B12VL 共有 2)
- [0212] DIVMX_{c1}QSPX_{c2}SLAVSX_{c3}GEX_{c4}X_{c5}TX_{c6}X_{c7}CKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQX_{c8}PGQX_{c9}PKLLIYWAS
TRESGVPDRFX_{c10}GSGSGTDFTLTISSX_{c11}X_{c12}AEDX_{c13}AVYYCQQYYIYPRTFGX_{c14}GTKLEIK ;
- [0213] X_{c1} 是中性氨基酸, 例如 T 或 S ;
- [0214] X_{c2} 是 D 或 S ;
- [0215] X_{c3} 是疏水性氨基酸, 例如 L 或 V ;
- [0216] X_{c4} 是碱性氨基酸, 例如 R 或 K ;
- [0217] X_{c5} 是疏水性氨基酸, 例如 A 或 V ;
- [0218] X_{c6} 是疏水性氨基酸, 例如 I 或 M ;
- [0219] X_{c7} 是 N 或 S ;
- [0220] X_{c8} 是碱性氨基酸, 例如 K 或 R ;
- [0221] X_{c9} 是 P 或 S ;
- [0222] X_{c10} 是中性氨基酸, 例如 S 或 T ;
- [0223] X_{c11} 是疏水性氨基酸, 例如 L 或 V ;
- [0224] X_{c12} 是碱性氨基酸, 例如 Q 或 K ;
- [0225] X_{c13} 是疏水性氨基酸, 例如 V 或 L 并且 ;
- [0226] X_{c14} 是 Q 或 G。
- [0227] seq id no. :36 (h21B12VL 共有 3)
- [0228] DIVMX_{c1}QSPX_{c2}SLAVSX_{c3}GEX_{c4}X_{c5}TX_{c6}X_{c7}CKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQX_{c8}PGQX_{c9}PKLLIYWAS
TRESGVPDRFX_{c10}GSGSGTDFTLTISSX_{c11}X_{c12}AEDX_{c13}AVYYCQQYYIYPRTFGX_{c14}GTKLEIK ;
- [0229] X_{c1} 是 T 或 S ; X_{c2} 是 D 或 S ; X_{c3} 是 L 或 V ; X_{c4} 是 R 或 K ; X_{c5} 是 A 或 V ; X_{c6} 是 I 或 M ; X_{c7}
是 N 或 S ; X_{c8} 是 K 或 R ; X_{c9} 是 P 或 S ; X_{c10} 是 S 或 T ; X_{c11} 是 L 或 V ; X_{c12} 是 Q 或 K ; X_{c13} 是 V 或
L 并且 ; X_{c14} 是 Q 或 G。
- [0230] SEQ ID NO. :37 (鼠 21B12VH)
- [0231] QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMHWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFA
FSLETSASTAYLQINNLKNETATYFCARDGFLYFFDYWGQGTTLTVSS
- [0232] seq id no. :38 (h21B12VH 共有 1)
- [0233] QXQLVQSGXELKKPGXXVKXSCKASGYTFTNYGMHWVXQAPGXGLXWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFX
FSLXTSXSTAYLQIXXLKXEDTAXYXCARDGFLYFFDYWGQGTXXTVSS
- [0234] 与 SEQ ID NO. :37 中所述多肽中的相应氨基酸相比, X 是一个氨基酸置换。
- [0235] seq id no. :39 (h21B12VH 共有 2)
- [0236] QX_{d1}QLVQSGX_{d2}ELKKPGX_{d3}X_{d4}VKX_{d5}SCKASGYTFTNYGMHWVX_{d6}QAPGX_{d7}GLX_{d8}WMGWINTYTGEPTY
ADDFKGRFX_{d9}FSLX_{d10}TSX_{d11}STAYLQIX_{d12}X_{d13}LKX_{d14}EDTAX_{d15}YX_{d16}CARDGFLYFFDYWGQGTX_{d17}X_{d18}TVSS ;
- [0237] X_{d1} 是疏水性氨基酸, 例如 V 或 I ;
- [0238] X_{d2} 是 S 或 P ;
- [0239] X_{d3} 是 A 或 E ;
- [0240] X_{d4} 是中性氨基酸, 例如 S 或 T ;
- [0241] X_{d5} 是疏水性氨基酸, 例如 V 或 I ;

