



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103509114 B

(45)授权公告日 2018.06.29

(21)申请号 201310314152.4

(22)申请日 2006.11.24

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103509114 A

(43)申请公布日 2014.01.15

(30)优先权数据

05025657.7 2005.11.24 EP

(62)分案原申请数据

200680043664.X 2006.11.24

(83)生物保藏信息

DSM ACC2737 2005.10.19

DSM ACC2738 2005.10.19

DSM ACC2739 2005.10.19

DSM ACC2740 2005.10.19

DSM ACC2741 2005.10.19

DSM ACC2742 2005.10.19

DSM ACC2743 2005.10.19

DSM ACC2745 2005.11.17

DSM ACC2746 2005.11.17

DSM ACC2747 2005.11.17

DSM ACC2748 2005.11.17

DSM ACC2808 2006.10.26

DSM ACC2809 2006.10.26

DSM ACC2810 2006.10.26

(73)专利权人 加尼梅德药物公司

地址 德国美因兹

专利权人 约翰内斯·古滕伯格美因兹大学,由校长代表

(72)发明人 乌尔·沙欣 厄兹莱姆·图雷奇

迪尔克·乌泽纳 斯特凡·弗里茨

克里斯托夫·乌赫雷克

贡达·勃兰登堡

哈拉尔德·格哈德·格佩特

安雅·克里斯蒂娜·施罗德

菲利普·蒂尔

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 彭鲲鹏 卢蓓

(51)Int.Cl.

C07K 16/30(2006.01)

C12N 5/20(2006.01)

C12N 5/09(2010.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

C12R 1/91(2006.01)

(56)对比文件

WO 2004047863 A2,2004.06.10,说明书实施例4.

TOMOAKI NIIMI等.claudin-18, a Novel Downstream Target Gene for the T/EBP/NKX2.1 Homeodomain Transcription Factor, Encodes Lung- and Stomach-Specific Isoforms through Alternative Splicing.《MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY》.2001,第21卷(第21期),第7380-7390页.

Shin-icuro Kitajiri等.Expression patterns of claudins, tight junction adhesion molecules,in the inner ear.《Hearing Research 》.2004,第187卷第25-34页.

审查员 陈莹

权利要求书3页 说明书92页

序列表86页 附图51页

(54)发明名称

用于治疗癌症的针对密蛋白-18的单克隆抗体

(57)摘要

本发明提供抗体,所述抗体可作为治疗剂用

于治疗和/或预防与表达CLD18的细胞相关的疾病,包括肿瘤相关疾病,如胃癌、食管癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、头颈癌和胆囊癌。

1. 结合CLD18A2并介导杀伤表达CLD18A2之细胞的嵌合抗体在制备用于预防或治疗癌症的药物中的用途，

其中所述嵌合抗体是这样的蛋白，其包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 的组合，所述组合各自包含选自以下 (i) 至 (ix) 的CDR1、CDR2和CDR3互补性决定区组：

(i) VH:CDR1:SEQ ID NO:115的45-52位,CDR2:SEQ ID NO:115的70-77位,CDR3:SEQ ID NO:115的116-125位,VL:CDR1:SEQ ID NO:122的49-53位,CDR2:SEQ ID NO:122的71-73位,CDR3:SEQ ID NO:122的110-118位，

(ii) VH:CDR1:SEQ ID NO:116的45-52位,CDR2:SEQ ID NO:116的70-77位,CDR3:SEQ ID NO:116的116-126位,VL:CDR1:SEQ ID NO:121的47-58位,CDR2:SEQ ID NO:121的76-78位,CDR3:SEQ ID NO:121的115-123位，

(iii) VH:CDR1:SEQ ID NO:117的45-52位,CDR2:SEQ ID NO:117的70-77位,CDR3:SEQ ID NO:117的116-124位,VL:CDR1:SEQ ID NO:123的47-52位,CDR2:SEQ ID NO:123的70-72位,CDR3:SEQ ID NO:123的109-117位，

(iv) VH:CDR1:SEQ ID NO:119的44-51位,CDR2:SEQ ID NO:119的69-76位,CDR3:SEQ ID NO:119的115-125位,VL:CDR1:SEQ ID NO:126的47-58位,CDR2:SEQ ID NO:126的76-78位,CDR3:SEQ ID NO:126的115-122位，

(v) VH:CDR1:SEQ ID NO:118的45-52位,CDR2:SEQ ID NO:118的70-77位,CDR3:SEQ ID NO:118的116-126位,VL:CDR1:SEQ ID NO:125的47-58位,CDR2:SEQ ID NO:125的76-78位,CDR3:SEQ ID NO:125的115-123位，

(vi) VH:CDR1:SEQ ID NO:120的45-53位,CDR2:SEQ ID NO:120的71-78位,CDR3:SEQ ID NO:120的117-128位,VL:CDR1:SEQ ID NO:124的47-58位,CDR2:SEQ ID NO:124的76-78位,CDR3:SEQ ID NO:124的115-123位，

(vii) VH:CDR1:SEQ ID NO:120的45-53位,CDR2:SEQ ID NO:120的71-78位,CDR3:SEQ ID NO:120的117-128位,VL:CDR1:SEQ ID NO:127的47-58位,CDR2:SEQ ID NO:127的76-78位,CDR3:SEQ ID NO:127的115-123位，

(viii) VH:CDR1:SEQ ID NO:120的45-53位,CDR2:SEQ ID NO:120的71-78位,CDR3:SEQ ID NO:120的117-128位,VL:CDR1:SEQ ID NO:128的47-58位,CDR2:SEQ ID NO:128的76-78位,CDR3:SEQ ID NO:128的115-123位，和

(ix) VH:CDR1:SEQ ID NO:120的45-53位,CDR2:SEQ ID NO:120的71-78位,CDR3:SEQ ID NO:120的117-128位,VL:CDR1:SEQ ID NO:129的47-52位,CDR2:SEQ ID NO:129的70-72位,CDR3:SEQ ID NO:129的109-117位。

2. 权利要求1的用途，其中所述癌症选自胃癌、食管癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、头颈癌和胆囊癌。

3. 权利要求1或2的用途，其中所述癌症是胃癌或胰腺癌。

4. 权利要求1至3中任一项的用途，其中所述嵌合抗体是单链蛋白，其中所述VL和VH区配对形成一价分子。

5. 权利要求1至4中任一项的用途，其中所述抗体包含重链可变区 (VH)，其含有选自SEQ ID NO:132,133,134,135,136和137的氨基酸序列。

6. 权利要求1至5中任一项的用途，其中所述抗体包含轻链可变区 (VL)，其含有选自SEQ

ID NO:138,139,140,141,142,143,144,145和146的氨基酸序列。

7. 权利要求1至6中任一项的用途,其中所述抗体包含选自以下可能性(i)至(ix)的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的组合:

(i) 包含SEQ ID NO:132所示氨基酸序列的VH以及包含SEQ ID NO:139所示氨基酸序列的VL,

(ii) 包含SEQ ID NO:133所示氨基酸序列的VH以及包含SEQ ID NO:138所示氨基酸序列的VL,

(iii) 包含SEQ ID NO:134所示氨基酸序列的VH以及包含SEQ ID NO:140所示氨基酸序列的VL,

(iv) 包含SEQ ID NO:136所示氨基酸序列的VH以及包含SEQ ID NO:143所示氨基酸序列的VL,

(v) 包含SEQ ID NO:135所示氨基酸序列的VH以及包含SEQ ID NO:142所示氨基酸序列的VL,

(vi) 包含SEQ ID NO:137所示氨基酸序列的VH以及包含SEQ ID NO:141所示氨基酸序列的VL,

(vii) 包含SEQ ID NO:137所示氨基酸序列的VH以及包含SEQ ID NO:144所示氨基酸序列的VL,

(viii) 包含SEQ ID NO:137所示氨基酸序列的VH以及包含SEQ ID NO:145所示氨基酸序列的VL,和

(ix) 包含SEQ ID NO:137所示氨基酸序列的VH以及包含SEQ ID NO:146所示氨基酸序列的VL。

8. 权利要求1至7中任一项的用途,其中所述抗体包含选自以下可能性(i)至(ix)的重链和轻链的组合:

(i) 包含SEQ ID NO:115所示氨基酸序列的重链以及包含SEQ ID NO:122所示氨基酸序列的轻链,

(ii) 包含SEQ ID NO:116所示氨基酸序列的重链以及包含SEQ ID NO:121所示氨基酸序列的轻链,

(iii) 包含SEQ ID NO:117所示氨基酸序列的重链以及包含SEQ ID NO:123所示氨基酸序列的轻链,

(iv) 包含SEQ ID NO:119所示氨基酸序列的重链以及包含SEQ ID NO:126所示氨基酸序列的轻链,

(v) 包含SEQ ID NO:118所示氨基酸序列的重链以及包含SEQ ID NO:125所示氨基酸序列的轻链,

(vi) 包含SEQ ID NO:120所示氨基酸序列的重链以及包含SEQ ID NO:124所示氨基酸序列的轻链,

(vii) 包含SEQ ID NO:120所示氨基酸序列的重链以及包含SEQ ID NO:127所示氨基酸序列的轻链,

(viii) 包含SEQ ID NO:120所示氨基酸序列的重链以及包含SEQ ID NO:128所示氨基酸序列的轻链,和

(ix) 包含SEQ ID NO:120所示氨基酸序列的重链以及包含SEQ ID NO:129所示氨基酸序列的轻链。

9. 包含选自以下可能性(i)至(ix)的重链和轻链之组合的抗体:

(i) 包含SEQ ID NO:115所示氨基酸序列的重链以及包含SEQ ID NO:122所示氨基酸序列的轻链,

(ii) 包含SEQ ID NO:116所示氨基酸序列的重链以及包含SEQ ID NO:121所示氨基酸序列的轻链,

(iii) 包含SEQ ID NO:117所示氨基酸序列的重链以及包含SEQ ID NO:123所示氨基酸序列的轻链,

(iv) 包含SEQ ID NO:119所示氨基酸序列的重链以及包含SEQ ID NO:126所示氨基酸序列的轻链,

(v) 包含SEQ ID NO:118所示氨基酸序列的重链以及包含SEQ ID NO:125所示氨基酸序列的轻链,

(vi) 包含SEQ ID NO:120所示氨基酸序列的重链以及包含SEQ ID NO:124所示氨基酸序列的轻链,

(vii) 包含SEQ ID NO:120所示氨基酸序列的重链以及包含SEQ ID NO:127所示氨基酸序列的轻链,

(viii) 包含SEQ ID NO:120所示氨基酸序列的重链以及包含SEQ ID NO:128所示氨基酸序列的轻链,和

(ix) 包含SEQ ID NO:120所示氨基酸序列的重链以及包含SEQ ID NO:129所示氨基酸序列的轻链。

用于治疗癌症的针对密蛋白-18的单克隆抗体

[0001] 本申请是申请日为2006年11月24日、申请号为“200680043664.X”、发明名称为“用于治疗癌症的针对密蛋白-18的单克隆抗体”的中国专利申请的分案申请,原申请是国际申请PCT/EP2006/011302的中国国家阶段申请。

技术领域

[0002] 与常规药物相比,基于抗体的癌症疗法具有较高特异性和较低副作用谱的潜力。其原因为抗体对正常细胞及赘生性细胞的精确区分以及以下事实,即其作用模式依赖于毒性较少的免疫学抗肿瘤机制,例如补体活化和细胞毒免疫细胞的募集。

背景技术

[0003] 基于抗体的疗法的靶标必须具有特定的性质,这形成了正确区分正常细胞及赘生性细胞的基础。显然,排他性地局限在肿瘤细胞中并且在正常组织中完全检测不到的靶标对于开发高效且安全的抗体疗法而言是很理想的。另一方面,高水平的过表达也可以是治疗窗和低副作用的基础,例如由于基因扩增而成为抗体曲妥珠单抗(trastuzumab,赫塞汀)优良靶标的2型人表皮生长因子受体(HER-2)。

[0004] 已获批准或正在临床开发的用于肿瘤疗法的抗体的其他靶标具有不基于靶分子在肿瘤细胞中数量上过表达的独特性质。对于针对蛋白聚糖MUC-1的抗体,靶标主链中的肽重复表位在肿瘤细胞中是低糖基化的,从而改变成其正常状态的对应物(counterpart)。对于针对CD20(利妥昔单抗(rituximab))、CD52(Campath-1H)和CD22(依帕珠单抗(epratuzumab))的抗体,抗体靶标在肿瘤细胞和正常淋巴细胞中的表达水平相当。这种情况下,抗体对正常细胞的去除是可以容忍的,因为靶标阴性的干细胞恢复了正常的淋巴细胞谱。抗体靶标差异性可接近性的其他实例为癌胚抗原(carcinoembryonal antigen,CEA)和碳酸酐酶IX(carboanhydrase IX,CA9)。这两种抗原分别在结肠和肾的正常上皮中表达。然而,经放射性标记的成像抗体确实良好区分了肿瘤及正常组织,而且细胞毒性抗体可以良好地容忍。这很可能是由于CA9和CEA在正常上皮组织中限制性表达在IgG抗体无法接近的腔侧。上皮细胞粘附分子(epithelial cell adhesion molecule,Ep-CAM)这种抗原也属于这一类别。作为上皮细胞的同型细胞粘附分子,它定位于在细胞间隙中。有意思的是,尽管高亲和力抗Ep-CAM抗体毒性极高,但中间亲和力的抗体却是良好容忍的。这提示了Ep-CAM靶标在正常细胞上的可接近性,但也表明抗体结合动力学为治疗提供了可能。

[0005] 一种可能性是涉及细胞/细胞粘附的其他上皮细胞特异性蛋白质对于抗体方法也有意义,因为它们在正常结构的上皮中几乎无法接近抗体,但在肿瘤细胞中却暴露出来。因此,我们对参与组织上皮组织结构的蛋白质作为治疗性抗体靶标的适用性进行了分析。一种特别吸引我们注意力的蛋白质是密蛋白18(claudin 18)。

[0006] 密蛋白18(CLD18)分子(Genbank登记号:剪接变体1(CLD18A1):NP_057453、NM016369,以及剪接变体2(CLD18A2):NM_001002026、NP_001002026)是分子量约为27,9/27,72kD的内在跨膜蛋白。密蛋白是位于上皮和内皮的紧密连接中的内在膜蛋白。紧密连接

在相邻细胞之间组织膜内颗粒互联链的网。在紧密连接中,闭合蛋白(occludin)和密蛋白是最主要的跨膜蛋白组分。由于其强胞间粘附特性,它们产生了防止和控制溶质的细胞旁转运并限制膜脂和蛋白质侧向扩散以维持细胞极性的一级屏障。形成紧密连接的蛋白质关键性地参与了组织上皮组织结构。我们推测,这些蛋白质在构造良好的上皮中几乎无法接近抗体,但在肿瘤细胞中则变得暴露出来。

[0007] CLD18是一种四次跨膜蛋白,因此具有四个疏水区。我们得出的数据表明CLD18展示若干不同构象,这些构象可被抗体选择性寻址。一种构象(CL18-构象-1)显示,全部四个疏水区均作为常规跨膜区(transmembrane domain, TM),并形成两个胞外环(环1由疏水区1和疏水区2环绕而成;环2由疏水区3和疏水区4环绕而成),像对绝大多数密蛋白家族成员所描述的那样。另一种构象(CL18-构象-2)显示,像对另一四次跨膜家族成员PMP22所描述的那样(Taylor等, *J. Neurosc. Res.* 62:15-27, 2000),第二个和第三个疏水结构域不完全跨过质膜,从而第一个和第四个跨膜结构域之间的部分(环D3)在胞外。第三种构象(CL18-构象-3)显示了由作为常规跨膜结构域的被第一个和第四个疏水区所环绕具有两个内部疏水区的大胞外结构域。由于环D3中存在经典的N-糖基化位点,密蛋白-18的拓扑学变体CLD18拓扑-2和CLD18拓扑-3带有额外的胞外N-糖基化位点。

[0008] 两种不同剪接变体的存在给CLD18分子增添了另一层水平上的复杂性,这两种变体描述于小鼠和人中(Niimi, *Mol. Cell. Biol.* 21:7380-90, 2001)。剪接变体CLD18A1和CLD18A2在包括第一个TM和环1的N端前21个氨基酸中存在差异,而C端的一级蛋白质序列相同。

[0009] CLD18A1在正常肺和胃的上皮中选择性表达,而CLD18A2仅在胃细胞中表达(Niimi, *Mol. Cell. Biol.* 21:7380-90, 2001)。最重要的是,CLD18A2局限在已分化的胃上皮短寿细胞中,但在胃干细胞区中不存在。我们使用灵敏的RT-PCR显示,两种变体在任何其他正常人器官中均完全检测不到,但在若干癌症类型中强烈表达,包括胃、食管、胰腺和肺的肿瘤以及人癌症细胞系。表达主要是在这些适应症的腺癌亚型中。

[0010] 该蛋白质的分子量在一些癌症和邻近的正常组织中存在差异。在健康组织中观察到的较高分子量的蛋白质可以通过用去糖基化化合物PNGase F处理组织裂解液而转变成与癌症中所观察到相同的分子量。这提示与其正常组织对应物相比,CLD18在癌症中N-糖基化较少。这种结构差异很可能产生改变的表位。经典的N-糖基化基序在该分子环D3结构域的116位氨基酸中。

[0011] 本发明的术语“CLD18”和“CLD18变体”应包括(i) CLD18剪接变体;(ii) CLD18 N糖基化变体;(iii) CLD18构象变体;(iv) 位于胞间紧密连接中的游离CLD18和同型/异型相连变体以及(v) CLD18的癌症相关变体和CLD18非癌症细胞相关变体。

[0012] CLD18的分子特征和功能特征使得该分子对基于抗体的癌症疗法非常有意义。特别是(i) 绝大多数毒性相关正常组织中不存在CLD18;(ii) CLD18 A2变体的表达局限在作为已分化胃细胞的可分散细胞群体中,这些细胞可由靶标阴性的胃干细胞进行补充;(iii) 正常及增生性细胞之间潜在差异性糖基化的线索;(iv) 不同构象拓扑学情况的存在。此外,CLD18作为紧密连接蛋白的作用可能进一步促成良好的治疗窗。由于肿瘤细胞表达密蛋白,但经常不像正常上皮组织中可见的那样通过密蛋白的同型和异型相关联形成经典的紧密连接,因此肿瘤细胞具有适用于胞外抗体结合及免疫疗法的可观的游离密蛋白库。有可能

在健康上皮中密蛋白的结合表位被屏蔽在紧密连接中,使这些抗体无法接近。

[0013] 本发明的一个目的是提供可用于治疗其中有CLD18表达的疾病(例如肿瘤疾病)的抗体。本文所述抗体还可用于诊断这些疾病。

发明内容

[0014] 本发明一般地提供抗体,所述抗体可用作治疗剂用于治疗 and/或预防与表达CLD18的细胞相关的疾病,包括肿瘤相关疾病,如胃癌、食管癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、头颈癌和胆囊癌。

[0015] 本发明的一个方面涉及能够结合CLD18并介导杀伤表达CLD18的细胞的抗体。优选地,该抗体与CLD18A1和CLD18A2结合,更优选地,该抗体与CLD18A2结合但不与CLD18A1结合。优选地,本发明的抗体与CLD-构象-1的环1或环2结合并对其具有特异性。在另一优选实施方案中,本发明的抗体与CLD-构象-2的环D3结合并对其具有特异性,特别是与环D3中116位的N糖基化位点处或其周围结合。在另一实施方案中,本发明的抗体对环D3中116位潜在N糖基化位点未发生糖基化的形式具有特异性。

[0016] 本发明抗体对细胞的杀伤优选通过该抗体与所述细胞所表达的CLD18结合来诱导,更优选通过该抗体与所述细胞所表达的CLD18A2结合来诱导。在一个实施方案中,本发明抗体与所述细胞所表达的CLD18A1的结合不诱导杀伤所述细胞。

[0017] 所述表达CLD18的细胞优选为癌细胞,特别是选自致瘤性的胃、食管、胰腺、肺、卵巢、结肠、肝、头颈和膀胱的癌细胞。

[0018] 优选地,本发明抗体通过诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)介导的裂解、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)介导的裂解、凋亡、同型粘附和/或吞噬作用来介导对细胞的杀伤,优选通过诱导CDC介导的裂解和/或ADCC介导的裂解来介导对细胞的杀伤。

[0019] 在一个实施方案中,本发明的抗体不诱导CDC介导的细胞裂解。

[0020] 优选地,ADCC介导的细胞裂解在效应细胞存在时发生,所述效应细胞在具体实施方案中选自单核细胞(monocyte)、单个核细胞(mononuclear cell)、NK细胞和PMN,吞噬作用是通过巨噬细胞来实现。

[0021] 本发明的抗体可以是单克隆抗体、嵌合抗体、人抗体或人源化抗体或者是抗体片段,并且可选自IgG1、IgG2(优选IgG2a和IgG2b)、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、分泌性IgA、IgD和IgE抗体。

[0022] 根据本发明的所有方面,CLD18优选为人CLD18,优选人CLD18A2,并且CLD18A2优选具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列,CLD18A1优选具有SEQ ID NO:8的序列。

[0023] 在一个特别优选的实施方案中,本发明的抗体与活细胞表面上存在的CLD18的天然表位结合。在另一优选的实施方案中,本发明的抗体对癌细胞(优选胃癌细胞)具有特异性。

[0024] 在本发明的某些实施方案中,CLD18表达于细胞表面。

[0025] 本发明的抗体可通过包括以下步骤的方法获得:用具有选自SEQ ID NO:2、4、6、16、18、20、21-23和26-31的氨基酸序列的蛋白质或多肽或其免疫原性片段或者表达所述蛋白质或多肽或其免疫原性片段的核酸或宿主细胞免疫动物。优选地,本发明的抗体对上述蛋白质、多肽或其免疫原性片段具有特异性。

[0026] 在一个特别优选的实施方案中,本发明的抗体通过登记号为DSM ACC2737 (182-D1106-055)、DSM ACC2738 (182-D1106-056)、DSM ACC2739 (182-D1106-057)、DSM ACC2740 (182-D1106-058)、DSM ACC2741 (182-D1106-059)、DSM ACC2742 (182-D1106-062)、DSM ACC2743 (182-D1106-067)、DSM ACC2745 (182-D758-035)、DSM ACC2746 (182-D758-036)、DSM ACC2747 (182-D758-040)、DSM ACC2748 (182-D1106-061)、DSM ACC2808 (182-D1106-279)、DSM ACC2809 (182-D1106-294)或DSM ACC2810 (182-D 1106-362)的克隆来产生。

[0027] 在一个实施方案中,本发明的抗体与治疗剂如毒素、放射性同位素、药物或细胞毒剂偶联。

[0028] 本发明的另一方面涉及能产生本发明抗体的杂交瘤。优选杂交瘤的登记号为DSM ACC2737 (182-D1106-055)、DSM ACC2738 (182-D1106-056)、DSM ACC2739 (182-D1106-057)、DSM ACC2740 (182-D1106-058)、DSM ACC2741 (182-D1106-059)、DSM ACC2742 (182-D1106-062)、DSM ACC2743 (182-D1106-067)、DSM ACC2745 (182-D758-035)、DSM ACC2746 (182-D758-036)、DSM ACC2747 (182-D758-040)、DSM ACC2748 (182-D1106-061)、DSM ACC2808 (182-D1106-279)、DSM ACC2809 (182-D1106-294)或DSM ACC2810 (182-D1106-362)。

[0029] 本发明的抗体在本文中通过参考该抗体的命名(如182-D758-035)和/或通过参考产生该抗体的克隆(如26D12)来命名。

[0030] 本发明还涉及包含本发明抗体和/或其与治疗剂的缀合物以及可药用载体的药物组合物。

[0031] 本发明的另一方面涉及杀伤表达CLD18(优选CLD18A2)和/或抑制其生长的方法,包括使细胞接触有效量的本发明抗体和/或其与治疗剂的缀合物。CLD18优选在所述细胞的表面表达。

[0032] 本发明的另一方面涉及治疗或预防与表达CLD18(优选CLD18A2)的细胞相关的疾病或病症的方法,包括对受试者施用本发明的抗体、其与治疗剂的缀合物或者包含本发明抗体或其与治疗剂的缀合物的药物组合物。优选地,所述疾病或病症为肿瘤相关疾病,在具体实施方案中选自胃癌、食管癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、头颈癌和胆囊癌。CLD18优选在所述细胞的表面表达。

[0033] 优选地,本发明的抗体能够区分不同细胞类型(包括癌细胞和非恶性细胞)所表达的CLD18变体。在一个特别优选的实施方案中,本发明的抗体能够与CLD18A2结合,但不与CLD18A1结合,或者与CLD18A1结合的特异性低于与CLD18A2的结合特异性。

[0034] 本发明的术语“结合”优选涉及特异性结合。“特异性结合”指试剂(如抗体)与其特异性靶标(如表位)的结合强于与其他靶标的结合。如果试剂与第一种靶标结合的解离常数(K_D)低于与第二种靶标的解离常数,则其与第一种靶标的结合强于与第二种靶标的结合。优选地,试剂特异性结合的靶标的解离常数(K_D)低于该试剂非特异性结合的靶标的解离常数(K_D)的1/10以下,优选1/20以下,更优选1/50以下,甚至更优选1/100、1/200、1/500或1/1000以下。

[0035] 本发明的抗体通过结合CLD18(优选表达在所述细胞表面)介导杀伤表达CLD18(优选表达CLD18A2)的细胞。在一个实施方案中,本发明的抗体诱导补体依赖性细胞毒性(CDC),如CLD18表达细胞发生至少约20-40% CDC介导的裂解,优选约40-50% CDC介导的裂解,更优选高于50% CDC介导的裂解。这样的抗体在本文中通过以下抗体进行示例:37H8、

38G5、38H3、39F11、61C2、26B5、26D12、28D10、163E12、175D10、45C1、125E1、ch-163E12和ch-175D10。作为诱导CDC的替代或补充，本发明的抗体可在效应细胞（如单核细胞（monocyte）、单个核细胞（mononuclear cell）、NK细胞和PMN）存在下诱导CLD18表达细胞的抗体依赖性细胞毒性（ADCC）。这样的抗体在本文中通过以下抗体进行示例：37G11、37H8、38G5、38H3、39F11、43A11、61C2、26B5、26D12、28D10、42E12、163E12、175D10、45C1和125E1。本发明的抗体可具有以下能力：诱导CLD18表达细胞的凋亡、诱导CLD18表达细胞的同型粘附和/或在巨噬细胞存在下诱导CLD18表达细胞的吞噬作用。本发明的抗体可具有一种或多种上述功能特性。优选地，本发明的抗体诱导CLD18表达细胞的CDC介导的裂解和ADCC介导的裂解，更优选诱导CLD18表达细胞的ADCC介导的裂解，而不诱导所述细胞CDC介导的裂解。本发明抗体的示例性靶细胞包括但不限于表达CLD18（优选CLD128A2）的癌细胞，如致瘤性的胃、胰腺、食管和肺的癌细胞。在一个具体的优选实施方案中，本发明抗体介导的细胞杀伤是CLD18A2特异性的，即本发明抗体介导杀伤（优选CDC和/或ADCC介导的细胞裂解）表达CLD18A2的细胞，但是不介导杀伤表达CLD18A1而不表达CLD18A2的细胞。上述抗体可在例如以下癌症的治疗或预防中用于介导杀伤肿瘤细胞：胃癌、食管癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、头颈癌和胆囊癌。

[0036] 本发明的抗体可根据其结合特性及其介导效应子对CLD18表达细胞的功能的能力分类到不同类别中。本发明抗体可根据以下特征分类：

[0037] ●对表达CLD18A1或CLD18A2的细胞的结合特性和/或介导的效应子对所述细胞的功能（区分CLD18剪接变体），

[0038] ●对表达糖基化或非糖基化CLD18变体的细胞的结合特性和/或介导的效应子对所述细胞的功能（区分有无N糖基化的CLD18变体），

[0039] ●对癌细胞或正常细胞类型的细胞的结合特性和/或介导的效应子对所述细胞的功能（区分肿瘤细胞表达的或正常细胞表达的CLD18变体），

[0040] ●对被紧密连接的形成所屏蔽的CLD18表位的结合特性，

[0041] ●对活细胞诱导CLD18聚集体形成的能力，和

[0042] ●与非人CLD18变体特别是来自小鼠、大鼠、兔和灵长类的CLD18结合的能力。

[0043] 本发明的抗体具有一种或多种以下特性，其中给出本发明抗体（24H5、26B5、26D12、28D10、37G11、37H8、38G5、38H3、39F11、41C6、42E12、43A11、44E10、47D12、61C2、75B8、85A3、9E8、19B9、45C1、125E1、163E12、166E2、175D10、ch-43A11、ch-45C1、ch-125E1、ch-163E12、ch-166E2、ch-175D10）的具体实例作为参考：

[0044] a) 与CLD18A2以及CLD18A1结合（如26D12、28D10、37H8、38H3、39F11、61C2和41C6）

[0045] b) 与CLD18A2结合但不与CLD18A1结合（如26B5、37G11、38G5、42E12和43A11、45C1、125E1、163E12、166E2、175D10、ch-43A11、ch-45C1、ch-125E1、ch-163E12、ch-166E2、ch-175D10）

[0046] c) 与肿瘤细胞天然表达的CLD18结合但不与非癌细胞或组织（如胃和肺细胞）天然表达的CLD18结合（如26B5、75B8、24H5、39F11、45C1、125E1、163E12、166E2、175D10）

[0047] d) 介导CDC诱导的针对表达CLD18A2细胞的杀伤，而不针对表达CLD18A1的细胞（如26D12、28D10、37H8和39F11、163E12、ch-125E1、ch-163E12、ch-175D10）

[0048] e) 介导ADCC诱导的对表达CLD18细胞的杀伤（如26B5、37G11、37H8、38G5、38H3、

39F11、43A11、47D12和61C2、ch-163E12、ch-175D10)

[0049] f) 介导ADCC诱导的对表达CLD18细胞的杀伤,但不介导CDC介导的杀伤(如37G11、42E12和43A11)

[0050] g) 介导ADCC诱导的和CDC诱导的对表达CLD18A2细胞的杀伤(如37H8、38H3、39F11、ch-163E12、ch-175D10)。

[0051] 如本文所述示例的,本发明的抗体还包括以下分子,其

[0052] a) 与已分化的正常胃细胞结合,但不与胃干细胞结合(如39F11)

[0053] b) 不与正常胃组织以及其他正常器官结合,而是排他性地与癌细胞结合(如26B5)

[0054] c) 与包含CLD18的116位非糖基化Asn的表位结合

[0055] d) 与人及小鼠CLD18结合,使得可以在小鼠中充分进行临床前毒性研究。

[0056] 本发明的抗体可来自不同物种,包括但不仅限于小鼠、大鼠、兔、豚鼠和人。本发明的抗体还包括嵌合分子,其中来自一个物种(优选人)的抗体恒定区与来自另一物种的抗原结合位点组合。此外,本发明的抗体包括人源化分子,其中来自非人物种的抗体的抗原结合位点与人来源的恒定区和构架区组合。

[0057] 本发明的抗体包括多克隆抗体和单克隆抗体,并包括IgG2a(如IgG2a、 κ 、 λ)、IgG2b(如IgG2b、 κ 、 λ)、IgG3(如IgG3、 κ 、 λ)和IgM抗体。然而,本发明也包括其他抗体同种型,包括IgG1、IgA1、IgA2、分泌性IgA、IgD和IgE抗体。所述抗体可以是完整抗体或其抗原结合片段,包括如Fab、F(ab')₂、F_y、单链F_y片段,或者是双特异性抗体。此外,所述抗原结合片段包括包含以下部分的结合结构域免疫球蛋白融合蛋白:(i)与免疫球蛋白铰链区多肽融合的结合结构域多肽(如重链可变区或轻链可变区),(ii)与该铰链区融合的免疫球蛋白重链CH2恒定区,和(iii)与该CH2恒定区融合的免疫球蛋白重链CH3恒定区。这样的结合结构域免疫球蛋白融合蛋白在US2003/0118592和US 2003/0133939中有进一步公开。

[0058] 本发明的抗体优选以约1-100nM或更小的解离平衡常数(K_D)与CLD18解离。优选地,本发明的抗体不与相关细胞表面抗原交叉反应,因此不抑制其功能。

[0059] 在一些优选的实施方案中,本发明的抗体可通过一种或多种以下特性进行表征:

[0060] a) 对CLD18的特异性,特别是对CLD18A2的特异性;

[0061] b) 对CLD18特别是CLD18A2的结合亲和性为约100nM或更小,优选约5-10nM或更小,更优选约1-3nM或更小,

[0062] c) 介导对CD55/59阴性或CD55/59阳性细胞的高水平CDC的能力;

[0063] d) 抑制表达CLD18的细胞生长的能力;

[0064] e) 诱导表达CLD18的细胞凋亡的能力;

[0065] f) 对表达CLD18的细胞诱导同型粘附的能力;

[0066] g) 在效应细胞存在下对表达CLD18的细胞诱导ADCC的能力;

[0067] h) 延长患有表达CLD18的肿瘤的受试者存活的能力;

[0068] i) 清除表达CLD18的细胞的能力;

[0069] j) 清除表达低水平CLD18的细胞的能力,和/或

[0070] k) 在活细胞表面聚集CLD18的能力。

[0071] 本发明的抗CLD18抗体可进行衍生、连接或共表达以得到其它的结合特异性。在一个具体实施方案中,本发明提供双特异性或多特异性分子,其包含至少一种对CLD18的第一

结合特异性(如抗CLD18抗体或其模拟体)以及对效应细胞的第二结合特异性,如对Fc受体(例如Fc- γ 受体,如Fc- γ RI或其他Fc受体)或T细胞受体(如CD3)的结合特异性。

[0072] 因此,本发明包括与CLD18以及Fc受体或T细胞受体(如CD3)均结合的双特异性和多特异性分子。Fc受体的实例为IgG受体、Fc- γ 受体(Fc- γ R)如Fc- γ RI(CD64)、Fc- γ R II(CD32)和Fc- γ R III(CD16)。也可靶向其他Fc受体,如IgA受体(如Fc α RI)。所述Fc受体优选位于效应细胞如单核细胞、巨噬细胞或活化单个核细胞的表面上。在一个优选的实施方案中,所述双特异性和多特异性分子在Fc受体中不同于免疫球蛋白Fc(如IgG或IgA)结合位点的位点处与该受体结合。因此,所述双特异性和多特异性分子的结合不被生理水平的免疫球蛋白所封闭。

[0073] 在另一实施方案中,本发明的抗CLD18抗体与其他功能分子如其他肽和蛋白质(如Fab'片段)进行衍生、连接或共表达。例如,本发明的抗体可以与一种或多种其他分子实体功能性连接(例如通过化学偶联、遗传融合、非共价连接等),所述分子实体例如其他抗体(如用于产生双特异性或多特异性抗体)、毒素、细胞配体或抗原(如用于产生免疫缀合物,如免疫毒素)。本发明的抗体可以与其他治疗部分连接,如放射性同位素、小分子抗癌药物、重组细胞因子或趋化因子。因此,本发明包括多种抗体缀合物、双特异性或多特异性分子和融合蛋白,它们均与CLD18表达细胞结合,并可用于将其他分子靶向到这些细胞。

[0074] 在另一方面中,本发明提供组合物,如药物和诊断组合物/试剂盒,其包含与一种本发明抗体或本发明抗体组合配制在一起的可药用载体。在一个具体实施方案中,该组合物包含抗体组合,所述抗体与不同的表位结合,或者具有不同的功能特征,例如诱导CDC和/或ADCC以及诱导凋亡。在本发明的这一实施方案中,抗体可组合使用,例如作为包含两种或更多种抗CLD18单克隆抗体的药物组合物使用。例如,可将具有不同但互补的活性的抗CLD18抗体组合在单一治疗中,以实现所需疗效。在一个优选的实施方案中,该组合物包含介导CDC的抗CLD18抗体与诱导凋亡的其他抗CLD18抗体的组合。在另一实施方案中,该组合物包含在效应细胞存在下介导高效杀伤靶细胞的抗CLD18抗体与抑制CLD18表达细胞生长的其他抗CLD18抗体的组合。

[0075] 本发明还包括同时或依次施用两种或多种本发明的抗CLD18抗体,其中至少一种所述抗体为嵌合抗CLD18抗体,且至少一种其他抗体为人抗CLD18抗体,所述抗体结合CLD18中相同或不同的表位。优选地,首先施用本发明的嵌合CLD18抗体,其后施用本发明的人抗CLD18抗体,其中所述人抗CLD18抗体优选长期施用,即作为维持疗法。

[0076] 本发明的抗体、免疫缀合物、双特异性和多特异性分子以及组合物可用于抑制表达CLD18(特别是CLD18A2)的细胞生长和/或选择性杀伤表达CLD18(特别是CLD18A2)的细胞的多种方法中,所述方法通过使所述细胞接触有效量的抗体、免疫缀合物、双特异性/多特异性分子或组合物从而抑制细胞的生长和/或杀伤细胞来实现。在一个实施方案中,所述方法包括杀伤表达CLD18的细胞,任选地在效应细胞存在下进行杀伤,例如通过CDC、凋亡、ADCC、吞噬作用或通过两种或更多种这些机制的组合。可以使用本发明抗体抑制或杀伤的CLD18表达细胞包括癌细胞,如致瘤性的胃、胰腺、食管、肺、卵巢、结肠、肝、头颈和胆囊细胞。

[0077] 因此,本发明的抗体可用于治疗和/或预防多种涉及CLD18表达细胞的疾病,这通过对患这些疾病的患者施用抗体来实现。可以治疗(如改善)或预防的示例性疾病包括但不

仅限于致瘤性疾病。可以治疗和/或预防的致瘤性疾病的实例包括胃癌、胰腺癌、食管癌、肺癌、卵巢癌、结肠直肠癌、肝癌、头颈癌和胆囊癌。

[0078] 在本发明的一个具体实施方案中,施用抗体的受试者还另外用化学治疗剂、放射或调节(如增强或抑制)Fc受体(如Fc- γ 受体如细胞因子)表达或活性的药剂进行治疗。用于在治疗期间施用的典型细胞因子包括粒细胞菌落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素- γ (IFN- γ)和肿瘤坏死因子(TNF)。典型治疗剂包括抗肿瘤剂如阿霉素、顺铂、多西紫杉醇、5-氟尿嘧啶、氨甲喋呤、吉西他滨和环磷酰胺。

[0079] 在另一实施方案中,本发明涉及用人CLD18或其肽片段优选是CLD18A2或其肽片段免疫非人动物如小鼠以获得抗体的免疫策略。用于免疫的优选肽为选自SEQ ID NO:2、4、6、16、18、20-23和26-31的肽。因此,在一些优选的实施方案中,本发明的抗体为通过用选自SEQ ID NO:2、4、6、16、18、20-23和26-31的肽进行免疫而获得的抗体。类似地,可以在非人转基因动物如转基因小鼠中产生诊断CLD18的抗体。所述非人转基因动物可以是基因组中包含编码全部或部分抗体的重链转基因和轻链转基因的小鼠。

[0080] 可以用CLD18抗原和/或核酸和/或表达CLD18或其肽片段的细胞的经纯化或富集的制剂来免疫野生型以及非人转基因动物。优选地,所述非人动物能够通过进行V-D-J重组和同种型转换而产生多种对CLD18的人单克隆抗体同种型(如IgG、IgA和/或IgM)。同种型转换可通过如经典或非经典同种型转换而发生。

[0081] 因此,在另一方面中,本发明提供来自上述非人动物的分离的B细胞。接着可通过与永生细胞融合而使所述分离的B细胞永生,以提供本发明抗体的来源(如杂交瘤)。这样的杂交瘤(即产生本发明抗体的杂交瘤)也包括在本发明的范围内。

[0082] 如本文所示例的,本发明的抗体可直接得自表达该抗体的杂交瘤,或者可以克隆并在宿主细胞(如CHO细胞或淋巴细胞)中重组表达。宿主细胞的其他实例为微生物,如大肠杆菌,以及真菌,如酵母。作为替代的,它们可在非人转基因动物或植物中重组产生。

[0083] 用于产生本发明抗体的优选杂交瘤为在DSMZ (Mascheroder Weg 1b, 31824 Braunschweig, Germany; 新地址: Inhoffenstr. 7B, 31824 Braunschweig, Germany) 测序或保藏的杂交瘤,其命名和登记号如下:

- [0084] a. 182-D1106-055, 登记号DSM ACC2737, 保藏于2005年10月19日
- [0085] b. 182-D1106-056, 登记号DSM ACC2738, 保藏于2005年10月19日
- [0086] c. 182-D1106-057, 登记号DSM ACC2739, 保藏于2005年10月19日
- [0087] d. 182-D1106-058, 登记号DSM ACC2740, 保藏于2005年10月19日
- [0088] e. 182-D1106-059, 登记号DSM ACC2741, 保藏于2005年10月19日
- [0089] f. 182-D1106-062, 登记号DSM ACC2742, 保藏于2005年10月19日
- [0090] g. 182-D 1106-067, 登记号DSM ACC2743, 保藏于2005年10月19日
- [0091] h. 182-D758-035, 登记号DSM ACC2745, 保藏于2005年11月17日
- [0092] i. 182-D758-036, 登记号DSM ACC2746, 保藏于2005年11月17日
- [0093] j. 182-D758-040, 登记号DSM ACC2747, 保藏于2005年11月17日
- [0094] k. 182-D1106-061, 登记号DSM ACC2748, 保藏于2005年11月17日
- [0095] l. 182-D1106-279, 登记号DSM ACC2808, 保藏于2006年10月26日
- [0096] m. 182-D1106-294, 登记号DSM ACC2809, 保藏于2006年10月26日

[0097] n.182-D1106-362, 登记号DSM ACC2810, 保藏于2006年10月26日。

[0098] 本发明优选的抗体为通过上述杂交瘤产生并可得自上述杂交瘤的抗体——即对于182-D1106-055的情况为37G11, 对于182-D1106-056的情况为37H8, 对于182-D1106-057的情况为38G5, 对于182-D1106-058的情况为38H3, 对于182-D1106-059的情况为39F11, 对于182-D1106-062的情况为43A11, 对于182-D1106-067的情况为61C2, 对于182-D758-035的情况为26B5, 对于182-D758-036的情况为26D12, 对于182-D758-040的情况为28D10, 对于182-D1106-061的情况为42E12, 对于182-D1106-279的情况为125E1, 对于182-D1106-294的情况为163E12, 对于182-D1106-362的情况为175D10——及其嵌合及人源化形式。

[0099] 在一些优选的实施方案中, 本发明的抗体 (特别是嵌合形式的抗体) 包括含有如下重链恒定区 (CH) 的抗体, 所述重链恒定区包含来自人重链恒定区的氨基酸序列, 如SEQ ID NO: 46或150所示氨基酸序列或其片段。在另一些优选的实施方案中, 本发明的抗体 (特别是嵌合形式的抗体) 包括含有如下轻链恒定区 (CL) 的抗体, 所述轻链恒定区包含来自人轻链恒定区的氨基酸序列, 如SEQ ID NO: 41或148所示氨基酸序列或其片段。在一个具体的优选实施方案中, 本发明的抗体 (特别是嵌合形式的抗体) 包括含有如下重链恒定区 (CH) 并含有如下轻链恒定区 (CL) 的抗体, 所述重链恒定区包含来自人重链恒定区的氨基酸序列, 如SEQ ID NO: 46或150所示氨基酸序列或其片段, 所述轻链恒定区包含来自人轻链恒定区的氨基酸序列, 如SEQ ID NO: 41或148所示氨基酸序列或其片段。

[0100] 包含SEQ ID NO: 46所示氨基酸序列的CH可由包含SEQ ID NO: 45所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO: 150所示氨基酸序列的CH可由包含SEQ ID NO: 149所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO: 41所示氨基酸序列的CL可由包含SEQ ID NO: 40所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO: 148所示氨基酸序列的CL可由包含SEQ ID NO: 147所示核酸序列的核酸编码。

[0101] 在某些优选的实施方案中, 嵌合形式的抗体包括这样的抗体, 其包含重链和/或轻链, 所述重链含有选自SEQ ID NO: 115、116、117、118、119、120及其片段的氨基酸序列, 所述轻链含有选自SEQ ID NO: 121、122、123、124、125、126、127、128、129及其片段的氨基酸序列。

[0102] 在某些优选的实施方案中, 嵌合形式的抗体包括这样的抗体, 其包含选自以下可能性 (i) 至 (ix) 的重链和轻链的组合:

[0103] (i) 包含SEQ ID NO: 115所示氨基酸序列或其片段的重链以及包含SEQ ID NO: 122所示氨基酸序列或其片段的轻链,

[0104] (ii) 包含SEQ ID NO: 116所示氨基酸序列或其片段的重链以及包含SEQ ID NO: 121所示氨基酸序列或其片段的轻链,

[0105] (iii) 包含SEQ ID NO: 117所示氨基酸序列或其片段的重链以及包含SEQ ID NO: 123所示氨基酸序列或其片段的轻链,

[0106] (iv) 包含SEQ ID NO: 119所示氨基酸序列或其片段的重链以及包含SEQ ID NO: 126所示氨基酸序列或其片段的轻链,

[0107] (v) 包含SEQ ID NO: 118所示氨基酸序列或其片段的重链以及包含SEQ ID NO: 125所示氨基酸序列或其片段的轻链,

[0108] (vi) 包含SEQ ID NO: 120所示氨基酸序列或其片段的重链以及包含SEQ ID NO:

124所示氨基酸序列或其片段的轻链，

[0109] (vii) 包含SEQ ID NO:120所示氨基酸序列或其片段的轻链以及包含SEQ ID NO:127所示氨基酸序列或其片段的轻链，

[0110] (viii) 包含SEQ ID NO:120所示氨基酸序列或其片段的轻链以及包含SEQ ID NO:128所示氨基酸序列或其片段的轻链，和

[0111] (ix) 包含SEQ ID NO:120所示氨基酸序列或其片段的轻链以及包含SEQ ID NO:129所示氨基酸序列或其片段的轻链。

[0112] 上文使用的“片段”或“氨基酸序列的片段”涉及抗体序列的一部分，即代表N和/C端缩短的抗体序列的序列，其在替换抗体中的所述抗体序列时保留所述抗体对CLD18的结合，并优选保留所述抗体如本文所述的功能，例如CDC介导的裂解或ADCC介导的裂解。优选地，氨基酸序列的片段含有来自所述氨基酸序列的至少80%、优选至少90%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸残基。选自SEQ ID NO:115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128和129的氨基酸序列的片段优选涉及其中除去了N端17、18、19、20、21、22或23个氨基酸的所述序列。本文所述氨基酸序列的片段可分别由编码所述氨基酸序列的核酸序列的片段编码。

[0113] 包含SEQ ID NO:115所示氨基酸序列的重链可由包含SEQ ID NO:100所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:116所示氨基酸序列的重链可由包含SEQ ID NO:101所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:117所示氨基酸序列的重链可由包含SEQ ID NO:102所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:119所示氨基酸序列的重链可由包含SEQ ID NO:104所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:118所示氨基酸序列的重链可由包含SEQ ID NO:103所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:120所示氨基酸序列的重链可由包含SEQ ID NO:105所示核酸序列的核酸编码。

[0114] 包含SEQ ID NO:122所示氨基酸序列的轻链可由包含SEQ ID NO:107所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:121所示氨基酸序列的轻链可由包含SEQ ID NO:106所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:123所示氨基酸序列的轻链可由包含SEQ ID NO:108所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:126所示氨基酸序列的轻链可由包含SEQ ID NO:111所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:125所示氨基酸序列的轻链可由包含SEQ ID NO:110所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:124所示氨基酸序列的轻链可由包含SEQ ID NO:109所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:127所示氨基酸序列的轻链可由包含SEQ ID NO:112所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:128所示氨基酸序列的轻链可由包含SEQ ID NO:113所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:129所示氨基酸序列的轻链可由包含SEQ ID NO:114所示核酸序列的核酸编码。

[0115] 在一个优选的实施方案中，本发明的抗体包含重链可变区 (VH)，其含有选自SEQ ID NO:132,133,134,135,136,137及其片段的氨基酸序列。

[0116] 在一个优选的实施方案中，本发明的抗体包含轻链可变区 (VL)，其含有选自SEQ ID NO:138,139,140,141,142,143,144,145,146及其片段的氨基酸序列。

[0117] 在某些优选的实施方案中，本发明的抗体包括这样的抗体，其包含选自以下可能性 (i) 至 (ix) 的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 的组合：

[0118] (i) 包含SEQ ID NO:132所示氨基酸序列或其片段的VH以及包含SEQ ID NO:139所

示氨基酸序列或其片段的VL，

[0119] (ii) 包含SEQ ID NO:133所示氨基酸序列或其片段的VH以及包含SEQ ID NO:138所示氨基酸序列或其片段的VL，

[0120] (iii) 包含SEQ ID NO:134所示氨基酸序列或其片段的VH以及包含SEQ ID NO:140所示氨基酸序列或其片段的VL，

[0121] (iv) 包含SEQ ID NO:136所示氨基酸序列或其片段的VH以及包含SEQ ID NO:143所示氨基酸序列或其片段的VL，

[0122] (v) 包含SEQ ID NO:135所示氨基酸序列或其片段的VH以及包含SEQ ID NO:142所示氨基酸序列或其片段的VL，

[0123] (vi) 包含SEQ ID NO:137所示氨基酸序列或其片段的VH以及包含SEQ ID NO:141所示氨基酸序列或其片段的VL，

[0124] (vii) 包含SEQ ID NO:137所示氨基酸序列或其片段的VH以及包含SEQ ID NO:144所示氨基酸序列或其片段的VL，

[0125] (viii) 包含SEQ ID NO:137所示氨基酸序列或其片段的VH以及包含SEQ ID NO:145所示氨基酸序列或其片段的VL，和

[0126] (ix) 包含SEQ ID NO:137所示氨基酸序列或其片段的VH以及包含SEQ ID NO:146所示氨基酸序列或其片段的VL。

[0127] 包含SEQ ID NO:132所示氨基酸序列的VH可由包含SEQ ID NO:55所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:133所示氨基酸序列的VH可由包含SEQ ID NO:56所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:134所示氨基酸序列的VH可由包含SEQ ID NO:57所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:136所示氨基酸序列的VH可由包含SEQ ID NO:59所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:135所示氨基酸序列的VH可由包含SEQ ID NO:58所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:137所示氨基酸序列的VH可由包含SEQ ID NO:60所示核酸序列的核酸编码。

[0128] 包含SEQ ID NO:139所示氨基酸序列的VL可由包含SEQ ID NO:62所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:138所示氨基酸序列的VL可由包含SEQ ID NO:61所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:140所示氨基酸序列的VL可由包含SEQ ID NO:63所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:143所示氨基酸序列的VL可由包含SEQ ID NO:66所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:142所示氨基酸序列的VL可由包含SEQ ID NO:65所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:141所示氨基酸序列的VL可由包含SEQ ID NO:64所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:144所示氨基酸序列的VL可由包含SEQ ID NO:67所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:145所示氨基酸序列的VL可由包含SEQ ID NO:68所示核酸序列的核酸编码。包含SEQ ID NO:146所示氨基酸序列的VL可由包含SEQ ID NO:69所示核酸序列的核酸编码。

[0129] 在一个优选的实施方案中，本发明的抗体包含VH，其含有选自以下实施方案(i)至(vi)的CDR1、CDR2和CDR3互补性决定区组：

[0130] (i) CDR1:SEQ ID NO:115的45-52位，CDR2:SEQ ID NO:115的70-77位，CDR3:SEQ ID NO:115的116-125位，

[0131] (ii) CDR1:SEQ ID NO:116的45-52位，CDR2:SEQ ID NO:116的70-77位，CDR3:SEQ

ID NO:116的116-126位,

[0132] (iii) CDR1:SEQ ID NO:117的45-52位,CDR2:SEQ ID NO:117的70-77位,CDR3:SEQ ID NO:117的116-124位,

[0133] (iv) CDR1:SEQ ID NO:118的45-52位,CDR2:SEQ ID NO:118的70-77位,CDR3:SEQ ID NO:118的116-126位,

[0134] (v) CDR1:SEQ ID NO:119的44-51位,CDR2:SEQ ID NO:119的69-76位,CDR3:SEQ ID NO:119的115-125位,

[0135] (vi) CDR1:SEQ ID NO:120的45-53位,CDR2:SEQ ID NO:120的71-78位,CDR3:SEQ ID NO:120的117-128位。

[0136] 在一个优选的实施方案中,本发明的抗体包含VL,其含有选自以下实施方案(i)至(ix)的CDR1、CDR2和CDR3互补性决定区组:

[0137] (i) CDR1:SEQ ID NO:121的47-58位,CDR2:SEQ ID NO:121的76-78位,CDR3:SEQ ID NO:121的115-123位,

[0138] (ii) CDR1:SEQ ID NO:122的49-53位,CDR2:SEQ ID NO:122的71-73位,CDR3:SEQ ID NO:122的110-118位,

[0139] (iii) CDR1:SEQ ID NO:123的47-52位,CDR2:SEQ ID NO:123的70-72位,CDR3:SEQ ID NO:123的109-117位,

[0140] (iv) CDR1:SEQ ID NO:124的47-58位,CDR2:SEQ ID NO:124的76-78位,CDR3:SEQ ID NO:124的115-123位,

[0141] (v) CDR1:SEQ ID NO:125的47-58位,CDR2:SEQ ID NO:125的76-78位,CDR3:SEQ ID NO:125的115-123位,

[0142] (vi) CDR1:SEQ ID NO:126的47-58位,CDR2:SEQ ID NO:126的76-78位,CDR3:SEQ ID NO:126的115-122位,

[0143] (vii) CDR1:SEQ ID NO:127的47-58位,CDR2:SEQ ID NO:127的76-78位,CDR3:SEQ ID NO:127的115-123位,

[0144] (viii) CDR1:SEQ ID NO:128的47-58位,CDR2:SEQ ID NO:128的76-78位,CDR3:SEQ ID NO:128的115-123位,和

[0145] (ix) CDR1:SEQ ID NO:129的47-52位,CDR2:SEQ ID NO:129的70-72位,CDR3:SEQ ID NO:129的109-117位。

[0146] 在一个优选的实施方案中,本发明的抗体包含VH和VL,其分别含有选自以下实施方案(i)至(ix)的CDR1、CDR2和CDR3互补性决定区组:

[0147] (i) VH:CDR1:SEQ ID NO:115的45-52位,CDR2:SEQ ID NO:115的70-77位,CDR3:SEQ ID NO:115的116-125位,VL:CDR1:SEQ ID NO:122的49-53位,CDR2:SEQ ID NO:122的71-73位,CDR3:SEQ ID NO:122的110-118位,

[0148] (ii) VH:CDR1:SEQ ID NO:116的45-52位,CDR2:SEQ ID NO:116的70-77位,CDR3:SEQ ID NO:116的116-126位,VL:CDR1:SEQ ID NO:121的47-58位,CDR2:SEQ ID NO:121的76-78位,CDR3:SEQ ID NO:121的115-123位,

[0149] (iii) VH:CDR1:SEQ ID NO:117的45-52位,CDR2:SEQ ID NO:117的70-77位,CDR3:SEQ ID NO:117的116-124位,VL:CDR1:SEQ ID NO:123的47-52位,CDR2:SEQ ID NO:123的

70-72位,CDR3:SEQ ID NO:123的109-117位,

[0150] (iv) VH:CDR1:SEQ ID NO:119的44-51位,CDR2:SEQ ID NO:119的69-76位,CDR3:SEQ ID NO:119的115-125位,VL:CDR1:SEQ ID NO:126的47-58位,CDR2:SEQ ID NO:126的76-78位,CDR3:SEQ ID NO:126的115-122位,

[0151] (v) VH:CDR1:SEQ ID NO:118的45-52位,CDR2:SEQ ID NO:118的70-77位,CDR3:SEQ ID NO:118的116-126位,VL:CDR1:SEQ ID NO:125的47-58位,CDR2:SEQ ID NO:125的76-78位,CDR3:SEQ ID NO:125的115-123位,

[0152] (vi) VH:CDR1:SEQ ID NO:120的45-53位,CDR2:SEQ ID NO:120的71-78位,CDR3:SEQ ID NO:120的117-128位,VL:CDR1:SEQ ID NO:124的47-58位,CDR2:SEQ ID NO:124的76-78位,CDR3:SEQ ID NO:124的115-123位,

[0153] (vii) VH:CDR1:SEQ ID NO:120的45-53位,CDR2:SEQ ID NO:120的71-78位,CDR3:SEQ ID NO:120的117-128位,VL:CDR1:SEQ ID NO:127的47-58位,CDR2:SEQ ID NO:127的76-78位,CDR3:SEQ ID NO:127的115-123位,

[0154] (viii) VH:CDR1:SEQ ID NO:120的45-53位,CDR2:SEQ ID NO:120的71-78位,CDR3:SEQ ID NO:120的117-128位,VL:CDR1:SEQ ID NO:128的47-58位,CDR2:SEQ ID NO:128的76-78位,CDR3:SEQ ID NO:128的115-123位,和

[0155] (ix) VH:CDR1:SEQ ID NO:120的45-53位,CDR2:SEQ ID NO:120的71-78位,CDR3:SEQ ID NO:120的117-128位,VL:CDR1:SEQ ID NO:129的47-52位,CDR2:SEQ ID NO:129的70-72位,CDR3:SEQ ID NO:129的109-117位。

[0156] 在另一些优选的实施方案中,本发明的抗体优选包含针对CLD18的单克隆抗体(优选本文所述针对CLD18的单克隆抗体)中重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的一个或多个互补性决定区(CDR),优选至少包含CDR3可变区,并且优选包含本文所述重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的一个或多个互补性决定区(CDR),优选至少包含CDR3可变区。在一个实施方案中,所述一个或多个互补性决定区(CDR)选自本文所述的CDR1、CDR2和CDR3互补性决定区组。在一个特别优选的实施方案中,本发明的抗体优选包含针对CLD18的单克隆抗体(优选本文所述针对CLD18的单克隆抗体)重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的互补性决定区CDR1、CDR2和CDR3,并优选包含本文所述重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的互补性决定区CDR1、CDR2和CDR3。

[0157] 在一个实施方案中,如本文所述包含一个或多个CDR、一组CDR或CDR组的组合的本发明抗体包含与其介入构架区(intervening framework region)在一起的所述CDR。优选地,该部分还将包含第一个和第四个构架区中其一或其二的至少约50%、所述50%为第一个构架区的C端50%和第四个构架区的N端50%。构建通过重组DNA技术产生的本发明抗体可能导致在可变区的N端或C端引入接头编码的残基,所述接头的引入是为了便于克隆或其他操作步骤,包括引入接头以连接本发明的可变区与其他蛋白质序列,所述其他序列包括免疫球蛋白重链、其他可变结构域(例如在双抗体的产生中)或蛋白质标签。

[0158] 在一个实施方案中,如本文所述包含一个或多个CDR、一组CDR或CDR组的组合的本发明抗体在人抗体构架区中包含所述CDR。

[0159] 本文中提到的在其重链中包含特定链或特定区域或特定序列的抗体优选涉及所述抗体的所有重链均包含所述特定链、区域或序列的情况。相应地,这也适用于抗体的轻

链。

[0160] 本发明还涉及核酸,其包含编码如本文所述抗体或其部分(如抗体链)的基因或核酸序列。该核酸可以包含在载体中,例如质粒、粘粒、病毒、噬菌体或者例如在遗传工程中常规使用的其他载体。所述载体可包含其他基因,例如允许在适当的宿主细胞中和在适当的条件下选择该载体的标记基因。此外,所述载体还可包含允许编码区在适当宿主中正确表达的表达控制元件。这样的控制元件为本领域技术人员所公知,可包括启动子、剪接盒以及翻译起始密码子。

