



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101854946 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 03

(21) 申请号 200880115419. 4

*C12N 15/85* (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 11. 07

*C12N 5/06* (2006. 01)

*C12N 5/08* (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/996, 255 2007. 11. 08 US

(56) 对比文件

WO 2006113546 A2, 2006. 10. 26,

WO 9608514 A1, 1996. 03. 21,

CN 1546527 A, 2004. 11. 17,

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 05. 10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/082821 2008. 11. 07

审查员 王金凤

(87) PCT申请的公布数据

W02009/062050 EN 2009. 05. 14

(73) 专利权人 尼尔詹尼克斯肿瘤研究公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 J·安德鲁·布里斯托尔

朱迪斯·A·坎托尔

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限

责任公司 11287

代理人 沈锦华

(51) Int. Cl.

*C07K 16/18* (2006. 01)

*G01N 33/577* (2006. 01)

*A61K 39/395* (2006. 01)

*C12N 15/13* (2006. 01)

权利要求书2页 说明书41页

序列表17页 附图7页

(54) 发明名称

结肠癌和胰腺癌的重组单克隆抗体和相应抗原

(57) 摘要

本发明提供了与人结直肠癌和胰腺癌相关抗原结合的重组单克隆抗体, 以及编码所述抗体链的核酸序列、对应于所述核酸的氨基酸序列, 以及这些抗体、核酸和氨基酸的用途。

1. 一种分离的单克隆抗体或其 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 或 Fv 抗体片段，其中，所述抗体包含轻链和重链，以及其中所述轻链包含 SEQ ID NO :1-3 所示的 CDR1-CDR3 且所述重链包含 SEQ ID NO :7-9 所示的 CDR1-CDR3 ;或者所述轻链包含 SEQ ID NO :4-6 所示的 CDR1-CDR3 且所述重链包含 SEQ ID NO :7、10 和 11 所示的 CDR1-CDR3。
2. 权利要求 1 的抗体，其中所述轻链包含氨基酸序列 SEQ ID NO :14 且所述重链包含氨基酸序列 SEQ ID NO :15 ;或者所述轻链包含氨基酸序列 SEQ ID NO :16 且所述重链包含氨基酸序列 SEQ ID NO :22 ;或者所述轻链包含氨基酸序列 SEQ ID NO :29 且所述重链包含氨基酸序列 SEQ ID NO :28 ;或者所述轻链包含氨基酸序列 SEQ ID NO :17-21 中任一序列且所述重链包含氨基酸序列 SEQ ID NO :23-27 中任一序列。
3. 权利要求 1 或 2 的抗体，其中所述抗体是嵌合抗体或人源化抗体。
4. 权利要求 1 或 2 的抗体，其中所述抗体与细胞毒性剂缀合或包含在与细胞毒性剂的联合体中。
5. 权利要求 4 的抗体，其中所述细胞毒性剂是放射性核素、化疗药物或细胞毒性蛋白。
6. 权利要求 4 的抗体，其中所述细胞毒性剂是磷脂酶 C。
7. 权利要求 5 的抗体，其中所述放射性核素为 <sup>212</sup>Bi、<sup>131</sup>I、<sup>188</sup>Re 或 <sup>90</sup>Y。
8. 权利要求 5 的抗体，其中所述细胞毒性蛋白是核糖体抑制蛋白。
9. 权利要求 8 的抗体，其中所述核糖体抑制蛋白为商陆抗病毒蛋白、假单胞菌外毒素 A、白喉毒素或蓖麻毒素 A 链。
10. 权利要求 5 的抗体，其中所述化疗药物为长春地辛、甲氨蝶呤、阿霉素、顺铂、柔红霉素、甲氨蝶呤或丝裂霉素 C。
11. 权利要求 1 或 2 的抗体，其中所述抗体与标记物缀合。
12. 权利要求 11 的抗体，其中所述标记物是化学发光剂、酶、酶辅因子、酶抑制剂、荧光剂、生物发光剂和放射性标记。
13. 权利要求 12 的抗体，其中所述化学发光剂是发荧光的金属。
14. 一种包含权利要求 1 或 2 的抗体的诊断试剂盒。
15. 权利要求 14 的试剂盒，其中抗体被固定至固相支持物。
16. 权利要求 15 的试剂盒，其中所述固相支持物是珠、试管、薄板、培养皿或测试条。
17. 一种包含权利要求 1 或 2 的抗体和药物可接受载体的组合物。
18. 权利要求 1-13 中任一权利要求所述的抗体或其 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 或 Fv 抗体片段在制备用于治疗对象的药物中的用途，其中所述对象患有或疑似患有胰腺癌或结肠癌或者所述对象是无疾病个体。
19. 权利要求 18 的用途，其中所述对象患有或疑似患有胰腺癌或结肠癌。
20. 权利要求 18 的用途，其中所述药物进一步包含另一治疗剂 ;其中所述治疗剂是化

疗剂或免疫抑制剂。

21. 权利要求 1-13 中任一权利要求所述的抗体或其 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 或 Fv 抗体片段在制备用于促进对象中肿瘤退化的药物中的用途。

22. 权利要求 1-13 中任一权利要求所述的抗体或其 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 或 Fv 抗体片段在制备试剂的用途,其中所述试剂用于检测对象中表达人结直肠癌和胰腺癌相关抗原(CPAA) 的癌细胞的存在。

23. 权利要求 22 的用途,其中所述对象患有或疑似患有胰腺癌或结肠癌,或者是无疾病症状的对象。

24. 权利要求 22 的用途,其中所述抗体被固定至固相支持物。

25. 权利要求 22 的用途,其中所述试剂与样品接触,所述样品是组织活检样品、淋巴样品、尿样、脑脊液、羊水、炎性渗出物、血液样品、血清样品、粪便样品或者从结直肠道收集的液体。