- [0242] X_{d6} 是碱性氨基酸, 例如 R 或 K ;
- [0243] X_{d7} 是碱性氨基酸, 例如 Q 或 K ;
- [0244] X_{d8} 是 E 或 K ;
- [0245] X_{d9} 是疏水性氨基酸, 例如 V 或 A ;
- [0246] X_{d10} 是酸性氨基酸, 例如 D 或 E ;
- [0247] X_{d11} 是疏水性氨基酸, 例如 V 或 A ;
- [0248] X_{d12} 是 S 或 N ;
- [0249] X_{d13} 是 S 或 N ;
- [0250] X_{d14} 是 A 或 N ;
- [0251] X_{d15} 是 V 或 T ;
- [0252] X_{d16} 是芳族氨基酸, 例如 Y 或 F ;
- [0253] X_{d17} 是 L 或 T 并且 ;
- [0254] X_{d18} 是疏水性氨基酸, 例如 V 或 L。
- [0255] seq id no. :40 (h21B12VH 共有 3)
- [0256] QX_{d1}QLVQSGX_{d2}ELKKPGX_{d3}X_{d4}VKX_{d5}SCKASGYTFTNYGMHWVX_{d6}QAPGX_{d7}GLX_{d8}WMGWINTYTGEPTY
ADDFKGRFX_{d9}FSLX_{d10}TSX_{d11}STAYLQIX_{d12}X_{d13}LKX_{d14}EDTAX_{d15}YX_{d16}CARDGFLYFFDYWGQGTGX_{d17}X_{d18}TVSS ;
- [0257] X_{d1} 是 V 或 I ; X_{d2} 是 S 或 P ; X_{d3} 是 A 或 E ; X_{d4} 是 S 或 T ; X_{d5} 是 V 或 I ; X_{d6} 是 R 或 K ; X_{d7} 是 Q 或 K ; X_{d8} 是 E 或 K ; X_{d9} 是 V 或 A ; X_{d10} 是 D 或 E ; X_{d11} 是 V 或 A ; X_{d12} 是 S 或 N ; X_{d13} 是 S 或 N ; X_{d14} 是 A 或 N ; X_{d15} 是 V 或 T ; X_{d16} 是 Y 或 F ; X_{d17} 是 L 或 T 并且 ; X_{d18} 是 V 或 L。
- [0258] SEQ ID NO. :41 (16B5VL 的人模式)
- [0259] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNSKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS
GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPYSFGQGTKLEIK
- [0260] SEQ ID NO. :42 (16B5VH 的人模式)
- [0261] QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFDYYMHWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFKGRVT
ITADTSTDYAMELSSLRSEDVAVYYCARIPLFGRDHWGQGTTLVTVSR
- [0262] SEQ ID NO. :43 (21B12VL 的人模式)
- [0263] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNSKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS
GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPYS FGQGTKLEIK
- [0264] SEQ ID NO. :44 (21B12VH 的人模式)
- [0265] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTSYAMNWRQAPGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDWGQGTTLVTVSSVATIDENWFDP
- [0266] SEQ ID NO. :45
- [0267] 16B5 CDRH1 (较短形式) :GFNIKDIY
- [0268] SEQ ID NO. :46
- [0269] 16B5 CDRH2 (较短形式) :IDPAYGNT
- [0270] SEQ ID NO. :47
- [0271] 16B5 CDRH3 :ARRYDTAMDY
- [0272] SEQ ID NO. :48
- [0273] 16B5 CDRL1 (较短形式) :QSLLSNRTRKNY