[0161] 优选地,本发明的核酸与允许在真核或原核细胞中表达的上述表达控制序列有效连接。确保在真核或原核细胞中表达的控制元件为本领域技术人员所熟知。

[0162] 用于构建本发明核酸分子、构建包含上述核酸分子的载体、将载体引入正确选择的宿主细胞、引起或实现表达的方法在本领域中是公知的。

[0163] 本发明的另一方面涉及包含本文所述核酸或载体的宿主细胞

[0164] 本发明的其他特征和优点在以下详细描述和权利要求中将十分明显。

附图说明

[0165] 图1显示转染了与绿色荧光染料偶联的CLD18A2的HEK293细胞的免疫荧光分析,所述细胞与用SEQ ID NO:15进行DNA免疫后的小鼠血清进行了反应,所述SEQ ID NO:15是与辅助表位(helper epitope)相融合的。

[0166] 图2显示转染了CLD18A2-myc(SEQ ID NO:3)的HEK293细胞及未转染的HEK293细胞的Western印迹分析,所述分析使用单克隆小鼠抗c-myc抗体9E11(Serotec,CRL MCA2200)进行。

[0167] 图3显示使用转染了CLD18A2的CHO细胞和多克隆兔抗CLD18抗体(Zymed,CRL 38-8000)进行的免疫荧光分析。

[0168] 图4A和B显示通过流式细胞术测定的杂交瘤上清液24H5和85A3与瞬时转染了人CLD18A2和荧光标记的HEK293细胞的结合。图4C显示杂交瘤上清液45C1、125E1、163E12、166E2和175D10与稳定转染了人CLD18A2并用碘化丙锭(propidium iodide)复染的HEK293细胞的结合。

[0169] 图5显示通过流式细胞术测定的杂交瘤上清液24H5(A)、9E8(B)、26B5(C)和19B9(D)与瞬时转染了荧光标记以及人CLD18A2或CLD18A2-Myc或CLD18A2-HA的HEK293细胞的结合。

[0170] 图6A和B显示通过流式细胞术测定的杂交瘤上清液37H8、43A11、45C1和163E12与稳定转染了人CLD18A2或CLD18A1的HEK293细胞的结合。

[0171] 图7显示CLD18A2同工型特异性单克隆抗体37G11的免疫荧光分析,所述分析通过在天然(A、B)及多聚甲醛固定(C、D)条件下染色分别转染了CLD18A2(A、C)和CLD18A1(B、D)的HEK293细胞来进行。

[0172] 图8显示CLD18单克隆抗体26B5的免疫荧光分析,所述分析通过在天然(A、B)及多聚甲醛固定(C、D)条件下染色分别转染了CLD18A2(A、C)和CLD18A1(B、D)的HEK293细胞来进行。

[0173] 图9.细胞系RT-PCR

- [0174] 使用CLD18A2特异性引物的RT-PCR分析显示在4/5的测试细胞系中有明确的表达。
- [0175] 图10显示DAN-G细胞(亚克隆F2)和多克隆兔抗CLD18抗体(Zymed, CRL 38-8000)的免疫荧光分析。
- [0176] 图11显示KATO-III细胞(亚克隆3B94D5)和多克隆兔抗CLD18抗体(Zymed, CRL 38-8000)的免疫荧光分析。
- [0177] 图12A显示SNU-16细胞(亚克隆G5)与多克隆兔抗CLD18抗体(Zymed, CRL 38-8000)的免疫荧光分析。图12B显示KATO-III细胞与本发明单克隆抗体的免疫荧光分析。
- [0178] 图13显示CLD18在KATO-III和NUGC-4细胞表面的表达,其通过用单克隆抗体61C2和163E12染色随后进行流式细胞术来进行分析。
- [0179] 图14. 人CLD18A1 (NP_057453)、人CLD18A2 (NP_001002026)、小鼠CLD18A1 (NP_062789) 和小鼠CLD18A2 (AAL15636)的蛋白质比对。
- [0180] 图15A和B显示通过流式细胞术分析的杂交瘤上清液38G5、38H3、37G11、45C1和163E12分别与瞬时转染了荧光标记以及小鼠CLD18A1或小鼠CLD18A2的HEK293细胞的结合。
- [0181] 图16. 使用多克隆抗体p105进行的免疫组化分析
- [0182] 对正常组织亚组(胃、肺、骨髓和前列腺)的免疫组化染色证实了胃组织特异性(A)。还在胃癌(上面一行)和肺癌(B)中检测到了表达。仅分化细胞表达CLD18A2,但干细胞不表达(C)。
- [0183] 图17. 使用单克隆抗体39F11D7进行的免疫组化分析
- [0184] (A) 在正常胃粘膜中检测到特异性蛋白质表达,而测试的所有其他正常组织均为阴性。
- [0185] (B) 在胃癌和肺癌中发现强CLD18A2表达。
- [0186] 图18. 使用单克隆抗体26B5 (A)、175D10 (B)、43A11 (C)、163E12 (D) 和45C1 (E) 进行的免疫组化分析。所有抗体均显示HEK293-CLD18A2异种移植肿瘤和胃癌标本的强染色,而用HEK293-模拟对照转染的肿瘤则不然。
- [0187] 图19是比较通过85A3、28D10、24H5或26D12诱导针对稳定转染了人CLD18A2的HEK293细胞的CDC之后死细胞百分比的图,使用流式细胞术测定。
- [0188] 图20是通过24H5、26D12、28D10、37G11、37H8、38G5、38H3、39F11、41C6、42E12、43A11、44E10、47D12或61C2诱导针对稳定转染了人CLD18A2或人CLD18A1的贴壁CHO细胞的CDC之后特异性细胞裂解百分比的图,通过荧光测量来测定。
- [0189] 图21显示75B8 (A)、28D10 (B) 或37H8 (C) 浓度依赖性诱导针对稳定转染了人CLD18A2的CHO细胞的CDC,通过荧光测量来测定。
- [0190] 图22显示在MNC存在下26B5、37H8、38G5、47D12和61C2分别诱导的HEK293-CLD18A2细胞裂解。
- [0191] 图23显示在MNC存在下26B5、37H8、38G5、47D12和61C2分别诱导的HEK293-CLD18A1细胞裂解。
- [0192] 图24显示在使用HEK293-CLD18A2细胞的早期治疗异种移植模型中本发明抗体对肿瘤生长的抑制。
- [0193] 图25A和B显示在两种使用HEK293-CLD18A2细胞的早期治疗异种移植模型中通过使用本发明抗体治疗的存活延长。

[0194] 图26显示在使用HEK293-CLD18A2细胞的深度治疗(advanced treatment)异种移植模型中通过本发明抗体的存活延长。

[0195] 图27A显示在早期治疗异种移植模型中通过本发明抗体的肿瘤生长抑制。图27B显示早期治疗异种移植模型中通过本发明抗体的存活延长。使用内源表达CLD18A2的DAN-G细胞。

[0196] 图28显示小鼠组织中的CLD18A2mRNA表达。使用CLD18A2特异性引物的RT-PCR研究显示,在除胃以外的所有所测试正常组织中均无显著表达。分析了以下正常组织:1:小肠,2:脾,3:皮肤,4:胃,5:肺,6:胰腺,7:淋巴结,8:胸腺,9:阴性对照。

[0197] 图29显示正常胃中的CLD18表达。使用CLD18特异性抗体的小鼠胃免疫组化分析显示了保守的表达模式。尽管表面上皮和更深处的隐窝(crypt)在其细胞表面表达CLD18,但中央颈部区(central neck region)为CLD18阴性。

[0198] 图30显示小鼠胃组织的苏木精和伊红染色。显示了用37G11处理的小鼠与仅用PBS处理的对照小鼠(C和D)的胃的概况(A)和细节(B)。

[0199] 图31A和B显示使用本发明抗体(43A11、125E1、163E12、166E2和175D10)对分别稳定转染了CLD18A1和A2的HEK293细胞以及内源性表达的KATO-III细胞进行的流式细胞染色。

[0200] 图32显示本发明嵌合抗体介导的对CLD18A2表达细胞的CDC。

[0201] 图33显示本发明嵌合抗体介导的对KATO-III细胞的ADCC。

具体实施方式

[0202] 本文所述抗体可以是与CLD18上存在的表位特异性结合的分离的单克隆抗体。本发明涵盖的分离的单克隆抗体包括IgA、IgG1-4、IgE、IgM和IgD抗体。在一个实施方案中,所述抗体为IgG1抗体,更具体地为IgG1 κ 或IgG1 λ 同种型。在另一实施方案中,所述抗体为IgG3抗体,更具体地为IgG3 κ 或IgG3 λ 同种型。在另一实施方案中,所述抗体为IgG4抗体更特别地为IgG4 κ 或IgG4 λ 同种型。在另一实施方案中,所述抗体为IgA1或IgA2抗体。在另一实施方案中,所述抗体为IgM抗体。

[0203] 在一个实施方案中,本发明涉及这样的抗体,其与表达CLD18的细胞特异性结合,并且优选地(i)与表达CLD18A2的细胞结合,并且(ii)不与不表达CLD18A2但表达CLD18A1的细胞结合。本发明的抗体优选地(i)介导杀伤表达CLD18A2的细胞,并且(ii)不介导杀伤不表达CLD18A2但表达CLD18A1的细胞。

[0204] 在另一实施方案中,本发明涉及这样的抗体,其(i)与表达CLD18的肿瘤细胞结合,(ii)不与表达CLD18的正常胃粘膜细胞结合,和/或(iii)不与表达CLD18的非癌肺组织细胞结合。

[0205] 本发明还包括这样的抗体,其(i)介导杀伤表达CLD18的肿瘤细胞,(ii)不介导杀伤表达CLD18的正常胃粘膜细胞,和/或(iii)不介导杀伤表达CLD18的非癌肺组织细胞。

[0206] 在一些具体的实施方案中,本发明的抗体(i)结合CLD18A2上不存在于CLD18A1上的表位,优选SEQ ID NO:21、22和23,(ii)结合位于CLD18A2环1上的表位,优选SEQ ID NO:28,(iii)结合位于CLD18A2环2上的表位,优选SEQ ID NO:30,(iv)结合位于CLD18A2环D3上的表位,优选SEQ ID NO:31,(v)结合包括CLD18A2环1和CLD18A2环D3的表位,(vi)结合位于

CLD18A2环D3上的非糖基化表位,优选SEQ ID NO:29,或者(vii)结合人和小鼠CLD18中存在的表位(分别为SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37)。

[0207] 在一些特别优选的实施方案中,本发明的抗体结合CLD18A2上不存在于CLD18A1上的表位。

[0208] 本发明的抗体包括全人抗体。这样的抗体可以在非人转基因动物(如转基因小鼠)中产生,所述转基因动物能够通过进行V-D-J重组和同种型转换而产生多种针对CLD18的人单克隆抗体同种型。这样的转基因动物还可以是如US 2003/0017534所公开的用于产生多克隆抗体的转基因兔。

[0209] 本发明抗体与CLD18抗原的结合可介导杀伤表达CLD18的细胞(如肿瘤细胞),例如通过激活补体系统来介导。对表达CLD18的细胞的杀伤可通过一种或多种以下机制发生:表达CLD18的细胞的补体依赖性细胞毒性(CDC);表达CLD18的细胞的凋亡;表达CLD18的细胞的效应细胞吞噬作用;或者表达CLD18的细胞的效应细胞抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0210] 为了更易于理解本发明,首先定义一些术语。其他定义在详述全文中公开。

[0211] 术语定义

[0212] 术语“CLD18”指蛋白-18,并包括细胞天然表达的或转染了CLD18基因的细胞所表达的任何CLD18的变体(包括CLD18A1和CLD18A2)、构象、同工型(isoform)和种间同源物(species homologs)。优选地,“CLD18”指人CLD18,特别是CLD18A2(SEQ ID NO:1、2)和/或CLD18A1(SEQ ID NO:7、8),更优选CLD18A2。

[0213] 术语“CLD18A1”包括细胞天然表达的或转染了CLD18A1基因的细胞所表达的任何人CLD18A1的翻译后修饰变体、同工型和种间同源物。

[0214] 术语“CLD18A2”包括细胞天然表达的或转染了CLD18A2基因的细胞所表达的任何人CLD18A2的翻译后修饰变体、同工型和种间同源物。

[0215] 术语“CLD18变体”应包括(i) CLD18剪接变体,(ii) CLD18翻译后修饰变体,特别是包括N糖基化状态不同的变体,(iii) CLD18构象变体,特别是包括CLD18-构象-1、CLD18-构象-2和CLD18-构象-3,(iv) 位于胞间紧密连接处的游离CLD18和同型/异型相关联变体,(v) CLD18癌症相关变体和CLD18非癌症相关变体。

[0216] 术语“膜筏(raft)”指位于细胞质膜外小叶区中的富含鞘脂和胆固醇的膜微结构域。某些蛋白质结合到这些结构域中的能力及其形成“聚集体”或“病灶聚集体”的能力可影响该蛋白质的功能。例如,CLD18分子在结合本发明抗体后迁移到这些结构中,这在质膜中产生高密度的CLD18抗原-抗体复合物。这些高密度的CLD18抗原-抗体复合物能在CDC过程中有效活化补体系统。

[0217] 术语“构象”和“拓扑”描述整合的膜分子如何定位在细胞表面的膜中,特别地,其哪个区域在胞外并因而适合结合抗体。例如,CLD18可以三种不同构象存在,这很可能取决于它是否以同聚体或异聚体为优势,或者它是整合在超分子紧密连接结构中还是“游离的”。这些不同的状态导致不同的表位适于结合抗体。

[0218] 根据本发明,术语“疾病”指任何病理状态,包括癌症,特别是本文所述的癌症形式。

[0219] “肿瘤”指一组异常的细胞或组织,它们通过快速、不受控制的细胞增殖来生长,并在起始该新生物生长的刺激停止后仍继续生长。肿瘤显示出部分或完全缺失结构的组织以

及与正常组织的功能协调,并通常形成可以为良性或恶性的独特组织块。

[0220] “转移”指癌细胞从其原始部位传播到身体的其他部位。转移的形成是非常复杂的过程,依赖于恶性细胞从原发肿瘤中脱离、侵袭胞外基质、透过内皮基底膜以进入体腔和血管以及其后由血转运后浸润靶器官。最后,新肿瘤在靶部位的生长依赖于血管发生。肿瘤转移经常甚至在切除原发肿瘤后发生,因为肿瘤细胞或组分可能残留并发展出转移潜力。在一个实施方案中,本发明的术语“转移”指“远端转移”,这是指远离原发肿瘤和局部淋巴结系统的转移。

[0221] 术语“治疗疾病”包括疾病或其症状的治疗、持续时间的缩短、改善、预防、延缓或抑制其发展或恶化,或者延缓其发作。

[0222] 根据本发明,样品可以是根据本发明可用的任何样品,特别是生物样品如组织样品(包括体液)和/或细胞样品,并可以常规方式获得,例如通过组织活检(包括钻孔活检)和通过收集血、支气管灌洗液、痰、尿、排泄物或其他体液来获得。根据本发明,术语“生物样品”还包括生物样品的级分。

[0223] 术语“抗体”指包含通过二硫键互联的至少两条重(H)链和两条轻(L)链或其抗原结合片段的糖蛋白。术语“抗体”还包括抗体(特别是本文所述抗体)的所有重组形式,例如在原核细胞中表达的抗体、未糖基化的抗体以及与抗原结合的抗体片段和下文所述的衍生物。每条重链由重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区组成。每条轻链由轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区组成。VH和VL区可进一步细分为称为互补性决定区(CDR)的高变区,它们散布在称为构架区(FR)的更保守区域中。每条VH和VL由三个CDR和四个FR组成,从氨基端至羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导该免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的多种细胞(如效应细胞)和经典补体系统的第一成分(C1q)。

[0224] 术语“人源化抗体”指具有基本来自非人物种免疫球蛋白的抗原结合位点的分子,其中所述分子其余的免疫球蛋白结构是基于人免疫球蛋白的结构和/或序列。所述抗原结合位点可包含融合到恒定结构域上的完整可变结构域,或者仅包含移植到可变结构域中适当构架区的互补性决定区(CDR)。抗原结合位点可以是野生型的,或者通过一个或多个氨基酸替换进行修饰,例如进行修饰以与人免疫球蛋白更为相近。某些形式的人源化抗体保留了全部CDR序列(例如含有来自小鼠抗体的全部六个CDR的人源化小鼠抗体)。其他形式具有一个或多个相对于原始抗体而言发生了改变的CDR。

[0225] 术语“嵌合抗体”指这样的抗体,其中每个重链和轻链氨基酸序列的一部分与来自特定物种的抗体中相应氨基酸序列同源,或者属于特定的类别,而该链的其余区段则与另一物种中的相应序列同源。一般地,轻链和重链的可变区均模拟来自一个哺乳动物物种的抗体的可变区,而恒定部分则与来自另一物种的抗体序列同源。这种嵌合形式的一个明显优点是可使用易于获得的B细胞或来自非人宿主生物的杂交瘤从目前已知的来源中方便地产生可变区,而与其组合的恒定区来自例如人细胞制备物。所述可变区具有易于制备的优点,并且特异性不受来源的影响,而由于恒定区为人类,因此该抗体在注射时引发人受试者免疫应答的可能性将比恒定区来自非人来源时更低。然而,定义不限于此具体实例。

[0226] 本文使用的术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“结合部位”)指抗体中保留特

异性结合抗原的能力的一个或多个片段。已经显示,抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段来实现。属于抗体的“抗原结合部分”所涵盖的结合片段的实例包括(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH结构域组成的一价片段;(ii) F(ab')₂片段,包含通过较链区处的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v) 由VH结构域组成的dAb片段(Ward等,(1989) Nature 341:544-546);(vi) 独立的互补性决定区(CDR),和(vii) 可任选地通过合成接头连接的两个或更多个独立的CDR的组合。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由单独的基因编码,但它们可使用重组方法通过合成接头连接在一起,所述接头使它们成为单个蛋白质链,其中VL和VH区配对形成一价分子(称为单链Fv(scFv),参阅如Bird等(1988) Science 242:423-426和Huston等(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。这样的单链抗体还旨在包括于术语抗体的“抗原结合部分”中。另一实例为包含以下部分的结合结构域免疫球蛋白融合蛋白:(i) 与免疫球蛋白较链区多肽融合的结合结构域多肽,(ii) 与该较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。所述结合结构域多肽可以是重链可变区或轻链可变区。所述结合结构域免疫球蛋白融合蛋白在US 2003/0118592和US 2003/0133939中有进一步描述。这些抗体片段使用本领域技术人员公知的常规技术获得,并以与完整抗体相同的方式筛选所述片段。

[0227] 术语“表位”指能够与抗体结合的蛋白质决定簇,其中术语“结合”在本文中优选指特异性结合。表位通常由分子的化学活性表面基团(如氨基酸或糖侧链)组成,并通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象表位与非构象表位的区别在于在变性剂存在下前者丧失结合,而后者则不然。

[0228] 本文使用的术语“不连续表位”指蛋白质抗原上由至少两个蛋白质一级序列中独立的区域组成的构象表位。

[0229] 术语“双特异性分子”旨在包括具有两种不同结合特异性的任何试剂,如蛋白质、肽或者蛋白质或肽复合物。例如,该分子可与(a) 细胞表面抗原,和(b) 效应细胞表面的Fc受体结合或相互作用。术语“多特异性分子”或“异种特异性分子”旨在包括具有多于两种不同结合特异性的任何试剂,如蛋白质、肽或者蛋白质或肽复合物。例如,例如,该分子可与(a) 细胞表面抗原,(b) 效应细胞表面的Fc受体,和(c) 至少一种其他组分结合或相互作用。因此,本发明包括但不限于针对CLD18并针对其他靶标(如效应细胞上的Fc受体)的双特异性、三特异性、四特异性和其他多特异性分子。术语“双特异性抗体”还包括双抗体。双抗体是二价双特异性抗体,其中VH和VL结构域在单个多肽链上表达,但使用的接头太短,以至于不允许同一链上的两个结构域配对,从而迫使结构域与另一链上的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点(参阅如Holliger, P., 等(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., 等(1994) Structure 2:1121-1123)。

[0230] 本发明还包括本文所述抗体的衍生物。术语“抗体衍生物”指抗体的任何修饰形式,例如抗体与另一试剂或抗体的缀合物。在如下情况下本文中使用的抗体“来自”特定生殖系序列:即如果抗体通过免疫动物或通过筛选免疫球蛋白基因文库而得自一系统,并且其中所选抗体的氨基酸序列与该生殖系免疫球蛋白基因所编码的氨基酸序列具有至少90%、更优选至少95%、甚至更优选至少96%、97%、98%或99%的同一性。通常,来自特定生殖系序列的抗体将与该生殖系免疫球蛋白基因所编码的氨基酸序列显示不多于10个氨基酸差

异,更优选不多于5个氨基酸差异,或者甚至更优选不多于4、3、2或1个氨基酸差异。

[0231] 本文使用的术语“异源抗体”指连接在一起的两个或更多个抗体、其衍生物或抗原结合区,其中至少两个具有不同的特异性。这些不同的特异性包括对效应细胞表面的Fc受体的结合特异性以及对靶细胞(如肿瘤细胞)上的抗原或表位的结合特异性。

[0232] 本文所述的抗体可以是人抗体。本文使用的术语“人抗体”旨在包括具有来自人生殖系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可包含不是由人生殖系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机诱变或定点诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。

[0233] 本文使用的术语“单克隆抗体”指单分子组成的抗体分子制备物。单克隆抗体显示对特定表位的单结合特异性和亲和性。在一个实施方案中,单克隆抗体通过杂交瘤产生,所述杂交瘤包括与永生细胞融合的得自非人动物(例如小鼠)的B细胞。

[0234] 本文使用的术语“重组抗体”包括通过重组手段制备、表达、产生或分离的所有抗体,例如(a)从免疫球蛋白基因为转基因或转染色体的动物(如小鼠)或由其制备的杂交瘤中分离的抗体,(b)从经转化以表达抗体的宿主细胞(如转染瘤)中分离的抗体,(c)从重组的组合抗体文库中分离的抗体,和(d)通过涉及将免疫球蛋白基因序列剪接成DNA序列的任何其他手段制备、表达、产生或分离的抗体。

[0235] 本文使用的术语“转染瘤”包括表达抗体的重组真核宿主细胞,例如CHO细胞、NS/O细胞、HEK293细胞、HEK293T细胞、植物细胞或真菌(包括酵母)细胞。

[0236] 本文使用的术语“异源抗体”就产生这种抗体的转基因生物进行定义。该术语指这样的抗体,其氨基酸序列或编码核酸序列对应于不包括该转基因生物的生物,并且通常来自与该转基因生物不同的物种。

[0237] 本文使用的术语“异源杂合抗体(heterohybrid antibody)”指具有生物来源不同的轻链和重链的抗体。例如,具有与小鼠轻链连接的人重链的抗体是异源杂合抗体。

[0238] 本文所述抗体优选是分离的。本文使用的术语“分离的抗体”旨在指基本不含抗原特异性不同之其他抗体的抗体(例如,特异性结合CLD18的分离抗体基本不含特异性结合除CLD18以外抗原的抗体)。然而,与人CLD18的表位、同工型或变体特异性结合的分离的抗体可与其他相关抗原(如来自其他物种的抗原,如CLD18种间同源物)具有交叉反应性。此外,分离的抗体可基本不含其他细胞材料和/或化学物质。在本发明的一个实施方案中,“分离的”单克隆抗体的组合指具有不同特异性并组合在明确确定的组合物中的抗体。

[0239] 根据本发明,术语“结合”优选指“特异性结合”。本文使用的术语“特异性结合”指与预定抗原结合的抗体。通常,抗体结合的亲和力对应于约 1×10^{-7} M或更小的 K_D ,并且与预定抗原结合的亲和力所对应的 K_D 比其结合除该预定抗原以外的非特异性抗原(如BSA、酪蛋白)或密切相关抗原的亲和力低至少两个数量级。

[0240] 本文使用的术语“ K_D ”(M)旨在指特定的抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。

[0241] 本文使用的术语“同种型”指重链恒定区基因所编码的抗体类别(如IgM或IgG1)。

[0242] 本文使用的术语“同种型转换”指抗体的类别或同种型由一个Ig类别变成另一Ig类别的现象。

[0243] 应用于某对象时,本文使用的术语“天然存在的”指该对象可见于自然界这一事实。例如,存在于可从自然界来源分离的生物(包括病毒)中,并且在实验室中未有意进行人

工修饰的多肽或多核苷酸序列是天然存在的。

[0244] 本文使用的术语“重排”指重链或轻链免疫球蛋白基因座的构型，其中V区段在编码基本完整VH或VL结构域的构象中分别位于紧邻D-J或J区段的位置。重排的免疫球蛋白(抗体)基因座可通过与生殖系DNA的比较来鉴定，重排的基因座将具有至少一个重组的七聚体/九聚体同源性元件。

[0245] 涉及V区段时，本文使用的术语“未重排的”或“生殖系构型”指V区段未重组为与D或J区段紧邻的构象。

[0246] 本文使用的术语“核酸分子”旨在包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的，但优选为双链DNA。

[0247] 本发明所述的核酸优选是分离的。根据本发明，术语“分离的核酸”指该核酸是(i)在体外扩增的，例如通过聚合酶链式反应(PCR)扩增，(ii)通过克隆重组产生的，(iii)纯化的，例如通过酶切和凝胶电泳分级分离，或者(iv)合成的，例如通过化学合成。分离的核酸是可通过重组DNA技术操作的核酸。

[0248] 根据本发明，核酸单独存在或与其他核酸组合存在，所述其他核酸可以是同源或异源的。在一些优选的实施方案中，核酸与表达控制序列功能性连接，所述表达控制序列对于所述核酸可以是同源或异源的。术语“同源”指还天然地与表达控制序列功能性连接的核酸，术语“异源”指核酸不是天然地与该表达控制序列连接。

[0249] 如果表达RNA和/或蛋白质或肽的核酸与表达控制序列以所述核酸的表达或转录处在所述表达控制序列的控制或影响之下的方式彼此共价连接，则它们彼此“功能性”连接。如果该核酸待翻译成功能性蛋白质，而其带有与编码序列功能性连接的表达控制序列，所述表达控制序列的诱导引起所述核酸的转录，而不导致编码序列中的移码或导致所述序列不能翻译成所需蛋白质或肽。

[0250] 根据本发明，术语“表达控制序列”包括启动子、核糖体结合位点、增强子和调节基因转录或mRNA翻译的其他控制元件。在本发明的一些具体实施方案中，所述表达控制序列可受到调节。表达控制序列的确切结构可根据物种或细胞类型的功能而变化，但通常包含分别参与转录和翻译起始的5'非转录序列和5'及3'非翻译序列，例如TATA盒、加帽序列、CAAT序列等。更具体地，5'非转录表达控制序列包含启动子区，启动子区包含用于转录控制功能性连接核酸的启动子序列。表达控制序列还可包括增强子序列或上游活化子序列。

[0251] 根据本发明，术语“启动子”或“启动子区”指这样的核酸序列：其位于所表达核酸序列的上游(5')，并通过提供RNA聚合酶的识别和结合位点来控制该序列的表达。“启动子区”可包括用于参与基因转录调节的其他因子的其他识别和结合位点。启动子可控制原核或真核基因的转录。此外，启动子可以为“诱导型”，可应答于诱导物而起始转录，或者如果转录不受诱导物的控制则可以为“组成型”。如果诱导剂不存在，则诱导型启动子控制下的基因不表达，或表达程度很低。存在诱导物时，该基因开始转录，或者转录水平提高。一般而言，这通过特异性转录因子的结合来介导。

[0252] 本发明优选的启动子包括用于SP6、T3和T7聚合酶的启动子、人U6RNA启动子、CMV启动子及其人工杂合启动子(如CMV)，其中启动子的某部分与其他细胞蛋白(如人GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶)基因启动子的某部分融合，并包含或不包含额外的内含子。

[0253] 根据本发明，术语“表达”以其最普遍的意义使用，包括产生RNA或者RNA和蛋白质/

肽。还包括核酸的部分表达。此外,表达可瞬时进行或稳定进行。

[0254] 在一个优选的实施方案中,本发明的核酸分子存在于载体中,适当时还带有控制该核酸表达的启动子。术语“载体”在本文中以其最普遍的意义使用,包括用于核酸的任何中间载体,所述载体使得所述核酸能够例如引入原核和/或真核细胞中,并且适当时整合进基因组。这类载体优选在该细胞中复制和/或表达。本文使用的术语“质粒”一般指能独立于染色体DNA进行复制的染色体外的遗传物质,通常为环状DNA双链体。

[0255] 就用于表达抗体的载体而言,抗体重链及轻链存在于不同载体中的载体类型和重链及轻链存在于同一载体中的载体类型均可使用。

[0256] 本文就特定核酸和氨基酸序列(如序列表中所示)而言提供的教导应理解为还涉及对所述特定序列的修饰,所述修饰产生与所述特定序列功能等价的序列,例如显示与该特定氨基酸序列相同或相似的特性的氨基酸序列,以及编码显示与该特定核酸序列所编码氨基酸序列相同或相似的特性的氨基酸序列的核酸序列。一个重要的特性是保留抗体与其靶标的结合,或者维持抗体的效应子功能。优选地,就特定序列而言进行了修饰的序列在替换抗体中的该特定序列时保留所述抗体与CLD18的结合,并优选保留所述抗体如本文所述的功能,例如CDC介导的裂解作用或ADCC介导的裂解作用。

[0257] 本领域技术人员会理解,特别是可以修饰CDR、高变区和可变区的序列而不丧失结合CLD18的能力。例如,CDR区可以与本文所述区域相同或高度同源。“高度同源”认为是在CDR中产生1至5、优选1至4例如1至3或1或2个替换。此外,高变区和可变区可被修饰,从而与本文具体公开的区域显示显著的同源性。

[0258] 应该理解,本文所述的特定核酸还包括为了优化特定宿主细胞或生物中的密码子使用而进行了修饰的核酸。生物之间密码子使用的差异可引起多种关于异源基因表达的问题。通过改变原始序列中的一个或多个核苷酸而进行密码子优化可在待表达所述核酸的同源或异源宿主中引起核酸表达的优化,特别是翻译效率的优化。例如,如果需根据本发明使用来自人并编码抗体恒定区和/或构架区的核酸,例如用于制备嵌合或人源化抗体,则为了优化密码子使用而修饰所述核酸可能是优选的,特别是在如果所述核酸(任选地与异源核酸如来自其他本文所述生物的核酸融合)需在不同于人的其他生物(如小鼠或仓鼠)细胞中表达的情况下。例如,分别编码人轻链和重链恒定区的核酸序列(如SEQ ID NO:40和45的序列)可经修饰,以包含一个或多个、优选至少1、2、3、4、5、10、15、20个并优选多达10、15、20、25、30、50、70或100个或更多核苷酸替换,所述替换引起密码子使用的优化,但不引起氨基酸序列的改变。这样的核苷酸替换优选指分别将SEQ ID NO:40和45中的核苷酸替换为不引起所编码氨基酸序列改变的经修饰的对应物,所述核苷酸分别选自下文SEQ ID NO:40和45的比对中所述的替换;或者指分别编码人轻链和重链恒定区的其他核酸序列中相应位置的相应替换。优选地,在编码人轻链和重链恒定区的核酸序列中分别实现下文SEQ ID NO:40和45的比对中所示的全部替换,所述替换使用不引起所编码氨基酸序列改变的经修饰对应物。

[0259] SEQ ID NO:40与SEQ ID NO:147的比对:

```

CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT 60
||||||| ||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
CGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCC 60

GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG 120
||| ||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
GGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG 120

TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGAC 180
||||||| ||||| ||| || ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGAC 180

AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG 240
||||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCCTGAGCAAGGCCGACTACGAG 240

AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG 300
|| ||||| || ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
AAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG 300

AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG 324
||||||| ||||| |||
AGCTTCAACAGGGGCGAGTGCTAG 324

```

[0260]

[0261] SEQ ID NO:45与SEQ ID NO:149的比对:

[0262]

```

GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC   60
||||| | ||||||||| ||| | ||||||||| || ||||||||| ||
GGCCCAAGCGTGTTCGCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCCAGCGGCGGCACAGCCGCC   60

CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGA ACTCAGGC   120
||||||||||| ||||||||||| || ||||| || ||||| ||
CTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGA   120

GCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC   180
||||||| ||||||||||| || || || || || || || || || || || || ||
GCCCTGACCTCCGGCGTGACACACCTTCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGC   180

CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC   240
|| ||||||||| ||||||||| ||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||
CTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC   240

GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG TGAC   300
||||| ||||||||||| ||||||||| || ||||||||| || ||||
GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGAGGCCCAAGAGCTGCGAC   300

AAA ACTCACACATGCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC   360
|| | ||||| ||||| || ||||||||| || || || || ||||| ||||| || |||
AAGACCACACCTGCCCCCCTGCCCAGCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCC   360

CTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC   420
|| ||||||||| || ||||||||||| ||||| | ||||||| ||||| || |||
CTGTTCCCCC CAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGC   420

GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC   480
||||||||||| ||||||||| ||||| ||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC   480

```

[0263]

```

GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT 540
||||| ||||| ||||| | ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
GTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGG 540

GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC 600
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGC 600

AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG 660
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
AAGGTCTCCAACAAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGC 660

CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC 720
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
CAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC 720

CAGGTTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG 780
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
CAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG 780

GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC 840
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
GAGAGCAACGGCCAGCCCAGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGAC 840

GGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC 900
||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
GGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAAC 900

GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC 960
|| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
GTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTG 960

TCCCTGTCTCCGGGTAAATGA 981
|||| |||| |||| |
AGCCTGAGCCCCGGCAAGTAG 981

```

[0264] 此外,根据本发明,可能需要修饰本文所述氨基酸序列,特别是人重链恒定区的序列,以使该序列适用于所期望的同种异型,例如可见于白种人中的同种异型。这样的修饰优选选自以下SEQ ID NO:46中的氨基酸替换,或者其他入重链恒定区中相应位置的替换:K93R、D235E和L237M。优选地,所有这些修饰均包含在人重链恒定区的氨基酸序列中。

[0265] 根据本发明,术语“相应位置”指两核酸或蛋白质序列的序列比对中彼此对应的核苷酸或氨基酸残基。

[0266] 优选地,本文所述特定核酸序列与对所述特定核酸序列进行了修饰的核酸序列之间的同一性至少为70%,优选至少75%,更优选至少80%,甚至更优选至少90%,或者最优选至少95%、96%、97%、98%或99%。优选地,两序列能够彼此杂交并形成稳定的双链体,所述杂交优选在允许多核苷酸特异性杂交的条件(严格条件)下进行。严格条件描述于例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,J.Sambrook等编辑,第二版,Cold Spring

Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 或者 Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel 等编辑, John Wiley & Sons, Inc., New York, 其指例如在 65°C 下在杂交缓冲液 (3.5×SSC、0.02% Ficoll、0.02% 聚乙烯吡咯烷酮、0.02% 牛血清白蛋白、2.5mM NaH₂PO₄ (pH 7)、0.5% SDS、2mM EDTA) 中杂交。SSC 为 0.15M 氯化钠/0.15M 柠檬酸钠, pH 7。杂交后, 洗涤已转移有 DNA 的膜, 例如室温下在 2×SSC 中洗涤, 接着在高达 68°C 下在 0.1-0.5×SSC/0.1×SDS 中洗涤。

[0267] 优选地, 本文所述特定氨基酸序列与对所述特定氨基酸序列进行了修饰的氨基酸序列之间 (例如显示显著同一性的氨基酸序列之间) 的相似性 (优选同一性) 至少为 70%, 优选至少 80%, 甚至更优选至少 90%, 或者最优选至少 95%、96%、97%、98% 或 99%。

[0268] 所有上述修饰序列均在本发明的范围之内。

[0269] “序列相似性”指相同或显示保守性氨基酸替换的氨基酸的百分比。两多肽或核酸序列之间的“序列同一性”指所述序列间相同的氨基酸或核苷酸的百分比。

[0270] “百分比同一性”在最佳比对之后获得, 这一百分比完全是统计学意义上的, 两序列之间的差异随机分布在其全长上。两核苷酸或氨基酸序列之间的序列比较通过在对其进行最佳比对后比较其序列来常规地进行, 所述比较通过区段或“比较窗”来进行, 以鉴定和比较序列相似的局部区域。除了手工产生以外, 用于比较的序列最佳比对还可通过以下手段产生: Smith 和 Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482 的局部同源性算法, Needleman 和 Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443 的局部同源性算法, Pearson 和 Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444 的相似性检索法或者使用这些算法的计算机程序 (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N 和 TFASTA, 在威斯康辛遗传软件包中, 遗传计算组, 575 Science Drive, Madison, Wis.)。

[0271] 通过以下方法计算百分比同一性: 测定进行比较的两序列之间相同的位置数, 用该数除以进行比较的位置数, 用结果乘以 100, 从而得到这两个序列之间的百分比同一性。

[0272] “保守性替换”可以基于如所涉及残基在极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性质方面的相似性来进行。例如, (a) 非极性 (疏水) 氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸; (b) 极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺; (c) 带正电 (碱性) 氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸; (d) 带负电 (酸性) 氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。替换一般可在 (a) - (d) 组内进行。此外, 甘氨酸和脯氨酸可基于其破坏 [α] 螺旋的能力而彼此替换。可以在下列组中进行一些优选的替换: (i) S 和 T; (ii) P 和 G; 以及 (iii) A、V、L 和 I。在已知的遗传密码以及重组和合成 DNA 技术的条件下, 技术人员可容易地构建编码保守性氨基酸变体的 DNA。

[0273] 本发明包括在 Fc 区中进行了修改以改变该抗体功能或药代动力学特性的抗体。这样的修改可引起 C1q 结合和 CDC 的降低或提高, 或者 Fc γ R 结合和 ADCC 的降低或提高。例如, 可以在重链恒定区的一个或多个氨基酸残基中进行替换, 从而与修饰抗体相比引起效应子功能的改变同时保留结合抗原的能力, 参阅 US 5,624,821 和 US 5,648,260。

[0274] 可以修饰 Ig 恒定结构域或 Ig 样恒定结构域的补救受体表位以使该分子不包含完整的 CH₂ 结构域或完整的 Ig Fc 区, 从而提高抗体的体内半衰期, 参阅 US 6,121,022 和 US 6,194,551。还可以通过在 Fc 区中产生突变来提高体内半衰期, 例如用苏氨酸替换 252 位的亮氨酸、用苏氨酸替换 254 位的丝氨酸或者用苏氨酸替换 256 位的苯丙氨酸, 参阅 US 6,277,

375。

[0275] 此外,可以改变抗体的糖基化模式,以改变该抗体的效应子功能。例如,可以在不加入通常附着在Fc区297位Asn上的岩藻糖的转染瘤中表达抗体,以增强该Fc区对Fc受体的亲和力,这继而将引起NK细胞存在下该抗体ADCC的提高,参阅Shield等(2002) JBC, 277: 26733。此外,可以改变糖基化以改变CDC。

[0276] 或者,在另一实施方案中,在全部或部分抗CLD18抗体编码序列中随机引入突变,例如通过饱和诱变引入,可针对结合活性对得到的经修饰抗CLD18抗体进行筛选。

[0277] 本文使用的术语“重组宿主细胞”(或简称为“宿主细胞”)旨在指其中引入了重组表达载体的细胞。应该理解,这样的术语不仅旨在指特定的受试者细胞,而且指这些细胞的后代。在后续世代中由于突变或环境影响而可能发生某些改变,这些后代事实上可能不与亲本细胞相同,但仍包括在本文使用的术语“宿主细胞”的范围内。例如,重组宿主细胞包括转染瘤,如CHO细胞,NS/O细胞和淋巴细胞。

[0278] 本文使用的术语“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人灵长类、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0279] 术语“转基因动物”指这样的动物:其基因组中包含一个或多个转基因(优选重链和/或轻链转基因)或者转染色体(整合或未整合进该动物的天然基因组DNA),并且优选能够表达该转基因。例如,转基因小鼠可具有人轻链转基因以及人重链转基因或人重链转染色体,从而所述小鼠在用CLD18抗原和/或表达CLD18的细胞进行免疫时产生人抗CLD18抗体。所述人重链转基因可整合进该小鼠的染色体DNA中,像转基因小鼠的情况那样,例如HuMAb小鼠如HCo7或HCo12小鼠,或者所述人重链转基因可以在染色体外维持,像W0 02/43478所述转染色体(如KM)小鼠的情况那样。这样的转基因和转染色体小鼠可能能够通过进行V-D-J重组和同种型转换而产生针对CLD18的多种人单克隆抗体同种型(如IgG、IgA和/或IgE)。

[0280] mAb的作用机制

[0281] 尽管下文提供了关于本发明抗体疗效背后的机制方面的一些考虑,但这不应认为是以任何方式限制本发明。

[0282] 本文所述抗体优选与免疫系统的组分相互作用,优选通过ADCC或CDC发生。本发明的抗体还可用于靶向载荷(如放射性同位素、药物或毒素)以直接杀伤肿瘤细胞,或者可与常规化学治疗剂协同使用,通过补充性作用机制攻击肿瘤,所述机制可包括由于化学治疗对T淋巴细胞的细胞毒性副作用而受损的抗肿瘤免疫应答。

[0283] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)。ADCC描述本文所述效应细胞特别是淋巴细胞的细胞杀伤能力,这优选地需要靶细胞被抗体标记。

[0284] ADCC优选在抗体结合肿瘤细胞上的抗原并且抗体Fc结构域结合免疫效应细胞表面的Fc受体(FcR)时发生。已经鉴定了若干Fc受体家族,特定的细胞群特征性地表达确定的Fc受体。ADCC可以看作是直接诱导不同程度的直接肿瘤破坏的机制,所述破坏引起抗原呈递并诱导肿瘤指向性T细胞应答。优选地,ADCC的体内诱导将引起指向肿瘤的T细胞应答和来自宿主的抗体应答。

[0285] 补体依赖性细胞毒性(Complement-dependent cytotoxicity)。CDC是抗体指导的另一细胞杀伤方法。对于补体活化,IgM是最有效的同种型。IgG1和IgG3在通过经典补体活化途径指导CDC方面也都非常有效。优选地,在这一级联中,抗原-抗体复合物的形成导致紧邻参与抗体分子(例如IgG分子) C_{H2} 结构域的多个C1q结合位点暴露出来(C1q是补体C1的三种亚组分之一)。优选地,暴露的C1q结合位点将先前低亲和力的C1q-IgG相互作用转变成高亲和力相互作用,这触发了包括一系列其他补体蛋白的级联,并引起效应细胞趋化/活化剂C3a和C5a的蛋白水解释放。优选地,该补体级联最终形成膜攻击复合物,它在细胞膜中产生孔,有利于水和溶质自由穿行于细胞内外。

[0286] 抗体的产生

[0287] 本发明的抗体可通过多种技术产生,包括常规单克隆抗体法,例如Kohler和Milstein,Nature 256:495(1975)的标准体细胞杂交技术。尽管原则上优选体细胞杂交方案,但也可以利用产生单克隆抗体的其他技术,例如B淋巴细胞的病毒或致癌性转化,或者使用抗体基因文库的噬菌体展示技术。

[0288] 用于制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的优选动物系统是小鼠系统。小鼠中杂交瘤的产生是已经非常成熟的方案。分离用于融合的免疫脾细胞的免疫操作和技术为本领域所公知。融合配偶体(fusion partner)(如小鼠骨髓瘤细胞)和融合操作也是已知的。

[0289] 用于制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的其他动物系统为大鼠和兔系统(如Spieker-Polet等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.92:9348(1995)所述,还可参阅Rossi等,Am.J.Clin.Pathol.124:295(2005))。

[0290] 在另一优选的实施方案中,针对CLD18的人单克隆抗体可使用带有部分人免疫系统而不是小鼠系统的转基因或转染色体小鼠来产生。这些转基因和转染色体小鼠包括分别称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠,在本文中总称为“转基因小鼠”。可按照WO2004 035607中对CD20的详细描述在这些转基因小鼠中产生人抗体。

[0291] 产生单克隆抗体的另一策略是从产生确定策略抗体的淋巴细胞中直接分离编码抗体的基因,参阅如Babcock等,1996;A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single,isolated lymphocytes producing antibodies of defined strategy。重组抗体工程的细节还可参阅Welschof和Kraus,Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8和Benny K.C.Lo Antibody Engineering ISBN 1-58829-092-1。

[0292] 免疫

[0293] 为了产生针对CLD18的抗体,可以如所述用来自CLD18序列的载体缀合肽、重组表达的CLD18抗原或其片段的富集制备物和/或表达CLD18的细胞来免疫小鼠。或者,可以用编码全长人CLD18的DNA(如SEQ ID NO:1)或其片段(特别是SEQ ID NO:15、17和19的片段)免疫小鼠。在使用纯化或富集的CLD18抗原制备物进行的免疫不产生抗体的事件中,还可以用表达CLD18的细胞(如细胞系)免疫小鼠,以促进免疫应答。

[0294] 可以用通过尾静脉或眶后取血获得的血浆和血清样品在免疫方案的全程中监测免疫应答。可将抗CLD18免疫球蛋白效价足够的小鼠用于融合。可以在处死并摘除脾之前3天用表达CLD18的细胞腹腔内或静脉内对小鼠进行加强免疫,以提高分泌特异性抗体的杂交瘤的比率。产生生产单克隆抗体的杂交瘤

[0295] 为了产生生产CLD18单克隆抗体的杂交瘤,可从免疫小鼠中分离脾细胞和淋巴结细胞,并与适当的永生化细胞系(如小鼠骨髓瘤细胞系)融合。接着可针对抗原特异性抗体的产生筛选得到的杂交瘤。接着可以通过ELISA对单个孔筛选分泌抗体的杂交瘤。通过使用CLD18表达细胞进行的免疫荧光和FACS分析,可以鉴定对CLD18具有特异性的抗体。可将分泌该抗体的杂交瘤重新铺板,再次筛选,并且如果抗CLD18单克隆抗体仍为阳性则可以通过有限稀释进行亚克隆。接着可以体外培养稳定的亚克隆,以在组织培养基中产生抗体用于表征。

[0296] 产生生产单克隆抗体的转染瘤

[0297] 本发明的抗体还可以在宿主细胞转染瘤中产生,例如使用本领域熟知的重组DNA技术与基因转染技术的组合来进行(Morrison,S.(1985)Science 229:1202)。

[0298] 例如,在一个实施方案中,可将目的基因(如抗体基因)连接进表达载体如真核表达质粒中,例如通过WO 87/04462、WO 89/01036和EP 338 841中所述GS基因表达系统或本领域熟知的其他表达系统来进行。可将带有所克隆抗体基因的纯化质粒引入真核宿主细胞中,例如CHO细胞、NS/0细胞、HEK293T细胞或HEK293细胞,或者其他真核细胞,如来自植物的细胞、真菌或酵母细胞。用于引入这些基因的方法可以是本领域已描述过的方法,如电穿孔、lipofectine、lipofectamine或其他。将这些抗体基因引入宿主细胞后,可以鉴定并选择表达该抗体的细胞。这些细胞代表其后可扩增其表达水平并扩大规模以生产抗体的转染瘤。重组抗体可从这些培养物上清液和/或细胞中分离和纯化。或者,克隆的抗体基因可以在其他表达系统中表达,包括原核细胞如微生物,例如大肠杆菌。此外,抗体也可以在非人转基因动物中产生,例如在绵羊和兔的乳中或在鸡蛋中产生,或者在转基因植物中产生,参阅如Verma,R.,等(1998)J.Immunol.Meth.216:165-181;Pollock,等(1999)J.Immunol.Meth.231:147-157以及Fischer,R.,等(1999)Biol.Chem.380:825-839。

[0299] 使用部分抗体序列表达完整抗体(即人源化和嵌合)

[0300] a) 嵌合

[0301] 用毒素或放射性同位素进行标记时,小鼠单克隆抗体可在人中用作治疗性抗体。未标记的小鼠抗体在重复应用时在人中具有高免疫原性,导致疗效降低。主要的免疫原性由重链恒定区介导。如果对各个抗体进行嵌合或人源化,则小鼠抗体在人的免疫原性可以降低或者完全避免。嵌合抗体是不同部分来自不同动物物种的抗体,例如具有来自小鼠抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的抗体。抗体的嵌合通过将小鼠抗体重链和轻链可变区与人重链和轻链恒定区连接在一起来实现(如Kraus等,Methods in Molecular Biology series,Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8所述)。在一个优选的实施方案中,嵌合抗体通过将人 κ 轻链恒定区与小鼠轻链可变区连接来产生。在另一优选的实施方案中,嵌合抗体可通过将人 λ 轻链恒定区与小鼠轻链可变区连接来产生。用于产生嵌合抗体的优选重链恒定区为IgG1、IgG3和IgG4。用于产生嵌合抗体的其他优选的重链恒定区为IgG2、IgA、IgD和IgM。

[0302] b) 人源化

[0303] 抗体主要通过位于六个重链及轻链互补性决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。因此,在单个抗体之间CDR中的氨基酸序列比CDR外的序列更为多样。由于CDR序列负责所述抗体-抗原相互作用,因此有可能通过构建表达载体来表达模拟特定天然存在

抗体的特性的重组抗体,所述表达载体包含来自所述特定天然存在抗体的CDR序列,其移植到来自具有不同特性的不同抗体的框架序列上(参阅如Riechmann,L.等(1998) *Nature* 332:323-327; Jones,P.等(1986) *Nature* 321:522-525以及Queen,C.等(1989) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:10029-10033)。这样的框架序列可得自包含生殖系抗体基因序列的公共DNA数据库。这些生殖系序列将不同于成熟的抗体基因序列,因为它们不包含完整装配的可变基因,该基因是在B细胞成熟过程中通过V(D)J连接形成的。生殖系基因序列还将在均匀穿过可变区的个别处不同于高亲和力次级抗体谱(secondary repertoire antibody)的序列。例如,体细胞突变在框架区1的氨基端部分和构架区4的羧基端部分中相对少见。此外,许多体细胞突变不显著改变抗体的结合特性。因此,为了重建具有与原始抗体相似的结合特性的完整重组抗体,没有必要获得特定抗体的完整DNA序列(参阅WO 99/45962)。跨越CDR区的部分重链和轻链序列对于该目的而言通常是足够的。所述部分序列用于确定那些生殖系可变,并连接对重组抗体可变基因有贡献的区段。接着使用生殖系序列填补该可变区中缺少的部分。重链和轻链前导序列在蛋白质成熟过程中被切割掉,对最终抗体的特性没有贡献。为了加入缺少的序列,可通过连接或PCR扩增将克隆的cDNA序列与合成寡核苷酸组合。或者,可以将完整的可变区合成为一组短的重叠寡核苷酸,并通过PCR扩增组合以产生完整的可变区克隆。这种方法具有一些优点,例如消除或包含特定的限制性位点,或者优化特定的密码子。

[0304] 使用来自杂交瘤的重链及轻链转录物的核苷酸序列来设计合成寡核苷酸的重叠组,以产生与天然序列的氨基酸编码容量相同的合成V序列。合成的重链和 κ 链序列可以三种方式不同于天然序列:破坏了重复核苷酸碱基串,以便于寡核苷酸合成和PCR扩增;根据Kozak规则掺入了最佳翻译起始位点(Kozak,1991, *J.Biol.Chem.* 266:19867-19870);以及改造得到翻译起始位点上游的HindIII位点。

[0305] 对于重链和轻链可变区而言,经优化的编码链及相应非编码链的序列在相应非编码寡核苷酸的大致中点处打断成约30-50个核苷酸。因此,对于每条链,可将所述寡核苷酸装配成为跨越150-400个核苷酸的区段的重叠双链。接着将该库用作模板产生约150-400个核苷酸的PCR扩增产物。通常将单个可变区寡核苷酸组分为两个库,它们各自扩增以产生两个重叠的PCR产物。接着通过PCR扩增来组合这些重叠产物,以形成完整的可变区。在PCR扩增中可能需要包括重链或轻链恒定区的重叠片段,以产生可容易地克隆进表达载体构建体的片段。

[0306] 接着将重建的嵌合或人源化重链及轻链可变区与克隆的启动子、前导序列、翻译起始序列、恒定区、3'非翻译序列、多腺苷酸化序列和转录终止序列组合,以形成表达载体构建体。接着可将重链及轻链表达构建体组合进单个载体,共转染、连续转染或分别转染进宿主细胞中,接着所述宿主细胞融合形成表达两种链的宿主细胞。下文描述了用于构建人IgG κ 表达载体的质粒。构建所述质粒使得PCR扩增的V重链及V κ 轻链cDNA序列可用于重建完整的重链及轻链小基因(minigene)。这些质粒可用于表达全人抗体或者嵌合IgG1 κ 或IgG4 κ 抗体。可以构建类似的质粒用于表达其他重链同种型,或者表达包含 λ 轻链的抗体。

[0307] 因此,在本发明的另一方面中,使用本发明抗CLD18抗体的结构特征来产生结构上相关的人源化抗CLD18抗体,所述人源化抗体保留至少一种本发明抗体的功能特性,如结合CLD18。更具体地,可通过重组方式将小鼠单克隆抗体的一个或多个CDR区与已知的人框架

区和CDR组合,以产生本发明另外的经重组改造的人源化抗CLD18抗体。

[0308] 与抗原表达细胞结合

[0309] 抗体结合CLD18的能力可使用标准结合测定进行测定,例如实施例中公开的测定(如ELISA、Western印迹、免疫荧光和流式细胞术)。

[0310] 对抗体结合的特征

[0311] 为了纯化抗CLD18抗体,可以在2升离心瓶中培养选定的杂交瘤,以纯化单克隆抗体。或者,可以在基于透析的生物反应器中产生抗CLD18抗体。可以过滤上清液并在必要时进行浓缩,其后用蛋白G-琼脂糖或蛋白A-琼脂糖进行亲和层析。可通过凝胶电泳和高效液相色谱检查洗脱的IgG以确保纯度。缓冲液可交换成PBS,并使用1.43的消光系数通过OD280来测定浓度。可将单克隆抗体分成等分试样并保存于-80℃。

[0312] 为了确定选定的抗CLD18单克隆抗体是否结合独特的表位,可以使用定点诱变或多点定向诱变。

[0313] 确定同种型

[0314] 为了确定所纯化抗体的同种型,可以使用多种商品试剂盒(如Zymed、Roche Diagnostics)进行同种型ELISA。可使用抗小鼠IgG包被微量滴定板的孔。封闭后,在环境温度下使板与单克隆抗体或纯化的同种型对照反应2小时。接着使孔与小鼠IgG1、IgG2a、IgG2b或IgG3、IgA或小鼠IgM特异性过氧化物酶缀合探针反应。洗涤后,用ABTS底物(1mg/ml)使板显色并在405-650处分析OD。或者,可以如生产商所述使用IsoStrip小鼠单克隆抗体同种型试剂盒(Roche,目录号1493027)。

[0315] 流式细胞术分析

[0316] 为了证明免疫小鼠的血清中存在抗CLD18抗体或者证明单克隆抗体结合表达CLD18的活细胞,可以使用流式细胞术。可将天然表达或在转染CLD18后表达的细胞系以及缺乏CLD18表达的阴性对照(在标准生长条件下培养)与杂交瘤上清液中含1%FBS的PBS中多种浓度的单克隆抗体混合,并可在4℃下孵育30分钟。洗涤后,可在与第一抗体染色相同的条件下使APC或Alexa647标记的抗IgG抗体与结合了CLD18的单克隆抗体结合。可通过使用FACS装置的流式细胞术分析样品,其中使用光散射和侧散射特性对单个活细胞设置门控。为了在单个测量中区分CLD18特异性单克隆抗体与非特异性结合物,可以使用共转染法。可以如上述对瞬时转染了编码CLD18和荧光标记的质粒的细胞进行染色。转染细胞可在与抗体染色细胞不同的荧光通道中检测到。由于大部分转染细胞同时表达两种转基因,因此CLD18特异性单克隆抗体优先与表达荧光标记的细胞结合,而非特异性抗体以相当的比率与未转染细胞结合。作为流式细胞术测定的补充或替代,可以使用利用荧光显微术的替代性测定。可以完全按上述染色细胞,并通过荧光显微术来检查细胞。

[0317] 如果特定贴壁细胞失去(通过例如细胞脱离)与临近细胞的细胞-细胞接触,则紧密连接蛋白通常被内化。可通过以下手段调整CLD18的细胞表面表达:a)调整培养条件,如按标准方式以更高的细胞密度进行培养;使用温和的脱离条件(如2mM EDTA/PBS或accutase酶)、在室温下处理以及添加内吞作用的抑制剂(如叠氮钠)或CLD18转录或翻译的激活剂,以及b)选择和克隆在细胞表面维持高水平CLD18的细胞,例如通过对转染细胞使用抗生素进行选择,通过免疫磁性或FACS细胞分选以及通过有限稀释克隆。

[0318] 免疫荧光显微术

[0319] 为了证明免疫小鼠的血清中存在抗CLD18抗体或者证明单克隆抗体结合表达CLD18的活细胞,可以使用免疫荧光显微术分析。例如,在标准生长条件下,在补充了10%胎牛血清(FCS)、2mM L-谷氨酸、100IU/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的DMEM/F12培养基中在室玻片(chamber slide)中培养自发表达或在转染CLD18后表达的细胞系以及缺乏CLD18表达的阴性对照。接着将细胞用甲醇或多聚甲醛固定,或者不作处理。接着在25 $^{\circ}$ C下使细胞与针对CLD18的单克隆抗体反应30分钟。洗涤后,可在相同条件下使细胞与Alexa555标记的抗小鼠IgG第二抗体(Molecular Probes)反应。接着通过荧光显微术检查细胞。

[0320] 当细胞用甲醇固定或多聚甲醛固定并用Triton X-100进行透化后,可观察细胞中的总CLD18水平。在活细胞和非透化的多聚甲醛固定细胞中,可以检查CLD18的表面定位。此外,可以通过用紧密连接标记如ZO-1共染色来分析CLD18对紧密连接的靶向。此外,可以检查抗体结合以及细胞膜中CLD18定位的效果。

[0321] Western印迹

[0322] 还可以通过Western印迹测试抗CLD18IgG与CLD18抗原的反应性。简言之,可以制备来自CLD18表达细胞的细胞提取物和适当的阴性对照,并进行十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后,将分开的抗原转移至硝酸纤维素膜,封闭并用待测试的单克隆抗体进行检测。可以使用抗小鼠IgG过氧化物酶检测IgG结合,并用ECL底物显色。

[0323] 免疫组化

[0324] 还可以按技术人员熟知的方式通过免疫组化来检测抗CLD18小鼠IgG与CLD18抗原的反应性,例如使用来自非癌组织或癌组织样品的多聚甲醛或丙酮固定冷冻切片或石蜡包埋组织切片,所述样品在常规手术过程中得自患者,或者得自接种了自主表达(如DAN-G、SNU-16或KATO-III)或在转染后表达(如HEK293)CLD18的细胞系的带有异种移植肿瘤的小鼠。为进行免疫染色,可以接种与CLD18反应的抗体,其后按照生产商的说明接种缀合了辣根过氧化物酶的山羊抗小鼠或山羊抗兔抗体(DAKO)。

[0325] 抗体在体外的吞噬及细胞杀伤活性

[0326] 除了特异性结合CLD18以外,还可以对抗CLD18抗体测试其介导吞噬和杀伤CLD18表达细胞的能力。单克隆抗体活性的体外测试将在体内模型测试之前提供初步筛选。

[0327] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC):

[0328] 简言之,可以通过Ficoll Hypaque密度离心随后裂解污染红细胞来纯化来自健康供体的多形核细胞(polymorphonuclear cell, PMN)、NK细胞、单核细胞、单个核细胞或其他效应细胞。可将经洗涤的效应细胞悬于补充了10%热灭活胎牛血清或5%热灭活人血清的RPMI中,并按多种效应细胞与靶细胞的比例与用 51 Cr标记的CLD18表达靶细胞混合。或者,可以用荧光增强配体(BATDA)标记靶细胞。可通过荧光计测量死细胞所释放的增强配体与铈形成的高荧光螯合物。另一种替代技术可利用以萤光素酶转染靶细胞。接着,加入的荧光黄仅可被活细胞氧化。接着可以多种浓度加入纯化的抗CLD18IgG。可使用无关人IgG作为阴性对照。测定可在37 $^{\circ}$ C进行4至20小时,取决于所使用的效应细胞类型。可通过测量培养物上清液中 51 Cr的释放或EuTDA螯合物的存在情况来测量样品的细胞裂解。或者,由荧光黄氧化所产生的发光可作为活细胞的度量。