- [0274] SEQ ID NO. :49
- [0275] 16B5 CDRL2(较短形式):WAS
- [0276] SEQ ID NO. :50
- [0277] 16B5 CDRL3:KQSYNLWT
- [0278] SEQ ID NO. :51
- [0279] 21B12 CDRH1:GYTFTNYG
- [0280] SEQ ID NO. :52
- [0281] 21B12 CDRH2:INTYTGEP
- [0282] SEQ ID NO. :53
- [0283] 21B12 CDRH3:X3X4DGFLYFFDY
- [0284] X_3 是 A ;
- [0285] X_4 是 R ;
- [0286] 或 X_3 和 X_4 在 CDRH3 外部
- [0287] SEQ ID NO. :54
- [0288] 21B12 CDRL1:QSLLYSSNQKNY
- [0289] SEQ ID NO. :55
- [0290] 21B12 CDRL2:WAS
- [0291] SEQ ID NO. :56
- [0292] 21B12 CDRL3:QQYYIYPRT
- [0293] SEQ ID NO:57
- [0294] GAGCAGAGCGCTATAAATACG
- [0295] SEQ ID NO:58
- [0296] CACGGTCTCCATAAATTTAGG
- [0297] SEQ ID NO:59
- [0298] TTGCGGCCGCAATACAATGAGCTGCGTGTGGC
- [0299] SEQ ID NO:60
- [0300] GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG
- [0301] SEQ ID NO. :61
- [0302] 簇集蛋白反义 :5' -CAGCAGCAGAGTCTTCATCAT-3'
- [0303] SEQ ID NO. :62(20E11 可变轻链)
- [0304] DIVLTLSPASLAVSLGQRATISCRASQSVNSSNYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPARFSGS
GSGTHFTLNIHPVEEEDTATYYCQHSWEIPWTFGGGTKLEIK
- [0305] SEQ ID NO. :63(20E11 可变轻链)
- [0306] QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTDYSMHWVKQAPGKGLKWMGWINTETGEPTYADDFKGRFA
FSLETSASTAYLQINLNKEDTATYFCARTGSSGYFDCWGGTTLTVSS
- [0307] SEQ ID NO. :64(11E2 可变轻链 Gr1)
- [0308] ENVLTQSPAIMASAPGKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSSTSPKLWIYDTSKLAGVPGRFSGSGS
YSLTISSMEAEDVATYYCFQSGYPFTFGSGTKLEIK
- [0309] SEQ ID NO. :65(11E2 可变轻链 GR2)

[0310] DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCKASQDINKYIAWYQHKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGR
DYSFISISNLEPEDIATYYCLQYDNLRLRTFGGGTKLEIK

[0311] SEQ ID NO. :66(11E2 可变重链)

[0312] EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWKQNGKSLEWIGNIDPYYGTPNYNQKFKGKAT
LTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCALNSLLRLNAMDYWGQGTSVTVSS

[0313] SEQ ID NO. :67(16C11 可变重链)

[0314] EVQLQQSGPELGKPGASVKISCKASGYSFTGYNMYWVKQSHRKSLEWIGYIDPYNGDTSYNQKSKGKAT
LTADRSSTAYMHLNSLTSEDSGIYYCARGAYGSSYAWGQGLVAVSA

[0315] 参考文献

[0316] Lenferink, A. E., C. Cantin 等人 (2009). “Transcriptome profiling of a TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition reveals extracellular clusterin as a target for therapeutic antibodies(TGF-β 诱导的上皮至间充质转变的转录组剖析揭示胞外簇集蛋白作为治疗性抗体的靶).” *Oncogene*29:831。

[0317] Adamo, V., T. Franchina 等人 (2009) “Gefitinib in lung cancer therapy(肺癌疗法中的吉非替尼).” *Cancer Biol Ther*8:206。

[0318] Shigematsu H., L. Lin L 等人, (2005) “Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers(与肺癌表皮生长因子受体基因突变相关的临床特征和生物特征).” *J Natl Cancer Inst*97:339。

[0319] Barr, S., S. Thomson 等人, (2008) “Bypassing cellular EGF receptor dependence through epithelial-to-mesenchymal-like transitions(借助上皮至间充质转变的旁路细胞 EGF 受体依赖性).” *Clin Exp Metastasis*25:685。

[0320] Mirshahidi, H. R., C. T., Hsueh(2010) “Updates in non-small cell lung cancer-insights from the 2009 45th annual meeting of the American Society of Clinical Oncology(非小细胞肺癌新进展-来自 2009 年美国临床肿瘤学会第 45 届年会的深入认识).” *J Hemat&Oncol*3:18。