[0329] 还可以多种组合测试抗CLD18单克隆抗体,以确定用多种单克隆抗体是否增强细胞裂解。

[0330] 补体依赖性细胞毒性 (CDC) :

[0331] 可以使用多种已知技术对单克隆抗CLD18抗体测试其介导CDC的能力。例如,可以使用技术人员已知的方式从血中获得补体血清。为了测定mAb的CDC活性,可以使用不同的方法。例如,可以测量⁵¹Cr释放,或者可以使用碘化丙锭 (PI) 排除测定来评估膜通透性的升高。简言之,可洗涤靶细胞并可在室温或37°C下将 5×10^5 个/ml与多种浓度的mAb孵育10-30分钟。接着可加入血清或血浆至终浓度为20% (体积/体积),接着在37°C下孵育细胞20-30分钟。可将来自每个样品的所有细胞均加入FACS管中的PI溶液中。接着可立即使用FACSArray通过流式细胞术分析来分析该混合物。在一种替代性测定中,可以对贴壁细胞测定CDC的诱导。在这种测定的一个实施方案中,在测定前24小时以 3×10^4 个细胞/孔将细胞接种进平底组织培养微量滴定板。第二天除去生长培养基,并一式三份将细胞与抗体一起孵育。为测定背景裂解和最大裂解,将对照细胞分别与生长培养基或含0.2%皂苷的生长培养基一起孵育。室温孵育20分钟后,除去上清液,并将DMEM中20% (体积/体积) 的人血浆或血清(预热至37°C)加入细胞,在37°C再孵育20分钟。将来自每个样品的所有细胞加入碘化丙锭溶液(10 μ g/ml)中。接着用含2.5 μ g/ml碘化丙锭的PBS替换上清液,并在520nm激发后使用Tecan Safire在600nm处测量荧光发射。特异性裂解百分比计算为:%特异性裂解=(样品荧光/背景荧光)/(最大裂解荧光-背景荧光) \times 100。

[0332] 通过单克隆抗体抑制细胞增殖:

[0333] 为了测试起始凋亡的能力,例如,可将单克隆抗CLD18抗体与CLD18阳性肿瘤细胞(如SNU-16、DAN-G、KATO-III)或转染了CLD18的肿瘤细胞在37°C孵育约20小时。可以收获细胞、用膜联蛋白-V结合缓冲液(BD biosciences)洗涤,并与缀合了FITC或APC的膜联蛋白V(BD biosciences)在暗处孵育15分钟。可将来自每个样品的所有细胞加入FACS管中的PI溶液(PBS中10 μ g/ml)中,并立即通过流式细胞术(如上述)进行评估。或者,可以用市售的试剂盒检测单克隆抗体的一般性细胞增殖抑制。DELTA细胞增殖试剂盒(Perkin-Elmer,目录号AD0200)是基于测量微孔板中增殖细胞的DNA合成过程中5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)掺入的非同位素免疫测定。使用铈标记的单克隆抗体来检测掺入的BrdU。为进行抗体检测,使用固定液固定细胞并变性DNA。洗去未结合抗体并加入DELTA诱导物,以将铈离子从标记抗体上解离到溶液中,它们在溶液中与DELTA诱导物的组分形成高荧光螯合物。(在检测中使用时间分辨荧光术)测量的荧光与每个孔中细胞的DNA合成成比例。

[0334] 临床前研究

[0335] 还可以在体内模型(如接种了表达(如DAN-G、SNU-16或KATO-III)或在转染后表达(如HEK293)CLD18的细胞系的带有异种移植肿瘤的免疫缺陷小鼠)中测试与CLD18结合的单克隆抗体,以确定其控制表达CLD18的肿瘤细胞生长的效力。

[0336] 可以在将表达CLD18的肿瘤细胞异种移植进免疫受损小鼠或其他动物之后使用本发明抗体进行体内研究。可以对无肿瘤的小鼠施用抗体,其后注射肿瘤细胞,以测量该抗体预防肿瘤形成或肿瘤相关症状的效果。可以对带有肿瘤的小鼠施用抗体,以测定各个抗体降低肿瘤生长、转移或肿瘤相关症状的疗效。可将抗体应用与其他物质如细胞抑制药物、生长因子抑制剂、细胞周期阻断剂、血管发生抑制剂或其他抗体的应用相组合,以测定组合的协同效应和潜在毒性。为了分析本发明抗体介导的毒副作用,可用抗体或对照试剂接种动物,并彻底研究可能与CLD18抗体疗法相关的症状。体内应用CLD18抗体可能的副作用具体

包括对表达CLD18的组织(包括胃和肺)的毒性。在人和其他物种(如小鼠)中识别CLD18的抗体对于预测在人中应用单克隆CLD18抗体所介导的潜在副作用特别有用。

[0337] 表位作图

[0338] 可以如Glenn E.Morris在“Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology)”ISBN-089603-375-9中和Olwyn M.R.Westwood, Frank C.Hay在“Epitope Mapping: A Practical Approach”Practical Approach Series, 248中的详细描述进行本发明抗体所识别表位的作图。

[0339] I. 结合CLD18的双特异性/多特异性分子

[0340] 在本发明的另一实施方案中, 针对CLD18的抗体可被衍生化或与其他功能性分子(如其他肽或蛋白质, 如Fab' 片段)相连接, 以产生结合多个结合位点或靶表位的双特异性或多特异性分子。例如, 本发明的抗体可与一个或多个其他结合分子(如其他抗体、肽或结合模拟体)功能性连接(例如通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或其他方式连接)。

[0341] 因此, 本发明包括双特异性和多特异性分子, 其包含至少一种对CLD18的第一结合特异性和对第二靶表位的第二结合特异性。在本发明的一个具体实施方案中, 第二靶表位为Fc受体, 如人Fc- γ RI (CD64) 或人Fc- α 受体 (CD89), 或者为T细胞受体, 如CD3。因此, 本发明包括与表达Fc- γ R、Fc- α R或Fc- ϵ R的效应细胞(如单核细胞、巨噬细胞或多形核细胞(PMN))和表达CLD18的靶细胞均能反应的双特异性和多特异性分子。这些双特异性和多特异性分子可使表达CLD18的细胞靶向效应细胞, 并可触发Fc受体介导的效应细胞活性, 例如CLD18表达细胞的吞噬作用、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、细胞因子释放或超氧负离子的产生。

[0342] 除了抗Fc结合特异性和抗CLD18结合特异性以外, 本发明的双特异性和多特异性分子还可包括第三结合特异性。在一个实施方案中, 第三结合特异性为抗增强因子(EF)部分, 例如与涉及细胞毒活性的表面蛋白结合并由此提高针对靶细胞的免疫应答的分子。“抗增强因子部分”可以是抗体、功能性抗体片段或与给定分子(如抗原或受体)结合的配体, 由此导致增强Fc受体或靶细胞抗原中结合决定簇的效应。“抗增强因子部分”可与Fc受体或靶细胞抗原结合。或者, 所述抗增强因子部分可结合不同于第一和第二结合特异性所结合实体的实体。例如, 抗增强因子部分可结合细胞毒T细胞(如通过CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1或导致针对靶细胞的免疫应答提高的其他免疫细胞)。

[0343] 在一个实施方案中, 本发明的双特异性和多特异性分子包含作为结合特异性的至少一种抗体, 包括如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或单链Fv。该抗体还可以是轻链或重链二聚体或者任何其最小片段, 如Fv或Ladner等, US 4,946,778所述的单链构建体。所述抗体还可以是US2003/0118592和US 2003/0133939中公开的结合结构域免疫球蛋白融合蛋白。

[0344] 在一个实施方案中, 本发明的双特异性和多特异性抗体包含对效应细胞表面上存在的Fc- γ R或Fc- α R的结合特异性以及对靶细胞抗原(如CLD18)的另一结合特异性。

[0345] 在一个实施方案中, 对Fc受体的结合特异性由单克隆抗体提供, 所述抗体的结合不被人免疫球蛋白G(IgG)阻断。本文使用的术语“IgG受体”指位于1号染色体上的八个 γ 链基因中的任一个。这些基因编码共12种跨膜或可溶性受体同工型, 分为3个Fc- γ 受体类别: Fc- γ RI (CD64)、Fc- γ RII (CD32) 和Fc- γ RIII (CD16)。在一个优选的实施方案中, 所述Fc- γ 受体为人高亲和力Fc- γ RI。

[0346] 这些优选单克隆抗体的产生和表征由Fanger描述于WO 88/00052和US 4,954,617。这些抗体在不同于受体Fc- γ 结合位点的位点处与Fc- γ RI、Fc- γ RII或Fc- γ RIII的表位结合,因此其结合不被生理水平的IgG显著阻断。可用于本发明的特异性抗Fc- γ RI抗体为mAb22、mAb32、mAb44、mAb62和mAb197。在其他一些实施方案中,所述抗Fc- γ 受体抗体为单克隆抗体22的人源化形式(H22)。H22抗体的产生和表征描述于Graziano,R.F.等(1995)J.Immunol.155(10):4996-5002和WO 94/10332。产生H22抗体的细胞系于1992年11月4日以保藏号HA022CL1保藏于美国典型培养物保藏中心,登记号为CRL 11177。

[0347] 在另一些优选的实施方案中,对Fc受体的结合特异性由结合人IgA受体(如Fc- α 受体(Fc- α RI(CD89)))的抗体提供,其结合优选地不被人免疫球蛋白A(IgA)阻断。术语“IgA受体”旨在包括位于19号染色体上的一个 α 基因的基因产物(Fc- α RI)。已知该基因编码55至110kDa的若干替代性剪接的跨膜同工型。Fc- α RI(CD89)在单核细胞/巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞上组成型表达,但不在非效应细胞群中表达。Fc- α RI对IgA1和IgA2均具中等亲和力,这在接触细胞因子如G-CSF或GM-CSF后有所提高(Morton,H.C.等(1996)Critical Reviews in Immunology 16:423-440)。描述了在IgA配体结合结构域之外与Fc- α RI结合的四种Fc- α RI特异性单克隆抗体,鉴定为A3、A59、A62和A77(Monteiro,R.C.等(1992)J.Immunol.148:1764)。

[0348] Fc- α RI和Fc- γ RI是用于本发明的优选触发受体,因为它们(1)主要表达在免疫效应细胞上,如单核细胞、PMN、巨噬细胞和树突细胞;(2)以高水平表达(如5000-100000/细胞);(3)是细胞毒活性(如ADCC、吞噬作用)的介导者;(4)介导对靶向它们的抗原(包括自身抗原)增强的抗原呈递。

[0349] 在另一实施方案中,所述双特异性分子由具有互补性功能活性的两个本发明单克隆抗体组成,例如一个抗体主要通过诱导CDC来工作,另一抗体主要通过诱导凋亡来工作。

[0350] 本文使用的“效应细胞特异性抗体”指与效应细胞的Fc受体结合的抗体或功能性抗体片段。用于本发明的优选抗体在不结合内源免疫球蛋白的位点上与效应细胞Fc受体结合。

[0351] 本文使用的术语“效应细胞”指参与免疫应答的效应阶段而不是免疫应答的识别和活化阶段的免疫细胞。示例性免疫细胞包括骨髓或淋巴来源的细胞,如淋巴细胞,(如B细胞和T细胞,包括细胞裂解性T细胞(CTL)、杀伤细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、多形核细胞、粒细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞。一些效应细胞表达特定的Fc受体,并执行特定的免疫功能。在一些优选的实施方案中,效应细胞能诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC),例如嗜中性粒细胞能诱导ADCC。例如,表达FcR的单核细胞、巨噬细胞参与特异性杀伤靶细胞和将抗原呈递至免疫系统的其他组分,或者与呈递抗原的细胞结合。在其他一些实施方案中,效应细胞能吞噬靶抗原、靶细胞或微生物。特定FcR在效应细胞上的表达可受到体液因子如细胞因子的调节。例如,已发现干扰素 γ (IFN- γ)上调Fc- γ RI的表达。这种增强的表达提高了带有Fc- γ RI的细胞对靶标的细胞毒活性。效应细胞可吞噬或裂解靶抗原或靶细胞。

[0352] “靶细胞”应指本发明抗体能够靶向的受试者(如人或动物)中不想要的任何细胞。在一些优选的实施方案中,所述靶细胞为表达或过表达CLD18的细胞。表达CLD18的细胞一般包括肿瘤细胞。

[0353] 可以使用化学技术(参阅如D.M.Kranz等(1981)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:5807)、“多瘤(polydoma)”技术(参阅US 4,474,893)或重组DNA技术产生本发明的双特异性和多特异性分子。

[0354] 具体地,可以使用本领域已知的方法,通过缀合成分结合特异性(如抗FcR和抗CLD18结合特异性)来制备本发明的双特异性和多特异性分子。例如,可以分别产生双特异性和多特异性分子的每种结合特异性,然后彼此缀合。当结合特异性为蛋白质或肽时,可将多种偶联或交联剂用于共价缀合。交联剂的实例包括蛋白A、碳化二亚胺、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫代二(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻苯二马来酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-联硫基吡啶)丙酸盐(SPDP)和磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸盐(磺基-SMCC)(参阅如Karpovsky等(1984)J.Exp.Med.160:1686;Liu,MA等(1985)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:8648)。其他方法包括Paulus(Behring Ins.Mitt.(1985)No.78,118-132);Brennan等(Science(1985)229:81-83)和Glennie等(J.Immunol.(1987)139:2367-2375)所述的方法。优选的缀合剂为SATA和磺基-SMCC,均可得自Pierce Chemical Co.(Rockford,IL)。

[0355] 当结合特异性为抗体时,它们可通过两重链C端铰链区的巯基键合而发生缀合。在一个特别优选的实施方案中,在缀合前修饰铰链区以包含奇数个巯基残基,优选1个。

[0356] 或者,两种结合特异性可以均在同一载体中编码,并且在同一宿主细胞中表达并装配。这种方法在双特异性和多特异性分子为mAb×mAb、mAb×Fab、Fab×F(ab')₂或配体×Fab融合蛋白时特别有用。本发明的双特异性和多特异性分子(如双特异性分子)可以是单链分子,例如单链双特异性抗体、包含一个单链抗体和一个结合决定簇的单链双特异性分子或者包含两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性和多特异性分子还可以是单链分子或者可以包含至少两个单链分子。产生双特异性和多特异性分子的方法描述于例如US 5,260,203;US 5,455,030;US 4,881,175;US 5,132,405;US 5,091,513;US 5,476,786;US 5,013,653;US 5,258,498和US 5,482,858。

[0357] 双特异性和多特异性分子与其特异性靶标的结合可通过酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射性免疫测定(RIA)、FACS分析、生物测定(如生长抑制)或Western印迹测定来证实。这些测定中的每一种一般都通过使用对目的复合物具有特异性的带标记的试剂(如抗体)来检测特定目的蛋白质-抗体复合物的存在。例如,FcR-抗体复合物可使用如识别并特异性结合抗体-FcR复合物的酶联抗体或抗体片段来检测。或者,该复合物可使用多种其他免疫测定中的任一种来检测。例如,可对抗体进行放射性标记,并用于放射性免疫测定(RIA)(参阅如Weintraub,B.,Principles of Radioimmunoassays,Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques,The Endocrine Society,March,1986)。放射性同位素可通过诸如使用γ计数器或闪烁计数器的方法来检测,或者通过放射性自显影来检测。

[0358] II. 免疫缀合物

[0359] 在另一方面中,本发明的特征为缀合了治疗结构或药剂(如细胞毒素、药物(如免疫抑制剂)或放射性同位素)的抗CLD18抗体。这样的缀合物在本文中称为“免疫缀合物”。包含一个或多个细胞毒素的免疫缀合物称为“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒剂包括对细胞有害特别是杀伤细胞的任何药剂。实例包括紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根

碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙素、阿霉素、柔红霉素、二羟炭疽毒素二酮、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素及其类似物或同源物。

[0360] 用于形成本发明免疫缀合物的合适的治疗剂包括但不限于抗代谢物(如氨甲喋呤、6-巯嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶氮烯咪胺)、烷化剂(如氮芥、塞替派、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素C和顺二氯二胺铂(II)(DDP, 顺铂)、蒽环类(如柔红霉素(daunorubicin, 以前称为daunomycin)和阿霉素)、抗生素(如放线菌素D(以前称为放线菌素)、博来霉素、光辉霉素和氨曲霉素(AMC)以及抗有丝分裂剂(如长春新碱和长春碱)。在一个优选的实施方案中,所述治疗剂是细胞毒性剂或放射毒性剂。在另一个实施方案中,所述治疗剂为免疫抑制剂。在另一实施方案中,所述治疗剂为GM-CSF。在一个优选的实施方案中,所述治疗剂为阿霉素、顺铂、博来霉素、硫酸盐、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺或蓖麻毒素A。

[0361] 本发明的抗体还可与放射性同位素(如碘¹³¹、钷⁹⁰或铟¹¹¹)缀合,以产生用于治疗CLD18相关疾病如癌症的细胞毒性放射性药物。本发明的抗体缀合物可用于改变给定的生物应答,并且药物部分不应理解为仅限于经典的化学治疗剂。例如,药物部分可以是表达所需生物活性的蛋白质或多肽。这样的蛋白质可包括如酶活性毒素或其活性片段,例如相思豆毒素、蓖麻毒素A、假单胞菌外毒素或白喉毒素;蛋白质,如肿瘤坏死因子或干扰素- γ ;或者生物应答改变剂,例如淋巴因子、白介素-1("IL-1")、白介素-2("IL-2")、白介素-6("IL-6")、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子("GM-CSF")、粒细胞集落刺激因子("G-CSF")或其他生长因子。

[0362] 将这些治疗结构与抗体缀合的技术为本领域所熟知,参阅如Arnon等,"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld等编辑,243-56页(Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom等,"Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (第二版), Robinson等编辑,623-53页(Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe,"Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera等编辑,475-506页(1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin等编辑,303-16页(Academic Press 1985)以及Thorpe等,"The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58(1982)。

[0363] 在另一实施方案中,本发明的抗体附着在接头-螯合剂(如替坦异贝莫单抗(tiuxetan))上,其允许该抗体与放射性同位素缀合。

[0364] III. 药物组合物

[0365] 在另一方面中,本发明提供包含本发明抗体之一或其组合的组合物,例如药物组合物。可按照常规技术将所述药物组合物与可药用载体或稀释剂以及任何其他已知的辅剂和赋形剂配制在一起,例如按照Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第

十九版, Gennaro编辑, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995中公开的技术。在一个实施方案中, 所述组合物包含通过不同机制作用的多种(例如两种或更多种)分离的本发明抗体的组合, 例如将主要通过诱导CDC发挥作用的一种抗体与主要通过诱导凋亡发挥作用的另一抗体组合。

[0366] 本发明的药物组合物还可以在组合疗法中施用, 即与其他药剂组合。例如, 所述组合疗法可包括本发明的组合物以及至少一种抗炎剂或至少一种免疫抑制剂。在一个实施方案中, 这样的治疗剂包括一种或多种抗炎剂, 例如甾类药物或NSAID(非甾类抗炎药物, nonsteroidal anti-inflammatory drug)。优选的药剂包括如阿司匹林和其他水杨酸酯、Cox-2抑制剂例如罗非考昔(Vioxx)和塞来考昔(Celebrex)、NSAID类例如布洛芬(Motrin, Advil)、非诺洛芬(Nalfon)、萘普生(Naprosyn)、舒林酸(Clinoril)、双氯芬酸(Voltaren)、吡罗昔康(Feldene)、酮洛芬(Orudis)、二氟尼酸(Dolobid)、萘丁美酮(Relafen)、依托度酸(Lodine)、奥沙普秦(Daypro)和吲哚美辛(Indocin)。

[0367] 在另一实施方案中, 这样的治疗剂包括引起调节性T细胞清除或功能失活的药剂, 例如低剂量的环磷酰胺、抗CTLA4抗体、抗IL2或抗IL2受体抗体。

[0368] 在另一实施方案中, 这样的治疗剂包括一种或多种化学治疗剂, 例如紫杉醇衍生物、多烯紫杉醇(taxotere)、吉西他滨、5-氟尿嘧啶、阿霉素(Adriamycin)、顺铂(Platinol)、环磷酰胺(Cytoxan、Procytox、Neosar)。在另一个实施方案中, 本发明的抗体可与化学治疗剂组合施用, 所述化学治疗剂优选在患胃癌、食管癌、胰腺癌和肺癌的患者中显示疗效。

[0369] 在另一实施方案中, 本发明的抗体可与放射疗法和/或自体外周血干细胞或骨髓移植联合施用。

[0370] 在另一实施方案中, 本发明的抗体可与选自以下的一种或多种抗体组合施用: 抗CD25抗体、抗EPCAM抗体、抗EGFR、抗Her2/neu和抗CD40抗体。

[0371] 在另一实施方案中, 本发明的抗体可与抗C3b(i)抗体组合施用, 以增强补体活化。

[0372] 本文使用的“可药用载体”包括生理相容的任何及所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地, 所述载体适用于静脉内、肌肉、皮下、胃肠外、脊柱或表皮给药(如通过注射或输注)。取决于给药途径, 可将活性化合物(即抗体、双特异性和多特异性分子)包裹在一定材料中, 以保护化合物免受可能使该化合物失活的酸和其他天然条件的作用。

[0373] “可药用盐”指保留母体化合物的所期望生物活性而且不导致任何不想要的毒理学效应的盐(参阅如Berge, S.M., 等(1977) J.Pharm.Sci. 66:1-19)。

[0374] 这样的盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括来自无毒无机酸如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等的盐, 以及来自无毒有机酸如脂肪单羧酸和二羧酸、苯取代链烷酸、羟基烷酸、芳香酸、脂肪及芳香磺酸等的盐。碱加成盐包括来自碱土金属如钠、钾、镁、钙等的盐以及来自无毒有机胺如N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等的盐。

[0375] 本发明的组合物可通过本领域已知的多种方法施用。本领域技术人员会理解, 给药途径和/或模式将根据所期望的结果而变化。活性化合物可与保护该化合物不迅速释放的载体制备在一起, 例如控释制剂, 包括植入物、透皮贴剂和微胶囊递送系统。可以使用可

生物降解的生物相容性聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备这些制剂的方法为本领域技术人员所公知。参阅如Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson编辑, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0376] 为了通过某些给药途径施用本发明的化合物,可能必须用一定材料包裹化合物或与其共施用,以防止其失活。例如,化合物可在适当的载体如脂质体或稀释剂中施用于受试者。可药用稀释剂包括盐水和水性缓冲液。脂质体包括水包油包水CGF乳剂以及常规脂质体(Strejan等(1984) J. Neuroimmunol. 7:27)。

[0377] 可药用载体包括无菌水溶液或分散剂以及用于在临用时制备无菌注射液或分散剂的无菌粉剂。这些介质和试剂用于药物活性物质的用途为本领域公知。除了任何常规介质或药剂均与活性化合物相容以外,还考虑了它们在本发明药物组合物中的用途。补充性活性化合物也可掺入该组合物中。

[0378] 治疗性组合物通常必须是无菌的,并在生产和贮藏条件下稳定。该组合物可配制成溶液、微乳剂、脂质体或其他适用于高药物浓度的有序结构。载体可以是含有如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其适当的混合物的溶剂或分散介质。可以例如通过使用包衣(如卵磷脂)、通过维持所期望微粒大小(对于分散剂的情况)以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。在许多情况下,组合物中优选包含等渗剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇或者氯化钠。可以通过在组合物中包含延缓吸收的试剂(如单硬脂酸盐和明胶)来引起注射用组合物的延长吸收。

[0379] 无菌注射液可通过以所需量将活性化合物与所需上述成分中的一种或组合一起掺入适当的溶剂随后进行无菌微过滤来制备。

[0380] 一般通过将活性化合物掺入无菌载体来制备分散剂,所述无菌载体中含有碱性分散介质和上述其他所需成分。对于用于制备无菌注射液的无菌粉剂的情况,优选的制备方法为真空干燥和冷冻干燥(冻干),所述方法从之前已无菌过滤的溶液中获得活性成分加任何额外所期望成分的粉末。

[0381] 对给药方案进行调整以提供最佳的期望应答(如治疗应答)。例如,可以进行单次推注,随时间施用若干分开的剂量,或者可以根据治疗情况的紧急程度,按比例降低或提高剂量。特别有利的是将肠胃外组合物配制成剂量单位形式,以便于施用和实现剂量的均一性。本文使用的剂量单位形式指适于作为受治对象单一剂量的物理分开的单位;每个单位中含有与所需药用载体相关联的预定量的活性化合物,所述预定量为经计算产生所期望疗效的量。本发明剂量单位形式的规格由以下因素决定,并直接取决于以下因素:(a) 活性化合物的独特特征和意图实现的具体疗效,和(b) 调配用于治疗个体中敏感性状况的这些活性化合物的内在限制。

[0382] 可药用抗氧化剂的实例包括:(1) 水溶性抗氧化剂,例如维生素C、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;(2) 油溶性抗氧化剂,例如维生素C棕榈酸酯、丁羟茴醚(butylated hydroxyanisole, BHA)、丁羟甲苯(butylated hydroxytoluene, BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α 生育酚等;以及(3) 金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0383] 就治疗组合物而言,本发明的制剂包括适用于经口、经鼻、局部(topical)(包括口

腔和舌下)、直肠、阴道和/或肠胃外给药的制剂。所述制剂可以常规地以剂量单位形式存在,并可通过药学领域中任何已知方法来制备。可与载体材料组合以产生单个剂量形式的活性成分的量将根据受治的对象以及具体给药模式而变化。可与载体材料组合以产生单个剂量形式的活性成分的量通常将是产生疗效的组合物量。

[0384] 一般地,在总计100%中,这一量的范围将为0.01%至约99%活性成分,优选约0.1%至约70%,最优选约1%至约30%。

[0385] 适用于阴道给药的本发明制剂还包括含有本领域已知适用载体的阴道栓剂、卫生棉条、乳膏剂、凝胶剂、泥膏剂、泡沫剂或喷雾剂。用于局部或透皮施用本发明组合物的剂型包括粉剂、喷雾剂、软膏剂、泥膏剂、乳膏剂、洗剂、凝胶剂、溶液剂、贴剂和吸入剂。活性化合物可在无菌条件下与可药用载体以及可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[0386] 本文使用的术语“肠胃外给药”和“肠胃外施用”指非肠内和非局部给药的给药模式,通常是通过注射,包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、椎管内、硬膜外、胸骨内注射和输注。

[0387] 可用于本发明药物组合物的适当水性及非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其适当的混合物、植物油(如橄榄油)以及注射用有机酯(如油酸乙酯)。可通过如使用包衣材料(如卵磷脂)、通过维持期望的微粒大小(对于分散剂的情况)以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0388] 这些组合物还可含有辅剂,如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。通过灭菌操作和通过包含多种抗菌剂和抗真菌剂(如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等)均可防止存在微生物。还可以期望在组合物中包含等渗剂,如糖、氯化钠。此外,可以通过包含延缓吸收的药剂(如单硬脂酸铅和明胶)来实现注射用药物形式的延长吸收。

[0389] 在一个实施方案中,通过皮下注射施用结晶形式的本发明单克隆抗体,参阅Yang等(2003)PNAS,100(12):6934-6939。当本发明的组合物作为药物施用于人和动物时,它们可单独给药或作为药物组合物给药,所述药物组合物包含如0.01%至99.5%(更优选0.1至90%)的活性成分与可药用载体的组合。

[0390] 无论选择什么给药途径,可以适当水化形式使用的本发明组合物,和/或本发明的药物组合物均通过本领域技术人员已知的常规方法配制成可药用剂型。

[0391] 可以改变本发明药物组合物中活性成分的确切剂量水平,从而对具体的患者、组合物和给药模式获得有效实现理想的治疗应答而又对患者无毒的活性成分量。所选择的剂量水平将取决于多种药代动力学因素,包括具体使用的本发明组合物的活性、给药途径、给药时间、具体使用的化合物的排泄速率、治疗持续时间、与具体使用的组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料、受治患者的年龄、性别、体重、病症、一般健康和之前的病史以及医学领域熟知的类似因素。

[0392] 本领域普通医师或兽医能够容易地确定所需药物组合物的有效量并开出处方。例如,医师或兽医可从低于获得理想疗效所需剂量的水平开始给予药物组合物中所用本发明化合物的剂量,并逐渐提高剂量直至实现理想的疗效。一般而言,适当的本发明组合物的每日剂量将是有效产生疗效的最低剂量的化合物量。这样的有效剂量一般将取决于上述因素。优选静脉内、肌内、腹膜内或皮下给药,优选施用至靶部位附近。必要时,治疗组合物的

有效日剂量可以以2、3、4、5、6或更多的小剂量以适当的间隔在一天中分开施用,任选地以单位剂量形式施用。尽管有可能单独施用本发明化合物,但优选将化合物作为药物制剂(组合物)施用。

[0393] 在一个实施方案中,本发明的抗体可通过输注施用,优选在长时间(如长于24小时)中慢速连续输注,从而降低毒性副作用。施用可通过在2至24小时(如2至12小时)的时间中连续输注来进行。这样的方案可在必要时重复一次或多次,例如在6个月或12个月后重复。可通过使用靶向抗CLD18抗体的抗独特型抗体在施用后在生物样品中测量循环中单克隆抗CLD18抗体的量来确定或调整剂量。

[0394] 在另一实施方案中,通过维持疗法(如在6个月或更长时间内每周一次)施用抗体。

[0395] 在另一实施方案中,可通过包含以下的方案施用本发明的抗体:输注针对CLD18的抗体一次,其后输注缀合有放射性同位素的针对CLD18的抗体。该方案可在例如7至9天后重复进行。

[0396] 治疗组合物可使用本领域已知的医疗设备施用。例如,在一个优选的实施方案中,本发明的治疗组合物可使用无针皮下注射设备施用,例如US 5,399,163、US 5,383,851、US 5,312,335、US 5,064,413、US 4,941,880、US 4,790,824或US 4,596,556中公开的设备。可用于本发明的公知植入物和模块的实例包括以下文献中所述的那些:US 4,487,603,其公开了用于以受控速率分散药物的可植入微输注泵;US 4,486,194,其公开了用于通过皮肤施用药物的治疗设备;US 4,447,233,其公开了用于以精确输注速率递送药物的医疗输注泵;US 4,447,224,其公开了用于连续药物递送的可变流速可植入输注装置;US 4,439,196,其公开了具有多腔隔间的渗透性药物递送系统;以及US 4,475,196,其公开的渗透性药物递送系统。

[0397] 许多其他这样的植入物、递送系统和模块是本领域技术人员已知的。在某些实施方案中,本发明的抗体可配制成确保正确的体内分布。例如,血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)排除了许多高亲水性化合物。为了确保本发明的治疗化合物穿过BBB(必要时),可将其例如配制在脂质体中。生产脂质体的方法参阅如US 4,522,811、US 5,374,548、和US 5,399,331。脂质体可包含一个或多个选择性转运到特定细胞或器官中的部分,从而增强靶向药物的递送(参阅如V.V.Ranade (1989) J.Clin.Pharmacol. 29:685)。示例性靶向部分包括叶酸盐/酯或生物素(参阅如Low等的US 5,416,016)、甘露糖苷(Umezawa等, (1988) Biochem.Biophys.Res.Commun. 153:1038)、抗体(P.G.Bloeman等(1995) FEBS Lett. 357:140;M.Owais等(1995) Antimicrob.Agents Chemother. 39:180)和表面活性剂蛋白A受体(Briscoe等(1995) Am.J.Physiol. 1233:134)。

[0398] 在本发明的一个实施方案中,本发明的治疗化合物配制在脂质体中。在一个更优选的实施方案中,所述脂质体包括靶向部分。在一个最优选的实施方案中,脂质体中的治疗化合物通过推注递送至目标部位(如肿瘤部位)附近的部位。该组合物的流动性必须达到易于注射的程度。它必须在生产和贮藏条件下稳定,并且必须在防止微生物(如细菌和真菌)污染作用的条件下保存。

[0399] 在另一实施方案中,本发明的抗体可配制成防止或降低其穿越胎盘的转运。这可通过本领域已知方法来实现,例如通过抗体的PEG化或通过使用F(ab)2'片段。还可参考" Cunningham-Rundles C,Zhou Z,Griffith B,Keenan J. (1992) Biological activities

of polyethylene-glycol immunoglobulin conjugates. Resistance to enzymatic degradation. *J. Immunol. Methods*, 152:177-190 以及 "Landor M. (1995) Maternal-fetal transfer of immunoglobulins, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 74:279-283.

[0400] 用于肿瘤治疗的“治疗有效剂量”可通过目标肿瘤应答来衡量,所述应答可以是完全或部分的。完全应答 (complete response, CR) 定义为无疾病的临床、放射性或其他迹象。部分应答 (partial response, PR) 是由于合计肿瘤大小的降低高于 50%。进程 (progression) 的中位数时间是表征客观肿瘤应答耐久性的一个度量。

[0401] 用于肿瘤治疗的“治疗有效剂量”还可通过其稳定疾病进程的能力来衡量。化合物抑制癌症的能力可在预测其于人肿瘤中效力的动物模型系统中进行评价。或者,化合物的这一特性可通过使用技术人员已知的体外测定检查该化合物抑制细胞生长或凋亡的能力来评价。治疗有效量的治疗化合物能减小肿瘤尺寸,或者改善受试者的症状。本领域技术人员能够基于以下因素确定这样的量:例如受试者的体重、受试者症状的严重程度以及选择的具体组合物或给药途径。

[0402] 所述组合物必须无菌,并且其流动性达到可通过注射递送的程度。除了水以外,载体还可以是等渗缓冲的盐水溶液、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其适当的混合物。可以例如通过使用包衣(如卵磷脂)、通过维持理想的微粒大小(对于分散剂的情况)和通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。在许多情况下,优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇如甘露醇或山梨醇以及氯化钠。可通过在组合物中包含延缓吸收的药剂(如单硬脂酸铝或明胶)来实现注射用组合物的长期吸收。

[0403] 当活性化合物如上述进行了适当的保护时,该混合物可经口给药,例如与惰性稀释剂或能吸收的可食用载体一起给药。

[0404] IV. 本发明的用途和方法

[0405] 本发明所述抗体(包括本文所述免疫缀合物、双特异性/多特异性分子、组合物和其他衍生物)具有多种治疗效用,包括治疗与CLD18表达细胞相关的病症。例如,该抗体可施用于培养物中的细胞(如体外或离体)或人受试者(如体内),以治疗或预防多种病症,如本文所述病症。本文使用的术语“受试者”旨在包括应答于针对CLD18的抗体的人和动物。优选的受试者包括患有可通过杀伤患病细胞(特别是特征为与正常细胞相比CLD18表达模式改变的细胞)来治疗或改善的病症的人患者。

[0406] 本文所讨论治疗的疗效优选通过本发明抗体介导细胞杀伤的功能特性来实现,例如通过诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)介导的裂解、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)介导的裂解、凋亡、同型粘附和/或吞噬作用介导的杀伤,优选诱导CDC介导的裂解和/或ADCC介导的裂解介导的杀伤。

[0407] 例如,在一个实施方案中,本发明的抗体可用于治疗患致瘤性病症的受试者,例如患特征为存在表达CLD18的肿瘤细胞的疾病(包括如胃癌)的受试者。可治疗和/或预防的致瘤性疾病的实例包括所有表达CLD18的癌症和肿瘤实体,包括胃癌、食管癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肝癌、胆囊癌和头颈癌。这些癌症可以为早期、中期或晚期,例如转移癌。

[0408] 本发明所述药物组合物和治疗方法还可用于免疫或疫苗接种,以预防本文所述疾病。

[0409] 在另一实施方案中,本发明的抗体可用于检测CLD18或特定CLD18形式的水平,或者检测在其膜表面上含有CLD18的细胞的水平,接着可将所述水平与某些疾病或疾病症状(如上述)相联系。或者,上述抗体可用于消除CLD18表达细胞的功能或与其相互作用,由此将这些细胞当作这些疾病的重要中介体。这可以通过使样品以及对照样品与抗CLD18抗体在允许抗体与CLD18形成复合物的条件下接触来实现。对样品以及对照样品(即参照样品)抗体与CLD18之间形成的任何复合物进行检测,并进行比较。

[0410] 可首先在体外对本发明的抗体测试其与治疗或诊断用途相关的结合活性。例如,可使用如本文所述的流式细胞术来测定该抗体。

[0411] 此外,可测定抗体在触发至少一种效应子介导的效应细胞活性上(包括抑制表达CLD18的细胞生长和/或杀伤所述细胞)的活性。例如,可测定抗体触发CDC和/或凋亡的能力。测定CDC、同型粘附、分子聚簇或凋亡的操作如本文所述。

[0412] 本发明的抗体可用于在体内或体外引发一种或多种以下生物学活性:抑制表达CLD18的细胞生长和/或分化;杀伤表达CLD18的细胞;在效应细胞存在下介导表达CLD18的细胞的吞噬作用或ADCC;在补体存在下介导表达CLD18的细胞的CDC;介导表达CLD18的细胞的凋亡;诱导同型粘附;和/或诱导在结合CLD18后迁移至脂筏(lipid raft)。

[0413] 在一个具体的实施方案中,所述抗体用于在体内或体外治疗、预防或诊断多种CLD18相关疾病。CLD18相关疾病的实例包括癌症等,例如胃癌、胰腺癌、食管癌、肺癌和上文列出的癌症。

[0414] CLD18A2也在分化的正常胃细胞中表达。有可能通过平行施用胃保护性药物如抗酸剂或者胃质子泵抑制剂如奥美拉唑或相关药物来降低或避免抗体通过杀伤这些细胞而诱导的临床副作用。

[0415] 本发明抗体组合物在体内和体外的合适的给药途径为本领域所熟知,并可由普通技术人员进行选择。

[0416] 如上文所述,本发明的抗CLD18抗体可与一种或多种其他治疗剂(如细胞毒剂、放射性毒剂、抗血管发生剂或/和免疫抑制剂)共施用,以降低诱导针对本发明抗体的免疫应答。抗体可与所述药剂连接(作为免疫复合物),或者可以与所述药剂分开施用。对于后一种情况(分开施用),抗体可以在药剂之前、之后或同时施用,或者可与其他已知疗法(例如抗癌疗法,如放射)共施用。这样的治疗剂包括上文列出的抗肿瘤剂等。本发明抗CLD18抗体与化学治疗剂的共施用提供了两种抗癌剂,它们通过不同机制发挥作用,获得对肿瘤细胞的细胞毒效应。这样的共施用可解决由于产生对药物的抗性或者肿瘤细胞抗原性发生变化导致的问题,所述问题可使得它们不与所述抗体发生反应。

[0417] 在本发明的另一具体实施方案中,对施用抗体的受试者额外使用抗血管发生剂进行治疗,所述抗血管发生剂包括靶向VEGF或VEGFR的抗体以及抑制血管发生的一种或多种化合物。用这些药物进行预处理或平行应用这些药物可改善抗体在大块肿瘤中的渗透。

[0418] 在本发明的另一具体实施方案中,对施用抗体的受试者额外使用抑制生长因子受体的化合物进行治疗,所述化合物包括与EGFR受体结合的单克隆抗体以及抑制EGFR、Her1或Her2/neu受体所起始的信号的化合物。

[0419] 也可以使用靶标特异性效应细胞(例如与组合物(如抗体、多特异性和双特异性分子)连接的效应细胞)作为治疗剂。用于靶向的效应细胞可以是人白细胞,如巨噬细胞、嗜中

性粒细胞或单核细胞。其他细胞包括嗜酸性粒细胞、自然杀伤细胞及其他带有IgG或IgA受体的细胞。必要时,效应细胞可得自待治疗的受试者。靶标特异性效应细胞可以在生理可接受溶液中作为细胞悬液施用。所施用的细胞数可以为 10^8 至 10^9 的数量级,但可根据治疗目的而变化。一般而言,该量将足以获得在靶细胞(如表达CLD18的肿瘤细胞)处的定位,并通过例如吞噬作用实现细胞杀伤。给药途径也可以变化。

[0420] 使用靶标特异性效应细胞的疗法可以与用于除去靶细胞的其他技术联合进行。例如,使用本发明组合物的抗肿瘤疗法和/或带有这些组合物的效应细胞可以与化学疗法联合使用。此外,可以使用联合免疫疗法将两种不同的细胞毒效应子群体导向肿瘤细胞排斥。例如,与抗Fc-RI或抗CD3连接的抗CLD18抗体可与IgG或IgA受体特异性结合剂联合使用。

[0421] 本发明的双特异性和多特异性分子还可用于调节效应细胞上的Fc- γ R或Fc- α R水平,例如通过掩盖和清除细胞表面的受体来进行。抗Fc受体的混合物也可用于此目的。

[0422] 还可以在补体存在下使用具有补体结合位点(如来自IgG1、2或3或IgM的与补体结合的部分)的本发明组合物(如抗体、双特异性和多特异性分子和免疫缀合物)。在一个实施方案中,可通过加入补体或含有补体的血清对使用本发明结合剂和适当的效应细胞对包含靶细胞的细胞群进行的离体治疗进行补充。包被了本发明结合剂的靶细胞的吞噬作用可通过结合补体蛋白而得到改善。在另一实施方案中,包被本发明组合物的靶细胞还可被补体裂解。在另一实施方案中,本发明的组合物不活化补体。

[0423] 本发明的组合物还可与补体一起施用。因此,包含抗体、多特异性或双特异性分子以及血清或补体的组合物在本发明的范围内。这些组合物的优点在于补体位于抗体、多特异性或双特异性分子的附近。

[0424] 或者,本发明的抗体、多特异性或双特异性分子以及补体或血清可分开施用。本发明组合物与靶细胞的结合导致CLD18抗原-抗体复合物迁移至细胞膜的脂筏中。这样的迁移产生可有效激活和/或增强CDC的高密度抗原-抗体复合物。

[0425] 包含本发明组合物(如抗体和免疫缀合物)及其使用说明的试剂盒也在本发明的范围内。所述试剂盒还可含有一种或多种其他试剂,例如免疫抑制剂、细胞毒剂或放射性毒剂,或者一种或多种其他的本发明抗体(如具有补体活性的抗体)。

[0426] 因此,使用本发明抗体进行治疗的患者还可另外施用(在施用本发明抗体之前、同时或之后)增强或增进本发明抗体疗效的其他治疗剂,例如细胞毒剂或放射性毒剂。

[0427] 在另一些实施方案中,可以另外通过如用细胞因子治疗受试者来使用其他药剂来治疗该受试者,其中所述药剂调节(如增强或抑制)Fc- γ 或Fc- α 受体的表达或活性。优选的细胞因子包括粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素- γ (IFN- γ)和肿瘤坏死因子(TNF)。用于提高本文所述抗体和药物组合物疗效的其他重要药剂为 β -葡聚糖,它是分支葡萄糖残基的同聚多糖,由多种植物和微生物产生,例如细菌、藻类、真菌、酵母和谷物。还可使用生物产生的 β -葡聚糖片段。优选地,所述 β -葡聚糖是 β (1,3)葡萄糖的多聚体,其中至少一些主链葡萄糖单元(如3-6%的主链葡萄糖单元)具有分支,如 β -(1,6)分支。

[0428] 在一个具体的实施方案中,本发明提供用于检测样品中CLD18抗原的存在或测量CLD18抗原量的方法,包括使样品和对照样品在允许抗体或其部分与CLD18形成复合物的条件下接触特异性结合CLD18的抗体。接着检测复合物的形成,其中样品与对照样品相比复合

物形成的差异指示样品中存在CLD18抗原。

[0429] 在另一实施方案中,本发明提供用于在体内或体外检测CLD18表达细胞或对其定量的方法。

[0430] 所述方法包括(i)对受试者施用缀合了检测标记的本发明组合物;(ii)使该受试者接触检测所述检测标记的手段,以鉴定含有CLD18表达细胞的部位。

[0431] 特别地,如上述的方法可用于诊断CLD18相关疾病和/或定位CLD18相关疾病,如癌症。优选地,样品中CLD18(优选CLD18-A2)的量高于对照样品中CLD18(优选CLD18-A2)的量指示该样品的来源受试者(特别是人)中存在CLD18相关疾病。

[0432] 在另一实施方案中,本发明的免疫缀合物可用于将化合物(如治疗剂、标记、细胞毒剂、放射性毒剂、免疫抑制剂等)靶向表面表达CLD18的细胞,这通过将化合物与该抗体连接来实现。因此,本发明还提供定位表达CLD18的离体或体外细胞(如循环中的肿瘤细胞)的方法。

[0433] 本发明通过以下实施例进一步进行说明,实施例不应理解为限制本发明的范围。

[0434] 实施例

[0435] 1.产生针对CLD18的小鼠抗体

[0436] a.免疫:

[0437] 用编码人CLD18片段(SEQ ID NO:15、16、17、18)的真核表达载体免疫Balb/c或C57/BL6小鼠。在佐剂(如CpG)存在下,在第1天和第10天将50 μ g或25 μ g质粒DNA注射进四头肌(肌内,i.m.),用于产生第1组单克隆抗体,或者在第1天和第9天、第1天和第11天或者第1天、第16天和第36天进行,用于产生第2组抗体(详细情况见表1b)。肌内注射CpG以及仅转染CLD18A2(SEQ ID NO:1)或共转染CLD18A2和小鼠可溶性CD40L编码RNA的细胞,肌内或腹膜内注射PEI-Man。根据所用的具体免疫方案,在第16天和第43天之间通过免疫荧光显微术监测小鼠血清中针对人CLD18的抗体的存在情况。使用HEK293细胞测定免疫荧光,所述细胞瞬时转染有编码包含人CLD18A2(SEQ ID NO:1、2)和荧光报告蛋白的融合构建体的核酸。通过腹膜内注射 5×10^7 个或 1×10^8 个瞬时转染了编码人CLD18A2(SEQ ID NO:1、2)的核酸的HEK293细胞,在摘除脾之前3天对具有可检测免疫应答(图1)的小鼠进行加强,以产生第1组单克隆抗体,或者在脾摘除术之前3天、3天和2天对小鼠进行加强,或者在摘除脾之前4天、3天和2天对小鼠进行加强,以产生第2组单克隆抗体(详细情况见表1b)。在表1a中,所使用的免疫方案用于各个单克隆抗体。

[0438] 表1a:用于产生单克隆抗体的免疫方案

[0439]

mAB	免疫方案 *	mAB	免疫方案
1组			
24H5	40	42E12	45
26B5	40	43A11	45
26D12	40	44E10	45
28D10	40	47D12	45
37G11	45	61C2	45
37H8	45	75B8	6
38G5	45	85A3	6
38H3	45	9E8	40
39F11	45	19B9	40
41C6	45		
2组			
45C1	53	166E2	51
125E1	45	175D10	51
163E12	51		

[0440] *具体的免疫方案见表1b

[0441]

表1b: 具体免疫方案

免疫方案	免疫 (用DNA引发及加强)		血清监测		用转染细胞加强		进行脾切除术之前的天数
	使用编码CLD18片段的DNA载体	使用佐剂	第...天	第...天	仅转染CLD18A2 (SEQ ID NO: 1) 的细胞	用CLD18A2 (SEQ ID NO: 1) 与编码小鼠可溶性CD40L的RNA共转染的细胞	
6	SEQ ID NO: 15: 50µg	50µg CpG	1 和 10	18	5 x 10 ⁷ 个转染的MC3T3 细胞	无	3
40	SEQ ID NO: 17: 50µg	50µg CpG	1 和 10	18		5 x 10 ⁷ 个 HEK293 细胞; 100µg CPG 为佐剂	3
45	SEQ ID NO: 15: 50µg	50µg CpG	1 和 9	16		1 x 10 ⁷ 个 HEK293 细胞	3
51	SEQ ID NO: 15: 25µg	含5%葡萄糖的水中的 2.5 µl PEI-Man* (150 mM)	1, 16 和 36	22, 30 和 43	5 x 10 ⁷ 个转染的 HEK293 细胞	无	3 和 2
53	引发: SEQ ID NO: 15: 25µg, 和 SEQ ID NO: 17: 25µg; 加强: SEQ ID NO: 17: 50µg	含5%葡萄糖的水中的 50µg CpG	1 和 11	20	5 x 10 ⁷ 个转染的 HEK293 细胞	无	4, 3 和 2

* 来自 PolyPlus Transfection 的 in vivo-jetPEI™Man

[0442]

b. 产生生产抗CLD18的人单克隆抗体的杂交瘤:

[0443]

小鼠脾细胞基于标准方案进行分离, 并使用PEG与小鼠骨髓瘤细胞融合。接着使用

转染了编码人CLD18的核酸的HEK293细胞,通过FACS分析针对CLD18特异性免疫球蛋白的产生筛选得到的杂交瘤。使用50%PEG (Roche Diagnostics, CRL 738641),以2:1的比例将来自免疫小鼠的脾淋巴细胞单细胞悬液与P3X63Ag8U.1非分泌型小鼠骨髓瘤细胞(ATCC, CRL 1597)融合。将细胞以约 3×10^4 个/孔铺到平底微量滴定板中,其后在含有10%胎牛血清、2%杂交瘤融合及克隆添加剂(HFCS, Roche Diagnostics, CRL 1 363 735)加10mM HEPES、0.055mM 2-巯基乙醇、50 μ g/ml庆大霉素和 $1 \times$ HAT (Sigma, CRL H0262)的选择培养基中孵育2周。10至14天后,通过流式细胞术对单个细胞筛选抗CLD18单克隆抗体。将分泌抗体的杂交瘤再铺板,再次筛选,仍为阳性的抗CLD18单克隆抗体则通过有限稀释进行亚克隆。接着体外培养稳定的亚克隆,以在组织培养培养基中产生少量抗体用于表征。从每个杂交瘤中选择至少一个保留亲本细胞反应性(通过FACS测定)的克隆。对每个克隆产生9管细胞库,并保存在液氮中。

[0444] c. 选择与CLD18结合的单克隆抗体:

[0445] 为了确定抗体的同种型,进行同种型ELISA。使用小鼠monoAB ID试剂盒(Zymed, CRL 90-6550)或者IsoStrip小鼠单克隆抗体同种型试剂盒(Roche, 目录号1493027)来测定所鉴定CLD18反应性单克隆抗体的Ig亚类。产生了定义为第1组的19个杂交瘤细胞系,6个来自以CLD18A2-loopD3 (SEQ ID NO:17、18)免疫的C57/BL6小鼠细胞的融合物,18个来自以CLD18A2-loop1 (SEQ ID NO:15、16)免疫的Balb/c小鼠细胞的融合物,它们表达以下抗体:

[0446] 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9

[0447] 24H5: 小鼠单克隆IgG2b, κ 抗体, 182-D758-034

[0448] 26B5: 小鼠单克隆IgG2a, κ 抗体, 182-D758-035, DSM ACC2745

[0449] 26D12: 小鼠单克隆IgG3, κ 抗体, 182-D758-036, DSM ACC2746

[0450] 28D10: 小鼠单克隆IgG3, κ 抗体, 182-D758-040, DSM ACC2747

[0451] 37G11: 小鼠单克隆IgG2a, κ 抗体, 182-D1106-055, DSM ACC2737

[0452] 37H8: 小鼠单克隆IgG3, κ 抗体, 182-D1106-056, DSM ACC2738

[0453] 38G5: 小鼠单克隆IgG3, κ 抗体, 182-D1106-057, DSM ACC2739

[0454] 38H3: 小鼠单克隆IgG3, κ 抗体, 182-D1106-058, DSM ACC2740

[0455] 39F11: 小鼠单克隆IgG3, κ 抗体, 182-D1106-059, DSM ACC2741

[0456] 41C6: 小鼠单克隆IgG2a, κ 抗体, 182-D1106-060

[0457] 42E12: 小鼠单克隆IgG2a, κ 抗体, 182-D1106-061, DSM ACC2748

[0458] 43A11: 小鼠单克隆IgG2a, κ 抗体, 182-D1106-062, DSM ACC2742

[0459] 44E10: 小鼠单克隆IgG3, κ 抗体, 182-D1106-063

[0460] 47D12: 小鼠单克隆IgG3, κ 抗体, 182-D1106-064

[0461] 61C2: 小鼠单克隆IgG2b, κ 抗体, 182-D1106-067, DSM ACC2743

[0462] 75B8: 小鼠单克隆IgM, κ 抗体, 182-D756-001

[0463] 85A3: 小鼠单克隆IgM, κ 抗体, 182-D756-002

[0464] 9E8: 小鼠单克隆IgM, κ 抗体, 182-D758-011

[0465] 19B9: 小鼠单克隆IgM, κ 抗体, 182-D758-024

[0466] 产生了定义为第2组的5个杂交瘤细胞系, 1个来自以CLD18A2-loopD3 (SEQ ID NO:

17、18)和CLD18A2-loopD1 (SEQ ID NO:15、16)免疫的Balb/c小鼠细胞的融合物,4个来自以CLD18A2-loopD1 (SEQ ID NO:15、16)免疫的Balb/c小鼠细胞的融合物,它们表达以下抗体:

[0467] 45C1,125E1,163E12,166E2,175D10

[0468] 45C1:小鼠单克隆IgG2a, κ 抗体,182-D758-187

[0469] 125E1:小鼠单克隆IgG2a, κ 抗体,182-D1106-279,DSM ACC2808

[0470] 163E12:小鼠单克隆IgG3, κ 抗体,182-D1106-294,DSM ACC2809

[0471] 166E2:小鼠单克隆IgG3, κ 抗体,182-D1106-308

[0472] 175D10:小鼠单克隆IgG1, κ 抗体,182-D1106-362,DSM ACC2810

[0473] 2.产生单克隆抗体

[0474] 产生并纯化对CLD18具有反应性的单克隆抗体:

[0475] 为了产生mg量的抗体用于功能表征,以 2×10^6 个细胞/ml将杂交瘤细胞接种到基于透析的生物反应器(CELLine CL1000,Integra,Chur,CH)中。每周收获一次含有抗体的上清液。使用MelonGel (Pierce, Rockford, USA) 纯化小鼠单克隆抗体并通过硫酸铵沉淀进行浓缩,或者使用FPLC通过蛋白A进行纯化。通过BCA测定来确定抗体浓度和纯度,并通过十二烷基硫酸钠凝胶电泳和考马斯染色来检查纯度。

[0476] 3.单克隆抗体的结合特征

[0477] a. WB、IF中转染体的质量控制:

[0478] 为了产生表达CLD18A2的细胞,用编码CLD18A2 (SEQ ID NO:1、2) 或CLD18A2-myc (SEQ ID NO:3、4) 的核酸转染HEK293或CHO细胞。

[0479] 用CLDN18A2-myc (SEQ ID NO:3、4) 转染HEK293细胞,或者不进行转染。转染后24小时收获细胞,裂解并进行十二烷基硫酸钠凝胶电泳。对凝胶进行印迹并用小鼠抗myc抗体染色。与过氧化物酶标记的抗小鼠抗体孵育后,用ECL试剂使印迹显色,并使用LAS-3000成像仪(Fuji)显影。仅在转染细胞中观察到具有CLD18-myc预计分子量的条带,而阴性对照中则没有(图2)。

[0480] 用CLD18A2 (SEQ ID NO:1、2) 转染CHO细胞并在室玻片上培养24小时。用甲醇固定细胞,并在25°C用 $1\mu\text{g/ml}$ 针对CLD18的兔多克隆抗体染色60分钟。洗涤后,用Alexa488标记的山羊抗兔IgG (Molecular Probes) 染色细胞,并通过荧光显微术进行评价。图3显示转染的CHO细胞像未转染细胞一样在细胞膜上表达CLD18。将这些异源CLD18表达细胞用于以下测定,以测试抗体结合的特异性。

[0481] b. 选择与CLD18结合的单克隆抗体/通过流式细胞术进行初步筛选:

[0482] 在测定前40小时用编码人CLD18A2 (SEQ ID NO:1、2) 和荧光报告蛋白的表达载体共转染HEK293细胞,或者使用稳定表达人CLD18A2 (HEK293-CLD18A2) 的HEK293细胞并用碘化丙锭(PI)复染。使用2mM EDTA/PBS使细胞脱离后,用完全生长培养基洗涤细胞,并以约 $1-5 \times 10^5$ 个细胞/孔将细胞铺到U型底微量滴定板中。在4°C将细胞与杂交瘤上清液孵育30分钟,其后用1%热灭活的FBS/PBS进行两次洗涤步骤,最后与APC或Alexa647缀合的抗小鼠IgG特异性第二抗体一起孵育。两次洗涤步骤之后,用CellFIX (BD Biosciences) 固定共转染的细胞。使用BD FACSAarray,通过流式细胞术评估结合。以荧光标记的表达作为横轴,对纵轴的抗体结合进行作图。所有的小鼠抗体24H5,26B5,26D12,28D10,37G11,37H8,38G5,38H3,39F11,41C6,42E12,43A11,44E10,47D12,61C2,75B8,85A3,9E8,19B9,45C1,125E1,

163E12,166E2和175D10均检测到与荧光标记表达细胞的表面特异性结合(图4,Q2中的细胞),例如含有单克隆抗体24H5(Fig.4A,Q2中的细胞)、85A3(Fig.4B)、175D10、125E1、163E12、166E2和45C1(Fig.4C,Q1中的细胞)的杂交瘤上清液。

[0483] c.比较抗体与Myc或HA标记的CLD18A2的结合:

[0484] 进一步说明了所鉴定的CLD18特异性单克隆抗体的结合特征。因此,分析单克隆抗体与通过插入表位标签产生的CLD18A2突变体的结合。CLD18A2-HA(SEQ ID NO:6)在CLD18A2-loop1中含有HA表位标签,而CLD18A2-Myc(SEQ ID NO:4)含有插入CLD18A2-loop2中的Myc表位标签。由于这些标签的插入引起表位的破坏,因此所鉴定的单克隆抗体可根据丧失与任何突变体的结合来进行分组。在4°C将瞬时共转染荧光标记和人CLD18A2、荧光标记和CLD18A2-HA或者荧光标记和CLD18A2-Myc的HEK293细胞与含有CLD18特异性单克隆抗体的杂交瘤上清液孵育30分钟,其后与Alexa647缀合的抗小鼠IgG第二抗体孵育。在BD FACSAarray上进行分析之前,用CellFIX固定细胞。如图5中24H5、9E8、26B5和19B9所示例的,可以基于其结合特征将单克隆抗体分成四个不同的组:(i)与未修饰CLD18A2以及CLD18A2-HA和CLD18A2-Myc结合的抗体,如24H5,(图5A),或者(ii)不与CLD18A2-HA结合的抗体,如9E8,(图5B),或者(iii)不与CLD18A2-Myc结合的抗体,如26B5,(图5C),或者(iv)不与CLD18A2-HA结合,也不与CLD18A2-Myc结合的抗体,如19B9,(图5D)。

[0485] d.通过流式细胞术比较抗体与人CLD18A1及CLD18A2转化体的结合:

[0486] 通过流式细胞术分析所鉴定的单克隆抗体与CLD18A2同工型的结合特异性。在4°C将稳定表达人CLD18A2(HEK293-CLD18A2)的HEK293细胞和稳定表达人CLD18A1(SEQ ID NO:7、8)(HEK293-CLD18A1)的HEK293细胞与含有单克隆抗体的杂交瘤上清液孵育30分钟,其后与Alexa647缀合的抗小鼠IgG第二抗体孵育,并固定细胞,或者不固定细胞而用PI复染。使用BD FACSAarray,通过流式细胞术评估结合。图6显示在24H5、26B5、26D12、28D10、37G11、37H8、38G5、38H3、39F11、41C6、42E12、43A11、44E10、47D12、61C2、75B8、85A3、9E8、19B9、45C1、125E1、163E12、166E2、175D10中鉴定的两组单克隆抗体的实例:(i)单克隆抗体43A11、45C1和163E12特异性结合人CLD18A2,但不结合人CLD18A1(图6A、B),以及(ii)单克隆抗体37H8与两种人同工型均结合(图6A)。

[0487] e.通过免疫荧光显微术比较抗体与人CLD18A1及CLD18A2转染体的结合:

[0488] 用编码CLD18A1(SEQ ID NO:8)或CLD18A2(SEQ ID NO:2)与荧光报告子的融合蛋白的表达载体瞬时转染HEK293细胞,并在室玻片上培养。不固定或在多聚甲醛固定后,在37°C用含有单克隆抗体的组织培养上清液染色细胞30分钟。洗涤后,用Alexa555标记的抗小鼠IgG抗体(Molecular Probes)染色细胞。通过荧光显微术评估抗体结合。如图7所示,抗体37G11与CLD18A2特异性发生反应(图7A),但不与CLD18A1反应(图7B)。相反,抗体26B5与CLD18A2及CLD18A1均发生反应(图8)。

[0489] 对于抗体24H5、26B5、26D12、28D10、37G11、37H8、38G5、38H3、39F11、41C6、42E12、43A11、44E10、47D12、61C2、75B8、85A3、9E8、19B9,观察到活细胞与多聚甲醛固定细胞之间明显的染色差异。当细胞经固定时,所述抗体形成均一的膜染色(图7C、8C、8D)。相反,将活细胞与这些抗体孵育引起蛋白质簇的产生,可见斑点样染色模式(图7A、8A、8B)。这显示,所有抗体均与活细胞表面所见天然表位结合。

[0490] f.确定内源表达细胞系:

[0491] 在RT-PCR分析中使用CLD18A2基因特异性引物对(SEQ ID NO:11,12),以筛选表达CLD18A2的细胞系。发现人胃癌细胞系NCI-SNU-16(ATCC CRL-5974)、NUGC-4(JCRB0834)和KATO-III(ATCC HTB-103)和人胰腺癌细胞系DAN-G(DSMZ ACC249)显示CLD18的强内源表达(图9)。通过用抗CLD18的兔多克隆血清进行染色在蛋白质水平证实表达。

[0492] g.用CLD18特异性抗体染色内源表达细胞并进行免疫荧光分析:

[0493] 在标准条件下在室玻片上培养DAN-G、SNU-16、NUGC-4和KATO-III细胞。细胞不进行固定或使用甲醇固定,并用各个抗体染色。对抗体24H5、26B5、26D12、28D10、37G11、37H8、38G5、38H3、39F11、41C6、42E12、43A11、44E10、47D12、61C2、75B8、85A3、9E8、19B9观察到细胞表面染色,如图10、11和12A所示。对抗体45C1、125E1、163E12、166E2和175D10测定了天然表位识别,并在未固定细胞中观察到细胞表面染色,如图12B所示。抗体亚组显示了主要在细胞-细胞界面或者在不毗邻其他细胞的膜游离部分的细胞膜同源染色。其他抗体染色了细胞膜上的离散点和聚集体,总之,证明各个抗体与不同表位结合,包括CLD18同型或异型联合所掩盖的表位以及在已形成的紧密连接中易于接近的CLD18表位。

[0494] h.通过流式细胞术染色内源性表达的细胞系:

[0495] 通过流式细胞术分析KATO-III和NUGC-4活细胞上组成型表达的CLD18A2的表面表达。例如,用单克隆抗体61C2或163E12染色KATO-III和NUGC-4细胞,其后与Alexa647缀合的抗小鼠IgG第二抗体一起孵育,固定细胞或者不进行固定。使用BD FACSArray,通过流式细胞术评估结合。图13显示61C2与至少70.3%的KATO-III细胞结合,163E12与KATO-III和NUGC-4细胞上的CLD18A2结合。

[0496] i.小鼠和人CLD18A1及CLD18A2的序列比对:

[0497] 人CLD18A2(NP_001002026)和人CLD18A1(NP_057453)在序列比较中在N端存在差异,小鼠CLD18变体(NP_062789和AAL15636)显示分子间的高同源性和序列变异位点(见图14)。

[0498] j.通过流式细胞术分析抗体与小鼠CLD18A1和小鼠CLD18A2的反应性:

[0499] 通过流式细胞术分析所鉴定的单克隆抗体与小鼠CLD18A2及CLD18A1的结合。将瞬时共转染了荧光标记和小鼠CLD18A2(SEQ ID NO:33,35)或者荧光标记和小鼠CLD18A1(SEQ ID NO:36,37)的HEK293细胞在4°C下与分别含有人CLD18特异性单克隆抗体38G5、38H3、37G11、45C1和163E12的杂交瘤上清液孵育30分钟,随后与Alexa647缀合的抗小鼠IgG第二抗体孵育并固定细胞。使用BD FACSArray,通过流式细胞术评估结合。图15显示三种不同的结合谱:38G5和45C1不与任何一种小鼠CLD18同工型结合,37G11和163E12与小鼠CLD18A2结合,但不与小鼠CLD18A1结合,以及38H3与小鼠CLD18A1和CLD18A2结合。这些抗体是在临床前研究中确定CLD18单克隆抗体潜在毒性的很有价值的工具。

[0500] 总之,这些数据显示,针对CLD18产生的本发明单克隆抗体24H5、26B5、26D12、28D10、37G11、37H8、38G5、38H3、39F11、41C6、42E12、43A11、44E10、47D12、61C2、75B8、85A3、9E8、19B9、45C1、125E1、163E12、166E2和175D10代表了与人CLD18不同表位和拓扑情况的多种结合特征。

[0501] 实施例3b、c、d、e、g、h和j中所示不同特性的组合可用于将单克隆抗体归类到这些不同类中。

[0502] 4.免疫组化(IHC)

[0503] 将通过用SEQ ID NO:21肽进行免疫而产生的CLD18A2表位特异性抗体用于CLD18A2表达的免疫组化表征。将来自一组详尽的正常及肿瘤组织的石蜡包埋组织切片用于蛋白质表达及定位分析。在除胃以外的任何其他正常器官组织中均未检测到显著表达(见表2、图16A)。相反,通过免疫组化证实了CLD18A2在不同癌症中的表达,包括胃癌和肺癌(图16B)。

[0504] 有趣的是,CLD18A2蛋白在胃粘膜中的表达局限在基部和凹陷区(pit region)胃上皮的终末分化细胞中。相反,胃粘膜颈区中的细胞(特别是峡区中补充整个粘膜的胃干细胞)不表达CLD18A2(图16C)。

[0505] 表2:通过IHC分析的CLD18A2在正常及肿瘤组织中的表达

组织类型	结果
肾上腺	-
膀胱	-
血细胞	-
骨髓	-
乳腺	-
结肠	-
内皮	-
食管	-
输卵管	-
心	-
肾(肾小球、肾小管)	-
肝	-
[0506] 肺	-
淋巴结	-
卵巢	-
胰腺	-
甲状旁腺	-
垂体	-
胎盘	-
前列腺	-
皮肤	-
脾	-
胃	+
横纹肌	-
睾丸	-

	胸腺	-
[0507]	甲状腺	-
	输尿管	-
	子宫(宫颈、子宫内膜)	-

[0508] 将单克隆抗体39F11用于免疫组化CLD18A2特异性研究。如图17A所示,在除胃以外的所有测试的正常组织中均未检测到显著的反应性(图17A),而胃癌和肺癌仍为强阳性(图17B)。

[0509] 另一组本发明抗体显示特异性癌症染色模式,与胃癌结合但对正常胃组织无反应性。图18A中的单克隆抗体26B5显示这样的染色模式。

[0510] 在来自HEK293肿瘤细胞系的切片上使用免疫组织化学对175D10(图18B)、43A11(图18C)、163E12(Fig.18D)和45C1(图18E)进行特异性分析:将稳定表达人CLD18A2(HEK293-CLD18A2)或CLD18A1(HEK293-CLD18A1)或者转染了表达对照质粒(HEK293-模拟)的HEK293肿瘤细胞系异种移植到小鼠中,以形成实体瘤,所述表达对照质粒中仅含有用于选择的抗生素抗性基因。在模拟转染的HEK293异种移植肿瘤中未检测到表达。相反,在HEK293-CLD18A2异种移植肿瘤和胃癌样品中观察到了强且均匀的膜染色。

[0511] 5. 补体依赖性细胞毒性(CDC)

[0512] a. 通过流式细胞术测量的第1组单克隆抗体的CDC:

[0513] 通过从健康志愿者中抽血至S-Monovette-EDTA真空管(Sarstedt,Ntirmbrecht, Germany)接着以600g离心20分钟来制备用于补体裂解的血浆。收获血浆并保存在-20℃。

[0514] 在第一组实验中,对杂交瘤上清液分析其针对稳定表达人CLD18A2(HEK293-CLD18A2)的HEK293细胞诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)的能力。室温下将细胞与分别含有单克隆抗体85A3、28D10、24H5或26D12的杂交瘤上清液孵育20分钟。离心(450g,5分钟)后除去上清液,将DMEM中20%的人血浆(预热至37℃)加入细胞中,并在37℃下再孵育20分钟。其后,通过使用碘化丙锭(PI)染色法以FACS测定细胞裂解。加入PI至终浓度2.5μg/ml。对于流式细胞术,使用BD FACSArray流式细胞仪(BD Biosciences,Mountain View,CA)。收集至少10000个事件用于分析,通过调整前侧向散射(forward sideward scatter,FCS)阈值来排除细胞碎片。裂解细胞(PI阳性细胞)的百分比示于图19。单克隆抗体85A3、28D10和26D12分别诱导HEK293-CLD18A2细胞中33.5%、38.2%和39.2%的裂解,而24H5介导的CDC仅为19.3%。

[0515] b. 第1组单克隆抗体的CDC:

[0516] 在第二组实验中,分析了单克隆抗体对CLD18A2表达细胞诱导CDC的特异性。因此,对于一组特异性结合人CLD18A2或者也结合人CLD18A1的抗体,测试其针对稳定表达人CLD18A2(CHO-CLD18A2)或人CLD18A1(CHO-CLD18A1)的CHO细胞的CDC诱导。在测定前24小时,以 3×10^4 个/孔的密度将CHO-CLD18A2和CHO-CLD18A1细胞接种到组织培养平底微量滴定板中。第二天除去生长培养基,将细胞一式三份与调整至含有10μg/ml浓度单克隆抗体的杂交瘤上清液一起孵育,所述单克隆抗体分别是24H5、26D12、28D10、37G11、37H8、38G5、38H3、39F11、41C6、42E12、43A11、44E10、47D12和61C2。对照细胞与生长培养基或含0.2%皂角苷的生长培养基一起孵育,分别用于测定背景裂解和最大裂解。孵育20分钟后,室温下除

去上清液,并将DMEM中20%的人血浆(预热至37℃)加入细胞,在37℃下再孵育20分钟。接着用含有2.5μg/ml溴化乙锭的PBS替换上清液,在520nm激发后使用Tecan Safire测量荧光发射。特异性裂解百分比计算为:特异性裂解%=(样品荧光-背景荧光)/(最大裂解荧光-背景荧光)×100。图20显示,单克隆抗体26D12、28D10、37H8、38H3和39F11介导针对CHO-CLD18A2细胞的高度CDC,单克隆抗体38G5介导中度CDC,单克隆抗体41C6和61C2介导低度CDC,单克隆抗体24H5、37G11、42E12、43A11、44E10和47D12不介导CDC。相反,所有抗体均不能诱导针对CHO-CLDA1细胞的CDC,尽管如通过流式细胞术和免疫荧光测定的,26D12、28D10、37H8、38H3、39F11、41C6、47D12和61C2也结合CLD18A1。

[0517] c. 单克隆抗体滴定和使用第1组单克隆抗体的CDC:

[0518] 为了测量抗CLD18抗体在低浓度下诱导CDC的能力,进行了滴定三种不同抗体的实验。将在微量滴定板中生长的CHO-CLD18A2细胞在室温下与一系列浓度的75B8(100、30、10、3和1μg/ml)、37H8(10、3.3和1μg/ml)和28D10(10、1和0.1μg/ml)分别孵育20分钟。除去上清液,将DMEM中20%的人血浆(预热至37℃)加入细胞,并在37℃下再孵育20分钟。在使用Tecan Safire进行分析之前,用含有2.5μg/ml溴化乙锭的PBS替换上清液。图21A-C显示,特异性裂解百分比是抗体浓度的函数。单克隆抗体75B8在10μg/ml时诱导CHO-CLD18A2细胞中31.0%的裂解,在1μg/ml时下降到6.2%(图21A),而单克隆抗体28D10和37H8在1μg/ml时仍分别诱导39%和26.5%的特异性裂解(图21B、C)。

[0519] d. 通过流式细胞术测量第2组单克隆抗体的CDC:

[0520] 通过从健康志愿者中抽血至Serum-Monovette真空管(Sarstedt, Nürnberg, Germany)中接着以600g离心20分钟来制备用于补体裂解的血清。收获血清并保存在-20℃。对照血清在保存前在56℃下热灭活30分钟。

[0521] 分析杂交瘤上清液针对内源表达人CLD18A2的KATO-III细胞诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)的能力。在37℃下,将细胞与粗制或纯化的杂交瘤上清液孵育30分钟,所述杂交瘤上清液中分别含有单克隆抗体45C1、125E1、163E12、166E2和175D10。将RPMI中20%的人血清加入细胞,并在37℃下再孵育30分钟。其后,使用碘化丙锭(PI)染色法,以FACS测定细胞裂解。加入PI至终浓度2.5μg/ml。对于流式细胞术,使用BD FACS Array流式细胞仪(BD Biosciences, Mountain View, CA)。收集至少10000个事件用于分析,通过调整前侧向散射(FSC/SSC)阈值来排除细胞碎片。通过下式计算特异性裂解:特异性裂解=(%样品中的PI阳性细胞-%使用热灭活血清的样品中的PI阳性细胞)。特别是对于163E12观察到了CDC介导的强裂解。

[0522] 6. 抗体依赖性细胞毒性(ADCC)

[0523] 对杂交瘤上清液分析其针对稳定表达人CLD18A2(HEK293-CLD18A2)或人CLD18A1(HEK293-CLD18A1)的HEK293细胞诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力。

[0524] a. 富集人外周血单个核细胞:

[0525] 将来自健康供体的人血在磷酸缓冲液(PBS)中稀释两次,血细胞在Ficoll(淋巴细胞分离培养基1077g/ml, PAA Laboratories, 目录号J15-004)上分层。从界面中分离血单个核细胞(MNC),洗涤并重悬在补充了10%热灭活胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺的RPMI 1640培养基中。

[0526] b. ADCC设置:

[0527] 用荧光增强配体 (BADTA, Perkin Elmer 细胞毒性测定试剂盒 DELFIA EuTDA Cytotoxicity Reagents, 目录号 AD0116) 标记靶细胞 30 分钟。用补充了 10mM 丙磺舒 (Sigma, 目录号 P8761)、10-20mM HEPES 和 10% 热灭活胎牛血清的 RPMI-10 彻底洗涤后, 将细胞调整至 1×10^5 个细胞/ml。将已标记的靶细胞、效应细胞 (MNC) 和调整至 10 μ g/ml 浓度的含有单克隆抗体的上清液加入圆底微量滴定板中。对于分离的效应细胞, 使用 100:1 的效应细胞与靶细胞 (E:T) 比例 (50:1 和 25:1 的数据未显示)。孵育 (2 小时, 37 $^{\circ}$ C) 后, 通过离心中止测定, 并在时间分辨荧光计中以铈计数来测量双链体中的荧光配体释放。使用下式计算细胞毒性百分比: 特异性裂解% = (实验释放计数 - 自发释放计数) / (最大释放计数 - 自发释放计数) \times 100, 最大配体释放通过在靶细胞中加入 Triton X-100 (0.25% 终浓度) 来测定, 在不存在抗体和效应细胞的情况下测量自发释放。图 22 显示, 单克隆抗体 26B5、37H8、38G5、47D12 和 61C2 介导针对 HEK293-CLD18A2 细胞的 ADCC。相反, 这些抗体对 CLD18A1 靶标未诱导显著细胞毒性或仅诱导低水平细胞毒性, 证明了 CLD18A2 特异性的 ADCC (图 23)。

[0528] 7. 增殖抑制

[0529] 对纯化的小鼠单克隆抗体分析其抑制内源表达人 CLD18A2 的 KATO-III 细胞生长的能力。

[0530] 在约 10 μ g 单克隆抗体存在下培养 1×10^4 个内源表达 CLD18A2 的靶细胞 (KATO-III)。

[0531] DELFIA 细胞增殖试剂盒 (Perkin-Elmer, 目录号 AD0200) 是基于测量微孔板中增殖细胞 DNA 合成过程中 5-溴-2'-脱氧尿苷 (BrdU) 掺入的非同位素免疫测定。掺入的 BrdU 使用铈标记的单克隆抗体进行检测。为进行抗体检测, 使用固定液固定细胞并变性 DNA。洗去未结合抗体, 并加 DELFIA 诱导物以从标记抗体上将铈解离到溶液中, 它们在溶液中与 DELFIA 诱导物的组分形成高荧光螯合物。所测量的荧光 (在检测中使用时间分辨荧光术) 与每个孔中细胞的 DNA 合成成比例。

[0532] 对于抗体 125E1、163E12、45C1、37G11、37H8、28D10 和 166E2 分别观察到了强增殖抑制。对于小鼠抗体 43A11、175D10、42E12、26D12、61C2 和 38H3 分别观察到了中度增殖抑制。

[0533] 8. 在治疗性小鼠异种移植模型中的表现

[0534] 在治疗性异种移植模型中研究了所鉴定的特异性结合 CLD18A2 的单克隆抗体的治疗潜力。

[0535] a. 在小鼠中高表达 CLD18A2 肿瘤的早期治疗

[0536] 用 1×10^7 个稳定表达高水平人 CLD18A2 (HEK293-CLD18A2) 的 HEK293 细胞皮下接种 SCID 小鼠。人 CLD18A2 在 HEK293-CLD18A2 细胞中的表达水平与在来自患者的原发性胃癌中的表达水平相当。每个实验治疗组包括 10 只小鼠 (每组中的小鼠数 $n = 10$)。对小鼠的治疗在肿瘤接种后 3 天开始。在 4 周中, 每周一次静脉内注射 200 μ g 纯化的杂交瘤上清液, 其代表小鼠单克隆抗体 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 39F11, 42E12, 43A11, 38H3 或 61C2。或者, 在 6 周中每周两次通过静脉内和腹膜内交替注射来施用含有小鼠单克隆抗体 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 或 175D10 的 200 μ g 纯化的杂交瘤上清液。每周两次监测受治小鼠的肿瘤生长 (肿瘤体积 = 长度 \times 宽度 \times 宽度 / 2, 以 mm^3 计)。如果肿瘤体积达到 500 mm^3 , 或者在发病严重的情况下, 则处死小鼠。图 24 示例了本发明抗体强烈抑制 HEK293-CLD18A2 肿瘤细胞的生长。图 25A 和 25B 显示, 在施用 HEK293-CLD18A2 的早期治疗异种移植模型中, 通过用本发明

抗体进行治疗延长了存活。

[0537] b. 小鼠中晚期高CLD18A2表达肿瘤的迟发治疗

[0538] 设计同样的基于HEK293-CLD18A2的肿瘤异种移植模型作为迟发治疗方案,而不是上述早期治疗。在肿瘤接种后第27天将小鼠随机分组到各含有5-6只小鼠的测试组中,并使用200 μ g纯化的杂交瘤上清液起始治疗,所述杂交瘤上清液分别含有小鼠单克隆抗体43A11、163E12和175D10。在六周中,每周两次通过静脉内和腹膜内交替注射来施用抗体。在这一模型中,本发明的抗体也显示抑制肿瘤生长。对于一些抗体,这引起了存活的延长(图26)。

[0539] c. 表达低水平CLD18A2的肿瘤的早期治疗

[0540] 对SCID小鼠皮下接种 2×10^5 个DAN-G肿瘤细胞系,该细胞系是组成型表达低水平CLD18A2蛋白的浸润性人胰腺癌细胞系。在肿瘤移植后3天起始小鼠的治疗(10只/组):在六周中每周两次通过静脉内和腹膜内交替注射来施用200 μ g纯化的杂交瘤上清液,所述杂交瘤上清液含有小鼠单克隆抗体45C1、125E1、163E12、166E2或175D10。由于胰腺DAN-G肿瘤细胞系在体内的侵略性以及迅速的肿瘤生长,小鼠发生肿瘤恶病质,并在几天内死亡。尽管因此测量疗效的窗口非常狭窄,但在此模型中也观察到了本发明抗体介导的肿瘤生长抑制以及存活延长(图27A和27B)。

[0541] d. 本发明的抗体在小鼠中不引发副作用

[0542] 在RT-PCR分析中使用小鼠CLD18A2特异性引物对(正义:CTA CCA AGG GCT ATG GCG TTC,反义:GCA CCG AAG GTG TAC CTG GTC)从一组广泛的正常小鼠组织中扩增cDNA(见图28)。

[0543] 除了胃以外,所测试的任何正常组织中均检测不到小鼠CLD18A2表达(见图28)。此外,使用与人及小鼠CLD18A2交叉反应的CLD18A2特异性抗体在多种正常小鼠组织中进行CLD18A2表达的免疫组织化学分析(见表3)。除了正常胃组织以外,所有测试的正常组织均未显示CLD18A2表达。像我们对人CLD18A2所观察到的那样,我们对于小鼠对应物也发现,尽管表面上皮和更深处的隐窝细胞在其细胞表面表达CLD18A2,但中央的颈部却为CLD18A2阴性(见图29A-C)。总之,CLD18A2的组织分布看来在人和小鼠中相同。

[0544] 表3:通过免疫组织化学分析CLD18在小鼠正常组织中的表达

[0545]

组织	CLD18 表达
小脑	-
大脑	-
结肠	-

[0546]

食管	-
心	-
肾	-
肝	-
肺	-
淋巴结	-
卵巢	-
胰腺	-
骨骼肌	-
脾	-
胃	+
胸腺	-
膀胱	-

[0547] 我们还研究了抗体125E1、163E12、166E2和175D10在小鼠中介导的潜在副作用。所有这些抗体均先前通过FACS分析显示与小鼠CLD18A2以及所述人蛋白反应。

[0548] 使用这些抗体治疗过程中和治疗后未观察到任何可见的副作用,用抗体治疗的小鼠与未治疗(PBS处理)小鼠相比,胃粘膜中也没有观察到任何与毒性相关的组织形态学情况(见图30)。

[0549] 9. 抗体的嵌合

[0550] a. 产生小鼠/人嵌合单克隆抗体

[0551] 通过本领域技术人员已知的标准方法,从人外周血单个核细胞(PBMC)和人脾组织中制备总RNA,其后制备单链cDNA,例如使用RNeasy小量试剂盒(Qiagen)和Superscript II逆转录酶(Invitrogen)。

[0552] 通过PCR从PBMC cDNA中扩增人 κ 轻链的恒定区。正义寡聚物(SEQ ID NO:38)在恒定区的5'末端加入BamHI限制性位点,并将编码恒定区前两个氨基酸(Arg-Thr)的原始核酸序列5'-CGAACT-3'变成5'-CGTACG-3',产生BsiWI限制性位点而不改变氨基酸序列。反义寡聚物(SEQ ID NO:39)包含终止密码子,并在所扩增恒定区的3'末端加入NotI限制性位点。将PCR产物和标准表达载体(如pcDNA3.1(+),Invitrogen)依次与BamHI和NotI限制性酶一起孵育。另外用牛小肠碱性磷酸酶处理载体,以防止重新环化。最后将恒定区连接进载体中,从而其后可变区在恒定区之前的任何融合现在均有可能通过残留的载体多克隆位点中的HindIII限制性位点(5'-AAGCTT-3')和PCR产物中产生的BsiWI限制性位点(5'-CGTACG-3')来进行。插入该载体中的人 κ 轻链恒定区的序列如SEQ ID NO:40所列,该人 κ 恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:41所列。

[0553] 通过PCR从脾cDNA中扩增人 γ -1重链的恒定区。5'磷酸化的正义寡聚物(SEQ ID NO:42)置于位于恒定区起点下游11个核苷酸的天然存在的ApaI限制性位点上,并在所扩增的恒定区部分的5'末端加入HindIII限制性位点。5'磷酸化的反义寡聚物(SEQ ID NO:43)包含终止密码子,并在这样扩增的恒定区的3'末端加入NotI限制性位点。使这样产生的PCR

产物变为平末端,并5'磷酸化。通过使用区分性反义寡聚物(SEQ ID NO:44)的PCR以及通过测序证实扩增的 γ 恒定区为IgG1亚类。将带有不同于轻链表达所用载体中抗生素抗性(如新霉素)的抗生素抗性(如潮霉素)的标准表达载体(例如pcDNA3.1(+)/Hygro,Invitrogen)与PmeI限制性酶孵育,以完全除去多克隆位点,留下平末端。另外用牛小肠碱性磷酸酶处理载体,以防止重新环化。最后将恒定区连接进载体中,从而其后可变区在恒定区之前的任何融合现在均有可能通过PCR产物产生的HindIII限制性位点(5'-AAGCTT-3')和通过ApaI限制性位点(5'-GGGCCC-3')来实现。通过测序来证实恒定区在载体中正确的取向,即适于该载体中上述启动子的取向。由于ApaI限制性位点的位置,用于此目的的任何可变区扩增均需包含除ApaI位点以外的人 γ -1恒定区序列中前11个核苷酸。插入载体中的这样扩增的人 γ -1重链恒定区序列如SEQ ID NO:45所列,这样表达的人 γ -1恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:46所列。

[0554] 表4:用于抗体克隆的小鼠杂交瘤细胞系

[0555]

	克隆	mAb	同种型	可变区	PCR中的寡聚物对	嵌合抗体
重链	43A11	182-D1106-062	IgG2a	SEQ ID NO:55, 132	SEQ ID NO:70, 71	SEQ ID NO:100, 115
	163E12	182-D1106-294	IgG3	SEQ ID NO:56, 133	SEQ ID NO:72, 73	SEQ ID NO:101, 116
	125E1	182-D1106-279	IgG2a	SEQ ID NO:57, 134	SEQ ID NO:74, 75	SEQ ID NO:102, 117
	166E2	182-D1106-308	IgG3	SEQ ID NO:59, 136	SEQ ID NO:78, 79	SEQ ID NO:104, 119
	175D10	182-D1106-362	IgG1	SEQ ID NO:58, 135	SEQ ID NO:76, 77	SEQ ID NO:103, 118
	45C1	182-D758-187	IgG2a	SEQ ID NO:60, 137	SEQ ID NO:80,81	SEQ ID NO:105, 120
轻链	43A11	182-D1106-062	IgK	SEQ ID NO:62, 139	SEQ ID NO:84, 85	SEQ ID NO:107, 122
	163E12	182-D1106-294	IgK	SEQ ID NO:61, 138	SEQ ID NO:82, 83	SEQ ID NO:106, 121
	125E1	182-D1106-279	IgK	SEQ ID NO:63, 140	SEQ ID NO:86, 87	SEQ ID NO:108, 123
	166E2	182-D1106-308	IgK	SEQ ID NO:66, 143	SEQ ID NO:92, 93	SEQ ID NO:111, 126
	175D10	182-D1106-362	IgK	SEQ ID NO:65, 142	SEQ ID NO:90, 91	SEQ ID NO:110, 125
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:64, 141	SEQ ID NO:88, 89	SEQ ID NO:109, 124
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:67, 144	SEQ ID NO:94, 95	SEQ ID NO:112, 127
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:68, 145	SEQ ID NO:96, 97	SEQ ID NO:113, 128
45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:69, 146	SEQ ID NO:98, 99	SEQ ID NO:114, 129	

[0556] 对应于其小鼠对应物,嵌合单克隆抗体通过加前缀“ch-”来命名,例如ch-43A11、ch-163E12、ch-125E1、ch-166E2、ch-175D10、ch-45C1。

[0557] 小鼠轻链及重链可变区的扩增按照Matz等(Nucleic Acids Research,1999,第27卷, No.6)描述的“step-out PCR”法进行。为此,通过本领域技术人员已知的标准方法从单克隆杂交瘤细胞系(见表4)中制备总RNA,例如使用RNeasy小量试剂盒(Qiagen)。根据“模板-转换”法制备单链cDNA,其也由Matz等(Nucleic Acids Research,1999,第27卷, No.6, 1558)描述。除了(dT)30寡聚物(SEQ ID NO:47)以外,它还包括DNA/RNA杂交寡聚物(SEQ ID NO:48)作为5'接头,用于在cDNA链的聚合过程中的模板转换。在这种接头寡聚物中,最后3

个核苷酸以核糖核苷酸代替脱氧核糖核苷酸。其后的“step-out PCR”使用靶向小鼠 κ 链恒定区或者靶向 γ 链1、2a或3亚类(分别为SEQ ID NO:49至52)恒定区的反义寡聚物。通过杂交瘤细胞系产生的IgG亚类小鼠单克隆抗体先前以IsoStrip进行了免疫学分析(见实施例1),相应地选择适当的反义寡聚物(见表4)。引物混合物在“step-out PCR”中作为正义寡聚物,其包含SEQ ID NO:53及54所列出的两种寡聚物。一些杂交瘤细胞系表达不止一个重链或轻链(除了用于产生杂交瘤的骨髓瘤细胞系所表达的链以外)。表4总结了克隆并测序的小鼠抗体链可变区(SEQ ID NO:55至69和SEQ ID NO:132至146)和克隆并测序的全长嵌合抗体链(SEQ ID NO:100to 129)的SEQ ID NO。

[0558] 接着通过省略5'UTR和3'小鼠恒定区并在末端加入限制性位点的PCR来扩增所鉴定的小鼠可变区,所述限制性位点允许亚克隆进所制备的带有人恒定区的表达载体中。此外,正义寡聚物提供共有的Kozak序列(5'-GCCGCCACC-3'或5'-AGCCACC-3'),用于重链可变区的反义寡聚物包含除ApaI限制性位点以外的人 γ -1恒定区前11个核苷酸(见表4,SEQ ID NO:70至99)。使用HindIII和BsiWI限制性酶克隆 κ 轻链可变区, γ 重链可变区需要HindIII和ApaI限制性酶。单克隆抗体45C1的 γ 重链可变区含有内部的HindIII限制性位点——此时使用相容的BsaI酶来代替(见SEQ ID NO:80)。SEQ ID NO:100至114显示所得嵌合抗体的核酸序列(见表4)。SEQ ID NO:115至129显示相应表达的嵌合抗体的氨基酸序列(见表4)。

[0559] b. 产生并生产针对CLD18的嵌合抗体

[0560] 产生了生产具有CLD18特异性的嵌合抗体的哺乳动物细胞系。该细胞系来源于HEK293T细胞(ATCC CRL-11268)。转染前一天,将 2.5×10^7 个细胞铺在14.5cm组织培养皿中并在20ml完全培养基中培养,或者将 1×10^7 个细胞铺在10cm组织培养皿中并在10ml完全培养基中培养,或者将 0.6×10^6 个细胞铺在12孔组织培养板中并在2-3ml完全培养基中培养(完全培养基:补充了10%FBS的无抗生素DMEM:F12培养基)。转染时推荐的细胞密度应为90%汇合。在临转染前将培养基替换为新鲜培养基。用转染试剂转染HEK293T细胞,例如Lipofectamine 2000(Invitrogen,11668-019)或者聚乙烯亚胺(PEI)(Sigma-Aldrich,408727)。HEK293T细胞的转染的示例为,将量为110 μ g或296 μ g的总DNA用于14.5cm培养皿,转染剂与DNA的比例对于Lipofectamine 2000和PEI分别为1:2.5和1:12。转染后24小时将培养基替换为GMP适用培养基,如X-Vivo 15(Cambrex),或者化学成分确定的培养基,如无血清的Pro293a(Cambrex)。将产生针对CLD18的嵌合单克隆抗体的转染HEK293T细胞再培养96小时。收获粗制上清液,无菌过滤并通过蛋白A-琼脂糖纯化。通过BCA测定来测定抗体浓度,通过十二烷基硫酸钠凝胶电泳和考马斯染色检查纯度。

[0561] c. 嵌合单克隆抗体的结合特征

[0562] 如实施例3所述,通过流式细胞术分析克隆并产生的针对CLD18A2嵌合单克隆抗体。在4 $^{\circ}$ C下将稳定表达人CLD18A2(HEK293-CLD18A2)的HEK293活细胞和稳定表达人CLD18A1(SEQ ID NO:7、8)(HEK293-CLD18A1)的HEK293细胞与含有嵌合单克隆抗体的经纯化的HEK293T细胞培养上清液孵育30分钟,其后与APC缀合的F(ab')₂片段山羊抗人IgG Fc γ 第二抗体孵育,并用PI复染。使用BD FACSAarray,通过流式细胞术评估结合。

[0563] 类似地,通过流式细胞术分析内源表达CLD18A2的人肿瘤细胞系,例如KATO-III和NUGC-4细胞。

[0564] 图31A和B显示嵌合抗体ch-43A11、ch-125E1、ch-163E12、ch-166E2和ch-175D10的

流式细胞术分析。它们均显示天然表位识别,并显示对CLD18A2而不是CLD18A1表达细胞的强且特异性的结合。

[0565] d. 补体依赖性细胞毒性 (CDC)

[0566] 通过从健康志愿者中抽血至Serum-Monovette真空管 (Sarstedt, Nürnberg, Germany) 中接着以600g离心20分钟来制备用于补体裂解的血清。收获血清并保存在-20℃。对照血清在保存前在56℃下热灭活30分钟。

[0567] 对蛋白A-琼脂糖纯化的本发明嵌合抗体分析其针对内源表达人CLD18A2的KATO-III细胞以及稳定转染的CHO-CLD18A2细胞诱导补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的能力。在37℃下将细胞与终浓度2.5μg/ml至35μg/ml的单克隆抗体ch-163E12、ch-166E2和ch-175D10分别孵育30分钟。将RPMI中的20%人血清加入细胞中,在37℃下再孵育30分钟。其后,通过终浓度为2.5μg/ml的PI染色来区分死细胞和活细胞,通过流式细胞术测定抗体介导的细胞裂解百分比。对于流式细胞术,使用BD FACSAarray流式细胞仪 (BD Biosciences, Mountain View, CA)。收集至少10000个事件用于分析,通过调整前侧向散射 (FSC/SSC) 阈值来排除细胞碎片。通过下式计算特异性裂解:特异性裂解=(%样品中的PI阳性细胞-%使用热灭活血清的样品中的PI阳性细胞)。对若干抗体显示了CDC介导的特异性裂解。全部三种抗体均对CHO-CLD18A2细胞介导强CDC (图32)。对于KATO-III细胞,抗体ch-163E12和ch-175D10是强CDC的诱导物。

[0568] e. 抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)

[0569] 对FPLC纯化的本发明嵌合抗体分析其针对内源表达人CLD18A2的KATO-III细胞诱导抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 的能力。

[0570] 将来自健康供体的人血在磷酸缓冲液 (PBS) 中稀释两次,血细胞在Ficoll (1077g/ml, Pharmacia) 上分层。离心后,从界面中分离外周血单个核细胞 (PBMC),洗涤并重悬在补充了5%热灭活胎牛血清的X-Vivo-15培养基中。

[0571] 测定前15小时,用萤光素酶转染KATO-III细胞,并以 5×10^4 个细胞/孔铺在白色微孔板中。

[0572] 对于此测定,以效应细胞与靶细胞 (E:T) 比例20:1加入效应细胞 (PBMC, 如上述制备) 和FPLC纯化的嵌合抗体,并在37℃、5% CO₂下孵育2-3小时。抗体在孔中的终浓度为50μg/ml。预孵育2-3小时后,以1mg/ml加入荧光黄 (BD Biosciences, San Jose USA)。使用微孔板阅读器 (Infinite200, Tecan, Switzerland) 连续测量活细胞萤光素酶氧化荧光黄所产生的发光多达6小时。使用下式计算细胞毒性百分比:特异性裂解%= $100 - ((\text{样品发光计数} - \text{自发发光计数}) / (\text{最大发光计数} - \text{自发发光计数}) \times 100)$,自发发光通过加入Triton X-100 (0.2%终浓度) 来测定,在不存在抗体的情况下测量最大信号。

[0573] 使用此测定显示,单克隆抗体ch-163E12和ch-175D10对KATO-III细胞介导强ADCC (图33)。

[0574] f. 增殖抑制

[0575] 对FPLC纯化的本发明嵌合抗体分析其抑制内源表达CLD18A2的KATO-III细胞的细胞生长的能力。在各个嵌合抗体存在下培养靶细胞 (KATO-III) (见小鼠抗体的增殖抑制,实施例7)。显示FPLC纯化的嵌合抗体ch-163E12和ch-166E2抑制细胞增殖。

[0576] 10. 选择抗体作为候选临床先导药物

[0577] 理想的临床先导药物可涵盖多种治疗和诊断应用(还参阅IV章节-本发明的用途和方法)。根据本发明,提供了针对CLD18-A2的抗体。已经显示,根据本发明提供的抗体在特异性、在特定肿瘤细胞中诱导CDC和ADCC以及抑制表达CLD18的细胞增殖的方面提供广谱的特性。此外,已经证明,抗体的嵌合可使之获得亲本小鼠分子中不存在的另外的Fc依赖性效应功能。例如,本文已经显示,带有小鼠IgG1的抗体175D10不诱导补体依赖性细胞毒性(见实施例5),而带有人IgG1的ch-175D10诱导特异性裂解组成型表达CLD18的肿瘤细胞(见表5和表6)。

[0578] 本发明提供的抗体可根据其结合特性和对表达CLD18的细胞介导效应功能的能力而归类到不同的类中。可以基于其功能特征而在本发明提供的抗体中选择候选临床先导药物。所选择的本发明小鼠及嵌合抗体的特性概述分别在表5和表6中给出。

[0579] 本发明的候选临床先导药物可具有一种或多种以下特性:

[0580] a) 结合人CLD18A2,但不结合人CLD18A1(例如43A11、45C1、125E1、163E12、166E2和175D10,以及ch-43A11、ch-45C1、ch-125E1、ch-163E12、ch-166E2和ch-175D10)。例如见图6A和6B。

[0581] b) 结合小鼠CLD18A2,但不结合小鼠CLD18A1(例如125E1、163E12、166E2和175D10)。例如见图15A和15B。

[0582] c) 结合肿瘤细胞天然表达的CLD18(例如45C1、43A11、125E1、163E12、166E2和175D10,以及ch-45C1、ch-43A11、ch-125E1、ch-163E12、ch-166E2和ch-175D10)。例如见图13。

[0583] d) 结合胞间接触区中的CLD18(例如45C1、43A11、125E1、163E12、166E2和175D10)。例如见图12A和12B。

[0584] e) 介导CDC诱导的杀伤表达CLD18的细胞(例如45C1、125E1、163E12、166E2和175D10,以及ch-163E12和ch-175D10)。例如见图32。

[0585] f) 介导ADCC诱导的杀伤表达CLD18的细胞(例如ch-163E12和ch-175D10)。例如见图33。

[0586] g) 抑制表达CLD18的细胞增殖(例如45C1、125E1、163E12、166E2和175D10,以及ch-163E12和ch-166E2)。

[0587] h) 在使用表达CLD18的细胞的异种移植模型中抑制肿瘤生长(例如43A11、125E1、163E12、166E2和175D10)。例如见图24。

[0588] i) 在使用表达CLD18的细胞的异种移植模型中延长存活(例如43A11、125E1、163E12、166E2和175D10)。例如见图25B。

[0589] 用于选择候选先导药物的特性概述

[0590] 表5:小鼠抗体

[0591]

抗体	结合人 CLD18A2 但不结合 A1	结合小鼠 CLD18A2 但不结合A1	结合肿瘤 细胞天然 表达的 CLD18	结合肿瘤 细胞天然 表达的 CLD18	对表达 CLD18 的细胞介 导 CDC	抑制表 达 CLD18 的细胞 增殖	在表达 CLD18的 异种移植 物中抑制 肿瘤生长	在表达 CLD18的 异种移植 物中延长 存活
45C1	+	-	+	+	(+)	+	(+)	(+)
125E1	+	+	+	+	(+)	+	+	+
163E12	+	+	+	+	+	+	+	+
175D10	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+

[0592] 图例:+性能优秀,(+)在不同条件中的性能。

[0593] 表6:嵌合抗体

抗体	结合人 CLD18A 2但不结 合A1	结合肿瘤 细胞天然 表达的 CLD18	对表达 CLD18的 细胞介导 CDC	对表达 CLD18的 细胞介导 ADCC	抑制表 达 CLD18的 细胞 增殖
ch-45C1	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
ch-125E1	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
ch-163E12	+	+	+	+	+
ch-175D10	+	+	+	+	n.d.

[0595] 图例:+性能优秀,(+)在不同条件中的性能,n.d.未进行

[0596] 新国际专利申请

[0597] 加尼梅德药物公司等

[0598] “用于治疗癌症的针对密蛋白-18的单克隆抗体”

[0599] 我方卷号:342-31 CNT2

[0600] 生物材料附加页

[0601] 其他保藏物的证明:

[0602] 1) 保藏物(DSM ACC2738,DSM ACC2739,DSM ACC2740,DSM ACC2741,DSM ACC2742,DSM ACC2743,DSM ACC-2745,DSM ACC2746,DSM ACC2747,DSM ACC2748)保藏机构的名称及地址为:

[0603] 德国微生物菌种保藏中心

[0604] Mascheroder Weg 1b

[0605] 38124Braunschweig

[0606] DE

- [0607] 2) 保藏物(DSM ACC2808,DSM ACC2809,DSM ACC2810)保藏机构的名称及地址为:
 [0608] 德国微生物菌种保藏中心
 [0609] Inhoffenstr.7 B
 [0610] 38124 Braunschweig
 [0611] DE
 [0612]

保藏日期	登记号	以下说明涉及在说明书中以下页的保藏微生物
2005年10月19日	DSM ACC2738	第13页第6行
2005年10月19日	DSM ACC2739	第13页第7行
2005年10月19日	DSM ACC2740	第13页第8行
2005年10月19日	DSM ACC2741	第13页第9行
2005年10月19日	DSM ACC2742	第13页第10行
2005年10月19日	DSM ACC2743	第13页第11行
2005年11月17日	DSM ACC2745	第13页第12行
2005年11月17日	DSM ACC2746	第13页第13行
2005年11月17日	DSM ACC2747	第13页第14行
2005年11月17日	DSM ACC2748	第13页第15行
2006年10月26日	DSM ACC2808	第13页第16行
2006年10月26日	DSM ACC2809	第13页第17行
2006年10月26日	DSM ACC2810	第13页第18行

- [0613] 对所有上文提到保藏物的其他说明
 [0614] -与小鼠(Mus musculus)脾细胞融合的小鼠(Mus musculus)骨髓瘤P3X63 Ag8U.1
 [0615] -分泌抗人密蛋白-18A2抗体的杂交瘤
 [0616] 3) 保藏人:所有上述保藏均由以下保藏人进行:
 [0617] 加尼梅德药物公司
 [0618] Freiligrathstrafle 12
 [0619] 55131 Mainz
 [0620] DE
 [0621]

申请人或代理人的文件号342-31PCT	国际申请号PCT/EP2006/011302
----------------------	------------------------

- [0622] 涉及保藏微生物或其他生物材料的说明
 [0623] (PCT第13条)

[0624]

A.下文的说明涉及说明书中第 13 页第 5 行提到的保藏微生物或其他生物材料	
B.保藏标识 附加页上标识了其他保藏物 <input checked="" type="checkbox"/>	
保藏机构名称 德国微生物菌种保藏中心	
保藏机构地址（包括邮编和国家） Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
保藏日 2005 年 10 月 19 日	登记号 DSM ACC2737
C.附加说明（如不适用则留空） 该信息在附加页上继续 <input type="checkbox"/>	
与小鼠（ Mus musculus ）脾细胞融合的小鼠（ Mus musculus ）骨髓瘤 P3X63Ag8U.1 分泌针对人密蛋白- 18A2 的抗体的杂交瘤	
D. 说明的指定国（如果并非针对所有指定国）	
E.其他补充说明（如果不适用则留空）	
以下列出的说明将随后递交至国际局（指明说明的一般性质，如“保藏登记号”	
仅用于接收局	仅用于国际局
<input type="checkbox"/> 本页与国际申请一起接收	<input type="checkbox"/> 本页由国际局接收于：
授权官员	授权官员

[0625] PCT/RO/134表(1998年7月;2004年1月再版)

[0626] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0627] 国际表格

[0628] 加尼梅德药物公司

[0629] Freiligrathstr.12

[0630] 55131 Mainz

[0631]

I. 微生物标识	
保藏人提供的标识参考： 182-D1106-055	国际保藏机构提供的登记号： DSM ACC2737
II. 科学说明和/或建议的分类名称	
第 I 项中的微生物附随： [X] 科学说明 [] 分类名称建议 (用叉号标记适用项)	
III. 收到和接受	
本国际保藏机构接受以上第 I 项标明的微生物，其于 2005 年 10 月 19 日 收到(初次提交日期) ¹ 。	
IV. 收到转换类型请求书	
本国际保藏机构于 (初次提交日期) 收到以上第 I 项标明的微生物，并于 (初次提交日期) 收到将原始保藏转换为根据布达佩斯条约保藏的请求书。	
V. 国际保藏机构	
名称：德国微生物菌种保藏中心 地址： Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字： 日期：2005 年 11 月 01 日

[0632] ¹如果条款6.4.d)适用,该日期即为已经获得国际保藏机构状态的日期。

[0633] DSMZ-BP/4表(单页)12/2001

[0634] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0635] 国际表格

[0636] 存活证明

[0637]

由下页底部标示的

[0638] 加尼梅德药物公司

国际保藏机构

[0639] Freiligrathstr.12

根据第10条第2款颁发

[0640] 55131 Mainz

[0641]

I. 保藏人	II. 微生物标识
名称: 加尼梅德药物公司 地址: Freiligrathstr. 12 55131 Mainz	国际保藏机构提供的登记号: DSM ACC2737 保藏或转移日期 ¹ : 2005-10-19
III. 存活陈述	
于 2005-10-19 ² 检验了以上第 II 项中微生物的存活性, 在该日, 所述微生物 [X] ³ 存活 [] ³ 不再存活	
IV. 存活性检验条件 ⁴	
V. 国际保藏机构	
名称: 德国微生物菌种保藏中心 地址: Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字: 日期: 2005-11-01

[0642] ¹表示初次提交日期, 或者如果新提交或转移, 最近一次的相应日期 (新提交或转移日期)

[0643] ²适用于条款 10.2.a) ii) 和 iii), 标出最近的存活性检验

[0644] ³叉号标记适用类型

[0645] DSMZ-BP/4表 (首页) 12/2001

[0646] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0647] 国际表格

[0648] 加尼梅德药物公司

[0649] Freiligrathstr.12

[0650] 55131 Mainz

[0651]

I. 微生物标识	
保藏人提供的标识参考： 182-D1106-056	国际保藏机构提供的登记号： DSM ACC2738
II. 科学说明和/或建议的分类名称	
第 I 项中的微生物附随： [X] 科学说明 [] 分类名称建议 (用叉号标记适用项)	
III. 收到和接受	
本国际保藏机构接受以上第 I 项标明的微生物，其于 2005 年 10 月 19 日 收到(初次提交日期) ¹ 。	
IV. 收到转换类型请求书	
本国际保藏机构于 (初次提交日期) 收到以上第 I 项标明的微生物，并于 (初次提交日期) 收到将原始保藏转换为根据布达佩斯条约保藏的请求书。	
V. 国际保藏机构	
名称：德国微生物菌种保藏中心 地址： Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字： 日期：2005 年 11 月 01 日

[0652] ¹如果条款6.4.d)适用,该日期即为已经获得国际保藏机构状态的日期。

[0653] DSMZ-BP/4表(单页)12/2001

[0654] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0655] 国际表格

[0656] 存活证明

[0657]

由下页底部标示的

[0658] 加尼梅德药物公司

国际保藏机构

[0659] Freiligrathstr.12

根据第10条第2款颁发

[0660] 55131 Mainz

[0661]

I. 保藏人	II. 微生物标识
名称: 加尼梅德药物公司 地址: Freiligrathstr. 12 55131 Mainz	国际保藏机构提供的登记号: DSM ACC2738 保藏或转移日期 ¹ : 2005-10-19
III. 存活陈述	
于 2005-10-19 ² 检验了以上第 II 项中微生物的存活性, 在该日, 所述微生物 [X] ³ 存活 [] ³ 不再存活	
IV. 存活性检验条件 ⁴	
V. 国际保藏机构	
名称: 德国微生物菌种保藏中心 地址: Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字: 日期: 2005-11-01

[0662] ¹表示初次提交日期, 或者如果新提交或转移, 最近一次的相应日期 (新提交或转移日期)

[0663] ²适用于条款 10.2.a) ii) 和 iii), 标出最近的存活性检验

[0664] ³叉号标记适用类型

[0665] DSMZ-BP/4表 (首页) 12/2001

[0666] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0667] 国际表格

[0668] 加尼梅德药物公司

[0669] Freiligrathstr.12

[0670] 55131 Mainz

[0671]

I. 微生物标识	
保藏人提供的标识参考： 182-D1106-057	国际保藏机构提供的登记号： DSM ACC2739
II. 科学说明和/或建议的分类名称	
第 I 项中的微生物附随： [X] 科学说明 [] 分类名称建议 (用叉号标记适用项)	
III. 收到和接受	
本国际保藏机构接受以上第 I 项标明的微生物，其于 2005 年 10 月 19 日 收到(初次提交日期) ¹ 。	
IV. 收到转换类型请求书	
本国际保藏机构于 (初次提交日期) 收到以上第 I 项标明的微生物，并于 (初次提交日期) 收到将原始保藏转换为根据布达佩斯条约保藏的请求书。	
V. 国际保藏机构	
名称：德国微生物菌种保藏中心 地址： Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字： 日期：2005 年 11 月 01 日

[0672] ¹如果条款6.4.d)适用,该日期即为已经获得国际保藏机构状态的日期。

[0673] DSMZ-BP/4表(单页)12/2001

[0674] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0675] 国际表格

[0676] 存活证明

[0677]

由下页底部标示的

[0678] 加尼梅德药物公司

国际保藏机构

[0679] Freiligrathstr.12

根据第10条第2款颁发

[0680] 55131 Mainz

[0681]

I. 保藏人	II. 微生物标识
名称: 加尼梅德药物公司 地址: Freiligrathstr. 12 55131 Mainz	国际保藏机构提供的登记号: DSM ACC2739 保藏或转移日期 ¹ : 2005-10-19
III. 存活陈述	
于 2005-10-19 ² 检验了以上第 II 项中微生物的存活性, 在该日, 所述微生物 [X] ³ 存活 [] ³ 不再存活	
IV. 存活性检验条件 ⁴	
V. 国际保藏机构	
名称: 德国微生物菌种保藏中心 地址: Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字: 日期: 2005-11-01

[0682] ¹表示初次提交日期, 或者如果新提交或转移, 最近一次的相应日期 (新提交或转移日期)

[0683] ²适用于条款 10.2.a) ii) 和 iii), 标出最近的存活性检验

[0684] ³叉号标记适用类型

[0685] DSMZ-BP/4表 (首页) 12/2001

[0686] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0687] 国际表格

[0688] 加尼梅德药物公司

[0689] Freiligrathstr.12

[0690] 55131 Mainz

[0691]

I. 微生物标识	
保藏人提供的标识参考： 182-D1106-058	国际保藏机构提供的登记号： DSM ACC2740
II. 科学说明和/或建议的分类名称	
第 I 项中的微生物附随： [X] 科学说明 [] 分类名称建议 (用叉号标记适用项)	
III. 收到和接受	
本国际保藏机构接受以上第 I 项标明的微生物，其于 2005 年 10 月 19 日 收到(初次提交日期) ¹ 。	
IV. 收到转换类型请求书	
本国际保藏机构于 (初次提交日期) 收到以上第 I 项标明的微生物，并于 (初次提交日期) 收到将原始保藏转换为根据布达佩斯条约保藏的请求书。	
V. 国际保藏机构	
名称：德国微生物菌种保藏中心 地址： Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字： 日期：2005 年 11 月 01 日

[0692] ¹如果条款6.4.d)适用，该日期即为已经获得国际保藏机构状态的日期。

[0693] DSMZ-BP/4表(单页)12/2001

[0694] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0695] 国际表格

[0696] 存活证明

[0697] 由下页底部标示的

[0698] 加尼梅德药物公司 国际保藏机构

[0699] Freiligrathstr.12 根据第10条第2款颁发

[0700] 55131 Mainz

[0701]

I. 保藏人	II. 微生物标识
名称: 加尼梅德药物公司 地址: Freiligrathstr. 12 55131 Mainz	国际保藏机构提供的登记号: DSM ACC2740 保藏或转移日期 ¹ : 2005-10-19
III. 存活陈述	
于 2005-10-19 ² 检验了以上第 II 项中微生物的存活性, 在该日, 所述微生物 [X] ³ 存活 [] ³ 不再存活	
IV. 存活性检验条件 ⁴	
V. 国际保藏机构	
名称: 德国微生物菌种保藏中心 地址: Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字: 日期: 2005-11-01

[0702] ¹表示初次提交日期, 或者如果新提交或转移, 最近一次的相应日期 (新提交或转移日期)

[0703] ²适用于条款 10.2.a) ii) 和 iii), 标出最近的存活性检验

[0704] ³叉号标记适用类型

[0705] DSMZ-BP/4表 (首页) 12/2001

[0706] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0707] 国际表格

[0708] 加尼梅德药物公司

[0709] Freiligrathstr.12

[0710] 55131 Mainz

[0711]

I. 微生物标识	
保藏人提供的标识参考： 182-D1106-059	国际保藏机构提供的登记号： DSM ACC2741
II. 科学说明和/或建议的分类名称	
第 I 项中的微生物附随： [X] 科学说明 [] 分类名称建议 (用叉号标记适用项)	
III. 收到和接受	
本国际保藏机构接受以上第 I 项标明的微生物，其于 2005 年 10 月 19 日 收到(初次提交日期) ¹ 。	
IV. 收到转换类型请求书	
本国际保藏机构于 (初次提交日期) 收到以上第 I 项标明的微生物，并于 (初次提交日期) 收到将原始保藏转换为根据布达佩斯条约保藏的请求书。	
V. 国际保藏机构	
名称：德国微生物菌种保藏中心 地址： Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字： 日期：2005 年 11 月 01 日

[0712] ¹如果条款6.4.d)适用,该日期即为已经获得国际保藏机构状态的日期。

[0713] DSMZ-BP/4表(单页)12/2001

[0714] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0715] 国际表格

[0716] 存活证明

[0717] 由下页底部标示的

[0718] 加尼梅德药物公司 国际保藏机构

[0719] Freiligrathstr.12 根据第10条第2款颁发

[0720] 55131 Mainz

[0721]

I. 保藏人	II. 微生物标识
名称: 加尼梅德药物公司 地址: Freiligrathstr. 12 55131 Mainz	国际保藏机构提供的登记号: DSM ACC2741 保藏或转移日期 ¹ : 2005-10-19
III. 存活陈述	
于 2005-10-19 ² 检验了以上第 II 项中微生物的存活性, 在该日, 所述微生物 [X] ³ 存活 [] ³ 不再存活	
IV. 存活性检验条件 ⁴	
V. 国际保藏机构	
名称: 德国微生物菌种保藏中心 地址: Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字: 日期: 2005-11-01

[0722] ¹表示初次提交日期, 或者如果新提交或转移, 最近一次的相应日期 (新提交或转移日期)

[0723] ²适用于条款 10.2.a) ii) 和 iii), 标出最近的存活性检验

[0724] ³叉号标记适用类型

[0725] DSMZ-BP/4表 (首页) 12/2001

[0726] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0727] 国际表格

[0728] 加尼梅德药物公司

[0729] Freiligrathstr.12

[0730] 55131 Mainz

[0731]

I. 微生物标识	
保藏人提供的标识参考： 182-D1106-062	国际保藏机构提供的登记号： DSM ACC2742
II. 科学说明和/或建议的分类名称	
第 I 项中的微生物附随： [X] 科学说明 [] 分类名称建议 (用叉号标记适用项)	
III. 收到和接受	
本国际保藏机构接受以上第 I 项标明的微生物，其于 2005 年 10 月 19 日 收到(初次提交日期) ¹ 。	
IV. 收到转换类型请求书	
本国际保藏机构于 (初次提交日期) 收到以上第 I 项标明的微生物，并于 (初次提交日期) 收到将原始保藏转换为根据布达佩斯条约保藏的请求书。	
V. 国际保藏机构	
名称：德国微生物菌种保藏中心 地址： Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字： 日期：2005 年 11 月 01 日

[0732] ¹如果条款6.4.d) 适用，该日期即为已经获得国际保藏机构状态的日期。

[0733] DSMZ-BP/4表(单页) 12/2001

[0734] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0735] 国际表格

[0736] 存活证明

[0737]

由下页底部标示的

[0738] 加尼梅德药物公司

国际保藏机构

[0739] Freiligrathstr.12

根据第10条第2款颁发

[0740] 55131 Mainz

[0741]

I. 保藏人	II. 微生物标识
名称: 加尼梅德药物公司 地址: Freiligrathstr. 12 55131 Mainz	国际保藏机构提供的登记号: DSM ACC2742 保藏或转移日期 ¹ : 2005-10-19
III. 存活陈述	
于 2005-10-19 ² 检验了以上第 II 项中微生物的存活性, 在该日, 所述微生物 [X] ³ 存活 [] ³ 不再存活	
IV. 存活性检验条件 ⁴	
V. 国际保藏机构	
名称: 德国微生物菌种保藏中心 地址: Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字: 日期: 2005-11-01

[0742] ¹表示初次提交日期, 或者如果新提交或转移, 最近一次的相应日期 (新提交或转移日期)

[0743] ²适用于条款 10.2.a) ii) 和 iii), 标出最近的存活性检验

[0744] ³叉号标记适用类型

[0745] DSMZ-BP/4表 (首页) 12/2001

[0746] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0747] 国际表格

[0748] 加尼梅德药物公司

[0749] Freiligrathstr.12

[0750] 55131 Mainz

[0751]

I. 微生物标识	
保藏人提供的标识参考： 182-D1106-067	国际保藏机构提供的登记号： DSM ACC2743
II. 科学说明和/或建议的分类名称	
第 I 项中的微生物附随： [X] 科学说明 [] 分类名称建议 (用叉号标记适用项)	
III. 收到和接受	
本国际保藏机构接受以上第 I 项标明的微生物，其于 2005 年 10 月 19 日 收到(初次提交日期) ¹ 。	
IV. 收到转换类型请求书	
本国际保藏机构于 (初次提交日期) 收到以上第 I 项标明的微生物，并于 (初次提交日期) 收到将原始保藏转换为根据布达佩斯条约保藏的请求书。	
V. 国际保藏机构	
名称：德国微生物菌种保藏中心 地址： Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字： 日期：2005 年 11 月 01 日

[0752] ¹如果条款6.4.d)适用,该日期即为已经获得国际保藏机构状态的日期。

[0753] DSMZ-BP/4表(单页)12/2001

[0754] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0755] 国际表格

[0756] 存活证明

[0757] 由下页底部标示的

[0758] 加尼梅德药物公司 国际保藏机构

[0759] Freiligrathstr.12 根据第10条第2款颁发

[0760] 55131 Mainz

[0761]

I. 保藏人	II. 微生物标识
名称: 加尼梅德药物公司 地址: Freiligrathstr. 12 55131 Mainz	国际保藏机构提供的登记号: DSM ACC2743 保藏或转移日期 ¹ : 2005-10-19
III. 存活陈述	
于 2005-10-19 ² 检验了以上第 II 项中微生物的存活性, 在该日, 所述微生物 [X] ³ 存活 [] ³ 不再存活	
IV. 存活性检验条件 ⁴	
V. 国际保藏机构	
名称: 德国微生物菌种保藏中心 地址: Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字: 日期: 2005-11-01

[0762] ¹表示初次提交日期, 或者如果新提交或转移, 最近一次的相应日期 (新提交或转移日期)

[0763] ²适用于条款 10.2.a) ii) 和 iii), 标出最近的存活性检验

[0764] ³叉号标记适用类型

[0765] DSMZ-BP/4表 (首页) 12/2001

[0766] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0767] 国际表格

[0768] 加尼梅德药物公司

[0769] Freiligrathstr.12

[0770] 55131 Mainz

[0771]