[0321] Pirker, R., J. R., Peirera 等人, (2012) “EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer:analysis of data from the phase 3 FLEX study(EGFR 表达作为晚期非小细胞肺癌患者中一线化疗外加西妥昔单抗的存活预测物:来自 III 期 FLEX 研究的分析数据).” *Lancet*13:33。

[0322] Costanzo, R., M. C., Piccirillo(2011) “Gefitinib in non small cell lung cancer(非小细胞肺癌中的吉非替尼吉非替尼).” *J Biomed Biotechnol*2011:815269. 815269。

[0323] Herbst, R. S. and A. Sandler(2008) “Bevacizumab and erlotinib:A promising new approach to the treatment of advanced NSCLC(贝伐珠单抗和厄洛替尼:一种治疗晚期 NSCLC 的有前景的新方法).” *Oncologist*13:1166。

[0324] Yauch, R. L., T. Januario(2005) “Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in

lung cancer patients(上皮表型与间充质表型决定体外敏感性并预测厄洛替尼在肺癌患者中的临床活性).” Clin Cancer Res5:8686。

[0325] Witta 等人, Cancer Res. 66:944-950, 2006

[0326] Akashi, Y., Okamoto, T. 等人, (2008), Br J Cancer98:749。

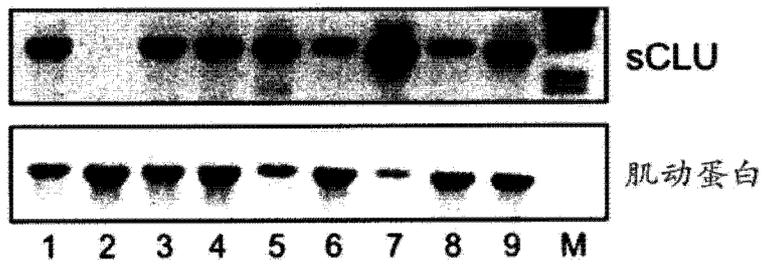


图 1

细胞系	[sCLU] (ng/ml)
A549	71.9
H226	<10
H292	40.8
H460	103
H1299	13.6

图 2

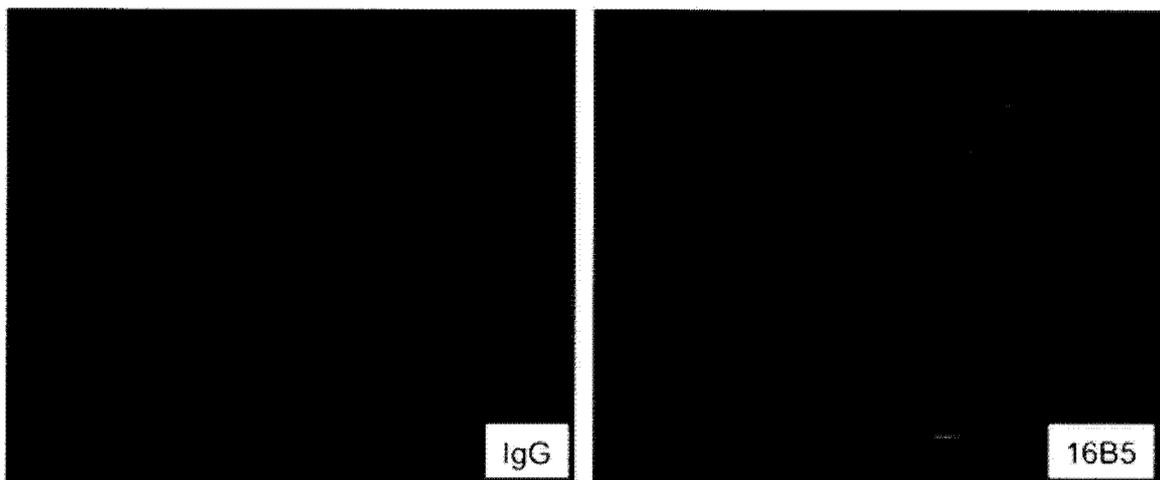


图 3

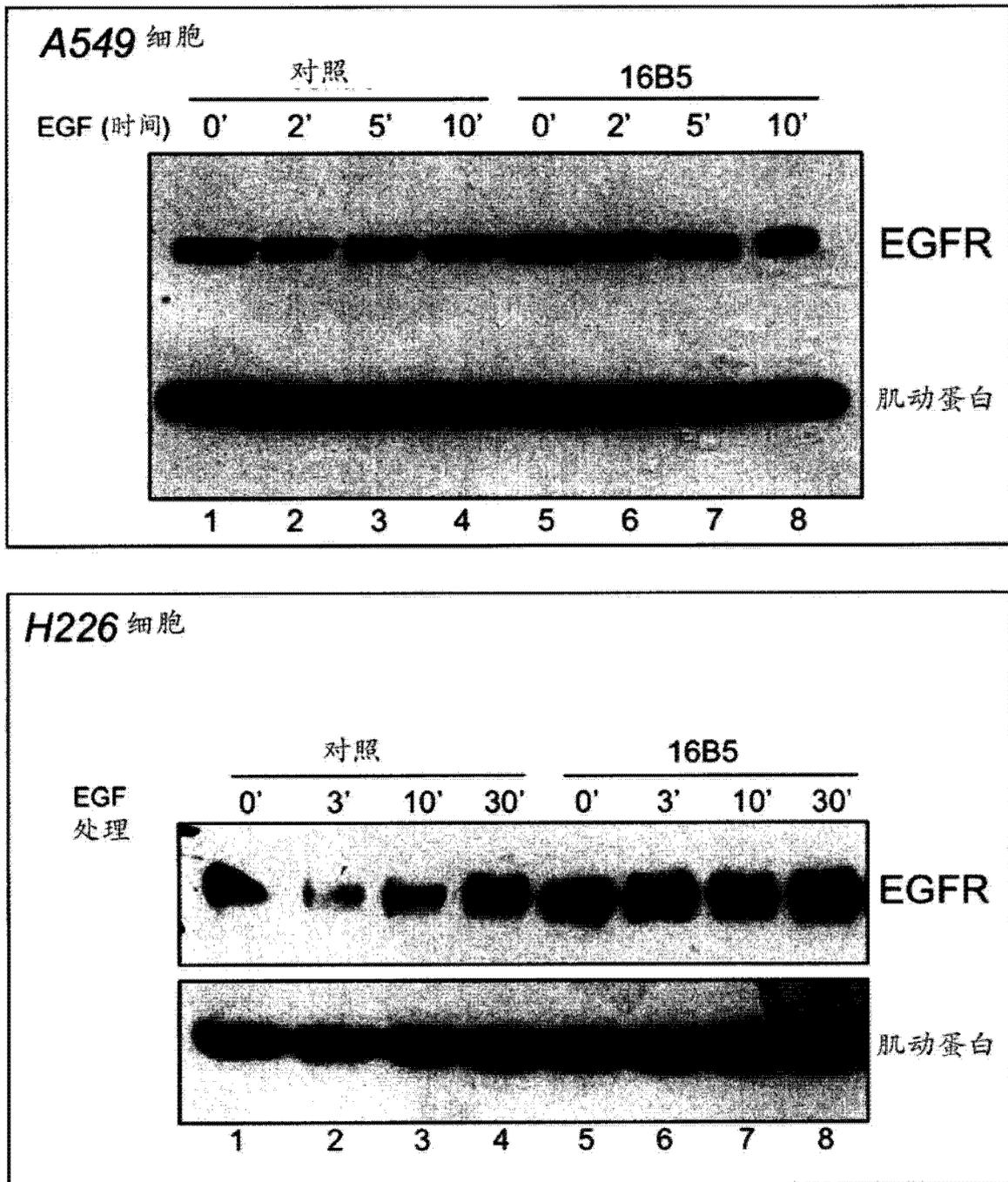


图 4

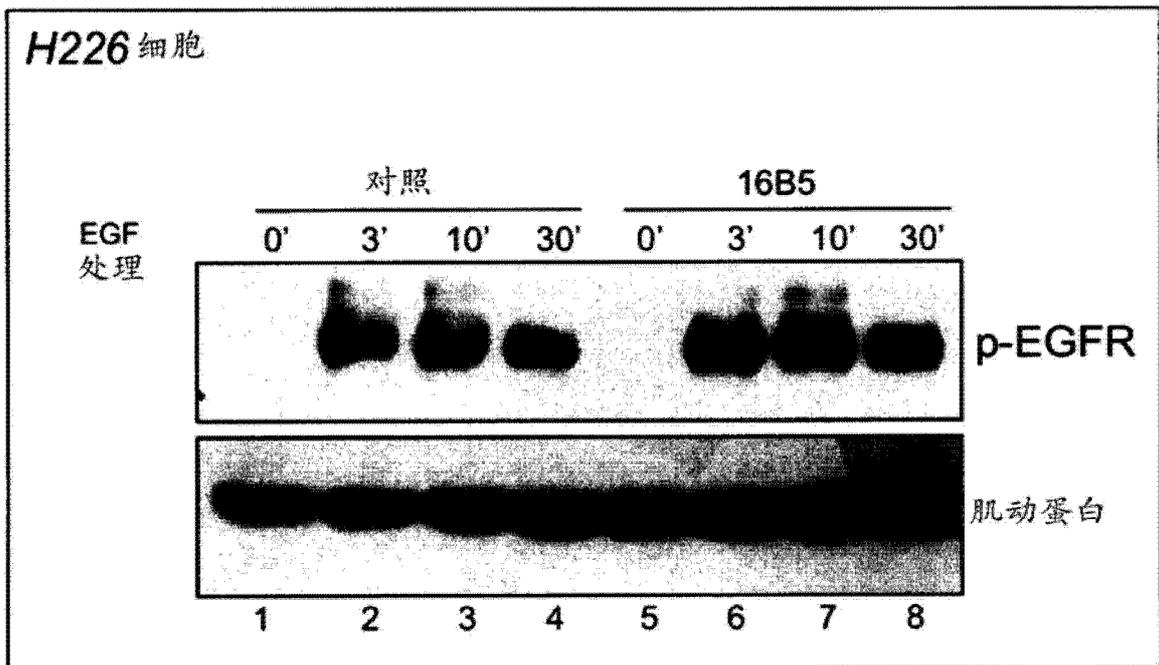
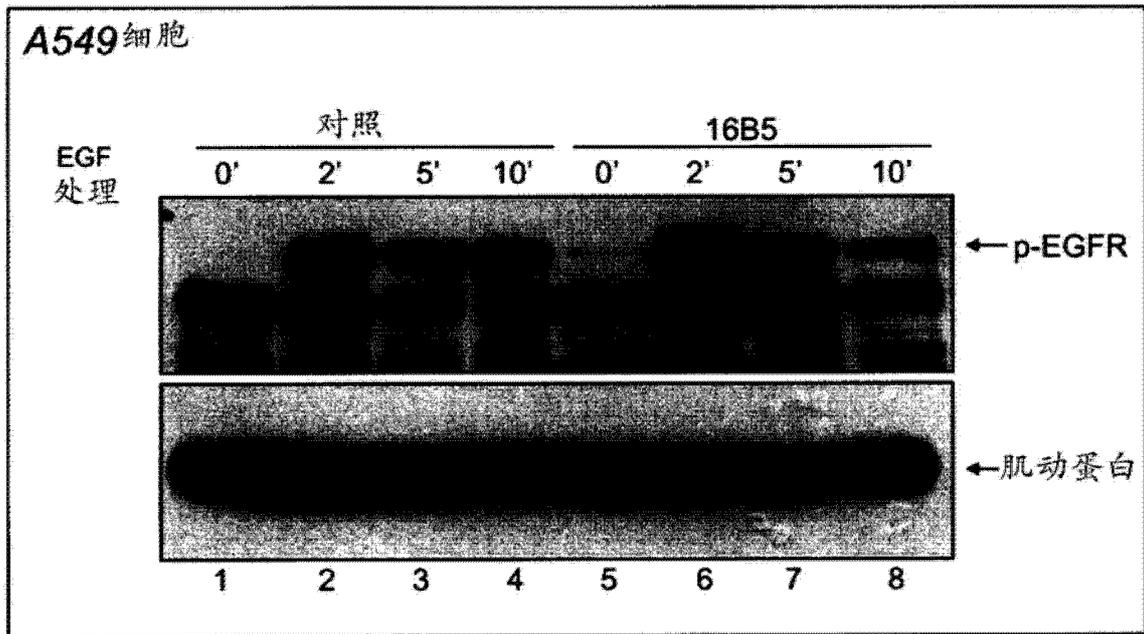