I. 微生物标识	
保藏人提供的标识参考： 182-D758-035	国际保藏机构提供的登记号： DSM ACC2745
II. 科学说明和/或建议的分类名称	
第 I 项中的微生物附随： [X] 科学说明 [] 分类名称建议 (用叉号标记适用项)	
III. 收到和接受	
本国际保藏机构接受以上第 I 项标明的微生物，其于 2005 年 11 月 17 日 收到(初次提交日期) ¹ 。	
IV. 收到转换类型请求书	
本国际保藏机构于 (初次提交日期) 收到以上第 I 项标明的微生物，并于 (初次提交日期) 收到将原始保藏转换为根据布达佩斯条约保藏的请求书。	
V. 国际保藏机构	
名称：德国微生物菌种保藏中心 地址： Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字： 日期：2005 年 12 月 05 日

[0772] ¹如果条款6.4.d) 适用，该日期即为已经获得国际保藏机构状态的日期。

[0773] DSMZ-BP/4表(单页) 12/2001

[0774] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0775] 国际表格

[0776] 存活证明

[0777]

由下页底部标示的

[0778] 加尼梅德药物公司

国际保藏机构

[0779] Freiligrathstr.12

根据第10条第2款颁发

[0780] 55131 Mainz

[0781]

I. 保藏人	II. 微生物标识
名称: 加尼梅德药物公司 地址: Freiligrathstr. 12 55131 Mainz	国际保藏机构提供的登记号: DSM ACC2745 保藏或转移日期 ¹ : 2005-11-17
III. 存活陈述	
于 2005-11-21 ² 检验了以上第 II 项中微生物的存活性, 在该日, 所述微生物 [X] ³ 存活 [] ³ 不再存活	
IV. 存活性检验条件 ⁴	
V. 国际保藏机构	
名称: 德国微生物菌种保藏中心 地址: Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字: 日期: 2005-12-05

[0782] ¹表示初次提交日期, 或者如果新提交或转移, 最近一次的相应日期 (新提交或转移日期)

[0783] ²适用于条款 10.2.a) ii) 和 iii), 标出最近的存活性检验

[0784] ³叉号标记适用类型

[0785] DSMZ-BP/4表 (首页) 12/2001

[0786] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0787] 国际表格

[0788] 加尼梅德药物公司

[0789] Freiligrathstr.12

[0790] 55131 Mainz

[0791]

I. 微生物标识	
保藏人提供的标识参考： 182-D758-036	国际保藏机构提供的登记号： DSM ACC2746
II. 科学说明和/或建议的分类名称	
第 I 项中的微生物附随： [X] 科学说明 [] 分类名称建议 (用叉号标记适用项)	
III. 收到和接受	
本国际保藏机构接受以上第 I 项标明的微生物，其于 2005 年 11 月 17 日 收到(初次提交日期) ¹ 。	
IV. 收到转换类型请求书	
本国际保藏机构于 (初次提交日期) 收到以上第 I 项标明的微生物，并于 (初次提交日期) 收到将原始保藏转换为根据布达佩斯条约保藏的请求书。	
V. 国际保藏机构	
名称：德国微生物菌种保藏中心 地址： Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字： 日期：2005 年 12 月 05 日

[0792] ¹如果条款6.4.d) 适用，该日期即为已经获得国际保藏机构状态的日期。

[0793] DSMZ-BP/4表(单页) 12/2001

[0794] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0795] 国际表格

[0796] 存活证明

[0797]

由下页底部标示的

[0798] 加尼梅德药物公司

国际保藏机构

[0799] Freiligrathstr.12

根据第10条第2款颁发

[0800] 55131 Mainz

[0801]

I. 保藏人	II. 微生物标识
名称: 加尼梅德药物公司 地址: Freiligrathstr. 12 55131 Mainz	国际保藏机构提供的登记号: DSM ACC2746 保藏或转移日期 ¹ : 2005-11-17
III. 存活陈述	
于 2005-11-21 ² 检验了以上第 II 项中微生物的存活性, 在该日, 所述微生物 [X] ³ 存活 [] ³ 不再存活	
IV. 存活性检验条件 ⁴	
V. 国际保藏机构	
名称: 德国微生物菌种保藏中心 地址: Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字: 日期: 2005-12-05

[0802] ¹表示初次提交日期, 或者如果新提交或转移, 最近一次的相应日期 (新提交或转移日期)

[0803] ²适用于条款 10.2.a) ii) 和 iii), 标出最近的存活性检验

[0804] ³叉号标记适用类型

[0805] DSMZ-BP/4表 (首页) 12/2001

[0806] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0807] 国际表格

[0808] 加尼梅德药物公司

[0809] Freiligrathstr.12

[0810] 55131 Mainz

[0811]

I. 微生物标识	
保藏人提供的标识参考： 182-D758-040	国际保藏机构提供的登记号： DSM ACC2747
II. 科学说明和/或建议的分类名称	
第 I 项中的微生物附随： [X] 科学说明 [] 分类名称建议 (用叉号标记适用项)	
III. 收到和接受	
本国际保藏机构接受以上第 I 项标明的微生物，其于 2005 年 11 月 17 日 收到(初次提交日期) ¹ 。	
IV. 收到转换类型请求书	
本国际保藏机构于 (初次提交日期) 收到以上第 I 项标明的微生物，并于 (初次提交日期) 收到将原始保藏转换为根据布达佩斯条约保藏的请求书。	
V. 国际保藏机构	
名称：德国微生物菌种保藏中心 地址： Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字： 日期：2005 年 12 月 05 日

[0812] ¹如果条款6.4.d)适用,该日期即为已经获得国际保藏机构状态的日期。

[0813] DSMZ-BP/4表(单页)12/2001

[0814] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0815] 国际表格

[0816] 存活证明

[0817]

由下页底部标示的

[0818] 加尼梅德药物公司

国际保藏机构

[0819] Freiligrathstr.12

根据第10条第2款颁发

[0820] 55131 Mainz

[0821]

I. 保藏人	II. 微生物标识
名称: 加尼梅德药物公司 地址: Freiligrathstr. 12 55131 Mainz	国际保藏机构提供的登记号: DSM ACC2747 保藏或转移日期 ¹ : 2005-11-17
III. 存活陈述	
于 2005-11-21 ² 检验了以上第 II 项中微生物的存活性, 在该日, 所述微生物 [X] ³ 存活 [] ³ 不再存活	
IV. 存活性检验条件 ⁴	
V. 国际保藏机构	
名称: 德国微生物菌种保藏中心 地址: Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字: 日期: 2005-12-05

[0822] ¹表示初次提交日期, 或者如果新提交或转移, 最近一次的相应日期 (新提交或转移日期)

[0823] ²适用于条款 10.2.a) ii) 和 iii), 标出最近的存活性检验

[0824] ³叉号标记适用类型

[0825] DSMZ-BP/4表 (首页) 12/2001

[0826] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0827] 国际表格

[0828] 加尼梅德药物公司

[0829] Freiligrathstr.12

[0830] 55131 Mainz

[0831]

I. 微生物标识	
保藏人提供的标识参考： 182-D1106-061	国际保藏机构提供的登记号： DSM ACC2748
II. 科学说明和/或建议的分类名称	
第 I 项中的微生物附随： [X] 科学说明 [] 分类名称建议 (用叉号标记适用项)	
III. 收到和接受	
本国际保藏机构接受以上第 I 项标明的微生物，其于 2005 年 11 月 17 日 收到(初次提交日期) ¹ 。	
IV. 收到转换类型请求书	
本国际保藏机构于 (初次提交日期) 收到以上第 I 项标明的微生物，并于 (初次提交日期) 收到将原始保藏转换为根据布达佩斯条约保藏的请求书。	
V. 国际保藏机构	
名称：德国微生物菌种保藏中心 地址： Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字： 日期：2005 年 12 月 05 日

[0832] ¹如果条款6.4.d)适用,该日期即为已经获得国际保藏机构状态的日期。

[0833] DSMZ-BP/4表(单页)12/2001

[0834] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0835] 国际表格

[0836] 存活证明

[0837]

由下页底部标示的

[0838] 加尼梅德药物公司

国际保藏机构

[0839] Freiligrathstr.12

根据第10条第2款颁发

[0840] 55131 Mainz

[0841]

I. 保藏人	II. 微生物标识
名称: 加尼梅德药物公司 地址: Freiligrathstr. 12 55131 Mainz	国际保藏机构提供的登记号: DSM ACC2748 保藏或转移日期 ¹ : 2005-11-17
III. 存活陈述	
于 2005-11-21 ² 检验了以上第 II 项中微生物的存活性, 在该日, 所述微生物 [X] ³ 存活 [] ³ 不再存活	
IV. 存活性检验条件 ⁴	
V. 国际保藏机构	
名称: 德国微生物菌种保藏中心 地址: Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字: 日期: 2005-12-05

[0842] ¹表示初次提交日期, 或者如果新提交或转移, 最近一次的相应日期 (新提交或转移日期)

[0843] ²适用于条款 10.2.a) ii) 和 iii), 标出最近的存活性检验

[0844] ³叉号标记适用类型

[0845] DSMZ-BP/4表 (首页) 12/2001

[0846] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0847] 国际表格

[0848] 加尼梅德药物公司

[0849] Freiligrathstr.12

[0850] 55131 Mainz

[0851]

I. 微生物标识	
保藏人提供的标识参考： 182-D1106-279	国际保藏机构提供的登记号： DSM ACC2808
II. 科学说明和/或建议的分类名称	
第 I 项中的微生物附随： [X] 科学说明 [] 分类名称建议 (用叉号标记适用项)	
III. 收到和接受	
本国际保藏机构接受以上第 I 项标明的微生物，其于 2006 年 10 月 26 日 收到(初次提交日期) ¹ 。	
IV. 收到转换类型请求书	
本国际保藏机构于 (初次提交日期) 收到以上第 I 项标明的微生物，并于 (初次提交日期) 收到将原始保藏转换为根据布达佩斯条约保藏的请求书。	
V. 国际保藏机构	
名称：德国微生物菌种保藏中心 地址： Inhoffenstr. 7 B 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字： 日期： 2006 年 11 月 08 日

[0852] ¹如果条款6.4.d)适用,该日期即为已经获得国际保藏机构状态的日期。

[0853] DSMZ-BP/4表(单页)12/2001

[0854] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0855] 国际表格

[0856] 存活证明

[0857]

由下页底部标示的

[0858] 加尼梅德药物公司

国际保藏机构

[0859] Freiligrathstr.12

根据第10条第2款颁发

[0860] 55131 Mainz

[0861]

I. 保藏人	II. 微生物标识
名称: 加尼梅德药物公司 地址: Freiligrathstr. 12 55131 Mainz	国际保藏机构提供的登记号: DSM ACC2808 保藏或转移日期 ¹ : 2006-10-26
III. 存活陈述	
于 2006-10-30 ² 检验了以上第 II 项中微生物的存活性, 在该日, 所述微生物 [X] ³ 存活 [] ³ 不再存活	
IV. 存活性检验条件 ⁴	
V. 国际保藏机构	
名称: 德国微生物菌种保藏中心 地址: Inhoffenstr. 7 B 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字: 日期: 2006-11-08

[0862] ¹表示初次提交日期, 或者如果新提交或转移, 最近一次的相应日期 (新提交或转移日期)

[0863] ²适用于条款 10.2.a) ii) 和 iii), 标出最近的存活性检验

[0864] ³叉号标记适用类型

[0865] DSMZ-BP/4表 (首页) 12/2001

[0866] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0867] 国际表格

[0868] 加尼梅德药物公司

[0869] Freiligrathstr.12

[0870] 55131 Mainz

[0871]

I. 微生物标识	
保藏人提供的标识参考： 182-D1106-294	国际保藏机构提供的登记号： DSM ACC2809
II. 科学说明和/或建议的分类名称	
第 I 项中的微生物附随： [X] 科学说明 [] 分类名称建议 (用叉号标记适用项)	
III. 收到和接受	
本国际保藏机构接受以上第 I 项标明的微生物，其于 2006 年 10 月 26 日 收到(初次提交日期) ¹ 。	
IV. 收到转换类型请求书	
本国际保藏机构于 (初次提交日期) 收到以上第 I 项标明的微生物，并于 (初次提交日期) 收到将原始保藏转换为根据布达佩斯条约保藏的请求书。	
V. 国际保藏机构	
名称：德国微生物菌种保藏中心 地址： Inhoffenstr. 7 B 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字： 日期： 2006 年 11 月 08 日

[0872] ¹如果条款6.4.d)适用,该日期即为已经获得国际保藏机构状态的日期。

[0873] DSMZ-BP/4表(单页)12/2001

[0874] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0875] 国际表格

[0876] 存活证明

[0877]

由下页底部标示的

[0878] 加尼梅德药物公司

国际保藏机构

[0879] Freiligrathstr.12

根据第10条第2款颁发

[0880] 55131 Mainz

[0881]

I. 保藏人	II. 微生物标识
名称: 加尼梅德药物公司 地址: Freiligrathstr. 12 55131 Mainz	国际保藏机构提供的登记号: DSM ACC2809 保藏或转移日期 ¹ : 2006-10-26
III. 存活陈述	
于 2006-10-30 ² 检验了以上第 II 项中微生物的存活性, 在该日, 所述微生物 [X] ³ 存活 [] ³ 不再存活	
IV. 存活性检验条件 ⁴	
V. 国际保藏机构	
名称: 德国微生物菌种保藏中心 地址: Inhoffenstr. 7 B 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字: 日期: 2006-11-08

[0882] ¹表示初次提交日期, 或者如果新提交或转移, 最近一次的相应日期 (新提交或转移日期)

[0883] ²适用于条款 10.2.a) ii) 和 iii), 标出最近的存活性检验

[0884] ³叉号标记适用类型

[0885] DSMZ-BP/4表 (首页) 12/2001

[0886] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0887] 国际表格

[0888] 加尼梅德药物公司

[0889] Freiligrathstr.12

[0890] 55131 Mainz

[0891]

I. 微生物标识	
保藏人提供的标识参考： 182-D1106-362	国际保藏机构提供的登记号： DSM ACC2810
II. 科学说明和/或建议的分类名称	
第 I 项中的微生物附随： [X] 科学说明 [] 分类名称建议 (用叉号标记适用项)	
III. 收到和接受	
本国际保藏机构接受以上第 I 项标明的微生物，其于 2006 年 10 月 26 日 收到(初次提交日期) ¹ 。	
IV. 收到转换类型请求书	
本国际保藏机构于 (初次提交日期) 收到以上第 I 项标明的微生物，并于 (初次提交日期) 收到将原始保藏转换为根据布达佩斯条约保藏的请求书。	
V. 国际保藏机构	
名称：德国微生物菌种保藏中心 地址： Inhoffenstr. 7 B 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字： 日期： 2006 年 11 月 08 日

[0892] ¹如果条款6.4.d)适用,该日期即为已经获得国际保藏机构状态的日期。

[0893] DSMZ-BP/4表(单页)12/2001

[0894] 专利程序的微生物保藏国际承认的布达佩斯条约

[0895] 国际表格

[0896] 存活证明

[0897]

由下页底部标示的

[0898] 加尼梅德药物公司

国际保藏机构

[0899] Freiligrathstr.12

根据第10条第2款颁发

[0900] 55131 Mainz

[0901]

I. 保藏人	II. 微生物标识
名称: 加尼梅德药物公司 地址: Freiligrathstr. 12 55131 Mainz	国际保藏机构提供的登记号: DSM ACC2810 保藏或转移日期 ¹ : 2006-10-26
III. 存活陈述	
于 2006-10-30 ² 检验了以上第 II 项中微生物的存活性, 在该日, 所述微生物 [X] ³ 存活 [] ³ 不再存活	
IV. 存活性检验条件 ⁴	
V. 国际保藏机构	
名称: 德国微生物菌种保藏中心 地址: Inhoffenstr. 7 B 38124 Braunschweig	有权代表本国际保藏机构者、或 经授权官员签字: 日期: 2006-11-08

[0902] ¹表示初次提交日期, 或者如果新提交或转移, 最近一次的相应日期 (新提交或转移日期)

[0903] ²适用于条款 10.2.a) ii) 和 iii), 标出最近的存活性检验

[0904] ³叉号标记适用类型

[0905] DSMZ-BP/4表 (首页) 12/2001

序列表

<110> 加尼梅德医药品有限公司
 <120> 用于治疗癌症的针对密蛋白-18的单克隆抗体
 <130> 342-31PCT
 <150> EP 05 025 657.7
 <151> 2005-11-24
 <160> 150
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 786
 <212> DNA
 <213> 人

[0001]

```

<400> 1
atggccgtga ctgctgtca gggcttggg ttcgtggtt cactgattg gattgctggc 60
atcattgctg ccacctgcat ggaccagtgg agcaccocaag acttgtataa caaccccgta 120
acagctgttt tcaaetacca gggcctgtgg cgtcctgtg tccgagagag ctctggettc 180
accgagtgcc ggggctaett caccctgctg gggetgcaag caatgctgca ggcagtgcga 240
gccctgatga tcgtaggcat cgtcctgggt gccattggcc tcttggtatc catctttgcc 300
ctgaaatgca tccgcattgg cagcatggag gactctgcca aagccaacat gacactgacc 360
tccgggatca tgttcattgt ctcaggtctt tgtgcaattg ctggagtgtc tgtgtttgcc 420
aacatgctgg tgactaaact ctggatgtcc acagctaaca tgtacaccgg catgggtggg 480
atggtgcaga ctgttcagac caggtacaca tttggtgagg ctctgttcgt gggctgggtc 540
gctggaggcc tcacactaat tgggggtgtg atgatgtgca tgcctgccc gggcctggca 600
ccagaagaaa ccaactacaa agccgtttct taccatgccc cggggcacag tgttgctac 660
aagcctggag gcttcaaggc cagcaatggc tttgggtcca acacaaaaa caagaagata 720
tacgatggag gtgcccgcac agaggacgag gtacaatctt atccttcaa gcacgactat 780
gtgtaa 786
    
```

<210> 2
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> 人

```

<400> 2
Met Ala Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile
1          5          10          15
Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
          20          25          30
    
```

Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly
 35 40 45
 Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
 50 55 60
 Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
 65 70 75 80
 Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
 85 90 95
 Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser
 100 105 110
 Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
 115 120 125
 Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
 130 135 140
 Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
 145 150 155 160
 Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
 165 170 175
 Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
 180 185 190
 Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
 195 200 205
 Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
 210 215 220
 Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
 225 230 235 240
 Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser
 245 250 255
 Lys His Asp Tyr Val
 260

[0002]

<210> 3
 <211> 816
 <212> DNA

```

<213> 人
<400> 3
atggcogtga ctgcctgtca gggcttgggg ttctgtggtt cactgattgg gattgogggc 60
atcattgtctg ccacctgcat ggaccagtgg agcacccaag acttgtataa caaccccgta 120
acagctgttt tcaactacca gggctgtggg cgctcctgtg tccgagagag ctctggcttc 180
accgagtgcg ggggctactt caccctgtct gggctgocag ccabgtctga ggcagtgcga 240
ggcctgatga tcgtaggcac cgtcctgggt gccattggcc tctgtgtatc catctttgcc 300
ctgaaatgca tccgcattgg cagcatggag gactctgcca aagccaacat gacactgacc 360
tccgggatca tgttcattgt ctcaggcttt tgtgcaattg ctggagtgtc tgtgtttgcc 420
aacatgctgg tgactaacct ctggatgtcc acagctaaca tgtacaccgg catgggtgaa 480
caaaaactca tctcagaaga ggatctgggg atggtgcaga ctgttcagac caggtacaca 540
tttggtgcgg ctctgttctg gggctgggtc gctggaggcc tcacactaat tgggggtgtg 600
atgatgtgca tcgcctgccc gggcctggca ccagaagaaa ccaactacaa agccgtttct 660
tatcatgcct cgggccacag tgttgcctac aagcctggag gcttcaaggc cagcactggc 720
tttggttcca acacaaaaaa caagaagata tacgatggag gtgcccgcac agaggacgag 780
gtacaatctt atccttccaa gcaagactat gtgtaa 816

```

[0003]

```

<210> 4
<211> 271
<212> PRT
<213> 人
<400> 4
Met Ala Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile
1 5 10 15
Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
20 25 30
Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly
35 40 45
Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
50 55 60
Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
65 70 75 80
Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
85 90 95
Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser

```

	100		105		110
	Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser				
	115		120		125
	Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val				
	130		135		140
	Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Glu				
	145		150		155
	Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Met Val Gln Thr Val Gln				
		165		170	175
	Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp Val Ala Gly				
		180		185	190
	Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met Cys Ile Ala Cys Arg Gly				
		195		200	205
	Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala Val Ser Tyr His Ala Ser				
		210		215	220
[0004]	Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly Phe Lys Ala Ser Thr Gly				
		225		230	235
	Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile Tyr Asp Gly Gly Ala Arg				
		245		250	255
	Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser Lys His Asp Tyr Val				
		260		265	270

<210> 5
 <211> 813
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 5
 atggcctgga ctgcctgtca gggcttgggg ttctgtggtt cactgattgg gattgcgggc 60
 atcattgctg ccacctgcat ggaccagtgg agcacccaag acttgtacaa caaccctgta 120
 acagctgttt tcaactacca gggcctgtgg cgctcctgtg tccgagagag ctctggcttc 180
 accgagtgcc ggggctactt cacctgtac ccatacgaag tgccagacta cgcactgggg 240
 ctgccagcca tgetgcaggc agtgcgagcc ctgatgatcg taggcacgtg cctgggtgcc 300
 attggcctcc tggatccat ctttgccctg aaatgcatcc gcattggcag catggaggac 360
 tctgccaaag ccaacatgac actgacctcc gggatcatgt tcattgtctc aggtctttgt 420
 gcaattgctg gagtgtctgt gtttgccaac atgctggtga ctaactctg gatgtccaca 480

```

gctaacatgt acaccggcat gggtaggatg gtgcagactg ttcagaccag gtacacattt 540
ggtagcggctc tgttcgtggg ctgggtcgcct ggaggcctca cactaattgg gggtaggatg 600
atgtgcatcg cctgcccggg cctggcacca gaagaaacca actacaaaagc cgtttcttat 660
catgcctcgg gccacagtgt tgcctacaag cctggaggct tcaaggccag cactggcttt 720
gggtccaaca ccaaaaacaa gaagatatac gatggagggt cccgcacaga ggacgaggta 780
caatcttate ctccaagca cgactatgtg taa 813
    
```

```

<210> 6
<211> 270
<212> PRT
<213> 人
<400> 6
    
```

```

Met Ala Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile
1           5           10           15
    
```

```

Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
          20           25           30
    
```

```

Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly
          35           40           45
    
```

[0005]

```

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
          50           55           60
    
```

```

Gly Tyr Phe Thr Leu Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Leu Gly
65           70           75           80
    
```

```

Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg Ala Leu Met Ile Val Gly Ile
          85           90           95
    
```

```

Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys
          100          105          110
    
```

```

Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu
115          120          125
    
```

```

Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly
130          135          140
    
```

```

Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr
145          150          155          160
    
```

```

Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr
165          170          175
    
```

Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp Val Ala Gly Gly
 180 185 190

Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu
 195 200 205

Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala Val Ser Tyr His Ala Ser Gly
 210 215 220

His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe
 225 230 235 240

Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr
 245 250 255

Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser Lys His Asp Tyr Val
 260 265 270

<210> 7
 <211> 786
 <212> DNA
 <213> 人

[0006]

<400> 7
 atgtccacca ccacatgcca agtgggtggc ttctcctctg ccacctctgg gctggccggc 60
 tgcacgcgg ccaccgggat ggacatgtgg agcaccacag acctgtacga caacccegtc 120
 acctccgtgt tccagtagca agggctctgg aggagctgcg tgaggcagag ttcaggcttc 180
 accgaatgca ggccctatct caccatcctg ggacttccag ccattgctgca ggeagtgcga 240
 gccctgatga tcgtaggcat cgtcctgggt gccattggcc tcttggtate catctttgcc 300
 ctgaaatgca tccgcattgg cagcatggag gactctgcca aagccaacat gacactgacc 360
 tccgggatca tgttcattgt etcaggctct tgtgcaattg ctggagtgtc tgtgtttgcc 420
 aacatgctgg tgactaactt ctggatgtcc acagctaaca tgtacaccgg catgggtggg 480
 atgggtcaga ctgttcagac caggtacaca tttgggtgcg ctctgttctg gggctgggtc 540
 gctggaggcc tcacactaat tgggggtgtg atgatgtgca tgcctgccc gggcctggca 600
 ccagaagaaa ccaactacaa agccgtttct tatcatgcct caggccacag tgttgcctac 660
 aagcctggag gcttcaaggc cagcactggc tttgggtcca acacaaaaa caagaagata 720
 tacgatggag gtgcccgcac agaggacgag gtacaatctt atccttccaa gcacgactat 780
 gtgtaa 786

<210> 8
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 8

Met Ser Thr Thr Thr Cys Gln Val Val Ala Phe Leu Leu Ser Ile Leu
1 5 10 15

Gly Leu Ala Gly Cys Ile Ala Ala Thr Gly Met Asp Met Trp Ser Thr
20 25 30

Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ser Val Phe Gln Tyr Glu Gly
35 40 45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
50 55 60

Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
65 70 75 80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
85 90 95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser
100 105 110

[0007]

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
115 120 125

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
145 150 155 160

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
165 170 175

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
180 185 190

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
195 200 205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
210 215 220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
225 230 235 240

Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser

	245	250	255				
	Lys His Asp Tyr Val						
	260						
	<210> 9						
	<211> 795						
	<212> DNA						
	<213> 小鼠						
	<400> 9						
	atggccaacca	ccacgtagcca	ggtggtaggg	cttctcctgt	ccctcctggg	tctggccggc	60
	tgcatagccg	ccactgggat	ggacatgtgg	agcactcaag	acctgtatga	caaccagtc	120
	accgccgtgt	tccagtatga	agggtctctg	aggagtgcg	tgcaacagag	ctcggggttc	180
	accgagtgcc	ggccatactt	caccatcctg	ggccttcag	ccatgctgca	agctgtacga	240
	gccctgatga	tctgtggcat	tgttctgggg	gtcatcgta	tcctcgtgtc	catcttcgcc	300
	ctgaagtgca	ttcgcattgg	tagcatggat	gactctgcca	aggccaagat	gactctgact	360
	tctgggatct	tgttcatcat	ctccggcacc	tgtgcaatca	ttgggtgtgc	tgtgtttgcc	420
	aacatgctgg	tgaccaactt	ctggatgtcc	acagctaaca	tgtacagcgg	catggggcgc	480
	atgggtggca	tggtgcagac	cgttcagacc	aggtacacct	ttgggtcagc	tctgttcgtg	540
[0008]	ggctgggttg	ctggaggcct	cacctgatt	gggggagtga	tgatgtgcat	cgctgcccgt	600
	ggcctgacac	cagatgacag	caacttcaaa	gctgtgtctt	accatgcttc	tggccaaaat	660
	gttgcctaca	ggcctggagg	ctttaaggcc	agcactggct	ttgggtccaa	caccagaaac	720
	aagaagatct	acgatggggg	tgcccgcaca	gaagacgatg	aacagtctca	tcctaccaag	780
	tatgactatg	tgtag					795
	<210> 10						
	<211> 795						
	<212> DNA						
	<213> 小鼠						
	<400> 10						
	atgtcggatga	ccgctgcca	ggccttgggg	tttgtggtgt	cactgatcgg	gtttgccggc	60
	atcattgcag	ccacttgat	ggaccagtgg	agcaccagg	atztatata	caaccgggtg	120
	accgctgtat	tcaactacca	agggtatagg	cgttcatgcg	tcagagagag	ctctggcttc	180
	accgagtgcc	gaggtactt	cacctgttg	gggttgccag	ccatgctgca	agctgtacga	240
	gccctgatga	tctgtggcat	tgttctgggg	gtcatcgta	tcctcgtgtc	catcttcgcc	300
	ctgaagtgca	ttcgcattgg	tagcatggat	gactctgcca	aggccaagat	gactctgact	360
	tctgggatct	tgttcatcat	ctccggcacc	tgtgcaatca	ttgggtgtgc	tgtgtttgcc	420
	aacatgctgg	tgaccaactt	ctggatgtcc	acagctaaca	tgtacagcgg	catggggcgc	480

atgggtggca tgggtgcagac cgttcagacc aggtacacct ttgggtgcagc tctgttctgtg 540
 ggctgggttg ctggaggcct caccctgatt gggggagtga tgatgtgcat cgctgcctg 600
 ggctgacac cagatgacag caacttcaaa gctgtgtctt accatgcttc tggccaaaat 660
 gttgcctaca ggctggagg ctttaaggcc agcactggct ttgggtccaa caccagaaac 720
 aagaagatct acgatggggg tgcccgcaca gaagacgatg aacagtctca tctaccaag 780
 tatgactatg tgtag 795

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<400> 11
 tggctctgtg tcgacactgt g 21

<210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工

[0009]

<220>
 <223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<400> 12
 gtgtacatgt tagctgtgga c 21

<210> 13
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 13

Met Asp Met Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ser
 1 5 10 15

Val Phe Gln Tyr Glu Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser
 20 25 30

Gly Phe Thr Glu Cys Arg Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala
 35 40 45

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala
 50 55

<210> 14
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> 人

```

<400> 14
Met Asp Met Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ser
1          5          10          15
Val Phe Gln Tyr Glu Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser
20          25          30
Gly Phe Thr Glu Cys Arg Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala
35          40          45
Met Leu Gln Ala Val Arg Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly
50          55          60
Ala Ile Gly Leu Leu Val Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile
65          70          75          80
Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly
85          90          95
Ile Met Phe Ile Val Ser Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val
100         105         110
Phe Ala Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met
115         120         125
Tyr Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr
130         135         140
Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp
145         150

```

[0010]

```

<210> 15
<211> 390
<212> DNA
<213> 人
<400> 15
atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtacgaagc ttggtaccga gctcggatcc      120
actccagtgt ggtggaattc tgcagatggc cgcattggacc agtggagcac ccaagacttg      180
tacaacaacc ccgtaacagc tgttttcaac taccaggggc tgtggcgctc ctgtgtccga      240
gagagctctg gcttcaccga gtgccggggc tacttcaccc tgcctggggt gccagccatg      300
ctgcaggcag tgcgagcggc catccagcac agtggcggcc gctcaggagg ggcccgaaca      360
aaaactcatc tcagaagagg atctgaatag                                     390

```

<210> 16
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 16

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
 20 25 30

Lys Leu Gly Thr Glu Leu Gly Ser Thr Pro Val Trp Trp Asn Ser Ala
 35 40 45

Asp Gly Arg Met Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro
 50 55 60

Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg
 65 70 75 80

Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly
 85 90 95

[0011] Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg Ala Ala Ile Gln His Ser Gly
 100 105 110

Gly Arg Ser Arg Arg Ala Arg Thr Lys Thr His Leu Arg Arg Gly Ser
 115 120 125

Glu

<210> 17
 <211> 411
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 17

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60

gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtacgaagc ttggtaccga gctcggatcc 120

actccagtgt ggtggaattc tgcagatggc cgcgccctga tgategtagg catcgtcctg 180

ggtgccattg gcctcctggt atccatcttt gcctgaaat gcacccgcat tggcagcatg 240

gaggactctg ccaaagccaa catgacactg acatccggga tcatgttcat tgtctcaggt 300

ctttgtgcaa ttgctggagt gtctgtgttt gccaacgcgg ccacccagca cagtggcggc 360

cgctcgagga gggcccgaac aaaaactcat ctcagaagag gatctgaata g 411

```

<210> 18
<211> 136
<212> PRT
<213> 人

<400> 18
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1          5          10          15

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
20          25          30

Lys Leu Gly Thr Glu Leu Gly Ser Thr Pro Val Trp Trp Asn Ser Ala
35          40          45

Asp Gly Arg Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly
50          55          60

Leu Leu Val Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met
65          70          75          80

Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe
85          90          95

[0012] Ile Val Ser Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn
100         105         110

Ala Ala Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Arg Arg Ala Arg Thr Lys
115         120         125

Thr His Leu Arg Arg Gly Ser Glu
130         135
    
```

```

<210> 19
<211> 531
<212> DNA
<213> 人

<400> 19
atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttcactggt 60
gacgcggccc agccggccag gcgcgccatg gaccagtgga gcaccaaga cttgtacaac 120
aaccocgtaa cagctgtttt caactaccag gggctgtggc gctcctgtgt ccgagagagc 180
tctggttca ccgagtgcg gggctacttc accctgctgg ggctgccagc catgctgcag 240
gcagtgcgag ccctgatgat cgtaggeatc gtcctgggtg ccattggcct cctggtatcc 300
atctttgccc tgaaatgcat ccgcattggc agcatggagg actctgcaa agccaacatg 360
acaetgaect ccgggatcat gttcattgtc tcaggctttt gtgcaattgc tggagtgtct 420
gtgtttgcca acatgctggt gactaacttc tggatgtcca cagetaacat gtacaccggc 480
    
```

atgggtggga tggtgcagac tgttcagacc aggtacacat ttgggtgcgta g 531

<210> 20
<211> 176
<212> PRT
<213> 人

<400> 20

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Met Asp Gln
20 25 30

Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn
35 40 45

Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr
50 55 60

Glu Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln
65 70 75 80

[0013]

Ala Val Arg Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly
85 90 95

Leu Leu Val Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met
100 105 110

Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe
115 120 125

Ile Val Ser Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn
130 135 140

Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly
145 150 155 160

Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala
165 170 175

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 21

Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn
1 5 10

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 22

Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln
 1 5 10

<210> 23
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 23

Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe
 1 5 10

<210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 24

[0014]

Asp Met Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro
 1 5 10

<210> 25
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 25

Cys Arg Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala
 1 5 10

<210> 26
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 26

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly
 1 5 10

<210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 27

Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile
 1 5 10

<210> 28
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 28

Met Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala
 1 5 10 15

Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser
 20 25 30

Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala
 35 40 45

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala
 50 55

<210> 29
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人

[0015]

<400> 29

Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys
 1 5 10 15

Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly
 20

<210> 30
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 30

Ala Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr
 1 5 10 15

Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe
 20 25 30

Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp
 35 40

<210> 31
 <211> 153
 <212> PRT

<213> 人
 <400> 31
 Met Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala
 1 5 10 15
 Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser
 20 25 30
 Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala
 35 40 45
 Met Leu Gln Ala Val Arg Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly
 50 55 60
 Ala Ile Gly Leu Leu Val Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile
 65 70 75 80
 Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly
 85 90 95
 Ile Met Phe Ile Val Ser Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val
 100 105 110
 Phe Ala Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met
 115 120 125
 Tyr Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr
 130 135 140
 Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp
 145 150

[0016]

<210> 32
 <211> 3359
 <212> DNA
 <213> 人
 <400> 32
 cacaccttcg gcagcaggag ggcggcagct tctcgcagge ggcagggcgg ggggccagga 60
 tcatgtccac caccacatgc caagtggtag cgttctctct gtccatcctg gggctggcgg 120
 gctgcacgc gcccaaccgg atggacatgt ggagcaccga ggacctgtac gacaaccccg 180
 tcacctcctg gttccagtac gaagggctct ggaggagctg cgtgaggcag agttcaggct 240
 tcaccgaatg caggccctat ttcaccatcc tgggacttcc agccatgctg caggcagtgc 300
 gagccctgat gatcgtagc atcgtctctg gtgccattgg cctcctggta tccatctttg 360
 ccctgaaatg catccgcatt ggcagcatgg aggactctgc caagccaac atgacactga 420

cctccgggat	catgttcatt	gtctcaggtc	tttgtgcaat	tgctggagtg	tctgtgtttg	480
ccaacatgct	ggtgactaac	ttctggatgt	ccacagetaa	catgtacacc	ggcatgggtg	540
ggatgggtgca	gaactgttcag	accaggtaaa	catttgggtc	ggctctgttc	gtgggctggg	600
tcgctggagg	cctcactacta	attgggggtg	tgatgatgtg	catcgcttgc	cggggcctgg	660
caccagaaga	aaccaactac	aaagccgttt	cttatcatgc	ctcaggccac	agtgttgccct	720
acaagcctgg	aggcttcaag	gccagcactg	gctttgggtc	caacacccaa	aacaagaaga	780
tatacgatgg	aggtgcccgc	acagaggacg	aggtacaatc	ttatccttcc	aagcacgact	840
atgtgtaatg	ctctaagacc	tctcagcagc	ggcggagaag	actcccgag	agctcaccca	900
aaaaacaagg	agatcccctc	tagatttctt	cttgcctttg	actcacagct	ggaagttaga	960
aaagcctcga	tttcatcttt	ggagaggcca	aatggtctta	gcctcagtct	ctgtctctaa	1020
atattccacc	ataaaacagc	tgagttatct	atgaattaga	ggctatagct	cacattttca	1080
atcctctatt	tcttttttta	aatataaett	tctactctga	tgagagaatg	tggttttaat	1140
ctctctctca	cattttgatg	atttagacag	actccccctc	ttcctcctag	tcaataaacc	1200
cattgatgat	ctatttccca	gcttatcccc	aagaaaactt	ttgaaaggaa	agagtagacc	1260
caaagatggt	atthttctgt	gtttgaattt	tgtctcccca	cccccaactt	ggctagtaat	1320
aaacacttac	tgaagaagaa	gcaataagag	aaagatattt	gtaatctctc	cagcccatga	1380
tctcggtttt	cttacctgtg	gatcttaaaa	gttaccacac	caaagtcatt	ttcagtttga	1440
ggcaacccaa	cccttctact	gctgttgaca	tcttcttatt	acagcaaac	cattctagga	1500
gtttctctgag	ctctccactg	gagtcctctt	tctgtcggcg	gtcagaaatt	gtccctagat	1560
gaatgagaaa	attatttttt	ttaatttaag	tcctaaatat	agttaaaata	aataatgttt	1620
tagtaaaatg	atacactatc	tctgtgaaat	agcctcacc	ctacatgtgg	atagaaggaa	1680
atgaaaaaat	aattgctttg	acattgtcta	tatggtactt	tgtaaagtca	tgcttaagta	1740
caaattccat	gaaaagctca	ctgatcctaa	ttctttccct	ttgaggtctc	tatggctctg	1800
attgtacatg	atagtaagtg	taagccatgt	aaaaagtaaa	taatgtctgg	gcacagtggc	1860
tcacgcctgt	aatcctagca	ctttgggagg	ctgaggagga	aggatcactt	gagcccagaa	1920
gttcgagact	agcctgggca	acatggagaa	gcctgtctc	tacaaaatac	agagagaaaa	1980
aatcagccag	tcatgggtggc	ctacacctgt	agtcccagca	ttccgggagg	ctgaggtggg	2040
aggatcactt	gagcccaggg	aggttggggc	tgcagtgagc	catgatcaca	ccactgcact	2100
ccagccaggt	gacatagcga	gatcctgtct	aaaaaaataa	aaaataaata	atggaacaca	2160
gcaagtctca	ggaagtaggt	taaaactaat	tctttaaaaa	aaaaaaaaag	ttgagcctga	2220
attaaatgta	atgtttccaa	gtgacaggta	tccacatttg	catggttaca	agccactgcc	2280
agttagcagt	agcactttcc	tggcactgtg	gtcggttttg	ttttgttttg	ctttgtttag	2340

[0017]

[0018]

```

agacggggtc tcaactttcca ggctggcctc aaactcctgc actcaagcaa ttcttctacc 2400
ctggcctccc aagtagctgg aattacaggt gtgcgccatc acaactaget ggtggtoagt 2460
tttgttactc tgagagctgt tcacttctct gaattcacct agagtggttg gaccatcaga 2520
tgtttgggca aaactgaaaag ctctttgcaa ccacacacct tccctgagct tacatcactg 2580
cccttttgag cagaaagtct aaattccttc caagacagta gaattccatc ccagtaccaa 2640
agccagatag gccccttagg aaactgaggt aagagcagtc tctaaaaact acccacagca 2700
gcattggtgc aggggaactt ggccattagg ttattatttg agaggaaagt cctcacatca 2760
atagtacata tgaaagtga cccaagggg attggtgaat actcataagg atcttcaggc 2820
tgaacagact atgtctgggg aaagaacgga ttatgcccca ttaaataaca agttgtgttc 2880
aagagtcaga gcagtgagct cagaggccct tctcactgag acagcaacat ttaaaccaaa 2940
ccagaggaag tatttgtgga actcactgcc tcagtttggg taaaggatga gcagacaagt 3000
caactaaaga aaaaagaaaa gcaaggagga gggttgagca atctagagca tggagtttgt 3060
taagtgtctc ctggatttga gttgaagagc atccatttga gttgaaggcc acagggcaca 3120
atgagctctc ccttctacca ccagaaagtc cctggtcagg tctcaggtag tgcggtgtgg 3180
ctcagctggg tttttaatta ggcattctc tatccaacat ttaattgttt gaaagcctcc 3240
atatagttag attgtgcttt gtaattttgt tgttgttget ctatcttatt gtatatgcat 3300
tgagtattaa cctgaatgtt ttgttactta aatattaaaa acaactgtat cctacagtt 3359

```

<210> 33
<211> 849
<212> DNA
<213> 小鼠

```

<400> 33
gagaacctgc ctgtctcttg tectctccat ttgtgtggac tctgtgctcc atcatgtcgg 60
tgaccgctg ccaggccttg gggtttgttg tgtoactgat cgggtttgcg ggcacattg 120
cagccaactg tatggaccag tggagcacc aggatttata caacaaccog gtgacogctg 180
tattcaacta ccaagggcta tggcgttcat gcgtccgaga gagctctggc ttcaccgagt 240
gccgaggcta cttaccctg ttggggttgc cagccatgct gcaagetgta cgagccctga 300
tgatcgtggg cattgttctg ggggtcatcg gtatcctcgt gtccatcttc gccctgaagt 360
gcattcgcac tggtagcatg gatgactctg ccaaggccaa gatgactctg acttctggga 420
tcttgttcat catctccggc atctgtgcaa tcattgggtg gtctgtgttt gccaacatgc 480
tggtgaccaa cttctggatg tccacagcta acatgtacag cggcatgggc gccatgggtg 540
gcatggtgca gaccgttcag accaggtaaa ccttcgggtg agctctgttc gtgggctggg 600
ttgctggagg cctcaccctg attgggggag tgatgatgtg catcgctgc cgtggcctga 660
caccagatga cagcaacttc aaagctgtgt cttaccatgc ctctggccaa aatgttgcct 720

```

acaggcctgg aggccttaag gccagcactg gctttgggtc caacaccaga aacaagaaga	780
tctacgatgg ggggtgccgc acagaagacg atgaacagtc tcatcctacc aagtatgact	840
atgtgtagt	849
<210> 34	
<211> 3350	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 34	
agaattgccc tgtccacttg tegtgtggct ctgtgtcgac actgtgcgcc accatggccc	60
tgactgcttg tcagggcttg gggttcgtgg ttteactgat tgggattgog ggcattcattg	120
ctgccacctg catggaccag tggagcacc aagacttgta caacaacccc gtaacagctg	180
ttttcaacta ccaggggctg tggcgctcct gtgtccgaga gagctctggc ttcaccgagt	240
gccggggcta cttcaccctg ctggggctgc cagccatgct gcaggcagtg cgagcccetga	300
tgatcgtagg catcgtcctg ggtgccattg gcctcctggg atccatcttt gcctgaaat	360
gcacccgcac tggcagcatg gaggaactcg ccaaagccaa catgacactg acctccggga	420
tcatgttcat tgtctcaggt ctttgtgcaa ttgtctggag gtctgtgttt gccaacatgc	480
tggtgactaa cttctggatg tccacagcta acatgtacac cggcatgggt gggatggctg	540
agactgttca gaccaggtag acatttgggt cggctctgtt cgtgggctgg gtcgctggag	600
gcctcacact aattgggggt gtgatgatgt gcctcgcctg cggggcctg gcaccagaag	660
aaaccaacta caaagccgtt tcttatcatg cctcaggcca cagtgttgc tacaagcctg	720
gaggcttcaa ggcagcact ggctttgggt ccaacaccaa aaacaagaag atatacgatg	780
gaggtgccc caccagggac gaggtacaat cttatcctc caagcacgac tatgtgtaat	840
gctctaagac ctctcagcac gggcggaaga aactccggga gagctcacc aaaaaacaag	900
gagatccat ctgatttct tcttgcctt gactcacagc tggagttag aaaagcctg	960
atctcatctt tggagaggcc aatggtctt agcctcagtc cctgtctct aatattccac	1020
cataaaacag ctgagttatt tatgaattag aggotatagc tcacattttc aatcctctat	1080
ttctttttt aaatataact ttctactctg atgagagaat gtggttttaa tctctctctc	1140
acattttgat gatttagaca gactccccct cttcctctca gtcaataaac ccattgatga	1200
tctatttccc agcttatccc caagaaaact tttgaaagga aagagtagac ccaaagatgt	1260
tattttctgc tgtttgaatt ttgtctcccc accoccaact tggctagtaa taaacactta	1320
ctgaagaaga agcaataaga gaaagatatt tgtaatctct ccagcccctg atctcggttt	1380
tcttacctg tgatcttaa agttaccaa ccaaagtcac tttcagtttg aggcaaccaa	1440
acctttctac tgctgttgac atcttcttat tacagcaaca ccattctagg agtttctga	1500

[0019]

	gctctccact ggagtcctct ttctgtcgcg ggtcagaaat tgtccctaga tgaatgagaa	1560
	aattattttt ttttaatttaa gtccctaaata tagttaaaat aaataatggt ttagtaaaat	1620
	gatacactat ctctgtgaaa tagcctcacc cctacatgtg gatagaagga aatgaaaaaa	1680
	taattgcttt gacattgtct atatggtact ttgtaaagtc atgcttaagt acaaattoca	1740
	tgaaaagctc actgatcccta attctttccc ttbgaggtct ctatggctct gattgtacat	1800
	gatagtaagt gtaagccatg taaaaagtaa ataatgtctg ggcacagtgg ctcaagcctg	1860
	taatcctagc actttgggag gctgaggagg aaggatcact tgagcccaga agttogagac	1920
	tagcctgggc aacatggaga agccctgtct ctacaaaata cagagagaaa aatcagoca	1980
	gtcatggtgg octacacctg tagtcccagc attccgggag gctgaggtgg gaggatcact	2040
	tgagcccagg gaggttgggg ctgcagtgg ccatgatcac accactgoac tccagccagg	2100
	tgacatagcg agatcctgtc taaaaaata aaaaaataat aatggaacac agcaagtctc	2160
	aggaagtagg ttaaaactaa ttctttaaaa aaaaaaaaaa gttgagcctg aattaaatgt	2220
	aatgtttoca agtgacaggt atccacattt gnatggttac aagccactgc cagttagcag	2280
	tagcactttc ctggcactgt ggtcggtttt gttttgtttt gctttgttta gagacggggt	2340
	ctcaacttcc aggetggcct caaactcctg cactcaagca attctctac cctggcctcc	2400
	caagtagctg gaattacagg tgtgcgccat cacaactagc tgggtggtcag ttttgttact	2460
[0020]	ctgagagctg ttcacttttc tgaattoacc tagagtggtt ggaccatcag atgtttgggc	2520
	aaaactgaaa gctctttgca acccacacacc ttccctgagc ttacatcact gcccttttga	2580
	gcagaaaagtc taaattcctt ccaagacagt agaattccat cccagtacca aagccagata	2640
	ggccccctag gaaactgagg taagagcagt ctctaaaaac taccacacagc agcattggtg	2700
	caggggaact tggccattag gttattatbt gagaggaaag toctcacatc aatagtacat	2760
	atgaaagtga cctccaaggg gattggtgaa tactcataag gatcttcagg ctgaacagac	2820
	tatgtctggg gaaagaacgg attatgcccc attaaataac aagttgtggt caagagtcag	2880
	agcagtgagc tcagaggccc ttctcactga gacagcaaca tttaaaccas accagaggaa	2940
	gtatttgtgg aactcactgc ctcagtttg gtaaaggatg agcagacaag tcaactaaag	3000
	aaaaaagaaa agcaaggagg agggttgagc aatctagagc atggagtttg ttaagtctc	3060
	tctggatttg agttgaagag catccatttg agttgaaggc cacagggcac aatgagctct	3120
	cccttctacc accagaaagt ccctggtcag gtctcaggta gtgcggtgtg gctcagctgg	3180
	gtttttaatt agcgcattct ctatccaaca ttttaattgt tgaaagcctc catatagtta	3240
	gattgtgctt tgtaattttg ttggtgttgc totatcttat tgtatagca ttgagtatta	3300
	acctgaatgt tttgttactt aaatattaaa aacactgtta toctacagtt	3350

<210> 35

<211> 264
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 <400> 35
 Met Ser Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile
 1 5 10 15
 Gly Phe Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
 20 25 30
 Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly
 35 40 45
 Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
 50 55 60
 Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
 65 70 75 80
 Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Val Ile Gly Ile Leu Val
 85 90 95
 Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Asp Asp Ser
 100 105 110
 Ala Lys Ala Lys Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Leu Phe Ile Ile Ser
 115 120 125
 Gly Ile Cys Ala Ile Ile Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
 130 135 140
 Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Ser Gly Met Gly Gly
 145 150 155 160
 Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala
 165 170 175
 Ala Leu Phe Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly
 180 185 190
 Val Met Met Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Thr Pro Asp Asp Ser Asn
 195 200 205
 Phe Lys Ala Val Ser Tyr His Ala Ser Gly Gln Asn Val Ala Tyr Arg
 210 215 220
 Pro Gly Gly Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Arg Asn
 225 230 235 240

[0021]

Lys Lys Ile Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Asp Glu Gln Ser
 245 250 255

His Pro Thr Lys Tyr Asp Tyr Val
 260

<210> 36
 <211> 2786
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 36
 ggccgggaac cttcccagea agaggggggt ggttgctcct ggaagcctgc gcccagcagc 60
 tgaagccatg gccaccacca cgtgccaggt ggtagggctt ctctgtccc tctgggtct 120
 ggccggctgc atagccgcca ctgggatgga catgtggagc actcaagacc tgtatgacaa 180
 ccagtcacc gccgtgttcc agtatgaagg gctctggagg agttgcgtgc aacagagctc 240
 ggggttcacc gagtgcggc cactcttcac cactctgggc cttccagcca tgttgcaagc 300
 tgtacgagcc ctgatgatcg tgggcattgt tctgggggtc atcggtatcc tcgtgtccat 360
 cttcgccctg aagtgcattc gcattggtag catggatgac tctgccaagg ccaagatgac 420
 tctgactctt gggatcttgt tcatcatctc cggcatctgt gcaatcattg gtgtgtctgt 480
 gtttgccaac atgctggtga ccaactctg gatgtccaca gctaacatgt acagcggcat 540
 gggcggcatg ggtggcatgg tgcagaccgt tcagaccagg tacaccttcg gtgcagctct 600
 gttcgtgggc tgggttgctg gaggcctcac cctgattggg ggagtgatga tgtgcatcgc 660
 ctgccctggc ctgacaccag atgacagcaa cttcaaagct gtgtcttacc atgcctctgg 720
 ccaaaatggt gcctacaggc ctggaggctt taaggccagc actggctttg ggtccaacac 780
 cagaaaacaag aagatctacg atgggggtgc ccgacagaa gacgatgaac agtctcatcc 840
 taccaagtat gactatgtgt agtgctctaa gacccgcaa cctgtgtgca ggaggaaacc 900
 ttcccacaaga agagctcac ccaaagcaac gggagtctac cttgttccct tgttgatttc 960
 aactgacatc tgaagttgg taaagcctga ttttcatcca tagggaggct agacagtctt 1020
 ggccacatgt gtctgcctct aaatatccca tcacaaaaca gctgagttat cgtttatgag 1080
 ttagaggcca taacaetcac tttagcccaa ccctctgctt tttaccgtag actttctttt 1140
 catctgggta tggaatggaa tttgactcac agactaatac tttaatggtt tagagaaact 1200
 ttccttctct gtacttaata agcctgctga tggtegattt tocagcttga ccaccaaggg 1260
 aaattttaaa aggaaaaaaa aatacattaa aaggcattat ttcctactca attgtgcctt 1320
 acccaccccc aacttgactg ataataataa tgaacaccac ttaaagaaag aatgccagag 1380
 gaaagatagt tgtgtttccc ccagccagt catctgagtc cccctatgtg gtgatctaga 1440

[0022]

[0023]

```

acattactcg ccacagtgat ttccaagaa ggcaagcgag cctgttcgct ctgctcagca 1500
tctgctgatt ccagcaaggc ccttcagag cttccacta gaagtcctec ttctctcgga 1560
agtcagaaat tccccotaga agagtaagaa atagattott ttgggtaacc tgagtcctag 1620
gtatagttat aataaatagt atattagcaa aacggtttgg tatctcagtg aattagtttc 1680
agccttcat atagaaaaag ctggggaaaa aaaaagcctc ccttgacatt gtctatagcg 1740
taagatccta tataaatcca agcttcaaca aaagctcact gagtetaata gttttctttt 1800
gaggtctcca cggccttagt actcatagat gcagccctg tttaaaagta aaaaaattaa 1860
agtagcttaa aacgggttct ttttttttt ttttttttca aaaaatccaa tagagacctg 1920
tgtgtctggc atagctacag ttactgcca togacaggc cacttctttg gtctcttagg 1980
cagttttgca gttctgacag ctgcccggg catcaatag cagaccacac ccttctctgt 2040
gcttgttaga cgaaccgttc aaggagaaag catgaactcc atctccatgt gagcctgaat 2100
gtcccagga aatggagata ggggtctctc caaaaccac ctgaacctga aacagctgta 2160
gcgctatgct gtaagagcct ggccatcaag ttctatgga gaaaaagggc agtccttcca 2220
ttaatagtgc atatataagt ggctctggg gggcaggat gaatattcag tgggtgctcc 2280
gagtatgtac agaccgtcta aggagctgtg ttgaccaaga gccaggtaa tacgcagagt 2340
ttttccact gggactacag tgattttaga ctatactgaa gaaggccctc tggaaaatca 2400
ttatctgaaa tggcataaag aatgaacaga ccaacaatt taaggggagg gggcagggtg 2460
aaggaggggg aaggaggtag aaataagaat ctagggcatg aagattgta aggttcttgg 2520
ggtccaaatg gaaggtcacc cctttgaggc catggacaca atgcaccca cccctacccc 2580
caoctgccc cccaccagaa agtcctggt cggactggag gcagtgagaa tcagctgttt 2640
tcagttagtg ggtctcggtg tagcacctgg ctgtttcaaa gcttcccctt gctttgcgt 2700
ttttccgcc attgctgtct tgttttctgt gtrattaacc tccatgtttt gtaogttaaa 2760
tattaaaaca ctgttaacat ccaatc 2786

```

<210> 37
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 37

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

Gly Leu Ala Gly Cys Ile Ala Ala Thr Gly Met Asp Met Trp Ser Thr
 20 25 30

Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Gln Tyr Glu Gly
 35 40 45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Gln Gln Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
 50 55 60
 Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
 65 70 75 80
 Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Val Ile Gly Ile Leu Val
 85 90 95
 Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Asp Asp Ser
 100 105 110
 Ala Lys Ala Lys Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Leu Phe Ile Ile Ser
 115 120 125
 Gly Ile Cys Ala Ile Ile Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
 130 135 140
 Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Ser Gly Met Gly Gly
 145 150 155 160
 Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala
 165 170 175
 Ala Leu Phe Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly
 180 185 190
 Val Met Met Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Thr Pro Asp Asp Ser Asn
 195 200 205
 Phe Lys Ala Val Ser Tyr His Ala Ser Gly Gln Asn Val Ala Tyr Arg
 210 215 220
 Pro Gly Gly Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Arg Asn
 225 230 235 240
 Lys Lys Ile Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Asp Glu Gln Ser
 245 250 255
 His Pro Thr Lys Tyr Asp Tyr Val
 260

[0024]

<210> 38
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>

[0025]

```

<223> 人工序列描述: 寡核苷酸
<400> 38
gagaggatcc cgtacgggtgg ctgcaccatc tgtcttcate 40

<210> 39
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<400> 39
gagagcggcc gcctaacct ctcccctggt gaagctc 37

<210> 40
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列描述: PCR产物

<400> 40
cgtacgggtgg ctgcaccatc tgtcttcate ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgctt ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagagge caaagtacag 120
tggaaggtgg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcage acctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcttg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg ttag 324

<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列描述: PCR产物的翻译

<400> 41
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
    
```

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

<210> 42
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<400> 42
 gagaaagctt tccaccaagg gcccatcggg cttc 34

<210> 43
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工

[0026]

<220>
 <223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<400> 43
 gagagcggcc gctcatttac ccggagacag ggagag 36

<210> 44
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<400> 44
 taccagttga acttgacctc a 21

<210> 45
 <211> 981
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: PCR产物

<400> 45
 ggcccatcgg tcttcccct gccaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 60
 ctgggctgcc tggtaagga ctacttccc gaaccggatga cgggtgctgtg gaactcaggc 120
 gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 180

```

ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 240
gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 300
aaaactcaca catgccaccg gtgccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 360
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 480
gtggaggtgc ataattgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 540
gtggtcagcg tcttcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 600
aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatcttcaa agccaaaggg 660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 720
caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctatccca gggacatcgc cgtggagtgg 780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 840
ggctccttct tctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 960
tcctgtctc cgggtaaatg a 981
    
```

[0027]

```

<210> 46
<211> 326
<212> PRT
<213> 人工
    
```

```

<220>
<223> 人工序列描述: PCR产物的翻译
    
```

```

<400> 46
    
```

```

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
1           5           10           15
    
```

```

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
20           25           30
    
```

```

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
35           40           45
    
```

```

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
50           55           60
    
```

```

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
65           70           75           80
    
```

```

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
85           90           95
    
```

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 100 105 110
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

[0028]

<210> 47
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 人工

```

<220>
<223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(32)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 47
tttttttttt tttttttttt tttttttttt nm 32

<210> 48
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<400> 48
aagcagtggg atcaacgcag agtacgcggg 30

<210> 49
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工

[0029] <220>
<223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<400> 49
ctgctcactg gatggtggga agatgg 26

<210> 50
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<400> 50
gggacagtca ctgagctgct cagag 25

<210> 51
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<400> 51
acaggggcca gtggatagac cgatg 25

<210> 52
<211> 27

```

	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400> 52	
	agccagggac caagggatag acagatg	27
	<210> 53	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400> 53	
	gtaatacgc tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt	45
	<210> 54	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
[0030]	<400> 54	
	gtaatacgc tcactatagg gc	22
	<210> 55	
	<211> 351	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: PCR产物	
	<400> 55	
	cagggtcagc tgcagcagtc tggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagata	60
	tcctgcaagg ctactggcta cacattcagt agctactgga tagagtgggt aaagcagagg	120
	cctggacatg gccttgagtg gattggagag atttacctg gaagtggtag tactaactac	180
	aatgagaagt tcaagggcaa gcccacattc actgcagata catcotccaa cacagcctac	240
	atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgocgtct attactgtgc aagatatgat	300
	taccocctgg ttgcttaactg gggccaaggg actctgggtca ctgtctctgc a	351
	<210> 56	
	<211> 354	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: PCR产物	

	<400> 56		
	cagatccagt tggtagcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc	60	
	tccctgcaagg cttctgggta taccttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcaggct	120	
	ccaggaaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacca acactggaga gccaacatat	180	
	gctgaagagt tcaagggacg gtttgcttc tctttggaaa cctctgccag caotgectat	240	
	ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggtacat atttctgtgc aagactgggt	300	
	tttggtaatg ctatggacta ctggggctcaa ggaacctcag tcacctctc ctca	354	
	<210> 57		
	<211> 348		
	<212> DNA		
	<213> 人工		
	<220>		
	<223> 人工序列描述: PCR产物		
	<400> 57		
	caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgaggc ccggggcttc agtgaagctg	60	
	tectgcaagg cttctggeta caccttcact gactactata taaactgggt gaagcagagg	120	
	actggacagg gccttgagtg gattggagag atttatcttg gaagtggtaa tacttactac	180	
	aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac	240	
[0031]	atgcagetca gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagatcgtat	300	
	ggtagccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctctca	348	
	<210> 58		
	<211> 354		
	<212> DNA		
	<213> 人工		
	<220>		
	<223> 人工序列描述: PCR产物		
	<400> 58		
	cagggtcaac tgcagcagcc tggggtgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgaagctg	60	
	tectgcaagg cttctggeta caccttcacc agctactgga taaactgggt gaagcagagg	120	
	cctggacaag gccttgagtg gatcggaat atttatcctt ctgatagtta tacttaactac	180	
	aatcaaaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac	240	
	atgcagetca gcagcccagc atctgaggac tctgcggtct attactgtac aagatcgtgg	300	
	aggggtaact cctttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca	354	
	<210> 59		
	<211> 354		
	<212> DNA		
	<213> 人工		
	<220>		

	<223> 人工序列描述: PCR产物	
	<400> 59	
	cagggttcagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg	60
	tcctgcaagg cttctggata cacattcaact gactatgtta taagctgggt gaagcagaga	120
	actggacagg gccttgagtg gattggagag atttatctctg gaagtggtag tacttactac	180
	aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccaa cacagcctac	240
	atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaggggta	300
	ttactacggg ctatggacta ctggggctcaa ggaacctcag tcacccgtctc ctca	354
	<210> 60	
	<211> 360	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: PCR产物	
	<400> 60	
	caggttcacc tacaacagtc tggttctgaa ctgaggagtc ctgggtcttc agtaaagctt	60
	tcattgcaagg attttgattc agaagcttc ccttttgctt atatgagttg gattaggcag	120
	aagcctgggc atggatttga atggattgga gacatactcc caagtatttg tagaacaatc	180
[0032]	tatggagaga agtttgagga caaagccaca ctggatgcag acacagtgtc caacacagcc	240
	tacttgagc tcaacagtct gacatctgag gactctgcta tctactactg tgcaaggggg	300
	gagggctacg gtgcctggtt tgcttactgg ggccaagga ctctggtcac tgtctctgca	360
	<210> 61	
	<211> 339	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: PCR产物	
	<400> 61	
	gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggctcact	60
	atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc	120
	tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactggtga tctactgggc atccactagg	180
	gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc	240
	atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat	300
	ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa	339
	<210> 62	
	<211> 318	
	<212> DNA	
	<213> 人工	

<220>
 <223> 人工序列描述: PCR产物
 <400> 62
 caaattgttc tcaccagtc tcacagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
 ataacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgcact ggttccagca gaagccaggc 120
 acttctccca aactctggat ttatagcaca tccaacctgg cttctggagt ccttgcctgc 180
 ttcagtggca gtggatctgg gacctcttac tctctcaca tcagccgaat ggaggctgaa 240
 gatgctgcca cttattactg ccagcaaagg agtagttacc caccacggtt cggagggggg 300
 accaagctgg aaataaaa 318

<210> 63
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 人工序列描述: PCR产物
 <400> 63
 gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
 atcacctgca aggccagtc gaatgttctg actgctgtag cctggtatca acagaaacca 120
 [0033] gggcagcttc ctaaagcact gatttacttg gcatccaacc ggcacactgg agtccctgat 180
 cgcttcacag gcagtggtac tgggacagat ttcactctca ccattagcaa tgtgcaatct 240
 gaagacctgg cagattattt ctgtctgcaa cattggaatt atcctctgac gttcgggtgga 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 64
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 人工序列描述: PCR产物
 <400> 64
 gacattgtga tgtcacagtc tccatctctc ctactgtgtg cagttggaga gaaggttact 60
 atgagctgca agtccagtc gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 120
 tggtagcagc agaaaccagg gcagctctct aaactgctga tttactgggc atccactagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg ctccacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 300
 ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 339

<210> 65
 <211> 339

	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: PCR产物	
	<400> 65	
	gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggctcact	60
	atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc	120
	tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg	180
	gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc	240
	atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat	300
	ccattcacgt tcggctcggg gacaaagttg gaaataaaa	339
	<210> 66	
	<211> 336	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: PCR产物	
	<400> 66	
[0034]	gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggctcact	60
	atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa ccgaaagaa ctacttggtc	120
	tggtaccagc agaaaccagg gcagctcctc aaactgctga tctactgggc atccactagg	180
	gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc	240
	atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg	300
	tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa	336
	<210> 67	
	<211> 339	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: PCR产物	
	<400> 67	
	gacatcgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact	60
	atgagctgca agtccagtca gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttgacc	120
	tggtaccagc agaaaccagg gcagctcctc aaactgctga tttactgggc atccactagg	180
	gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg caacagattt cactctgacc	240
	atcagcagtg tgcaggctga agacctgca gattatcact gtggacaggg ttacagctat	300
	ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaa	339

<210> 68
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: PCR产物

<400> 68
 gacattgtga tgtcacagtc tccatcctec ctagetgtgt cagttggaga gaaggttact 60
 atgagctgca agtccagtca gaccctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 120
 tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atccactagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 300
 ccgctcacgt tccgtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 339

<210> 69
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: PCR产物

[0035] <400> 69
 aacattgtaa tgaaccaatc tcccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc 60
 ttgacctgca aggccagtga gaatgtggtt acttatgttt cctggtatca acagaaacca 120
 ggcagctctc ctaaactgct gatatacggg gcattccaacc ggtacactgg ggtcccgat 180
 cgcttcacag gcagtgatc tgcaacagat ttcactctca ccatcagcag tgtgaaggct 240
 gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa tattataget atcagctcac gttcgggtct 300
 gggaccaagc tggagctgaa a 321

<210> 70
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<400> 70
 gagaaagctt gccgccacca tggaaatggac ctgggtcttt ctc 43

<210> 71
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: 寡核苷酸

	<400> 71 gagagggccc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccaga gtc	43
	<210> 72 <211> 47 <212> DNA <213> 人工	
	<220> <223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400> 72 gagaaagctt gccgccacca tggattggct gtggaacttg ctattcc	47
	<210> 73 <211> 44 <212> DNA <213> 人工	
	<220> <223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400> 73 gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgactgag gtcc	44
	<210> 74 <211> 46 <212> DNA <213> 人工	
[0036]	<220> <223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400> 74 gagaaagctt gccgccacca tggaatggat ctggatcttt ctcttc	46
	<210> 75 <211> 44 <212> DNA <213> 人工	
	<220> <223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400> 75 gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac tgtgagagtg gtgc	44
	<210> 76 <211> 46 <212> DNA <213> 人工	
	<220> <223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400> 76 gagaaagctt gccgccacca tgggatggag ctgtatcadc ctcttc	46

	<210> 77	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400> 77	
	gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac tgtgagagtg gtg	43
	<210> 78	
	<211> 47	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400> 78	
	gagaaagctt gccgccacca tggatggag gatctttctc ttcattc	47
	<210> 79	
	<211> 44	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
[0037]	<400> 79	
	gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgactgag gttc	44
	<210> 80	
	<211> 51	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400> 80	
	gagaggtctc aagcttagcc accatggact ggatttggat catgctccat c	51
	<210> 81	
	<211> 44	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400> 81	
	gagagggccc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccaga gtcc	44
	<210> 82	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工	

	<220>		
	<223>	人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400>	82	
		gagaaagctt gcgcaccca tggatcaca gaetcaggtc ctc	43
	<210>	83	
	<211>	34	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400>	83	
		cacacgtacg tttcagctcc agcttggtcc cagc	34
	<210>	84	
	<211>	46	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400>	84	
		gagaaagctt gccgcaccca tgcattttca agtgcagatt ttcagc	46
[0038]	<210>	85	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400>	85	
		cacacgtacg ttttatttcc agcttggtcc	30
	<210>	86	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400>	86	
		gagaaagctt gcgcaccca tggagtttca gacccaggtc ttg	44
	<210>	87	
	<211>	33	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	人工序列描述: 寡核苷酸	

[0039]

```

<400> 87
cacacgtacg tttgatttcc agcttggtgc ctc 33

<210> 88
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<400> 88
gagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggcccaggtt cttatg 46

<210> 89
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<400> 89
cacacgtacg tttcagetcc agcttggtcc 30

<210> 90
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<400> 90
gagaaagctt gccgccacca tggattcaca gactcaggtc ctcatg 46

<210> 91
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<400> 91
cacacgtacg ttttatttcc aactttgtcc 30

<210> 92
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<400> 92
gagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggcccaggtt cttatattg 49

```

	<210> 93	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400> 93	
	cacacgtacg ttttatttcc agcttggtcc	30
	<210> 94	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400> 94	
	gagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggcccaggtt ettatg	46
	<210> 95	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
[0040]	<400> 95	
	cacacgtacg ttttatttcc agcttggtcc	30
	<210> 96	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400> 96	
	gagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggcccaggtt ettatg	46
	<210> 97	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400> 97	
	cacacgtacg tttcagetcc agcttggtcc cag	33
	<210> 98	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 人工	

	<220>		
	<223>	人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400>	98	
		gagaaagctt agccaccatg gaatcacaga ctctggcttt c	41
	<210>	99	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	人工序列描述: 寡核苷酸	
	<400>	99	
		cacacgtacg ttccagctcc agcttggctc	30
	<210>	100	
	<211>	1401	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	人工序列描述: 嵌合单克隆抗体	
	<400>	100	
		atggaatgga cctgggtctt tctcttctcc ctgtcagtaa ctgcagggtt ccaactccag	60
[0041]		gttcagctgc agcagctctgg agctgagctg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc	120
		tgcaaggcta ctggctacac attcagtagc tactggatag agtgggtaaa gcagaggctt	180
		ggacatggcc ttgagtggtt tggagagatt ttacctggaa gtggtagtac taactacaat	240
		gagaagttca agggcaagge cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg	300
		caactcagca gectgacatc tgaggactct gccgtctatt actgtgcaag atatgattac	360
		ccctggtttg cttactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgcagc ctccaccaag	420
		ggcccatcgg tcttccccct ggcacctcc tccaagagca cctctggggg cacageggcc	480
		ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccgggtg cgggtgctgt gaactcagcc	540
		gccctgacca gggcggtgca caccttccc gctgtctac agtctcagg actctactcc	600
		ctcagcagcg tggtagccgt gccctcagc agcttgggca cccagacctc catctgcaac	660
		gtgaatcaca agcccagcaa caccagggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac	720
		aaaactcaca catgccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc	780
		ctcttcccc caaaaccaa ggaccctc atgatctccc ggacctga ggtcacatgc	840
		gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	900
		gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	960
		gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	1020
		aaggtctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccactctcaa agccaaaggg	1080

cagcccccag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac	1140
caggtcagcc tgacctgect ggtcaaaggc ttctatecca gcgacatgce cgtggagtgg	1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccaagc ctcccgtgct ggactccgac	1260
ggctctctct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	1320
gtcttctcat gctccgtgat gcctgagget ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	1380
tcctgtctc cgggtaaatg a	1401
<210> 101	
<211> 1404	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体	
<400> 101	
atggattggc tgtggaactt getattctct atggcagctg cccaaagtat ccaagcacag	60
atccagttgg tgcagtcttg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc	120
tgcaaggctt ctgggtatac ctccacaaac tatggaatga actgggtgaa gcaggctcca	180
ggaagggtt taaagtggat gggctggata aacaccaaca ctggagagcc aacatatgct	240
gaagagtcca agggacggtt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac tgctatctt	300
cagatcaaca acctcaaaaa tgaggacagc gctacatatt tctgtgcaag actgggtttt	360
ggtaatgcta tggactactg gggcaagga acctcagcca cctctctctc agctccacc	420
aagggcccat cggctctccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg	480
gcctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca	540
ggcgcctga ccagcggcgt gcacaccttc cgggctgtcc tacagtcctc aggactctac	600
tcctcagca gcgtgggtgac cgtgcctctc agcagcttg gcaccagac ctacatctgc	660
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt	720
gacaaaactc acacatgcc accgtgccc gcacctgaac tctgggggg accgtcagtc	780
ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	840
tgctgtgtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac	900
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtaca cagcacgtac	960
cgtgtggtea gcgtctctac cgtctctgac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	1020
tgcaaggctc ccaacaaaag cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa	1080
ggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag	1140
aaccaggtca gcctgacctg cctggtaaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctggag	1200
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc	1260

[0042]

gacggctcct tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
 ctctccctgt ctccgggtaa atga 1404

<210> 102
 <211> 1398
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体

<400> 102
 atggaatgga tctggatctt tctcttcac. ctctcaggaa ctgcaggtgt ccactcccag 60
 gttcagetgc agcagtctgg agctgagctg gcgaggcccg gggttcagt gaagctgtcc 120
 tgcaaggctt ctggctacac cttcactgac tactatataa actgggtgaa gcagaggact 180
 ggacagggcc ttgagtggat tggagagatt tatcctggaa gfggtaatac ttactacaat 240
 gagaagtcca agggcaaggc cacactgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 cagctcagea gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt tctgtgcaag atcgtatggt 360
 gcctttgact actggggcca aggcaccaact ctcacagtct cctcagcctc caccaagggc 420
 ccacgtctct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg 480
 [0043] ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 540
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 600
 agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcage ttggggaccc agacctacat ctgcaacgtg 660
 aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagtfg agcccaaatc ttgtgacaaa 720
 actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc 780
 ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctccccga cccctgaggt cacatgcgtg 840
 gtggtggacg tgagccacga agacctgag gtcaagttoa actggtacgt ggacggcgtg 900
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgctg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 960
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 1020
 gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1080
 ccccagaaac cacaggtgta caccctgccc ccattcccgg atgagctgac caagaaccag 1140
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1260
 tccttcttcc tctatagcaa gctcacctg gacaagagca ggtggcagea ggggaacgtc 1320
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggetctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380
 ctgtctccgg gtaaataa 1398

<210> 103
 <211> 1404
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体

<400> 103
 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaetcccag 60
 gtccaaactgc agcagcctgg ggcctgagctg gtgaggcctg gggcttcagt gaagctgtcc 120
 tgcgaaggctt ctggctaacac ctccaccagc tactggataa actgggtgaa gcagaggcct 180
 ggacaaggcc ttgagtggat cggaaatatt tatcctctcg atagttatac taactacaat 240
 caaaagtcca aggacaagc cacattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 cagctcagca gcccagatc tgaggactct gcggtctatt actgtacaag atcgtggagg 360
 ggtaactcct ttgactactg gggccaagc accactctca cagtctctc agcctccacc 420
 aagggccat eggtcttccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
 gcctgggct gcctgggtaa ggactacttc cccgaaccg tgacgggtgc gtggaactca 540
 ggcgcctcga ccagcggcgt gcacacctc ccggtctcc tacagctctc aggactctac 600
 tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttg gcaccagac ctacatctgc 660
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720
 gacaaaactc acacatgcc accgtgccc gcaectgaac tcctgggggg accgtcagtc 780
 ttctcttcc ccccaaac caaggacacc ctcatgatc cccggacccc tgaggtcaca 840
 tgcgtggtgg tggcgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaag ccgcgggagg agcagtaca cagcaagtac 960
 cgtgtggta gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
 tgcgaaggtc ccaacaagc cctcccagc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 1140
 aaecaggta gcctgacctg cctgggtaaa ggtttctatc ccagcgacat cgcctggag 1200
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260
 gacggctcct tcttctcta tagcaagtc accgtggaca agagcagggt gcagcagggg 1320
 aacgtctct catgctcct gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
 ctctcctgt ctccgggtaa atga 1404

[0044]

<210> 104
 <211> 1401
 <212> DNA
 <213> 人工

```

<220>
<223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体

<400> 104
atggaatgga ggatctttct ettcactctg tcaggaactg caggtgtcca ctcccaggtt    60
cagctgcagc agtctggacc tgagctggtg aagcctgggg ctfcagtga gatgtcctgc    120
aaggctctct gatacacatt cactgactat gttataagct gggatgaagca gagaactgga    180
cagggccttg agtggattgg agagatttat cctggaagtg gtagtactta ctacaatgag    240
aagtccaagg gcaaggccac actgactgca gacaaatcct ccaacacagc ctacatgcag    300
ctcagcagcc tgacatctga ggactctgag gtctatttct gtgcaagagg ggtattaacta    360
cgggctatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcacag tctcctcagc ctccaccaag    420
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc    480
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccgggtg cgggtgtcgtg gaactcaggc    540
gccctgacca gcggcgtgca caccctcccc gctgtcctac agtctcagg actctactcc    600
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca ccagaccta catctgcaac    660
gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagaag ttgagccaa atcttgtgac    720
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc    780
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc    840
[0045] gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc    900
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cactaccgt    960
gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc    1020
aaggctctca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg    1080
cagccccagc aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaaccaagaac    1140
caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg    1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac    1260
ggctcctctt tctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac    1320
gtcttctcat gctccgtgat gcctgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc    1380
tccctgtctc cgggtaaata a                                1401

<210> 105
<211> 1410
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体

<400> 105
atggactgga ttggatcat gctccatctg ctggcagcag ctacaggtat ccaatcccag    60

```

	gttcaacctac aacagttctgg ttctgaactg aggagtcctg ggtcttcagt aaagctttca	120
	tgcaaggatt ttgattcaga agtcttccct tttgcttata tgagttggat taggcagaag	180
	cctgggcatg gatttgaatg gattggagac ataactccaa gtattggtag aacaatctat	240
	ggagagaagt ttgaggacaa agccacactg gatgcagaca cagtgtccaa cacagcctac	300
	ttggagctca acagtctgac atctgaggac tctgctatct actactgtgc aaggggggag	360
	ggctacggtg cctggtttgc ttactggggc caagggaactc tggtcactgt ctctgcagcc	420
	tccaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	480
	acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttcccgc aaccggtgac ggtgtcgtgg	540
	aactcaggcg ccttgaccag cggcgtgcac accttcccgc ctgtcctaca gtcctcagga	600
	ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcac ccagacctac	660
	atctgcaacg tgaatcacia gccacgcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa	720
	tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaaactcct ggggggaccg	780
	tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag	840
	gtcacatcgc tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac	900
	gtggacggcg tggagggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	960
[0046]	acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	1020
	tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa	1080
	gccaaagggc agccccgaga accacagggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg	1140
	accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggtc totatcccag cgacatcgcc	1200
	gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg	1260
	gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaacc tggacaagag caggtggcag	1320
	caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag	1380
	aagagcctct cccctgtctcc gggtaaatga	1410
	<210> 106	
	<211> 723	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体	
	<400> 106	
	atggaateac agactcaggt cctcatgtcc ctgctgttct gggatatctgg tacctgtggg	60
	gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggtcact	120
	atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc	180
	tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg	240

	gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc	300
	atcagcagtg tgcaggetga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat	360
	ccgctcacgt tccgtgctgg gaccaagctg gagctgaaac gtacgggtggc tgcaccatct	420
	gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc	480
	ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc	540
	caategggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc	600
	ctcagcagca ccttgacgct gagcaaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc	660
	gaagtcacc c atcaggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt	720
	tag	723
	<210> 107	
	<211> 708	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体	
	<400> 107	
[0047]	atgcattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaatac gtgcctcagt cataatgtcc	60
	agaggacaaa ttgtttctac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag	120
	gtcaccataa cctgcagtgc cagctcaagt gtaagttaca tgcaactggt ccagcagaag	180
	ccaggcaact ctcccact ctggatttat agcacatcca acctggcttc tggagtcct	240
	gctcgttca gtggcagtgg atctgggacc tcttactctc tcacaatcag ccgaatggag	300
	gctgaagatg ctgccactta ttactgccag caaaggagta gttaccacc cacttcgga	360
	ggggggacca agctggaaat aaaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttccc	420
	ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	480
	tatcccagag aggccaaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc	540
	caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg	600
	acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgccaagt caccatcag	660
	ggcctgagct cccccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag	708
	<210> 108	
	<211> 705	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体	
	<400> 108	
	atggagtttc agaccaggt ctttgtatcc gtgttgcctc ggttgtctgg tgttgatgga	60

```

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaatc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 120
atcacctgca aggccagtoa gaatgttcgt actgctgtag cctggatca acagaaacca 180
gggcagtctc ctaaagcact gatttacttg gcatccaacc ggcacactgg agtcctgat 240
cgcttcacag gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccattagcaa tgtgcaatct 300
gaagacctgg cagattatct ctgtctgcaa cattggaatt atcctctgac gttcgggtgga 360
ggcaccgaagc tggaaatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc 420
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcgaagtca ccatcagggc 660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac agggggagagt gttag 705

```

```

<210> 109
<211> 723
<212> DNA
<213> 人工

```

```

<220>
<223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体

```

[0048]

```

<400> 109
atggattcac aggccaggt tcttatgtta ctgctgctat gggtatctgg tacctgtggg 60
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctgactgtgt cagttggaga gaaggttact 120
atgagctgca agtcagtcga gagccttcta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 180
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atccactagg 240
gaatctgggg tccctgatcg ctccacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 360
ccgctcacgt tcgggtgctg gaccaagctg gagctgaaac gtacgggtggc tgcaccatct 420
gtcttcatct tcccgcacat tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 480
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 540
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cactacagc 600
ctcagcagca ccctgacgct gagcaagca gactacgaga aacacaaaagt ctacgctgc 660
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgcgc gtcacaaaaga gcttcaacag gggagagtgt 720
tag 723

```

```

<210> 110
<211> 723
<212> DNA
<213> 人工

```


<220>
 <223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体
 <400> 110
 atggaatcac agactcaggt cctcatgtcc ctgctgttct gggatatctgg tacctgtggg 60
 gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggctcact 120
 atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 180
 tggtagcagc agaaaccagg gcagctcctt aaactgttga totactgggc atccactagg 240
 gaatctgggg tccctgatcg ettcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 300
 atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttaa 360
 ccattcacgt tcggctcggg gacaaagtg gaaataaac gtacgggtgc tgcaccatct 420
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 480
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 540
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
 ctcagcagca ccctgacgct gagcaaaagca gactacgaga aacacaaaag ctacgcctgc 660
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaaga gcttcaacag gggagagtgt 720
 tag 723

[0049]

<210> 111
 <211> 720
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体
 <400> 111
 atggattcac aggeccaggt tcttatattg ctgctgctat gggatatctgg tacctgtggg 60
 gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggctcact 120
 atgagctgca aatccagtca gagtctgttc aacagttaga cccgaaagaa ctacttggtc 180
 tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga totactgggc atccactagg 240
 gaatctgggg tccctgatcg ettcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300
 atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 360
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgta cggtagctgc accatctgtc 420
 ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgctctgtg tgtgtgcctg 480
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 540
 tcgggtaact ccagagagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
 agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 660
 gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720

<210> 112
 <211> 723
 <212> DNA
 <213> 人工

 <220>
 <223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体

 <400> 112
 atggattcac aggccaggt tcttatgtta ctgctgctat gggatatctgg tacctgtggg 60
 gacatcgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact 120
 atgagctgca agtccagtea gagcctttaa tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 180
 tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga ttactgggc atccactagg 240
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg caacagattt cactctgacc 300
 atcagcagtg tgcagctga agacctgca gattatcact gtggacaggg ttacagctat 360
 ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac gtacgggtggc tgcaccatct 420
 gtcttcactt tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 480
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 540
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gaggaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
 ctacagcagc ccttgacgct gagcaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 660
 [0050] gaagtcacc c atcagggcct gagctcggcc gtcacaaaaga gcttcaacag gggagagtg 720
 tag 723

<210> 113
 <211> 723
 <212> DNA
 <213> 人工

 <220>
 <223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体

 <400> 113
 atggattcac aggctcaggt tcttatgtta ctgctgctat gggatatctgg tacctgtggg 60
 gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact 120
 atgagctgca agtccagtea gagcctttaa tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 180
 tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga ttactgggc atccactagg 240
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300
 atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 360
 ccgctcacgt tcgggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac gtacgggtggc tgcaccatct 420
 gtcttcactt tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 480
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 540

caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gaggaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
 ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 660
 gaagtcacc c atcagggcct gagctcgcgc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 720
 tag 723

<210> 114
 <211> 705
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体

[0051]

<400> 114
 atggaatcac agactctggc cttcatatcc ataactgctc ggttatatgg agctgatggg 60
 aacattgtaa tgaccaatc tccc aaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc 120
 ttgacctgca aggccagtga gaatgtggtt acttatgttt cctggatca acagaaacca 180
 gagcagcttc ctaaaactgct gatatacggg gcataccaacc ggtacactgg ggtccccgat 240
 cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctca ccatcagcag tgtgaaggct 300
 gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa tattatagct atccgctcac gttcgggtct 360
 gggaccaagc tggagctgaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc 420
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gctgctgaa taacttctat 480
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgcc cccaatcggg taactcccag 540
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gctcagcag caccctgacg 600
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct gcaagtcac ccatcagggc 660
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 115
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体

<400> 115

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300

[0052]

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 340 345 350
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 420 425 430
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460
 Gly Lys
 465
 <210> 116
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体
 <400> 116
 Met Asp Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15
 Ile Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
 20 25 30

[0053]

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

[0054]

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 [0055] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 Pro Gly Lys
 465
 <210> 117
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体
 <400> 117
 Met Glu Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Ile Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asp Tyr Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 210 215 220
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 225 230 235 240
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 245 250 255
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 260 265 270
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 275 280 285

[0056]


```

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290                295                300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305                310                315                320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
                325                330                335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                340                345                350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355                360                365

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370                375                380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385                390                395                400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 405                410                415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420                425                430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435                440                445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 450                455                460

Lys
465

<210> 118
<211> 467
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体

<400> 118

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1                5                10                15
    
```

[0057]

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

[0058]

```

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
  275                               280                               285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
  290                               295                               300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
  305                               310                               315                               320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
  325                               330                               335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
  340                               345                               350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
  355                               360                               365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
  370                               375                               380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
  385                               390                               395                               400

[0059] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
  405                               410                               415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
  420                               425                               430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
  435                               440                               445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
  450                               455                               460

Pro Gly Lys
465

<210> 119
<211> 466
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体

<400> 119

Met Glu Trp Arg Ile Phe Leu Phe Ile Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val
  1           5           10           15

```

His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro
 20 25 30
 Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 35 40 45
 Asp Tyr Val Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu
 50 55 60
 Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu
 65 70 75 80
 Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr
 85 90 95
 Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 100 105 110
 Phe Cys Ala Arg Gly Val Leu Leu Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 145 150 155 160
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 210 215 220
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 225 230 235 240
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 245 250 255
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270

[0060]

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 275 280 285
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 340 345 350
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 420 425 430
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

[0061]

Gly Lys
465

<210> 120
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体

<400> 120

Met Asp Trp Ile Trp Ile Met Leu His Leu Leu Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Ile Gln Ser Gln Val His Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Arg Ser
 20 25 30
 Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val
 35 40 45
 Phe Pro Phe Ala Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Lys Pro Gly His Gly
 50 55 60
 Phe Glu Trp Ile Gly Asp Ile Leu Pro Ser Ile Gly Arg Thr Ile Tyr
 65 70 75 80
 Gly Glu Lys Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Val Ser
 85 90 95
 Asn Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
 100 105 110
 Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255

[0062]

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 370 375 380
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460
 Leu Ser Pro Gly Lys
 465

[0063]

<210> 121
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体

<400> 121
 Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr
 20 25 30
 Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 115 120 125
 Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 130 135 140
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 145 150 155 160
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 165 170 175
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 180 185 190
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 195 200 205
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 210 215 220
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235 240
 <210> 122
 <211> 235

[0064]

<212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体
 <400> 122
 Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
 35 40 45
 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser
 50 55 60
 Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
 100 105 110
 Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 130 135 140
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 145 150 155 160
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 165 170 175
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 180 185 190
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 195 200 205
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 210 215 220

[0065]

```

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225          230          235

<210> 123
<211> 234
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体

<400> 123

Met Glu Phe Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Val Leu Leu Trp Leu Ser
1          5          10          15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser
20          25          30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn
35          40          45

Val Arg Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50          55          60

Lys Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp
65          70          75          80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85          90          95

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp
100         105         110

Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115         120         125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130         135         140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145         150         155         160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165         170         175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180         185         190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195         200         205
    
```

[0066]

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 124
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体

<400> 124

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

[0067]

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235 240

<210> 125
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体

<400> 125

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr
 20 25 30

Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
 115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 145 150 155 160

[0068]

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235 240

<210> 126
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体

<400> 126

[0069] Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 127
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> 人工

[0070]

<220>
 <223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体

<400> 127

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr
 100 105 110

His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 115 120 125
 Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 130 135 140
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 145 150 155 160
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 165 170 175
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 180 185 190
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 195 200 205
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 210 215 220
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235 240
 [0071]
 <210> 128
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体
 <400> 128
 Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
 20 25 30
 Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 115 120 125
 Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 130 135 140
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 145 150 155 160
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 165 170 175
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 180 185 190
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 195 200 205
 [0072] Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 210 215 220
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235 240
 <210> 129
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 人工序列描述: 嵌合单克隆抗体
 <400> 129
 Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr
 1 5 10 15
 Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser
 20 25 30
 Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn
 35 40 45
 Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
 100 105 110
 Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 115 120 125
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

[0073]

<210> 130
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 人工序列描述: 寡核苷酸
 <400> 130
 ccaagggcta tggcgttc

18

<210> 131
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>

<223> 人工序列描述: 寡核苷酸

<400> 131

ccgaaggtgt acctggtc

18

<210> 132

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列描述: PCR产物的翻译

<400> 132

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

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

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

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

[0074]

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 133

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列描述: PCR产物的翻译

<400> 133

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

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 134

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工

[0075]

<220>

<223> 人工序列描述: PCR产物的翻译

<400> 134

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 135
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列描述: PCR产物的翻译

<400> 135

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

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

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

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

[0076] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 136
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列描述: PCR产物的翻译

<400> 136

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

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

```

Val Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
  35                               40                               45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
  65                               70                               75                               80

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser
  115

<210> 137
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列描述: PCR产物的翻译

[0077] <400> 137

Gln Val His Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Arg Ser Pro Gly Ser
  1                               5                               10                               15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val Phe Pro Phe
  20                               25                               30

Ala Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Lys Pro Gly His Gly Phe Glu Trp
  35                               40                               45

Ile Gly Asp Ile Leu Pro Ser Ile Gly Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Lys
  50                               55                               60

Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Val Ser Asn Thr Ala
  65                               70                               75                               80

Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr
  85                               90                               95

Cys Ala Arg Gly Glu Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
  100                              105                              110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
  115                               120

```

<210> 138
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: PCR产物的翻译

<400> 138

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

[0078]

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

Lys

<210> 139
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: PCR产物的翻译

<400> 139

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

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

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

Ser Thr Ser Asn 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 Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 140

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列描述: PCR产物的翻译

<400> 140

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

[0079]

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 141

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列描述: PCR产物的翻译

```

<400> 141
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1           5           10           15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20           25           30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35           40           45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50           55           60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80
Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85           90           95
Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100          105          110

```

[0080] Lys

```

<210> 142
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工序列描述: PCR产物的翻译

<400> 142
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1           5           10           15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20           25           30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35           40           45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50           55           60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

```


Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 143

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列描述: PCR产物的翻译

<400> 143

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

[0081]

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 144

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列描述: PCR产物的翻译

<400> 144

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

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

Lys

<210> 145
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工

[0082]

<220>
 <223> 人工序列描述: PCR产物的翻译
 <400> 145

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

Lys

<210> 146
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: PCR产物的翻译

<400> 146

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr
 20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

[0083]

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala
 65 70 75 80

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

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

<210> 147
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工序列描述: 密码子优化的核酸

<400> 147

cgtaacgggtgg ccgctcccag cgtgttcatc tccccccca gcgacgagca gctgaagtcc 60
 ggcaaccgcca gcgtggtgtg cctgctgaac aacttctaec cccgggaggc caaggtgcag 120
 tggaaggtgg acaacgccct gcagagcggc aacagccagg agagcgtcac cgagcaggac 180
 agcaaggact ccacctacag cctgagcagc accctgacc tgagcaaggc cgaactacgag 240
 aagcacaagg tgtacgcctg cgaggtgacc caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag 300
 agcttcaaca gggggcagtg ctag 324

<210> 148
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工

 <220>
 <223> 人工序列描述: 密码子优化的蛋白质

 <400> 148

 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

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

 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

 [0084] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 149
 <211> 981
 <212> DNA
 <213> 人工

 <220>
 <223> 人工序列描述: 密码子优化的核酸

 <400> 149
 ggccaagcgg tgttccccct ggccccccagc agcaagagca ccageggcgg cacagccgcc 60
 ctgggctgccc tgggtgaagga ctacttcccc gagcccgtga ccgtgagctg gaacagcggg 120
 gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc gccgtgctgc agagcagcgg cctgtacagc 180
 ctgagcagcg tggtgaccgt gcccagcagc agcctgggca ccagacctc catctgcaac 240
 gtgaaccaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagagag tggagcccaa gagctgagac 300
 aagaccaca cctgcccccc ctgcccagcc ccagagctgc tgggcggacc cagcgtgttc 360
 ctgttcccc ccaagcccaa ggacacctg atgatcagca ggacccccga ggtgacctgc 420
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaggaccca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggc 480

```

gtggaggtgc acaacgcca gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg 540
gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga atacaagtgc 600
aagggtctcca acaaggccct gccagccccc atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 660
cagccacggg agccccaggt gtacaccctg cccccagcc gggaggagat gaccaagaac 720
caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctacccca ggcacatcgc cgtggagtgg 780
gagagcaacg gccagcccca gaacaactac aagaccaccc ccccagtgtt ggacagcgac 840
ggcagcttct tctgtacag caagctgacc gtggacaagt ccaggtggca gcagggcaac 900
gtgttcagct gcagcgtgat gcacgagccc ctgcacaacc actacacca gaagtccctg 960
agcctgagcc ccggcaagta g 981

```

```

<210> 150
<211> 326
<212> PRT
<213> 人工

```

```

<220>
<223> 人工序列描述: 密码子优化的蛋白质
<400> 150

```

[0085]

```

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
1          5          10          15

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
          20          25          30

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
          35          40          45

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
          50          55          60

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
65          70          75          80

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
          85          90          95

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
          100          105          110

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
          115          120          125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
          130          135          140

```

[0086]

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325



图1

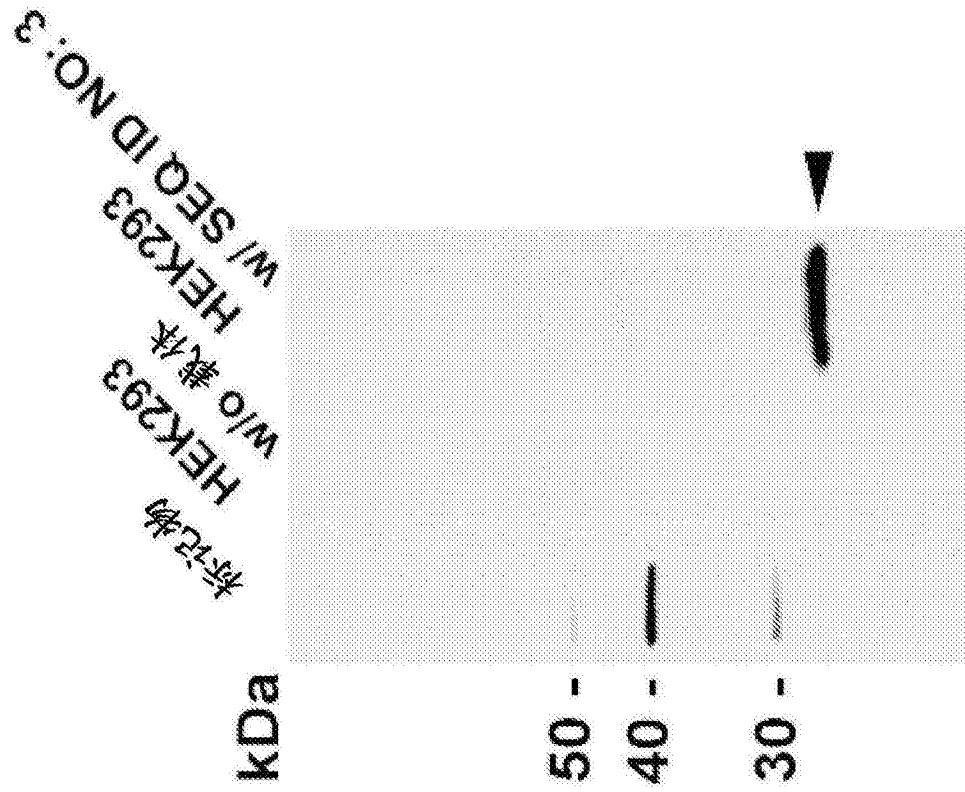


图2

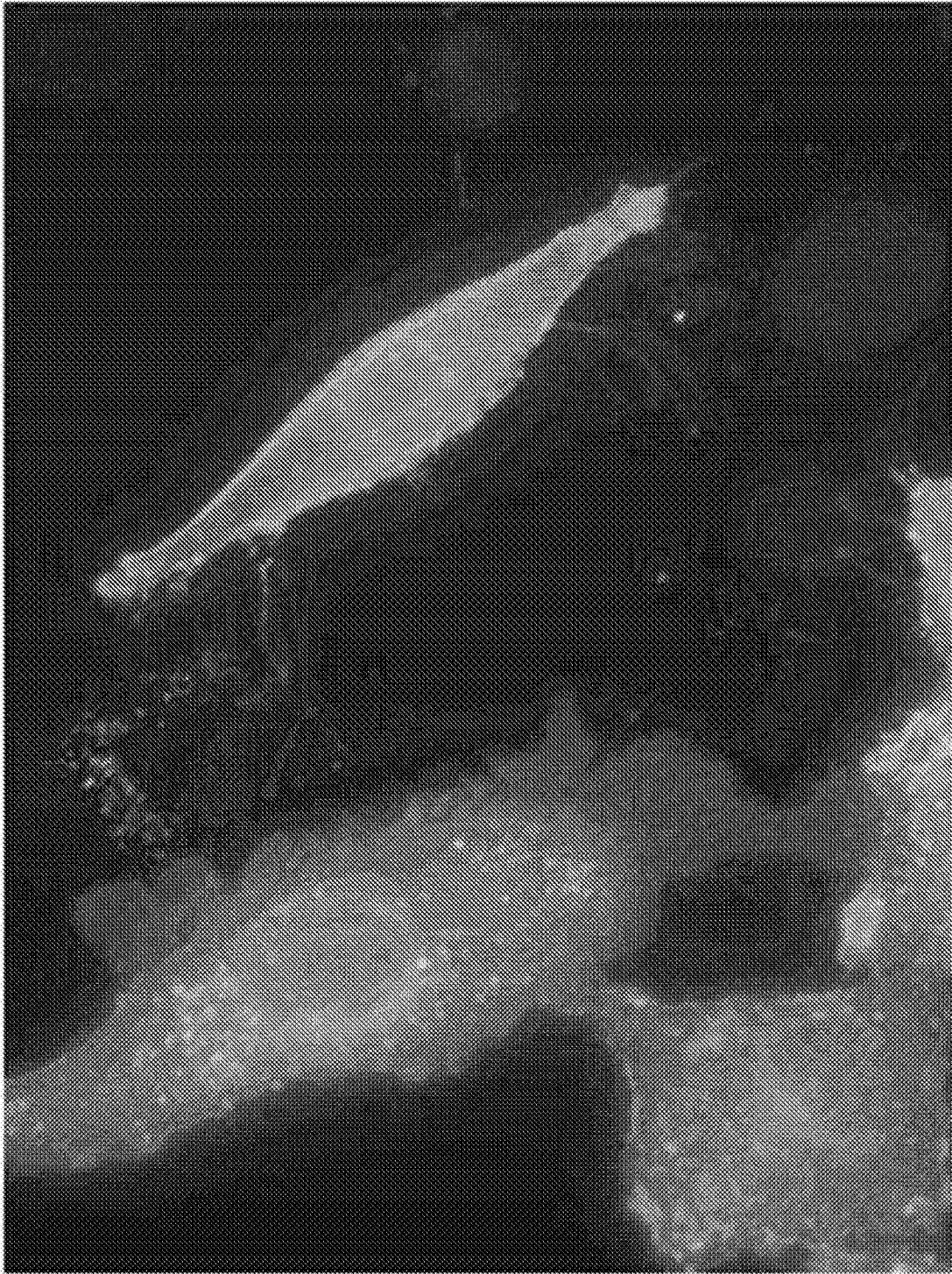
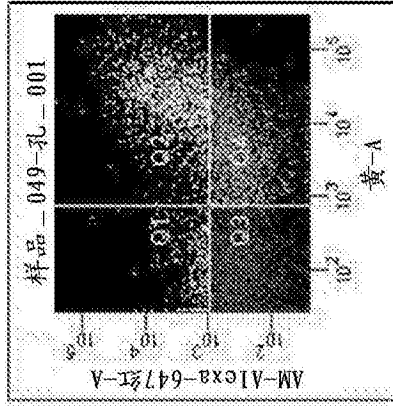


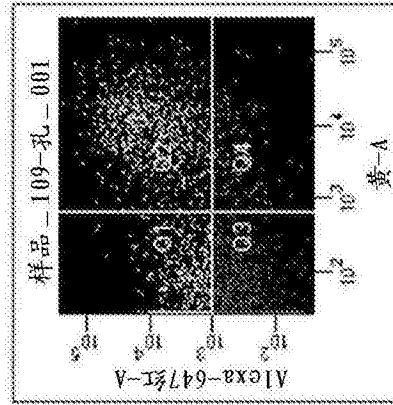
图3

85A3 (182-D756-002)



(B)

24H5 (182-D758-034)



(A)

图4

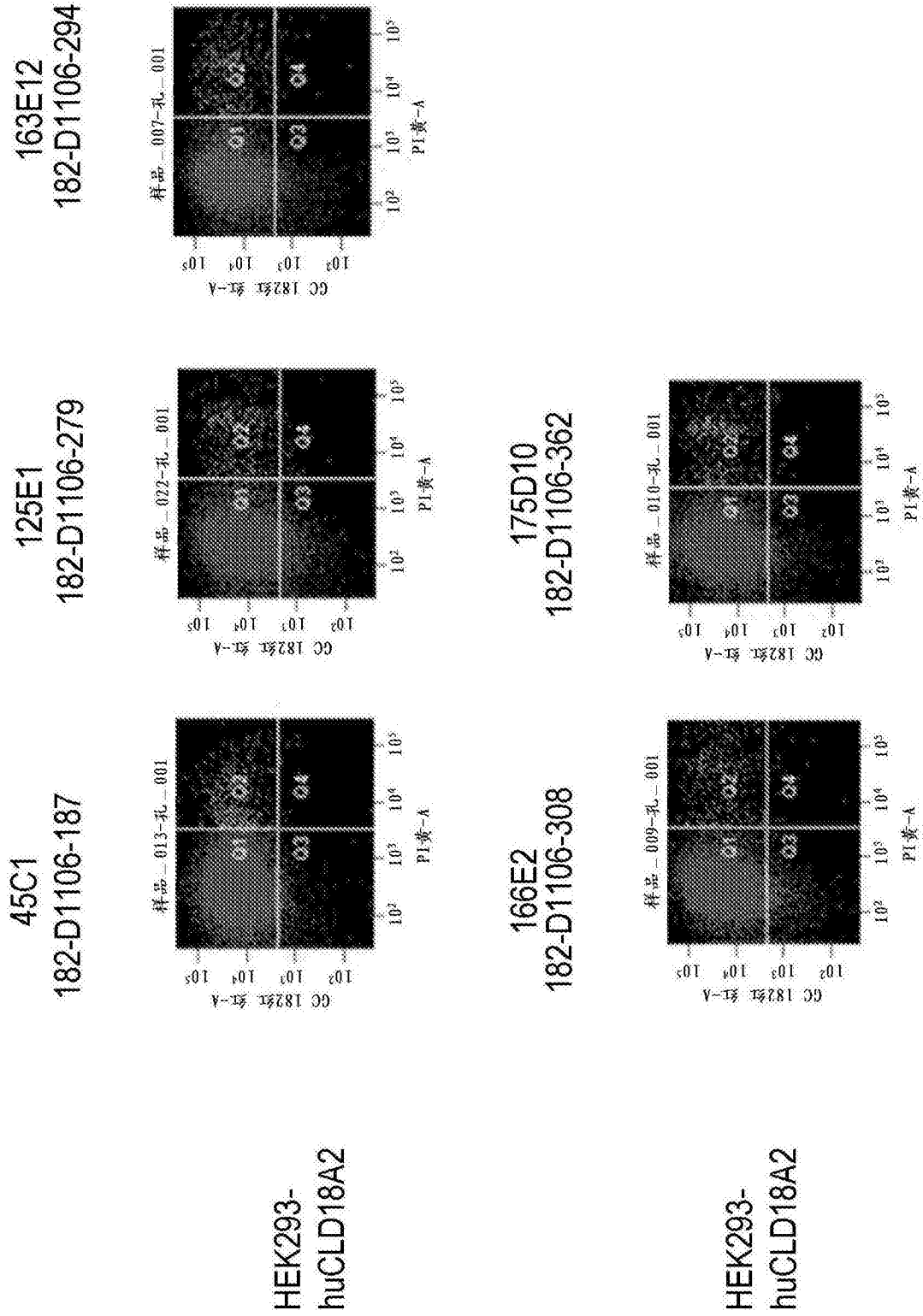


图4C

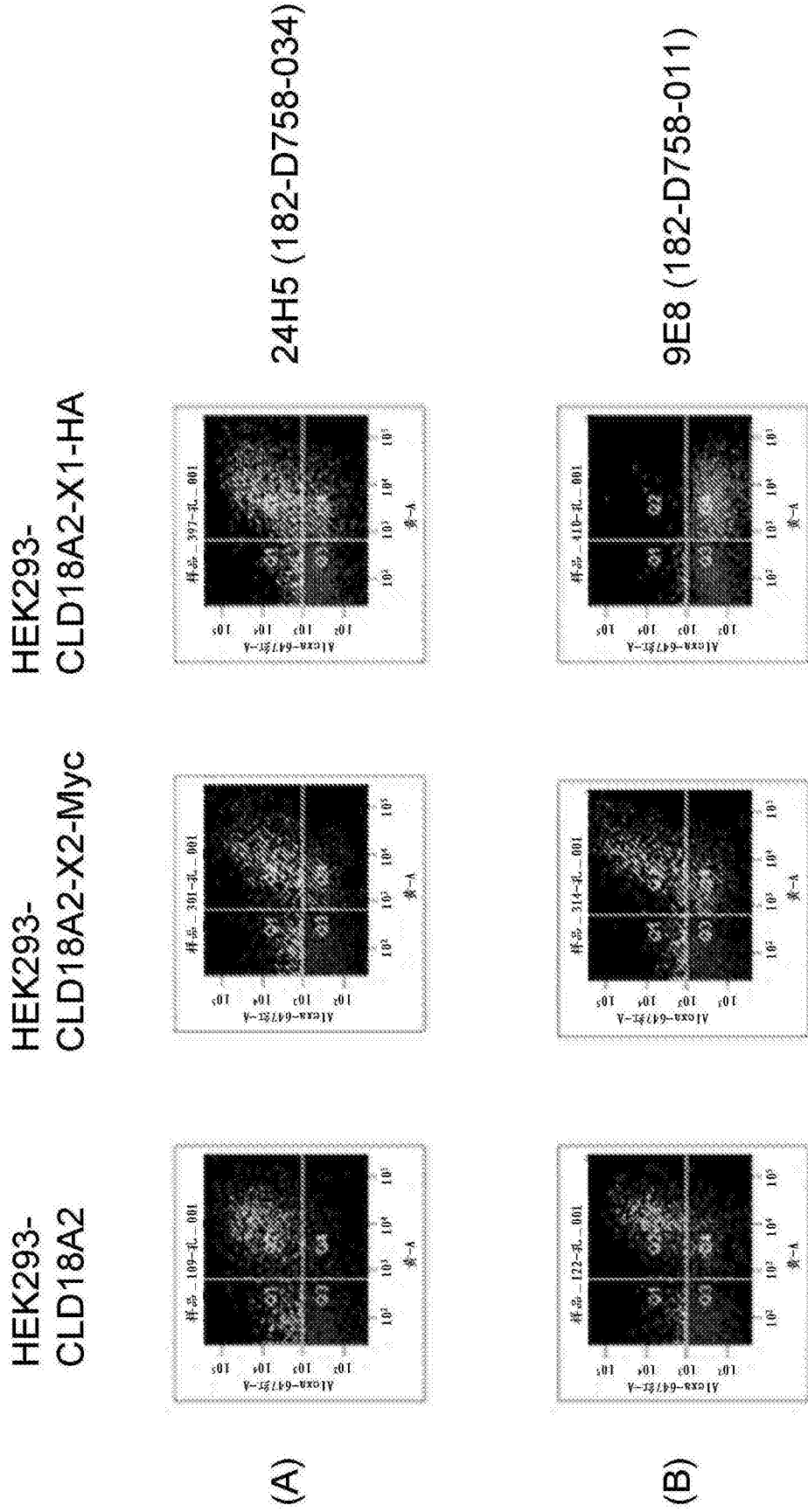
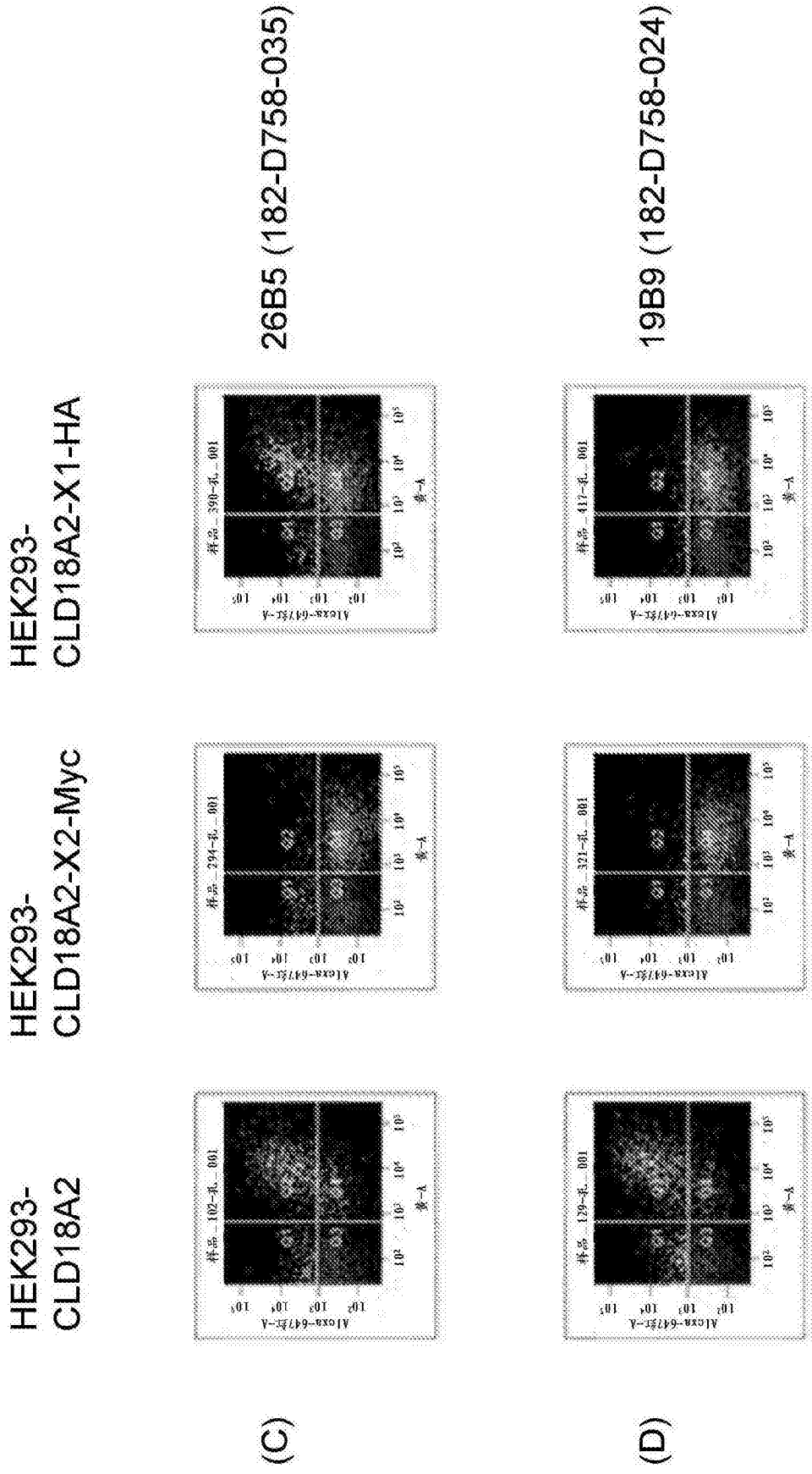


图5

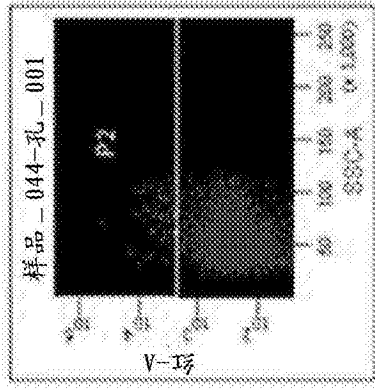


(C)

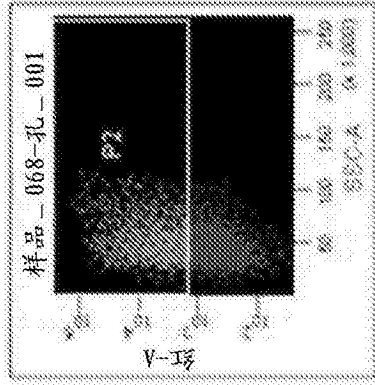
(D)

图5续

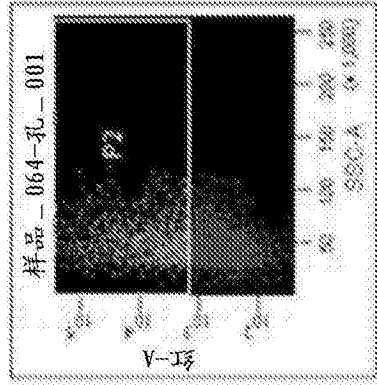
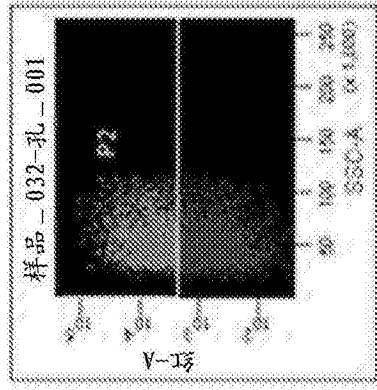
HEK293-
CLD18A1



HEK293-
CLD18A2



43A11
182-D1106-062



37H8
182-D1106-056

图6A

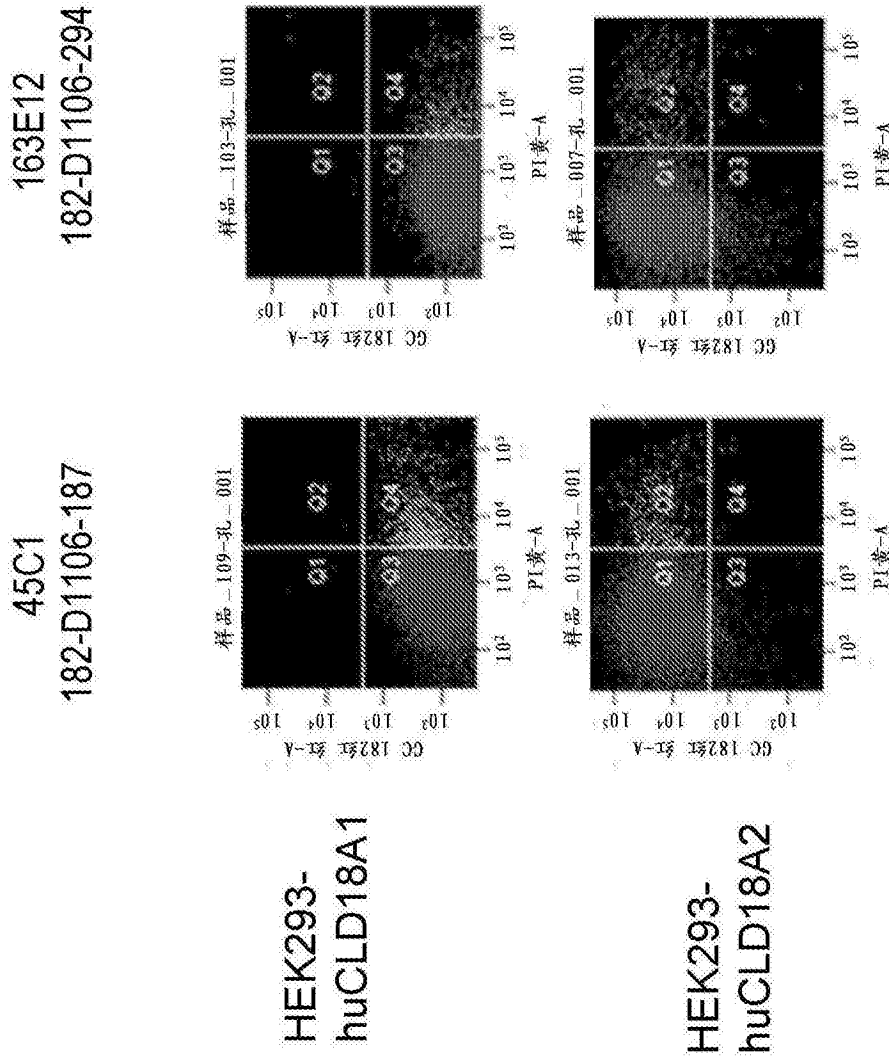


图6B

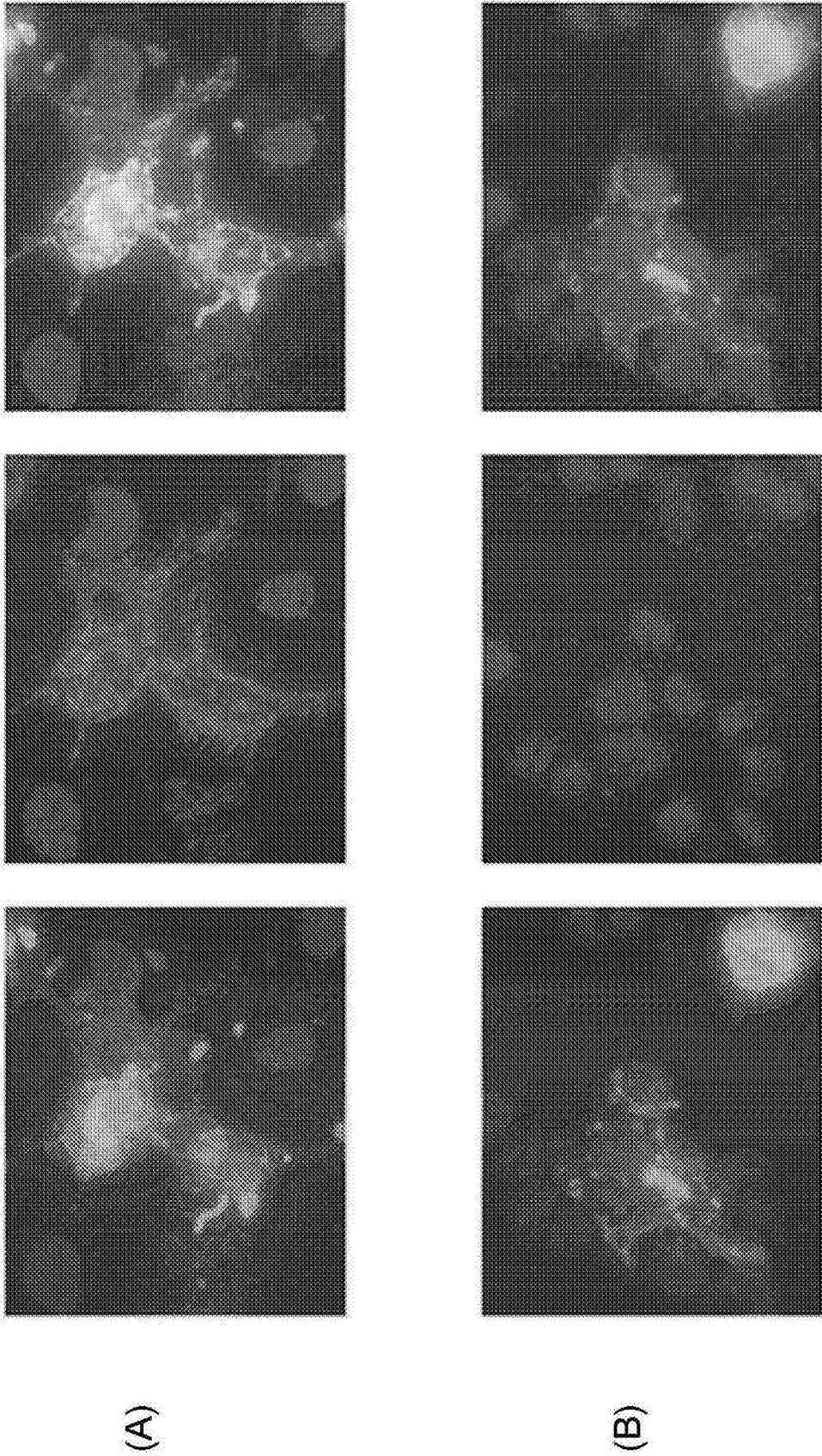
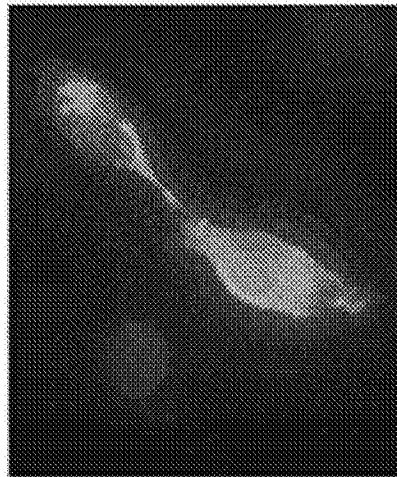
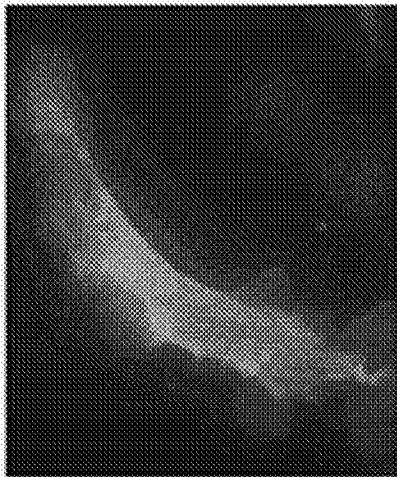
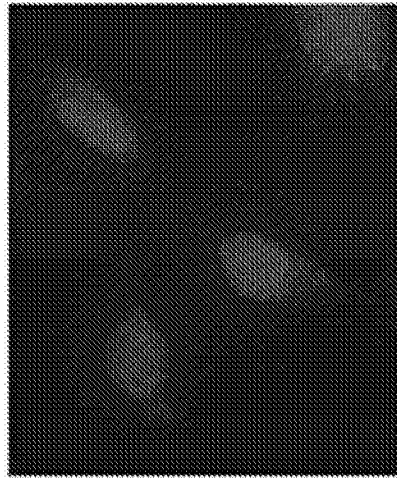
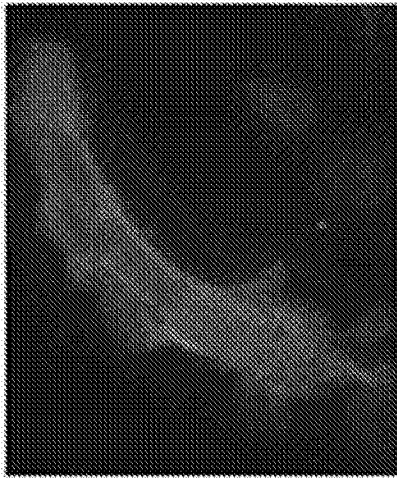
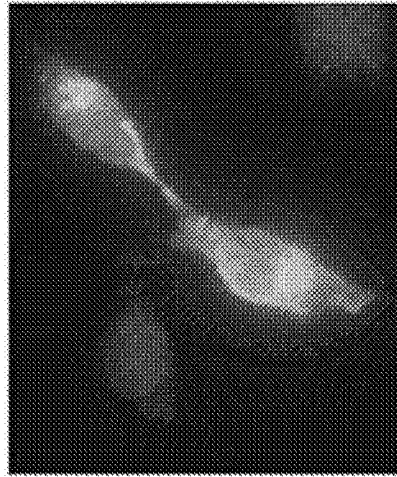
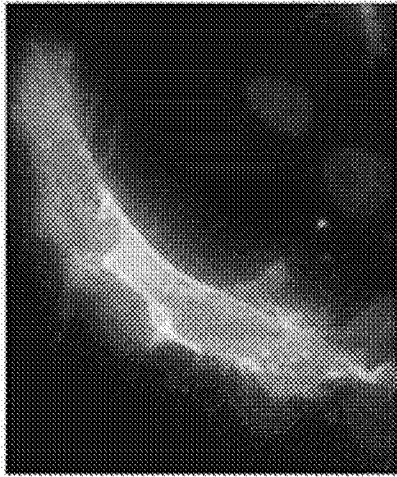