图 5

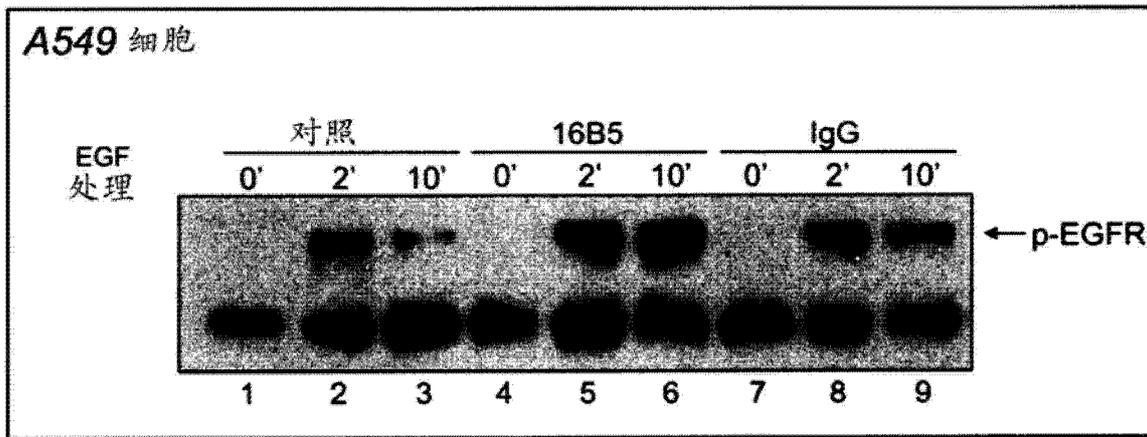


图 6

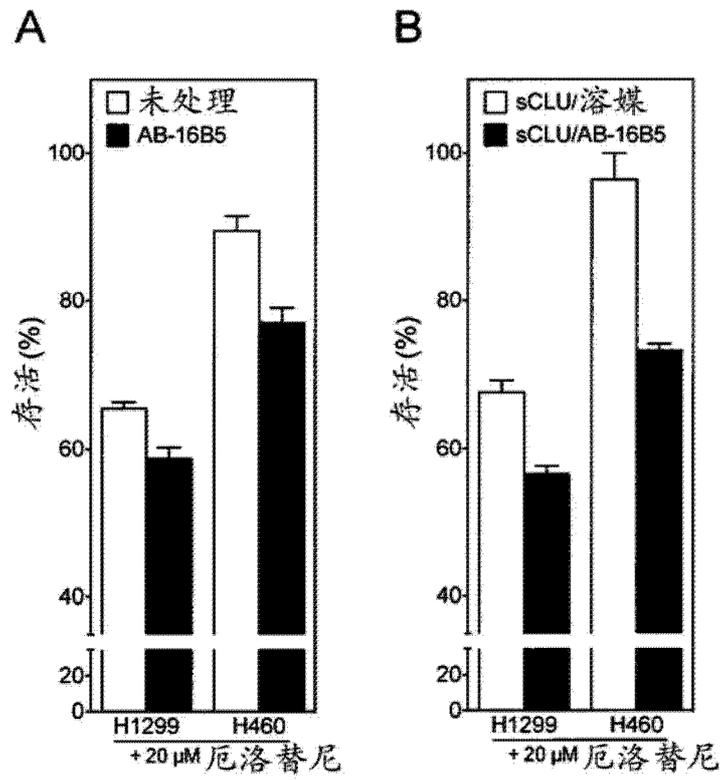


图 7