图7



(C)

(D)

图7续

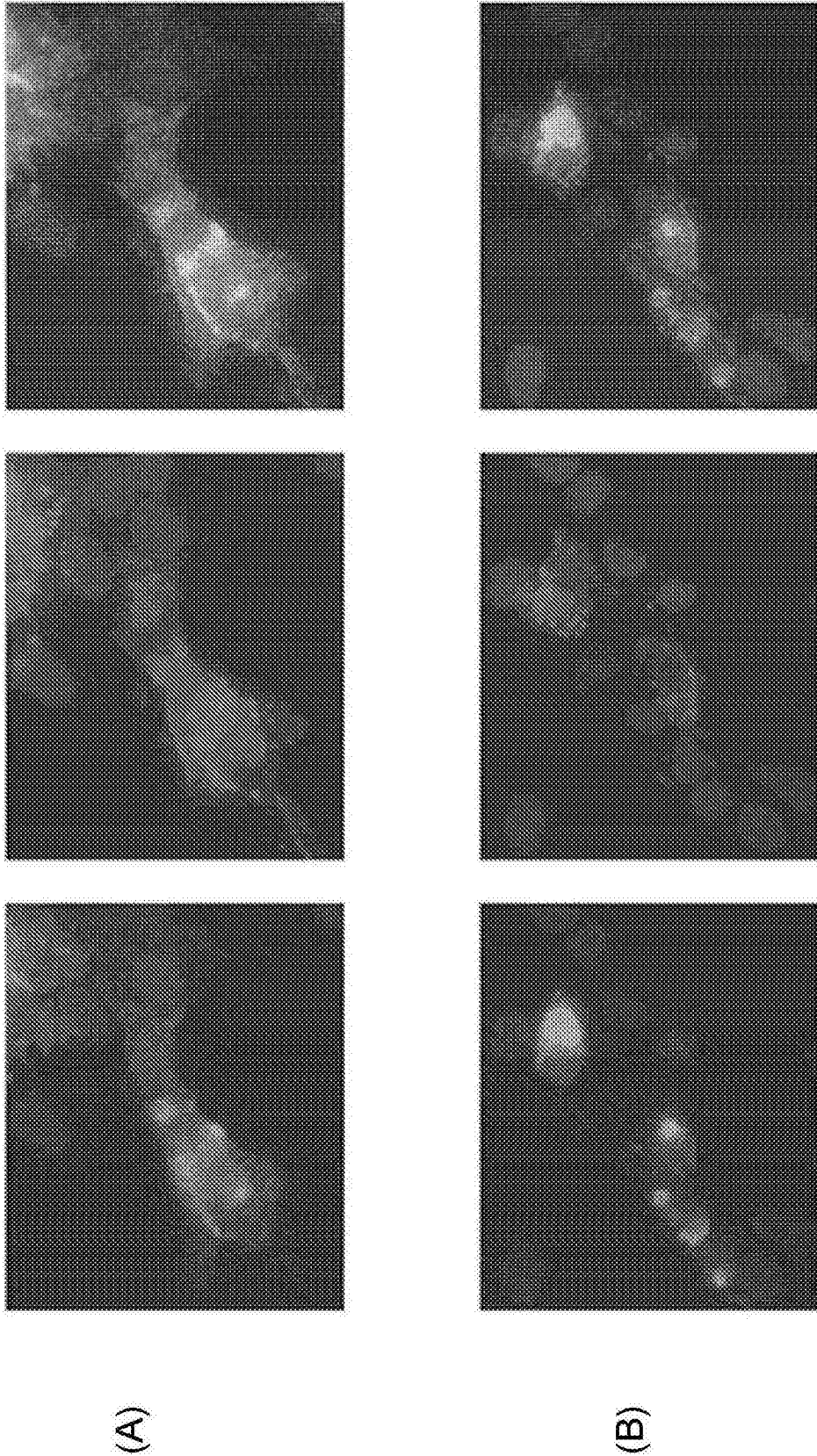
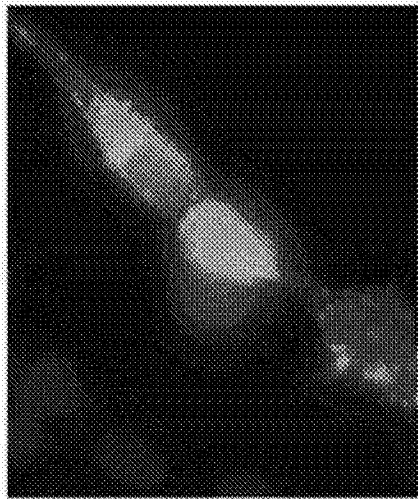
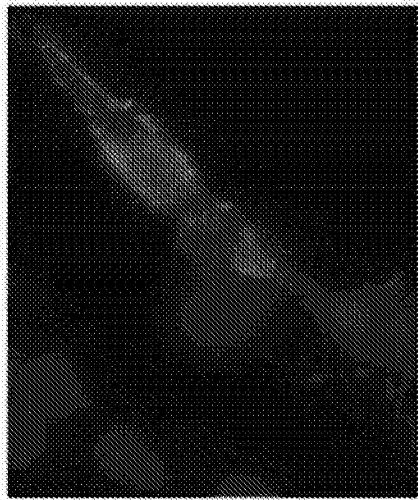
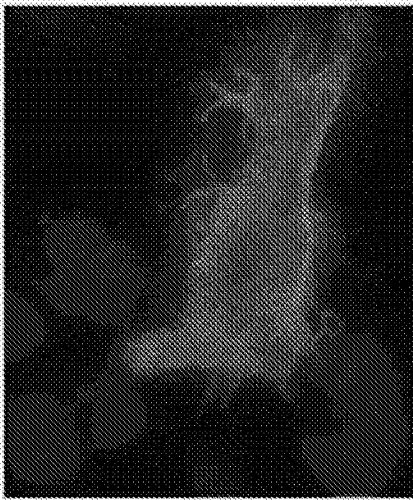
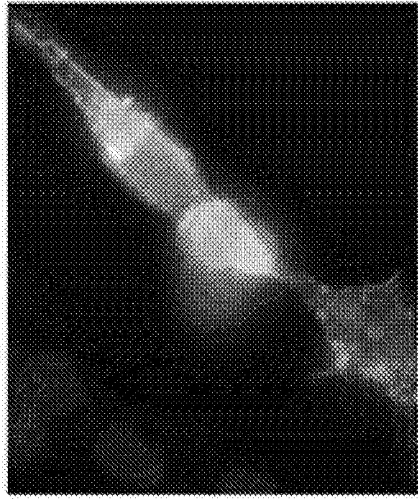
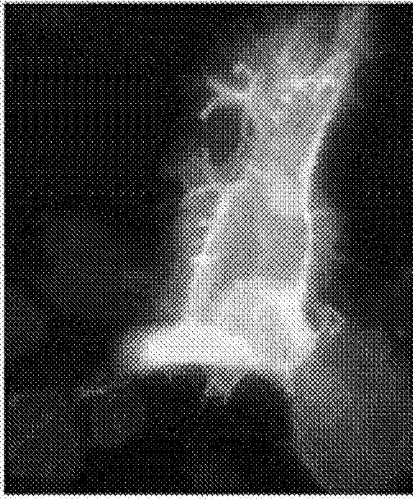


图8



(c)

(d)

图8续

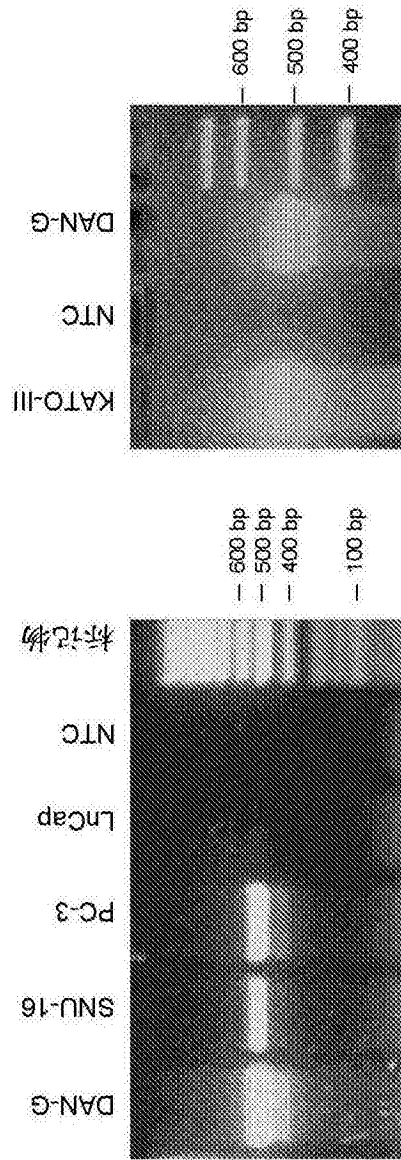


图6

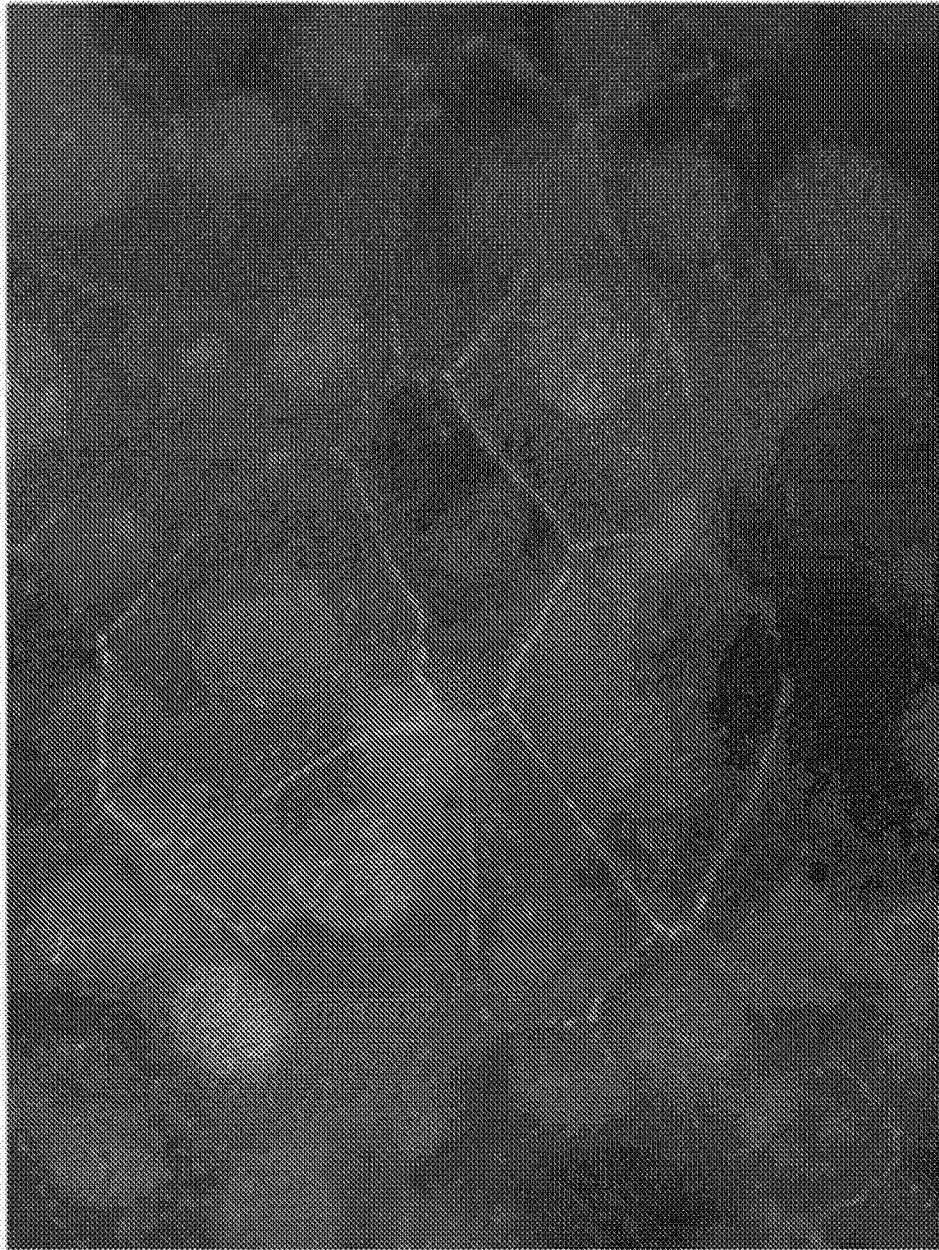


图10

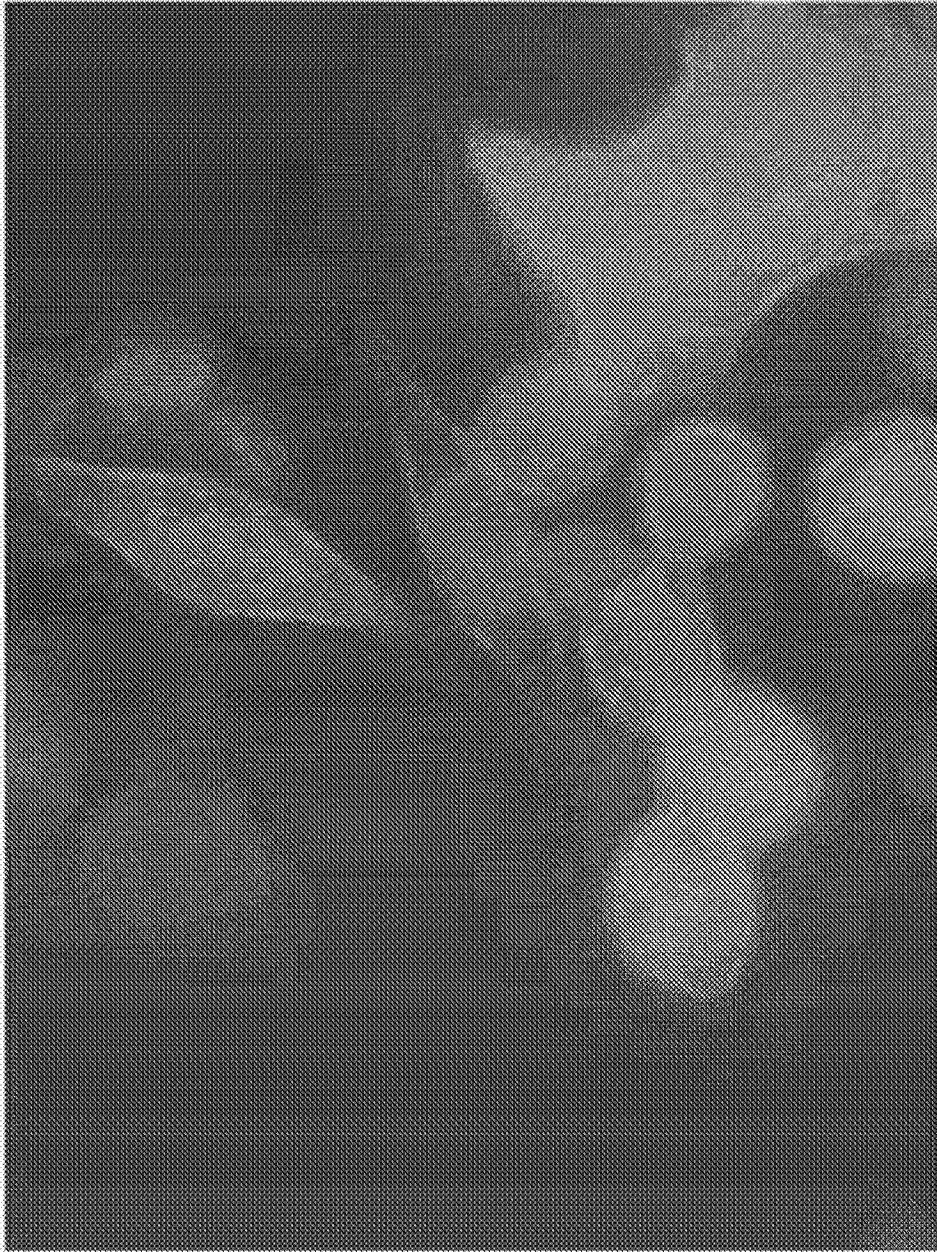


图11

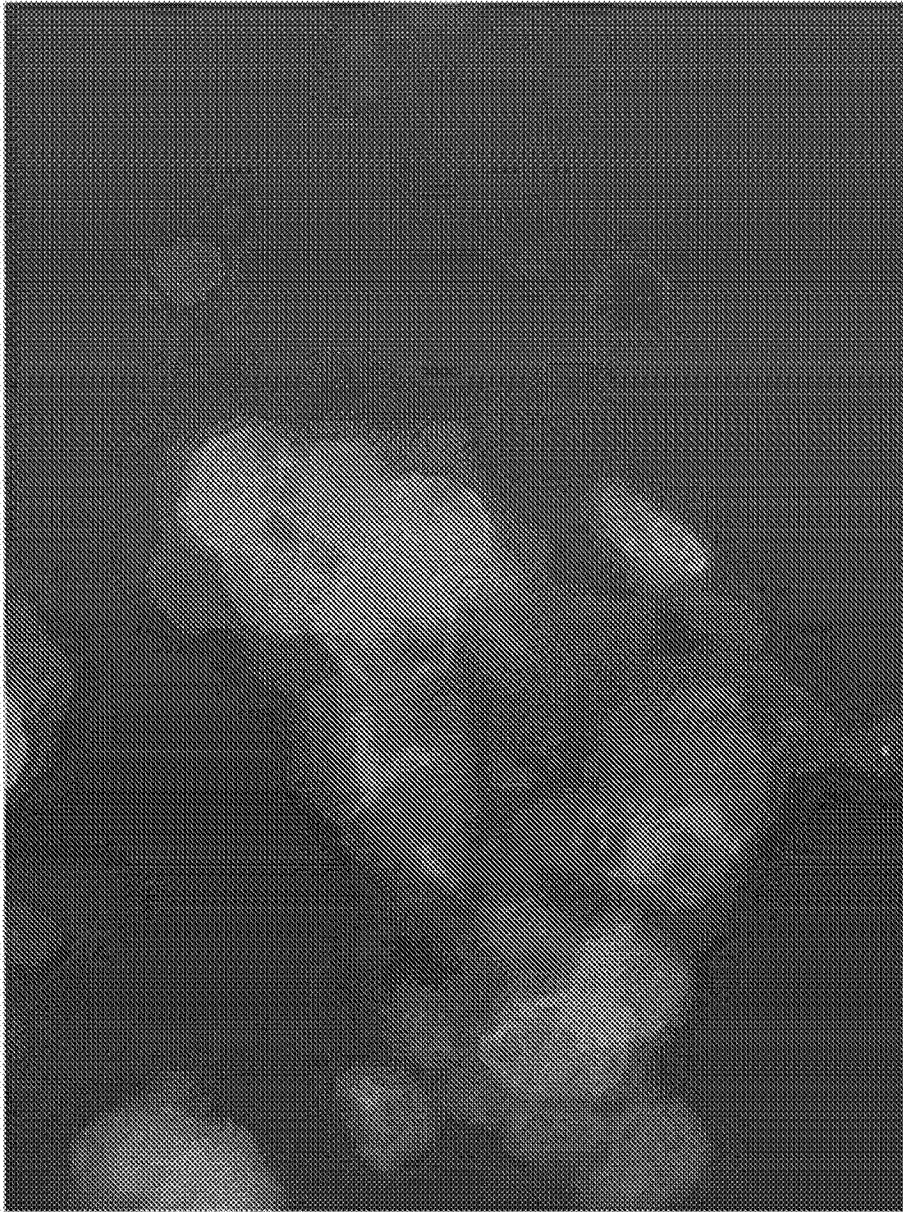
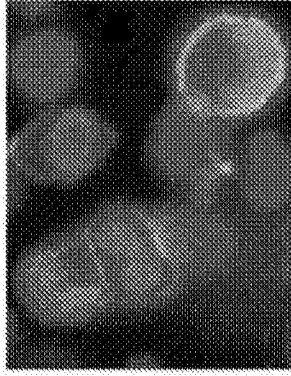


图12A

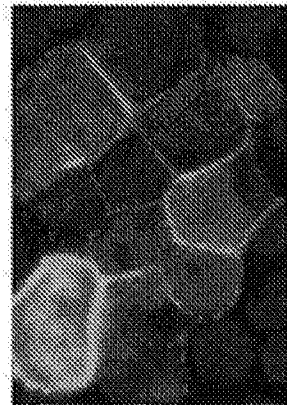
163E12
182-D1106-294



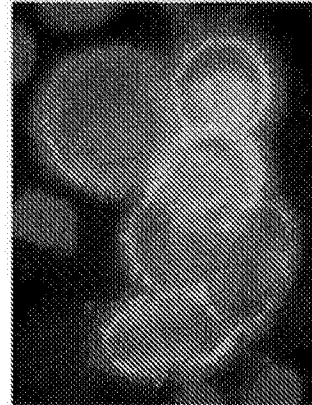
125E1
182-D1106-279



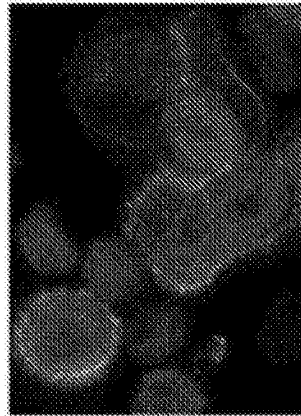
45C1
182-D758-187



175D10
182-D1106-362



166E2
182-D1106-308

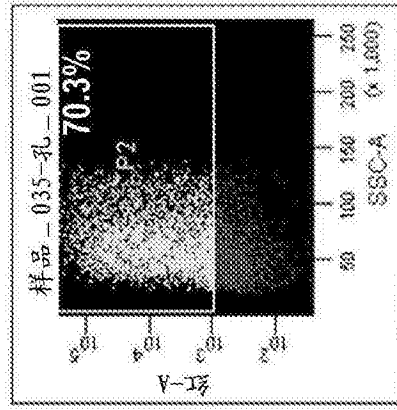
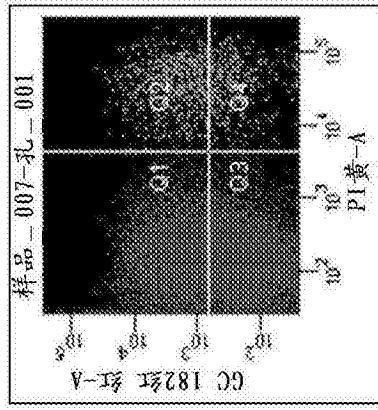


KATO-III

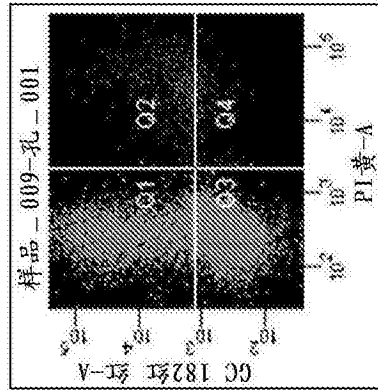
KATO-III

图12B

KATO-III



NUGC-4



163E12

182-D1106-294

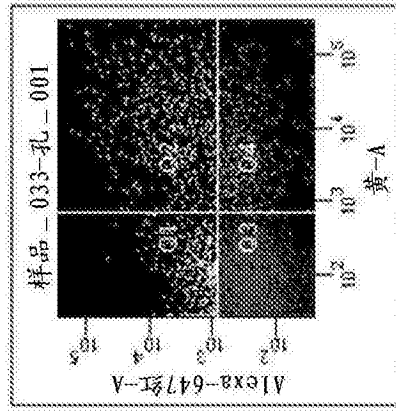
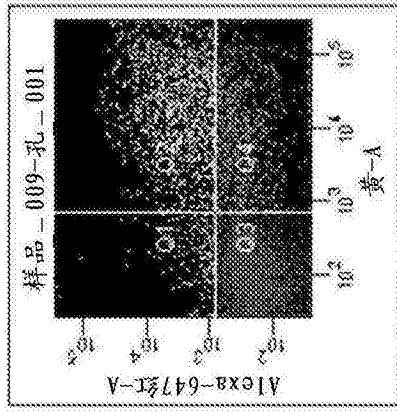
61C2

182-D1106-67-D1

图13

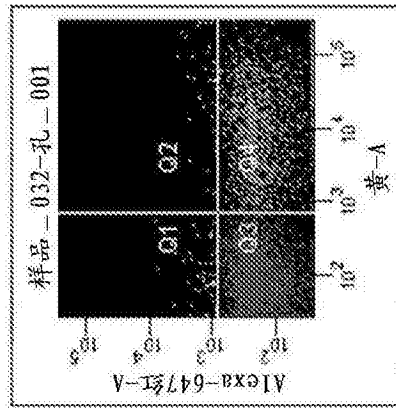
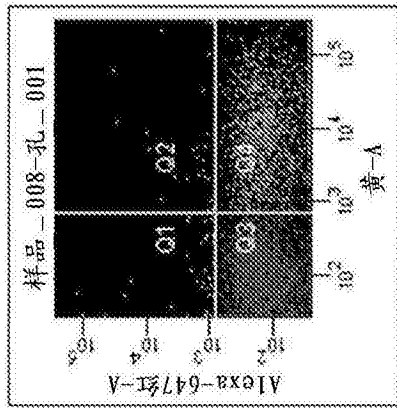
38H3

182-D1106-058-D1



38G5

182-D1106-057-D1



HEK293-
muCLD18A1

HEK293-
muCLD18A2

图15A

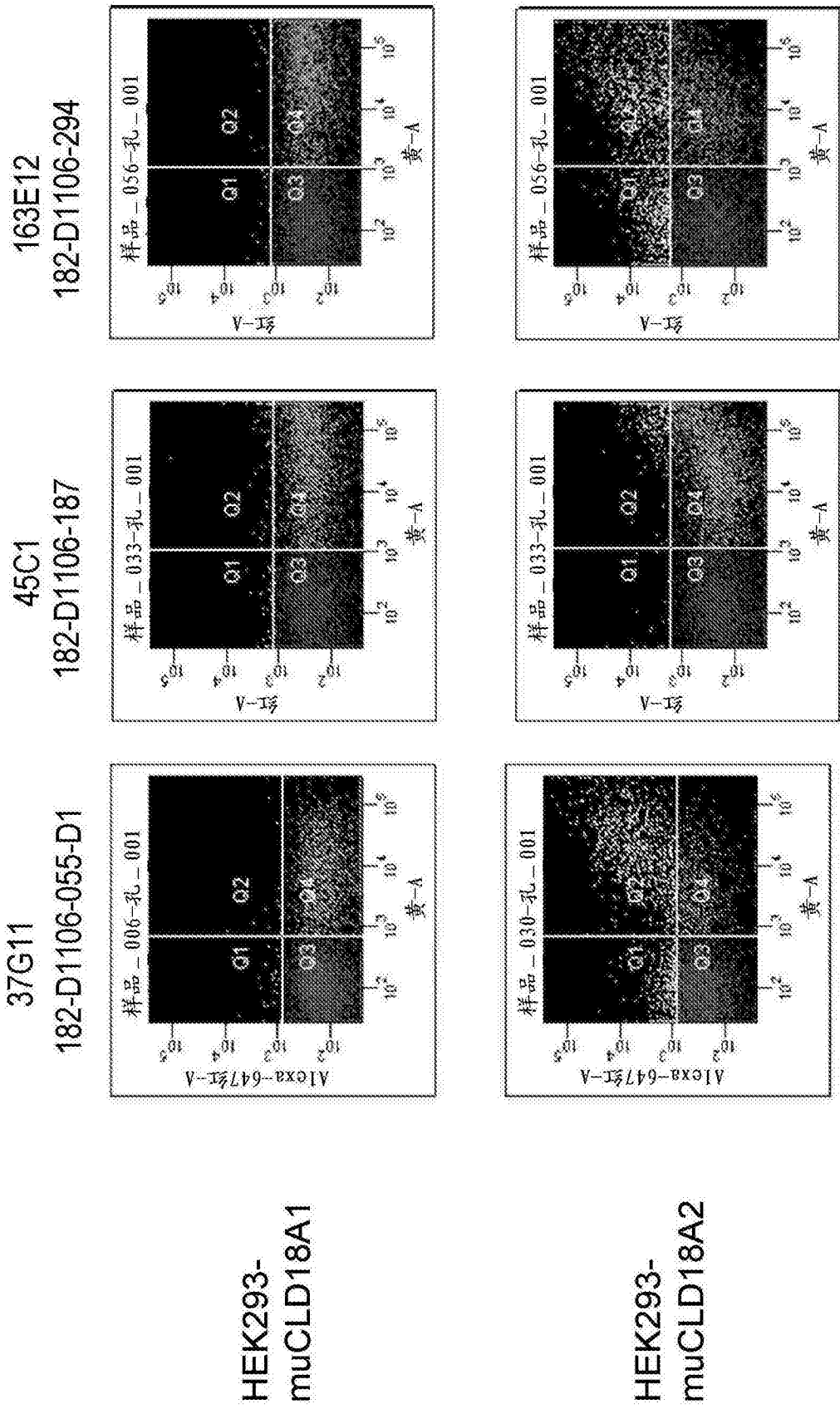


图15B



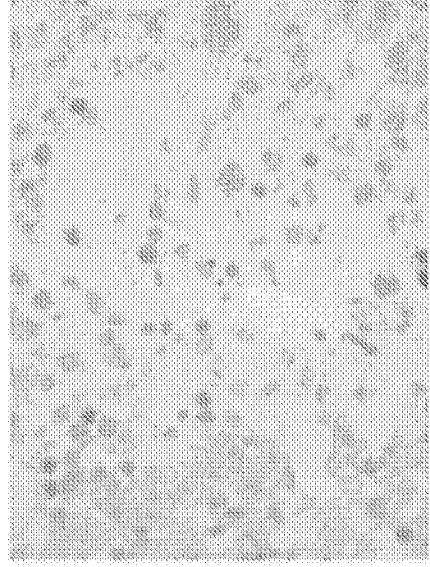
肺



前列腺



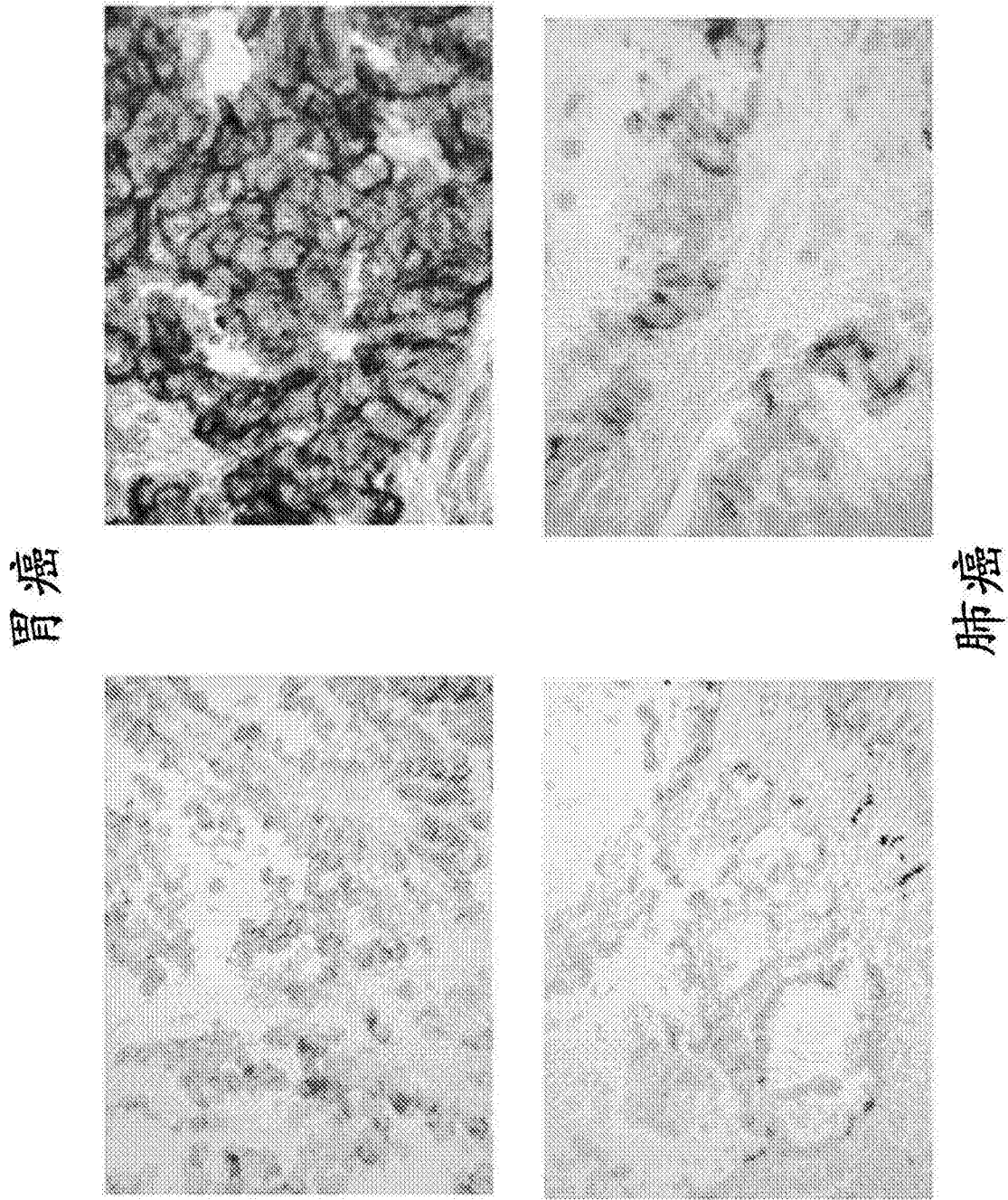
胃



骨髓

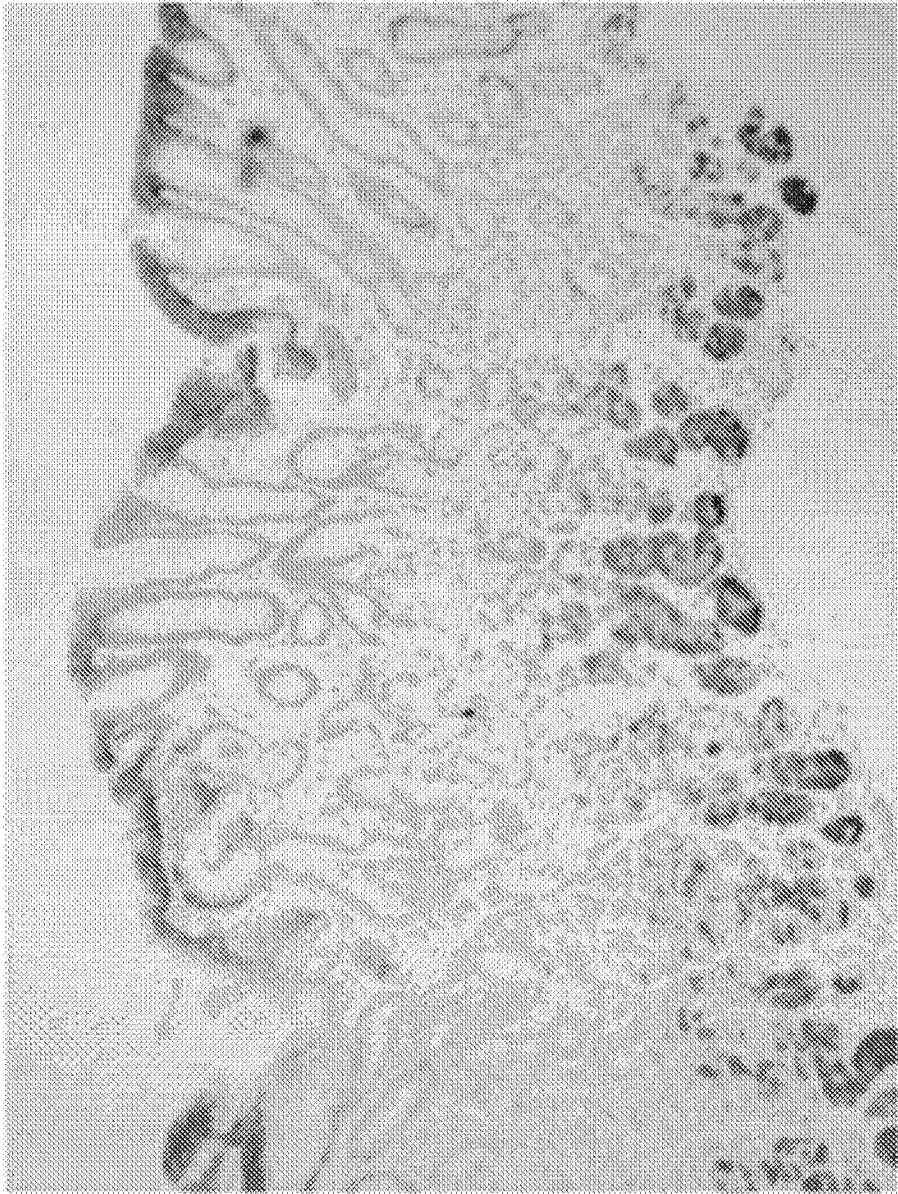
(A)

图16A



(B)

图16B

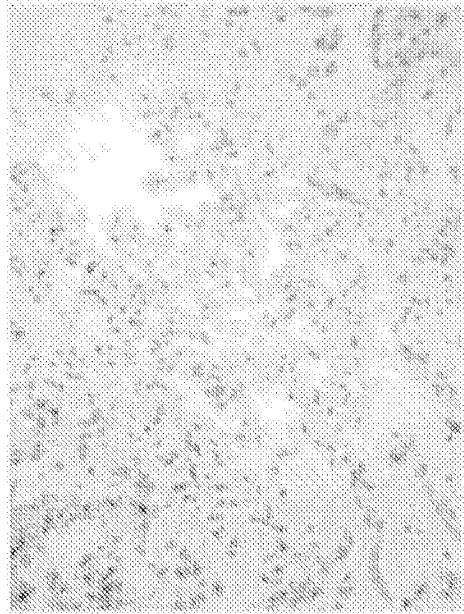


(c)

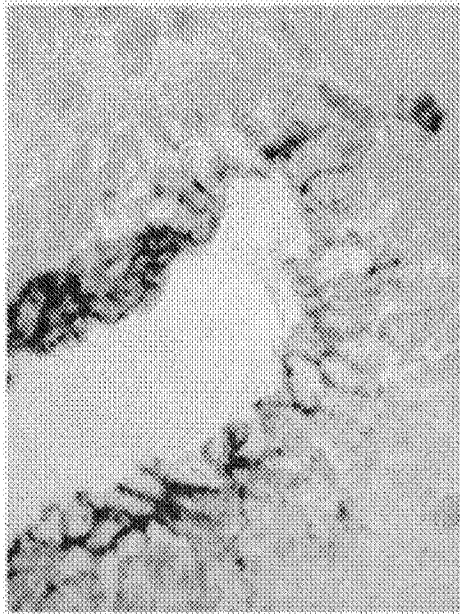
图16C



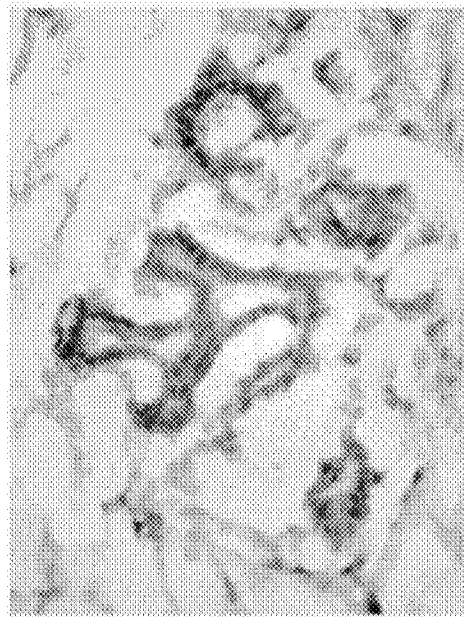
肾



肺泡



胃

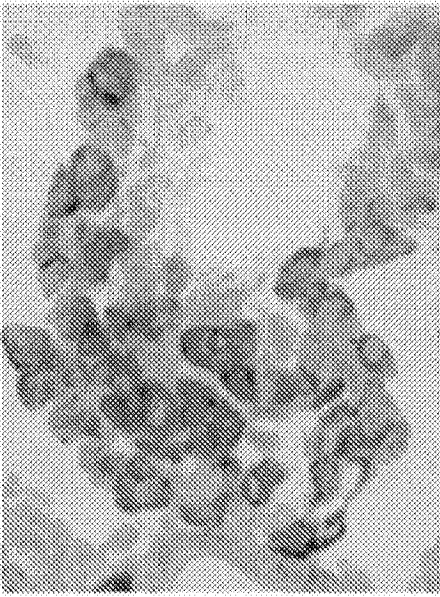


乳腺

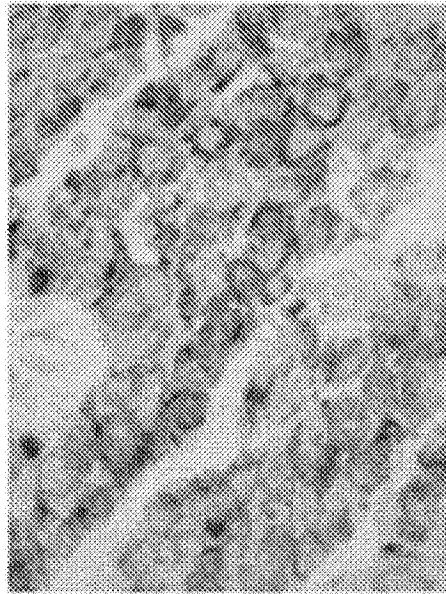
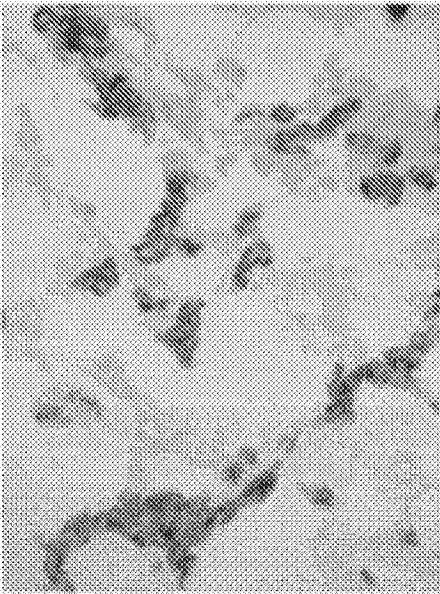
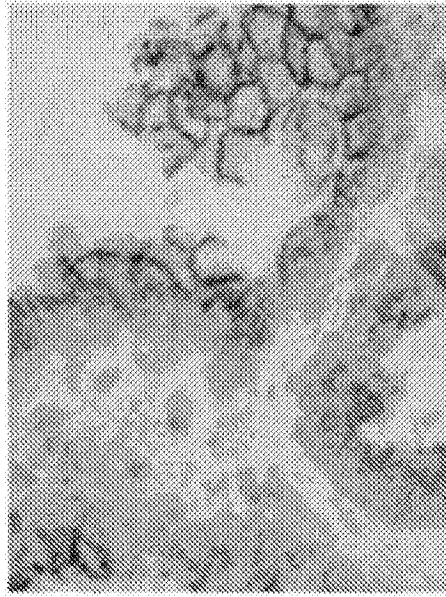
(A)

图17A

胃癌



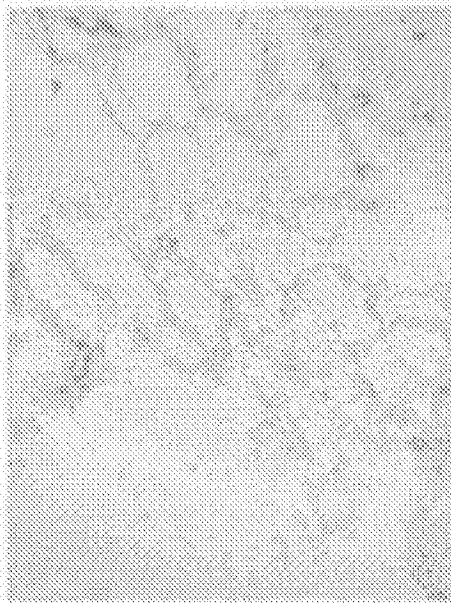
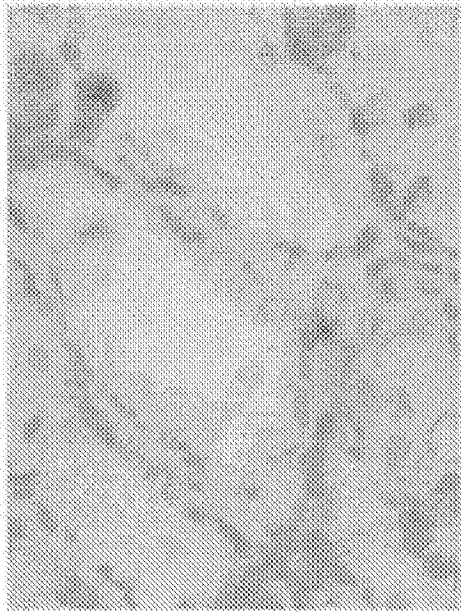
肺癌



(B)

图17B

正常胃



胃癌

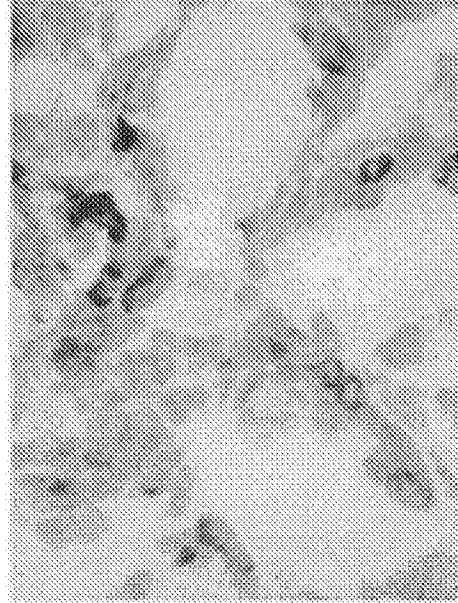
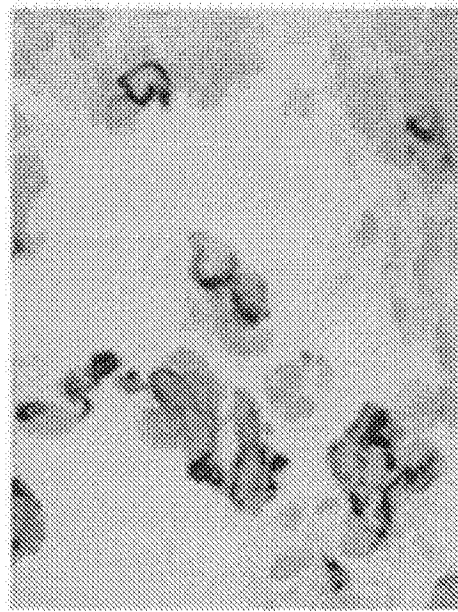
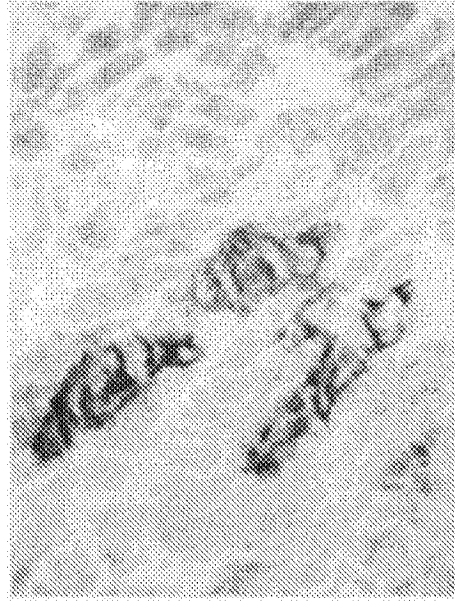
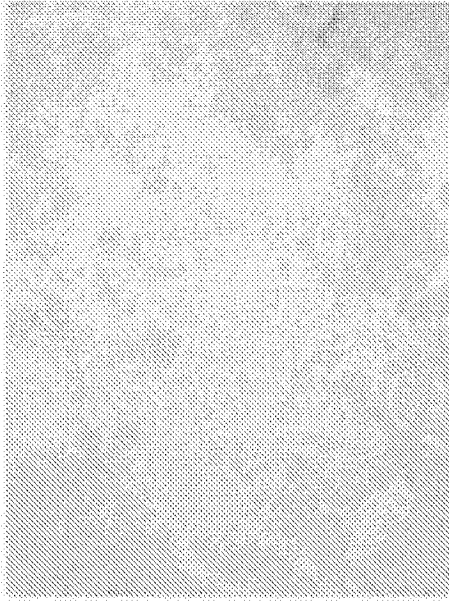


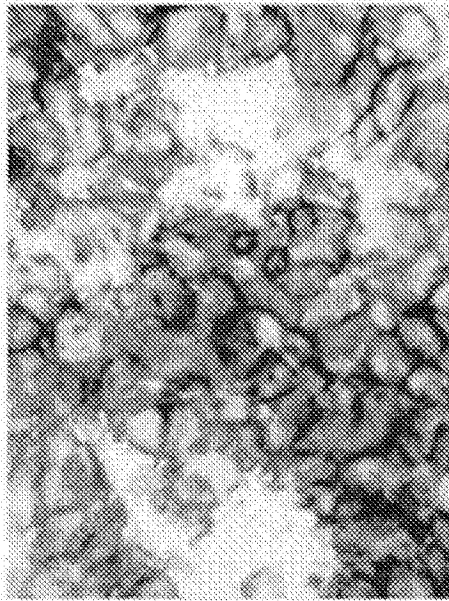
图18A

Hek293-模拟



胃癌

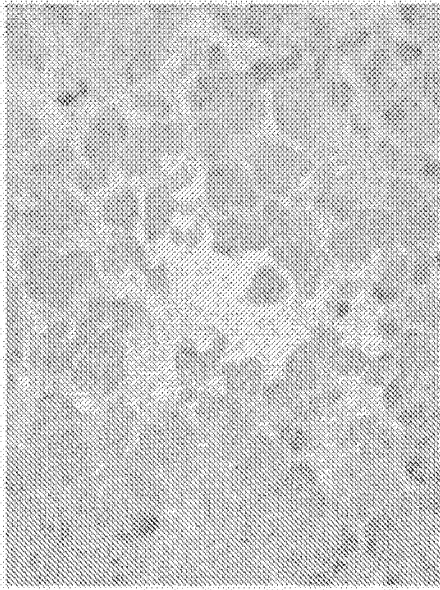
Hek293-GC182A2



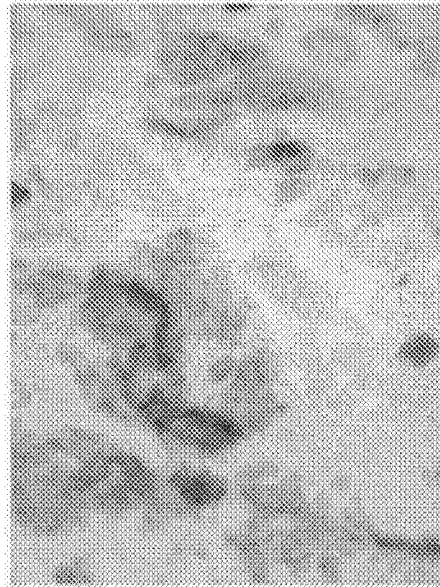
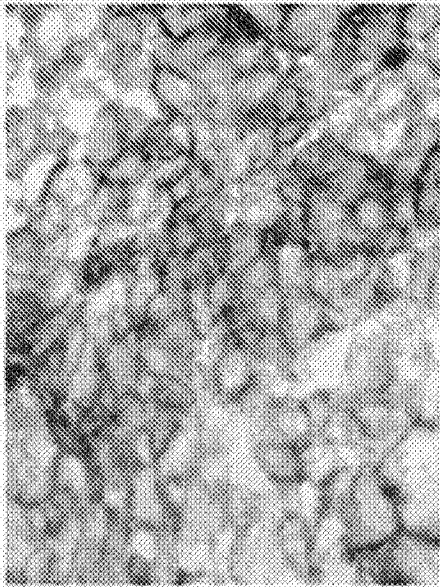
胃癌

图18B

Hek293-模拟



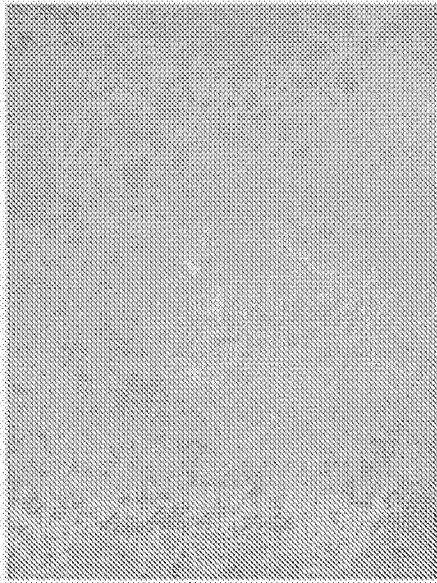
Hek293-GC182A2



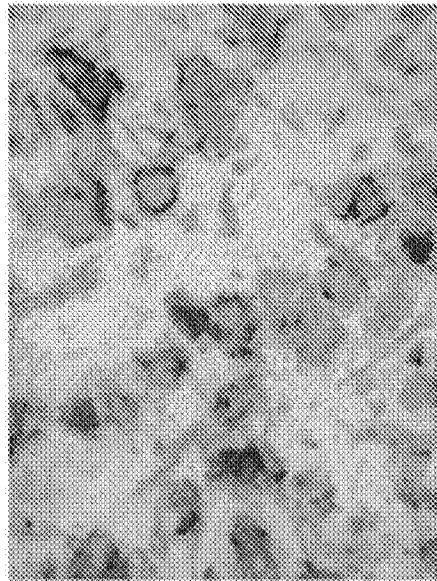
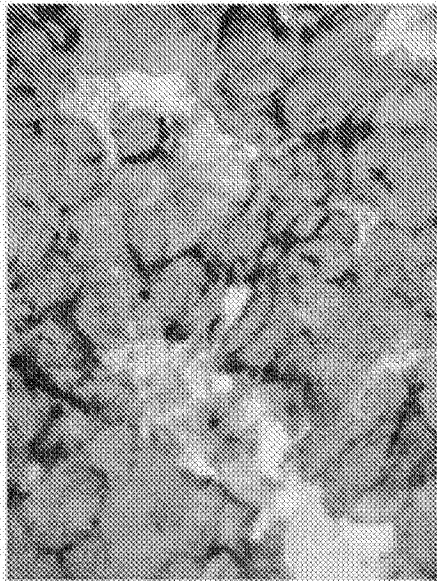
胃癌

图18C

Hek293-模拟



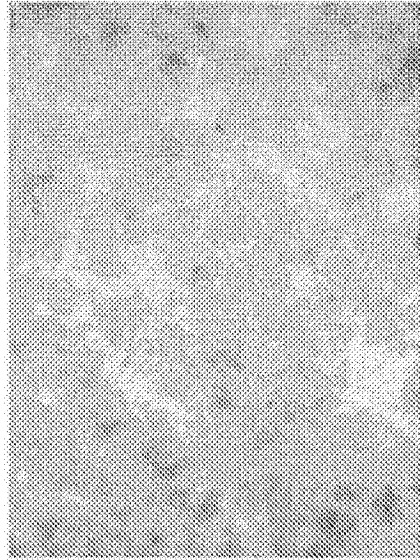
Hek293-GC182A2



胃癌

图18D

Hek293-模拟



Hek293-GC182A2

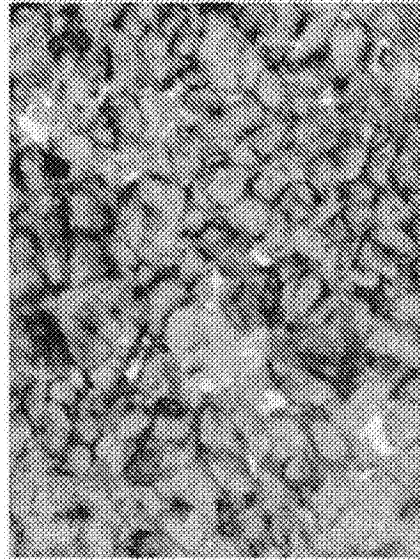


图18E

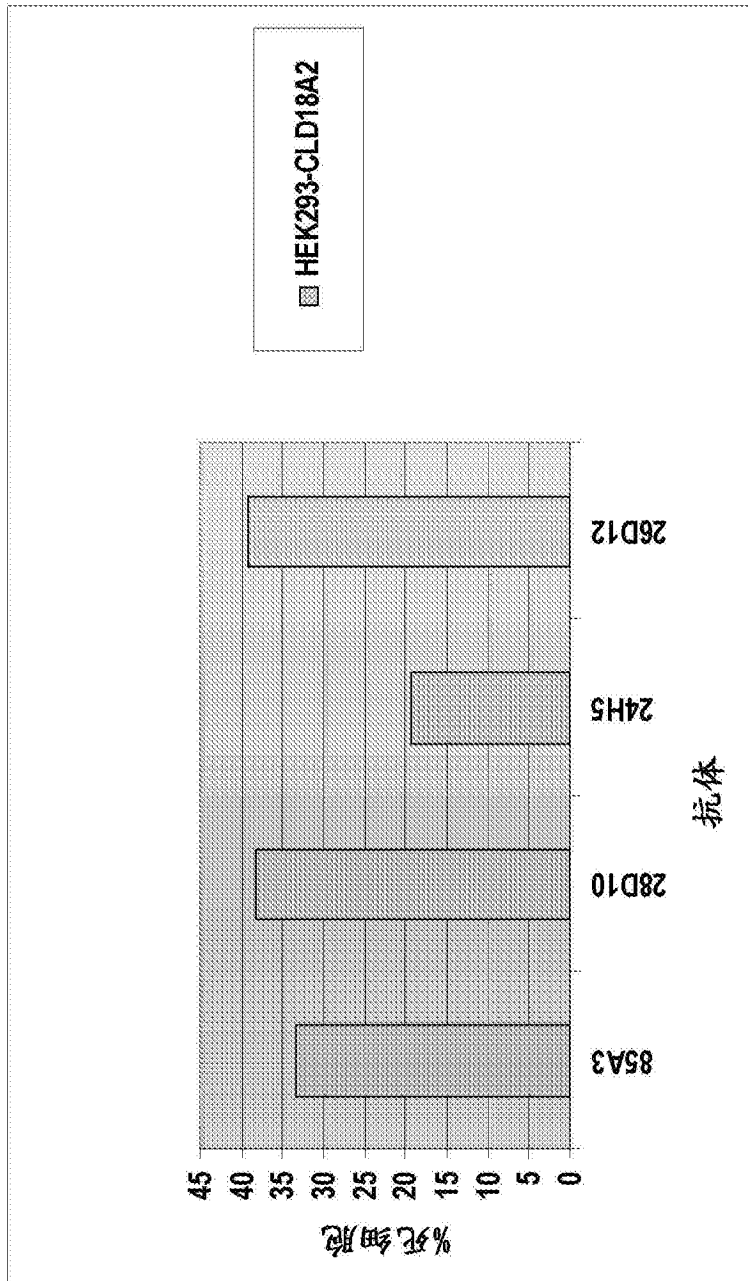


图19

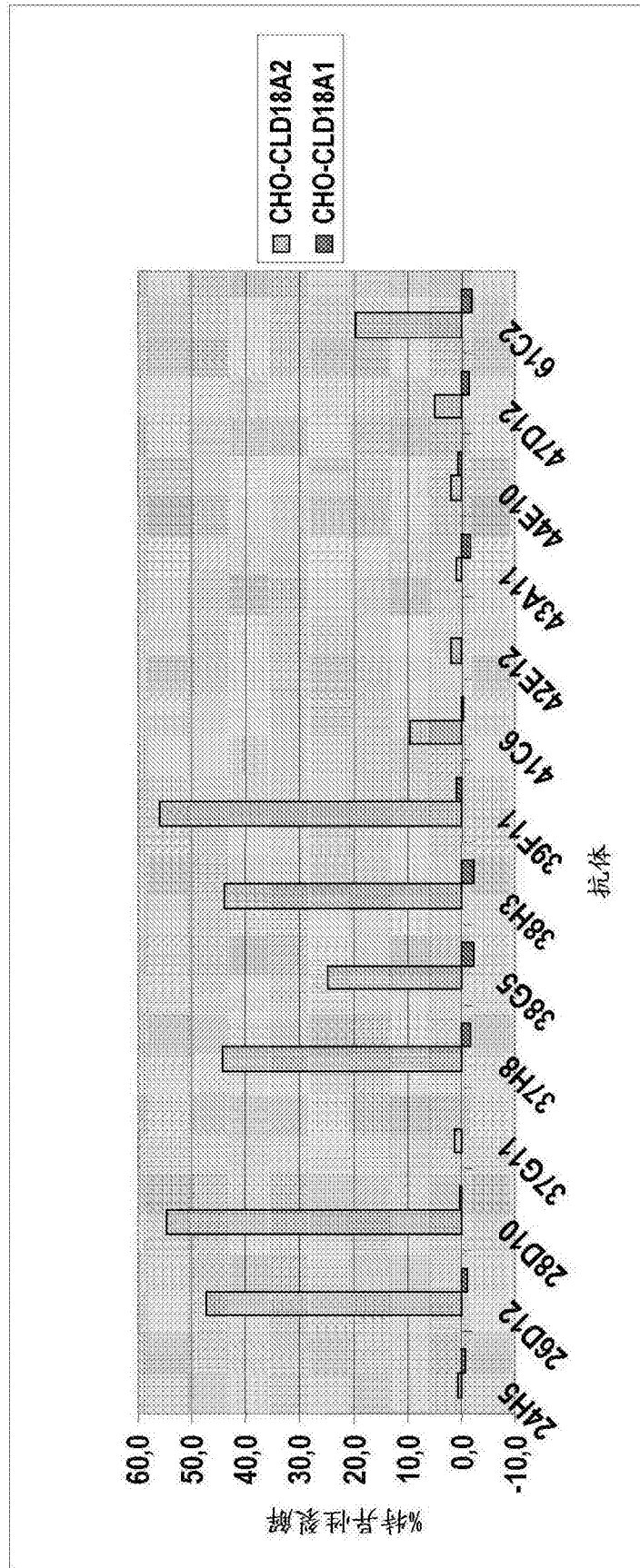


图20

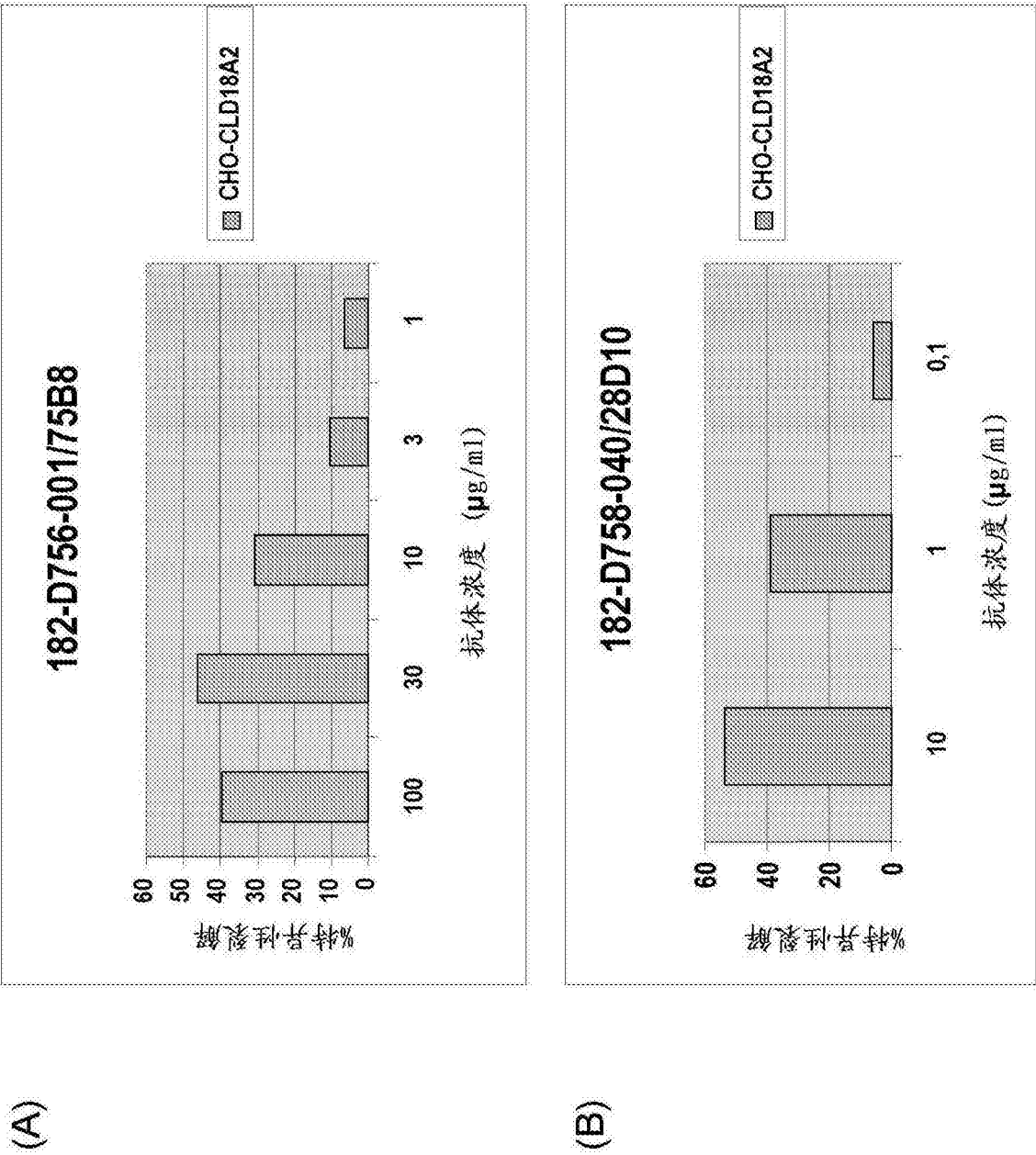


图21

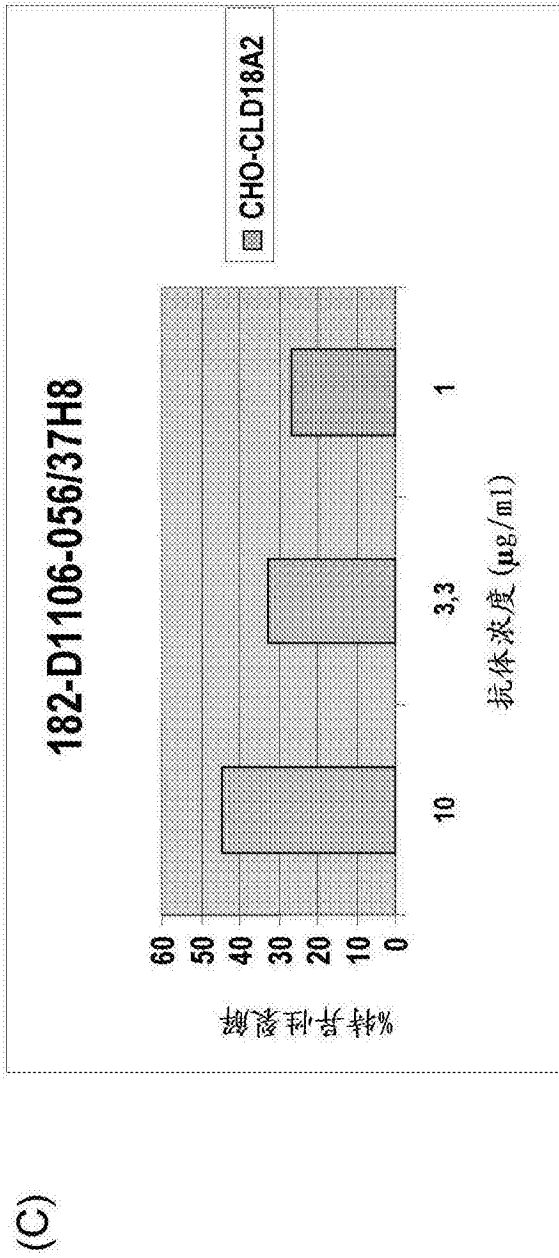


图21续

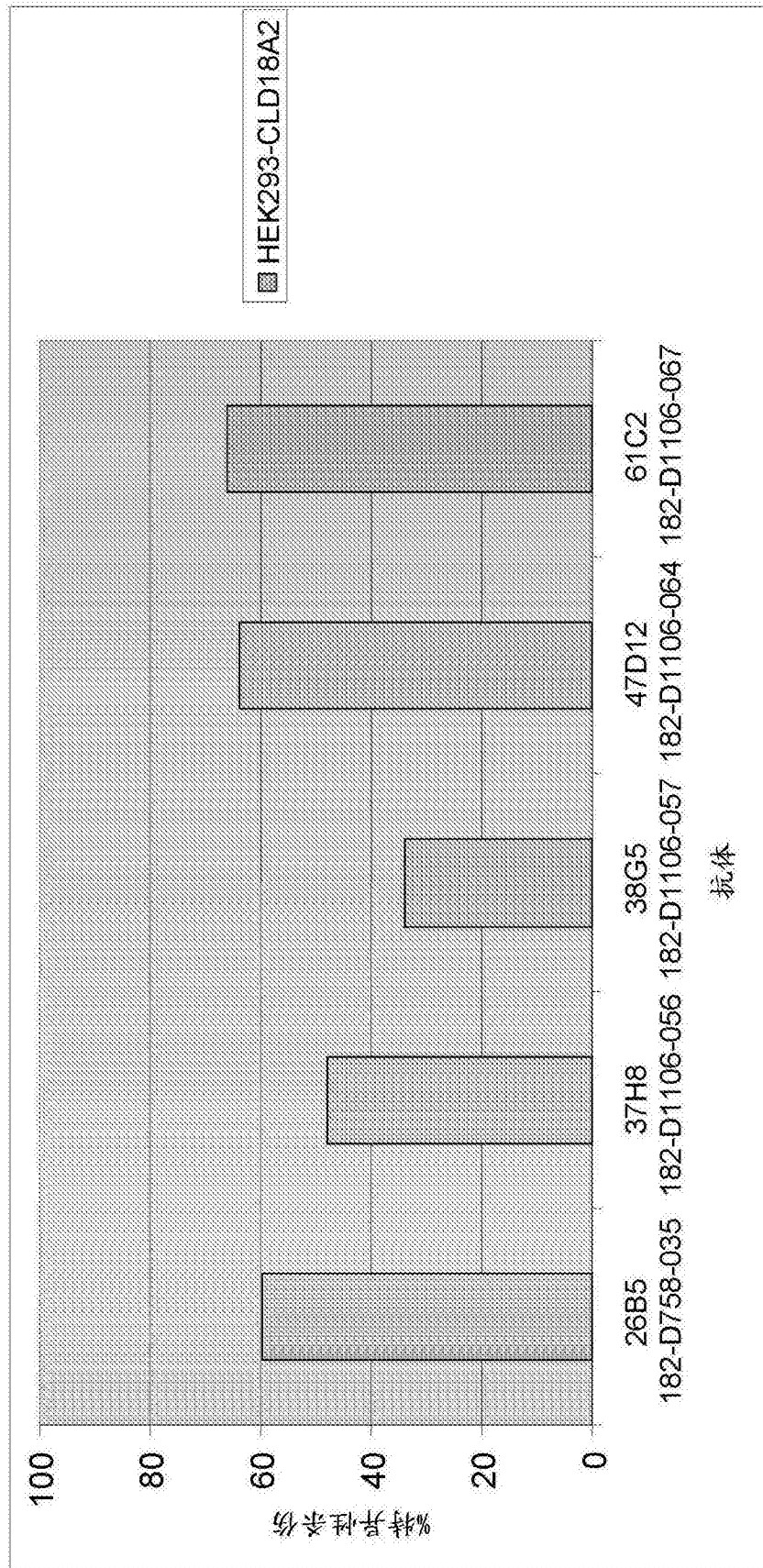


图22

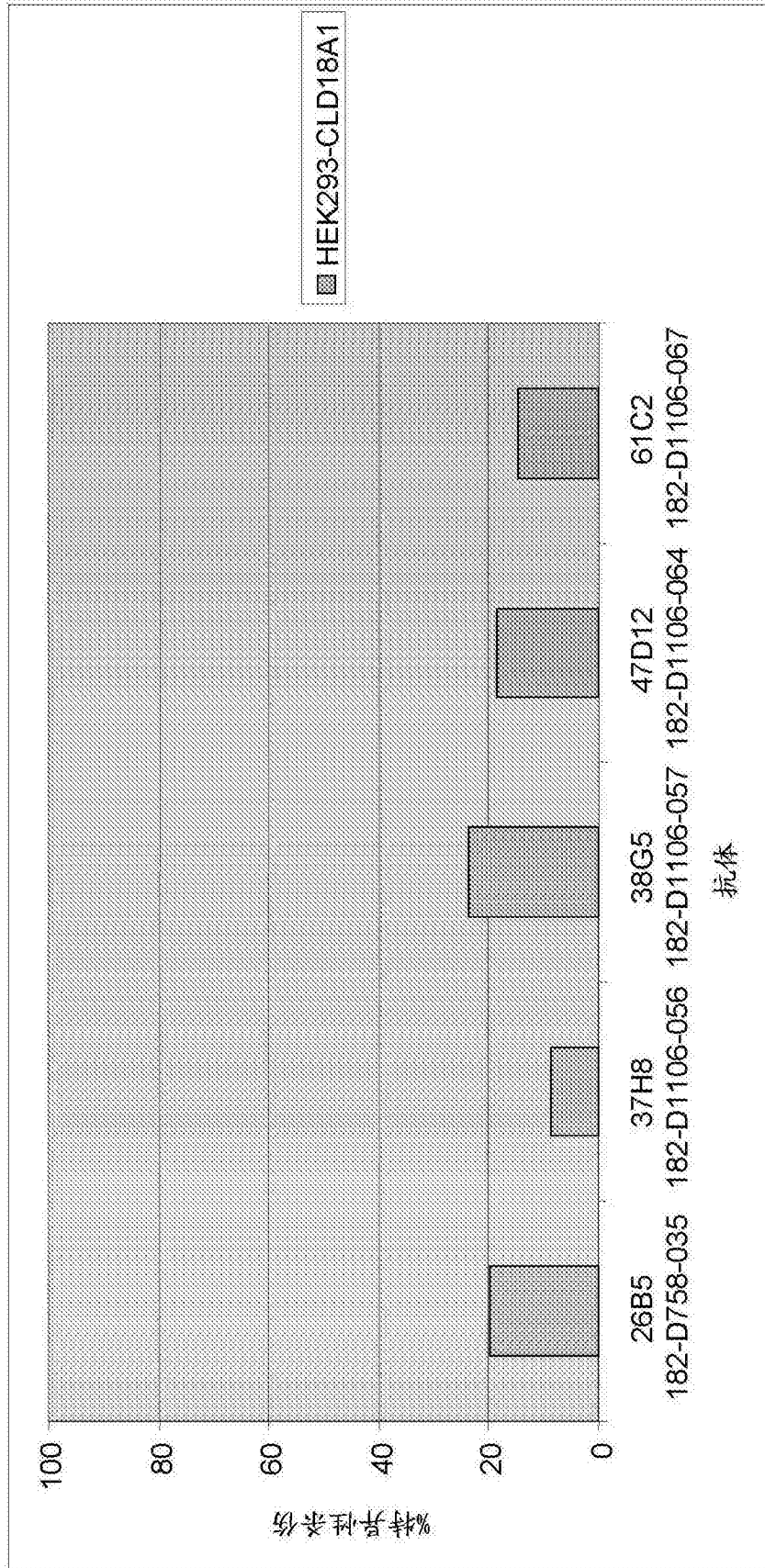


图23

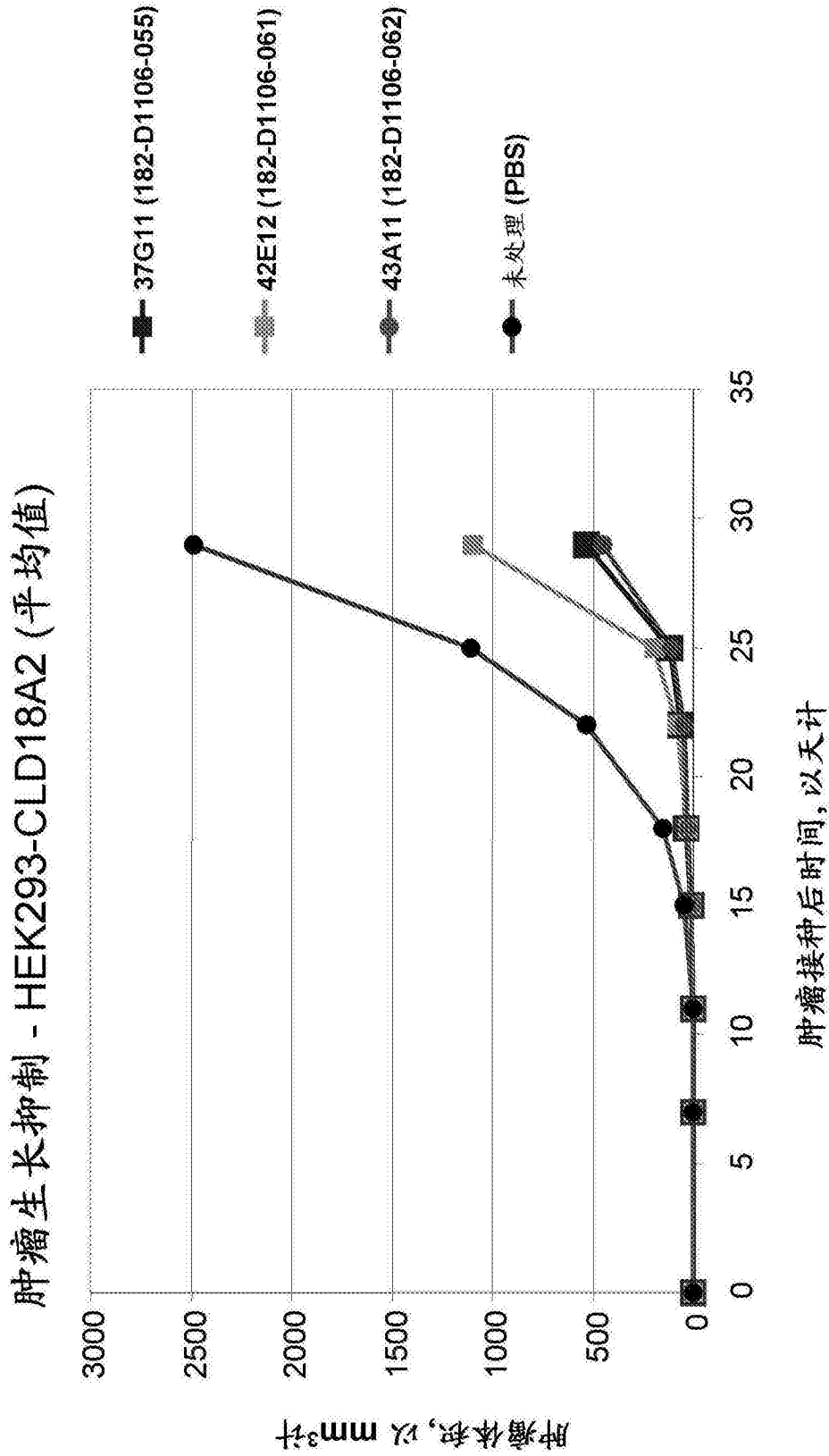


图24

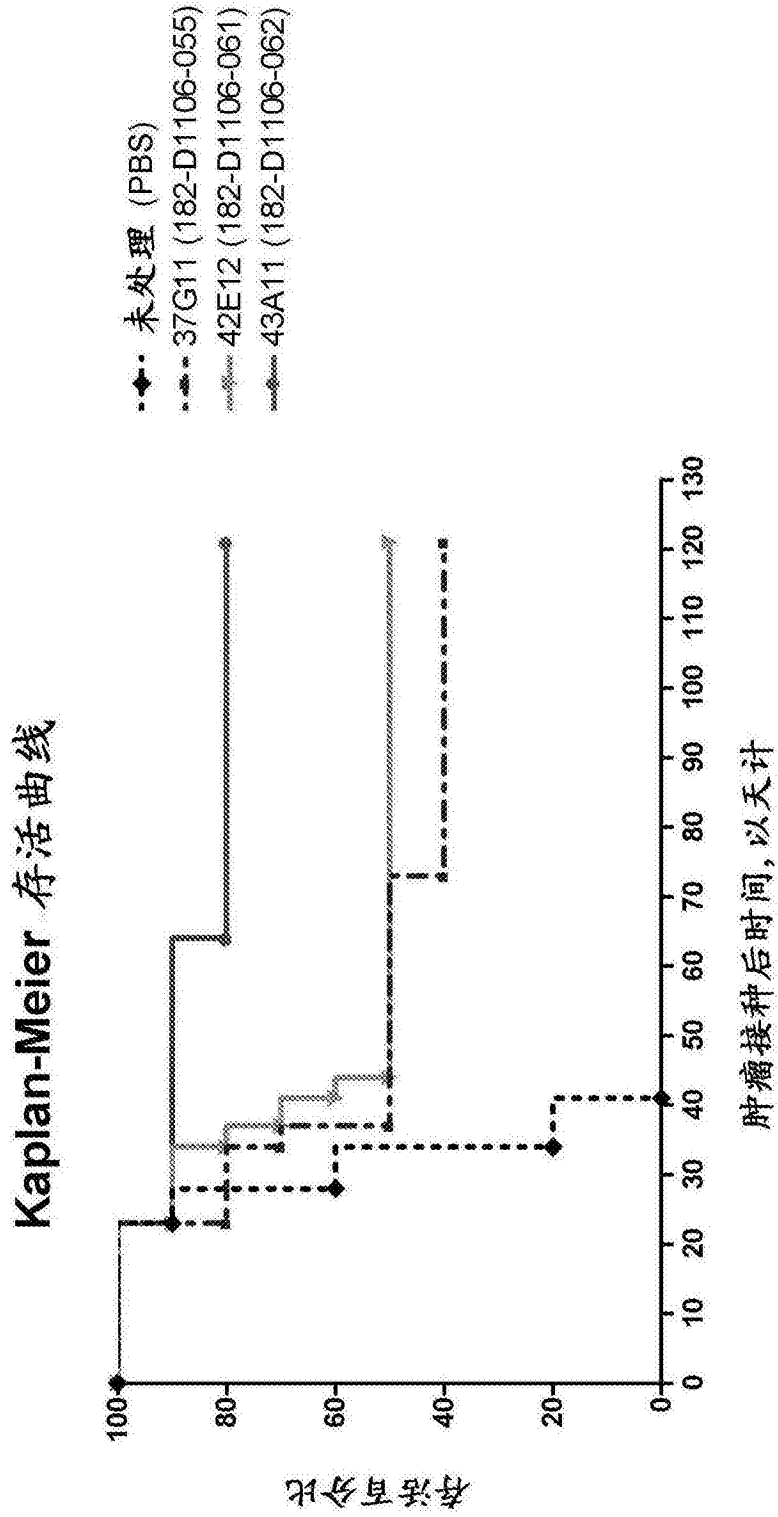


图25A

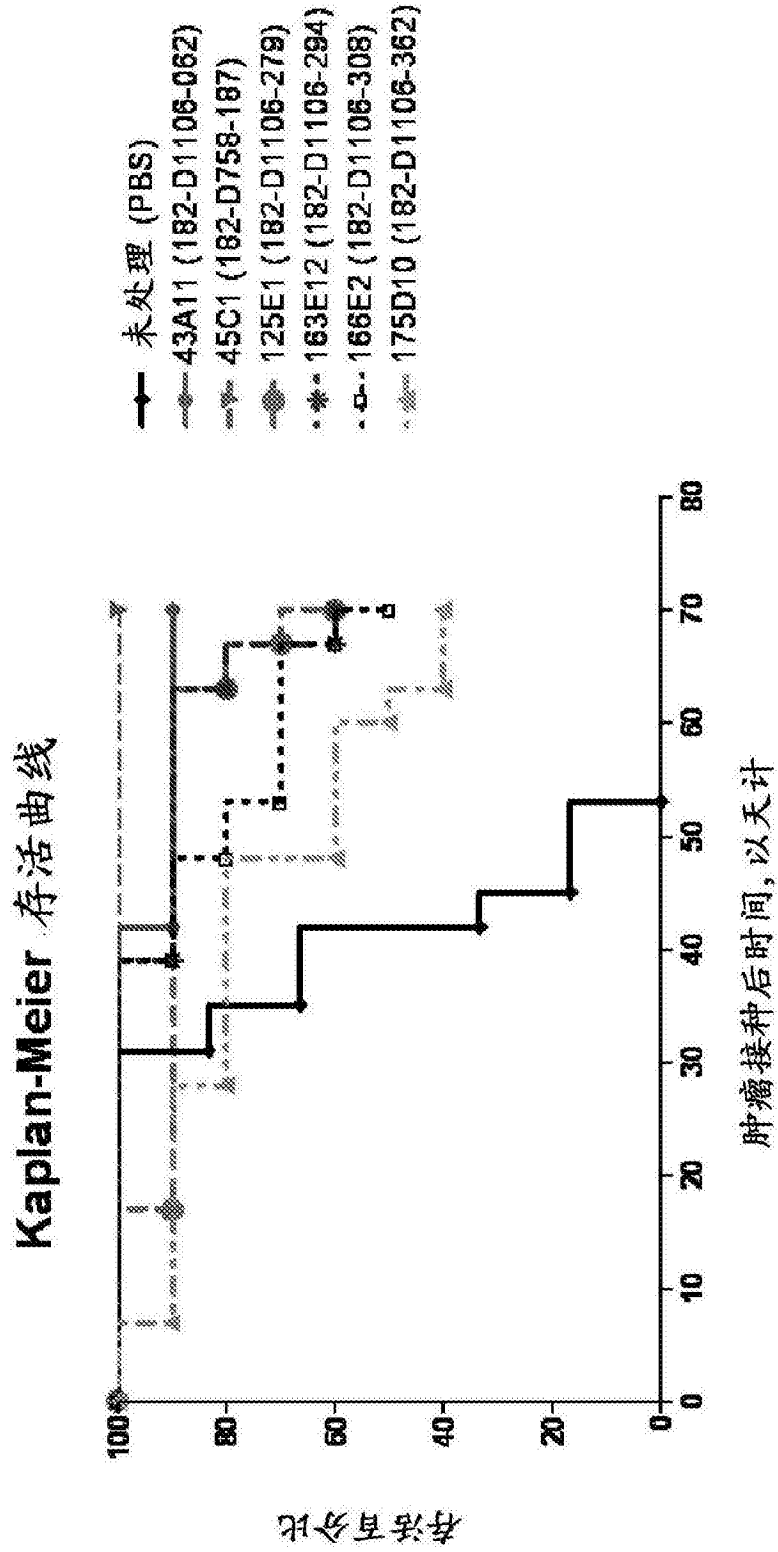


图25B

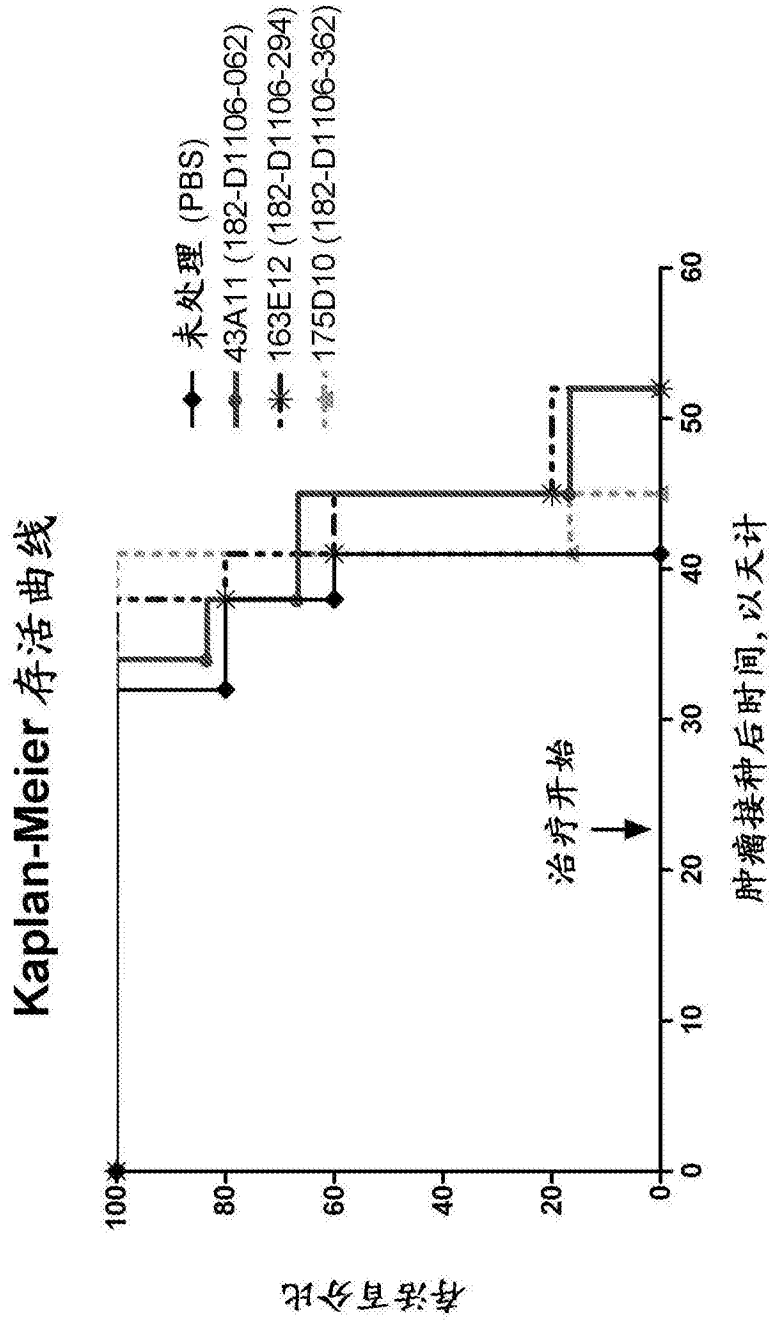


图26

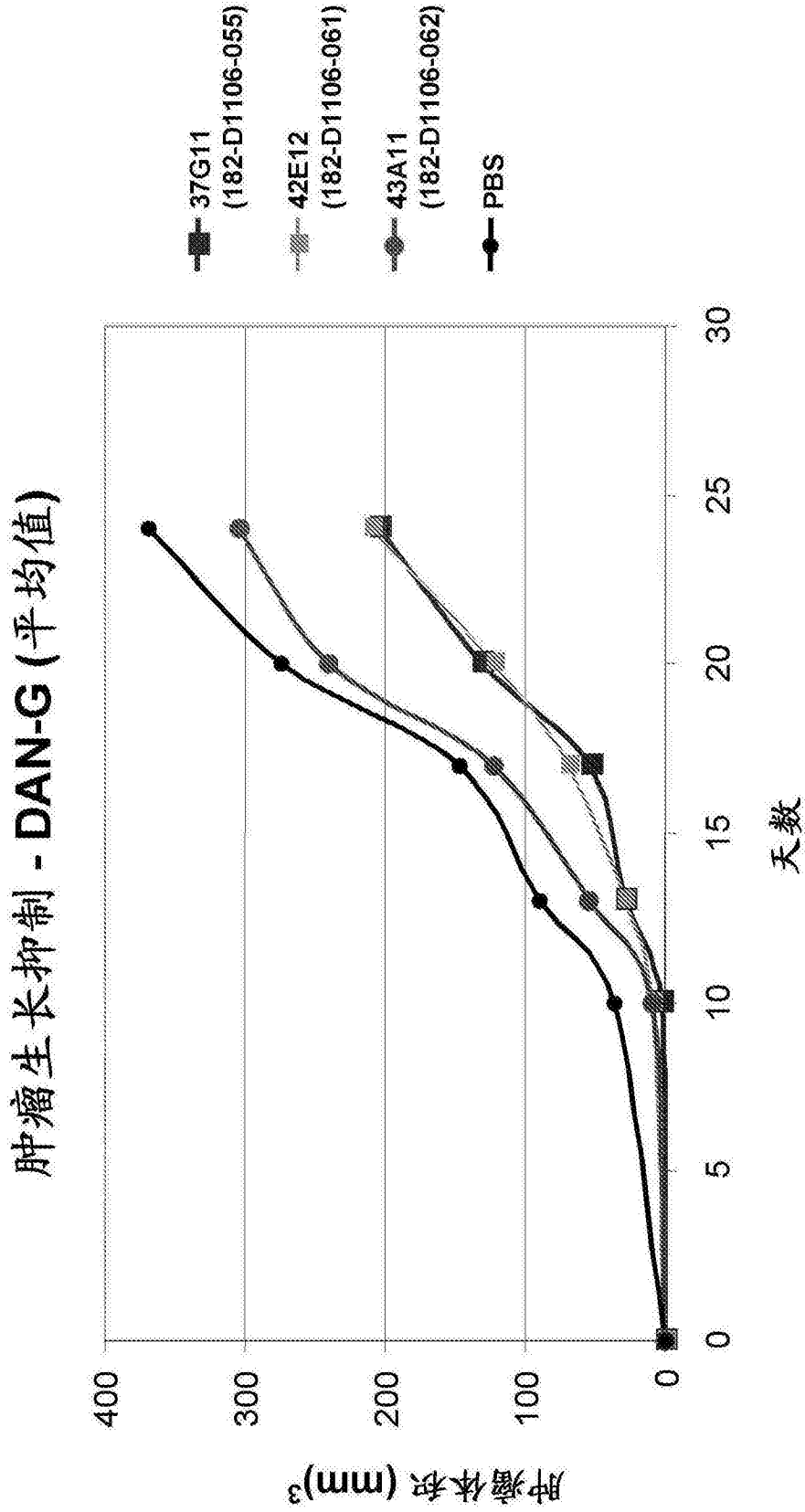


图27A

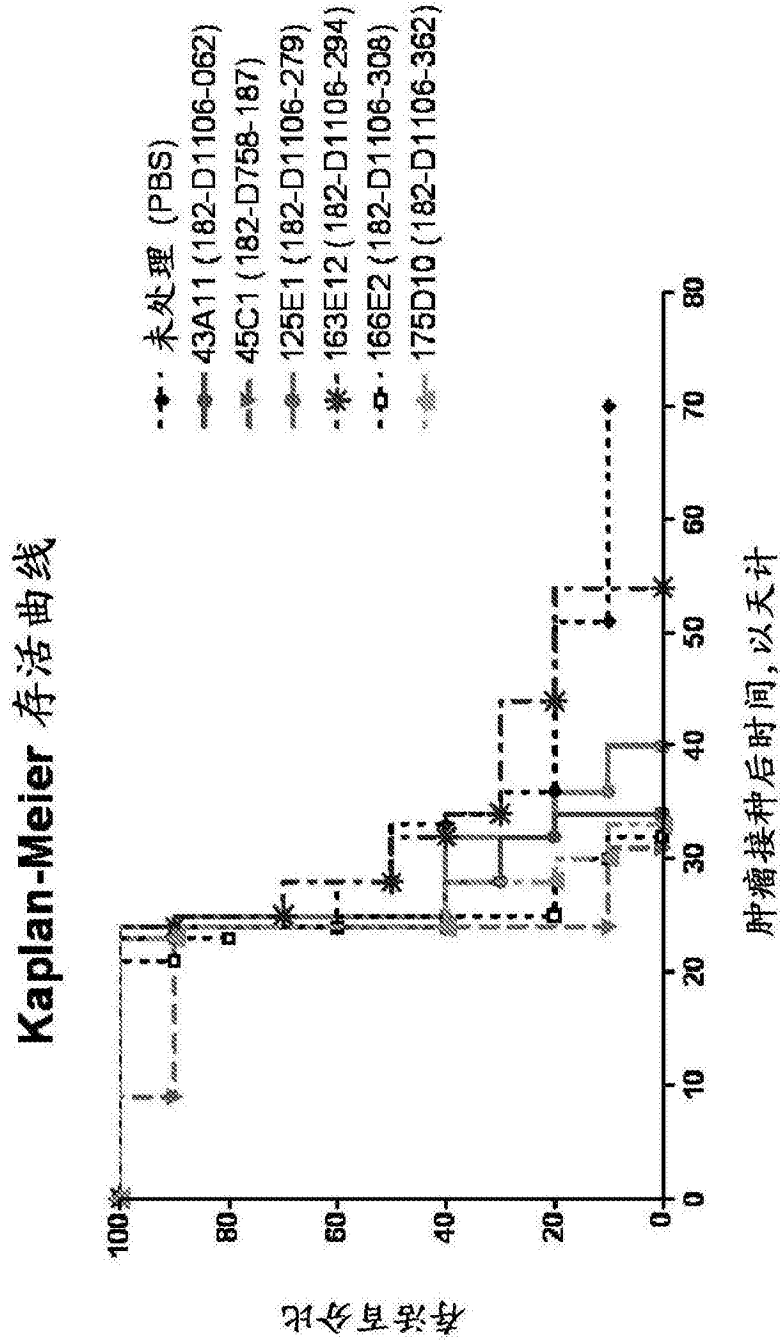


图27B

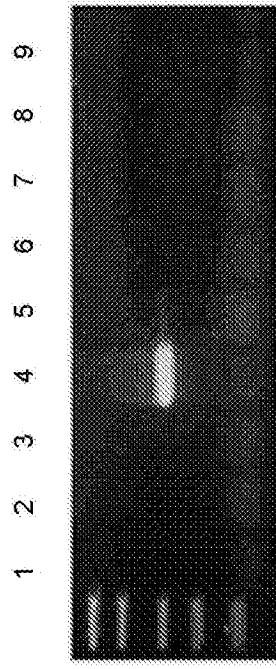


图28

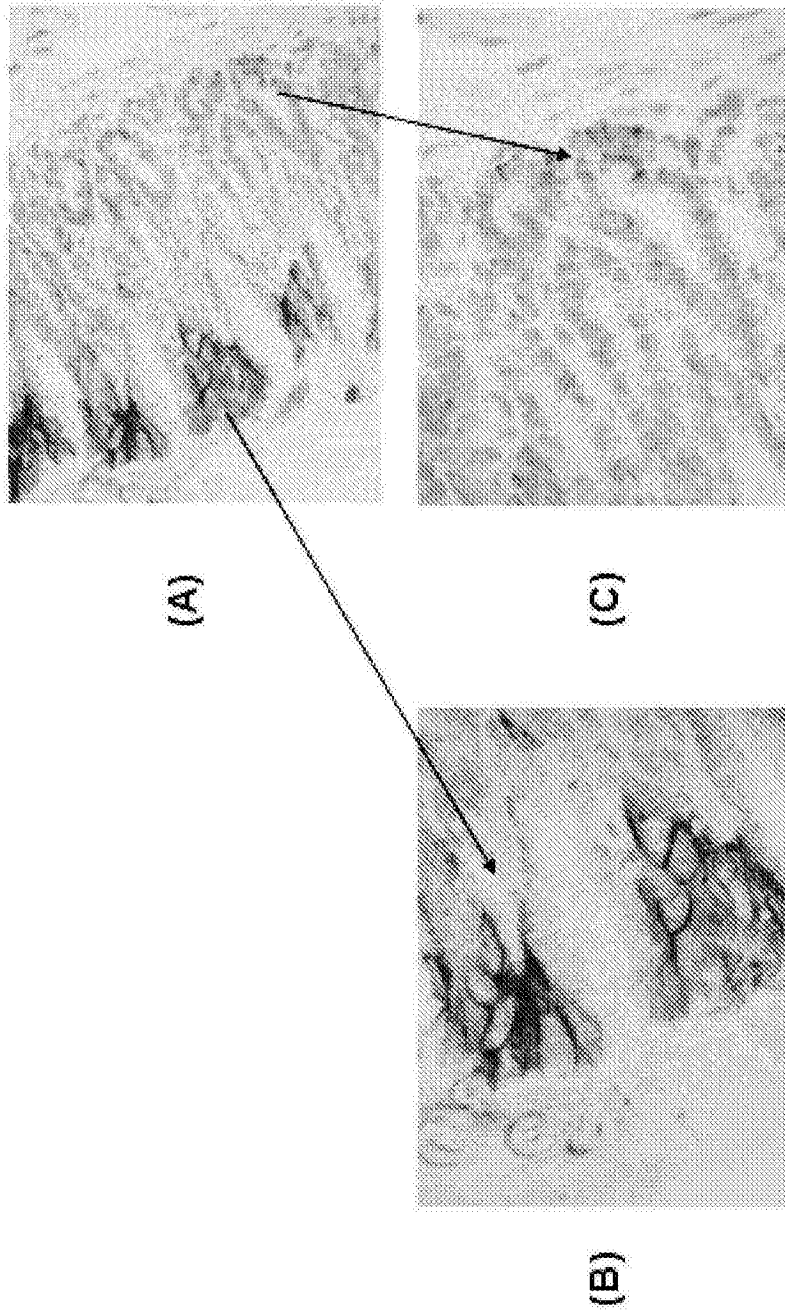


图29

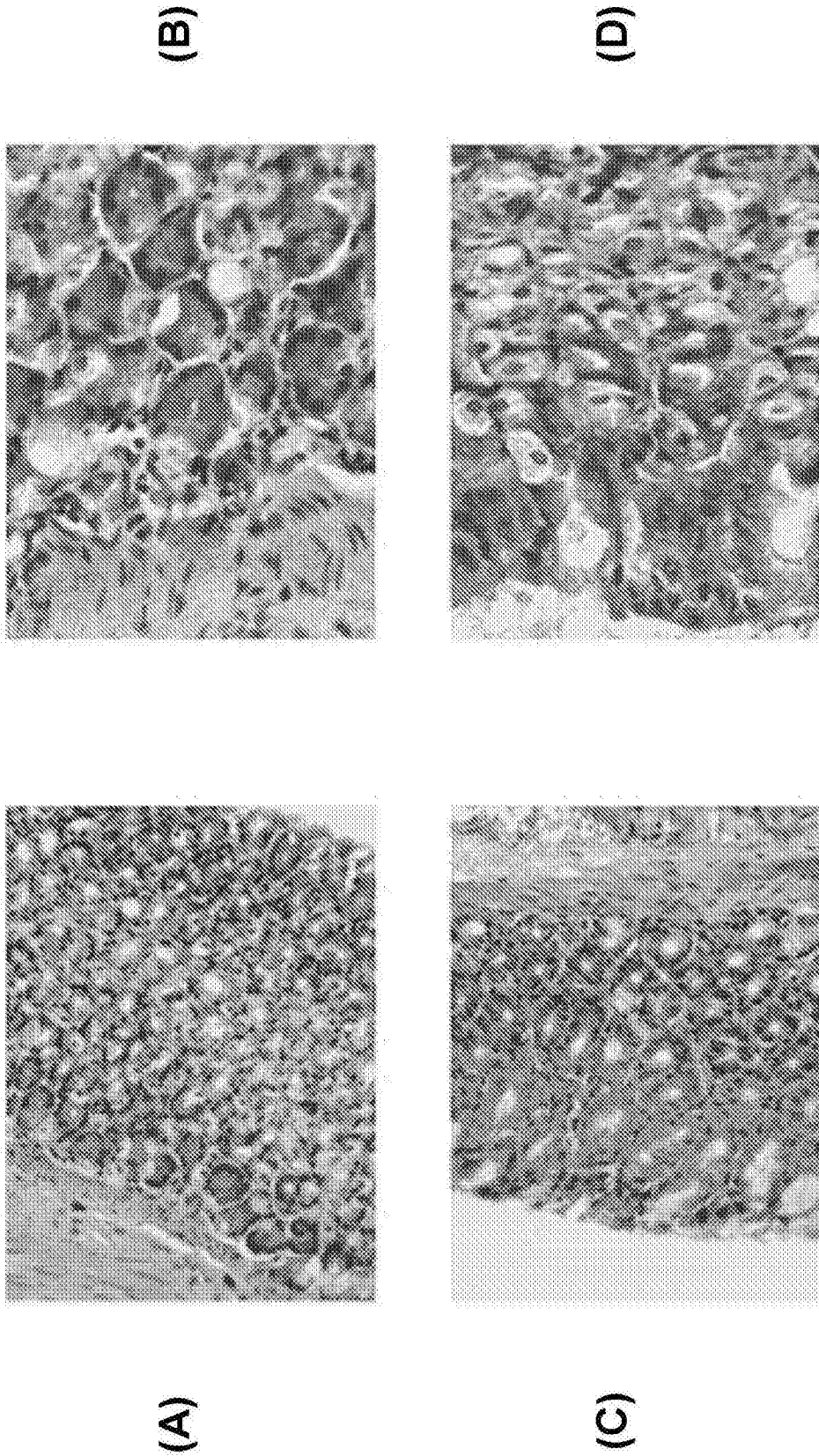


图30

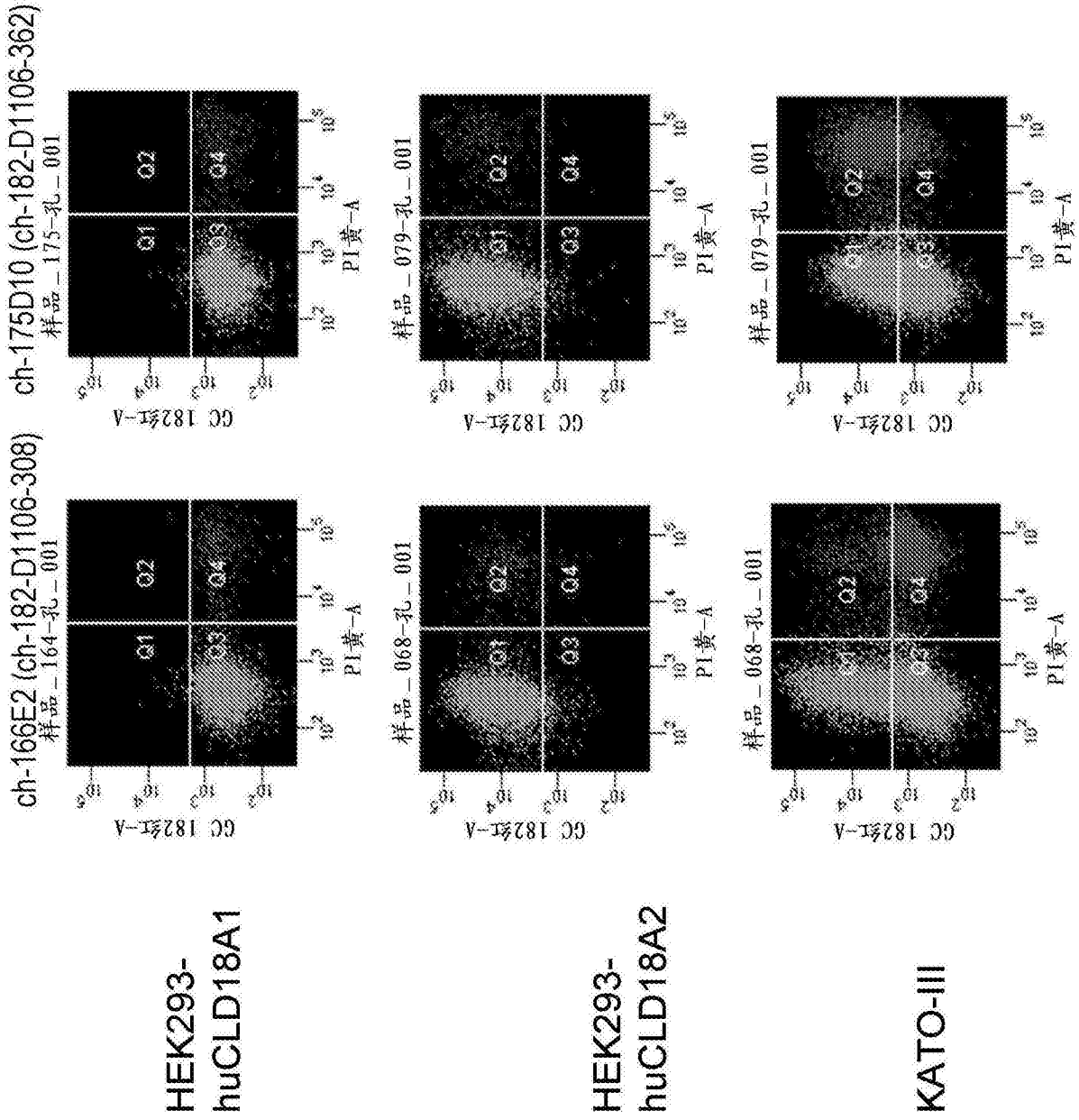


图31B

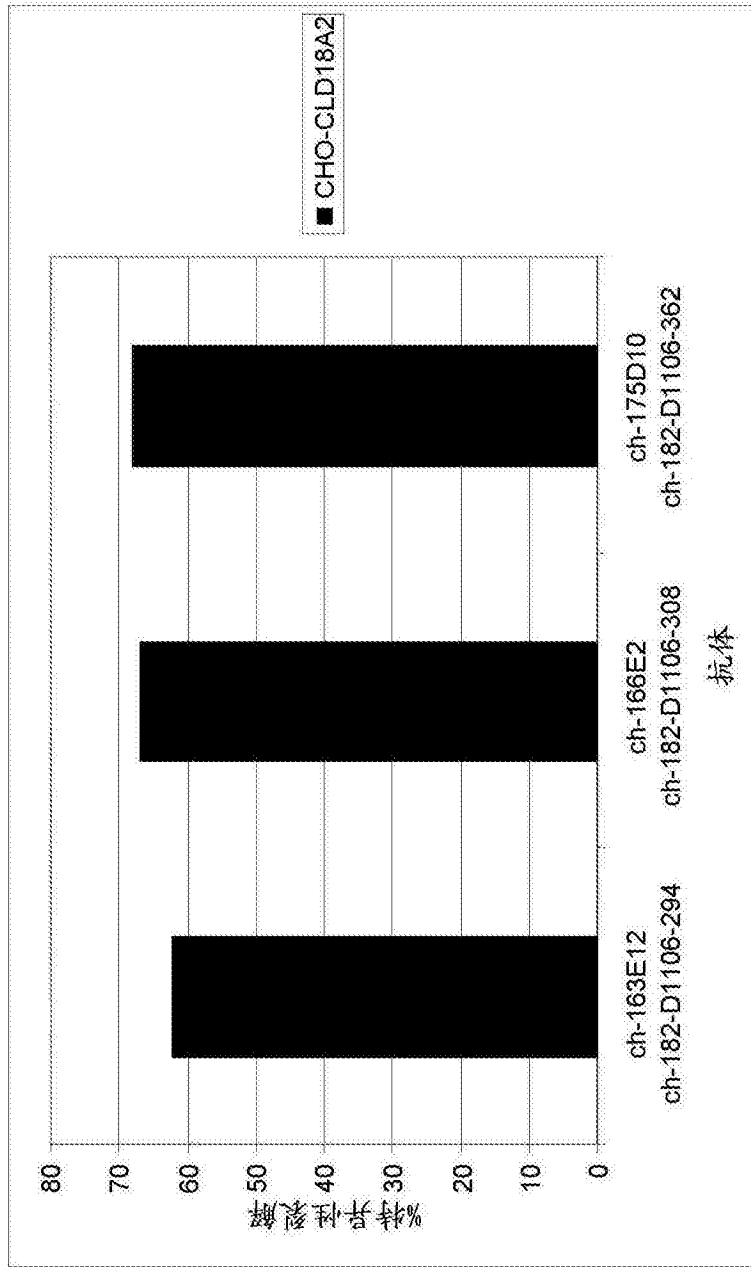


图32

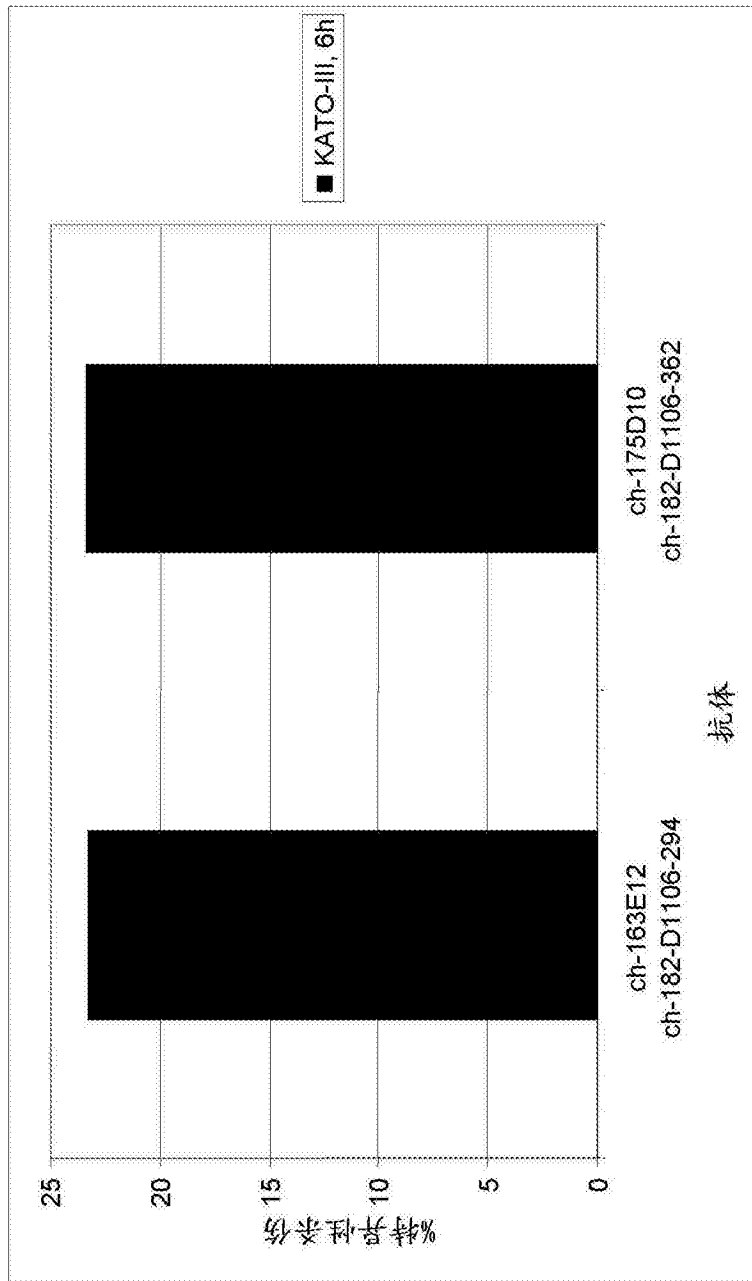


图33