26. 一种分离的核苷酸,其编码权利要求 1 或 2 所述的抗体。

27. 一种分离的表达载体,其包含权利要求 26 的核苷酸。

28. 一种分离的宿主细胞,其包含权利要求 27 的表达载体。

## 结肠癌和胰腺癌的重组单克隆抗体和相应抗原

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2007 年 11 月 8 日提交的美国临时申请序列号 No. 60/996, 255 的优先权, 其通过参考并入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及重组单克隆抗体和肽的领域, 及其在临床和科学方法 (包括诊断方法) 中的用途, 尤其当这种方法涉及人结直肠癌和胰腺癌相关抗原 (colorectal and pancreatic carcinoma-associated antigen, CPAA) 的检测以及涉及被所述重组单克隆抗体和肽识别之表位的表征时。本发明还提供了用于本发明诊断和 / 或治疗方法的采用诊断化合物和 / 或药物组合物形式的抗 CPAA 抗体和肽, 用于诊断和 / 或治疗结直肠癌和胰腺癌相关病症。

### 背景技术

[0004] 根据世界卫生组织的最新数据, 全世界范围内总共五千八百万的死亡人数中, 癌症占有所有死亡人数的 13%。预计世界上死于癌症的人数将会上升, 估计在 2015 年会有九百万人死于癌症, 在 2030 年将会超过一千一百万人死于癌症。在所有癌症中, 结直肠癌在美国是癌症相关死亡的第三大死因, 而胰腺癌在男性和女性中是在最常见癌症中排名第 11 位并且是第四大癌症死因。这种严峻的形势表明亟需新的癌症诊断和治疗。

[0005] 现代技术 (如涉及使用杂交瘤的技术) 使研究人员和临床医生可得到可用于一般性诊断和临床方法的高特异性且强效的单克隆抗体来源。例如, 目前 FDA 批准的用于结直肠癌的治疗性抗体, 如 **AVASTIN®** (贝伐单抗 (bevacizumab), Genentech, Inc.)、**ERBITUX®** (西妥昔单抗 (cetuximab) 注射品, ImClone Sys. Inc./Merck/Bristol-Myers Squibb) 和 **VECTIBIX®** (帕木单抗 (panitumumab), Amgen Inc.)。

[0006] 然而, 抗击癌症的最重要挑战仍然是寻求早期诊断。诊断时癌症分期越晚, 有效治疗的可能性就越小。美国癌症协会估计, 诊断患有 1 期结肠癌的美国人在诊断后 5 年有 90% 仍然存活, 但诊断患有 3 期癌症的患者在诊断后 5 年只有 68% 仍然存活。

[0007] 因此, 尽管癌症研究取得进展, 但仍需要可用于结肠癌和胰腺癌早期诊断和治疗的重组单克隆抗体。

### 发明内容

[0008] 本发明的一个目的是提供特异性针对人结直肠癌和胰腺癌相关抗原 (CPAA) 之抗原和表位的重组单克隆抗体或重组单克隆抗体之部分 (肽)。因此, 本发明的一个目的是提供特异性针对 CPAA 蛋白质和肽 (例如这些蛋白质或肽上的表位) 的重组单克隆抗体或其部分 (例如互补位 (paratope))。

[0009] 本发明另一目的是提供寡核苷酸 (例如 cDNA), 其核苷酸序列 (基因) 编码上述重组抗体之重链和轻链的部分或全部。因此, 本发明的一方面提供了编码单克隆抗体可变区

(特别是识别 CPAA、尤其是识别通常存在于特定 CPAA 中抗原决定簇或表位的可变区)的基因。

[0010] 本发明的另一目的是提供包含上述基因的重组载体。本发明的另一目的是提供使用上述重组载体获得的转化体。

[0011] 本发明的又一目的是提供特异性针对 CPAA 的重组抗体,其中所述抗体用标志物标记,使其易于分离并在使用所述抗体用于研究、诊断和临床目的中提供多种用途。本发明的另一方面提供了嵌合抗体,其包含分别与人免疫球蛋白  $\gamma$ -1 和  $\kappa$  恒定区连接的 CPAA 特异性鼠抗体的重链和轻链可变区。本发明的另一目的是提供特异性针对 CPAA 的完全人源化重组抗体。在该实施方案的一个方面中,优化所述完全人源化的重组抗体,以降低其在人中的免疫原性,同时维持其功能性。

[0012] 本发明的另一目的是提供使用本文公开的重组抗体用于研究、诊断和临床用途的方法。特别地,本发明的一个目的是提供(可能在无疾病症状的患者中)用于癌症早期检测的诊断工具。另一方面提供了用于区分迟缓型和侵袭型胰腺癌的免疫组化工具。

[0013] 本发明的另一目的是提供用于促进肿瘤退化或触发转化细胞死亡的方法,其包括向有此需求的患者施用结合 CPAA 抗原的抗体、其部分、片段、肽或衍生物,其中所述抗体以足以促进肿瘤退化或细胞死亡的量来施用。

[0014] 本发明的另一目的是提供使用抗 CPAA 抗体和/或抗 CPAA 肽用于体外、原位和/或体内诊断和/或治疗与存在 CPAA 相关的动物细胞、组织或病症的方法。本发明还提供了采用药物和/或诊断化合物和/或组合物形式的抗 CPAA 抗体和肽,其用于本发明中诊断和/或治疗 CPAA 相关病症的诊断和/或治疗方法。

[0015] 本发明还涉及含有两条轻链和两条重链的抗 CPAA 嵌合或人源化抗体,其中各链含有至少部分的人恒定区以及至少部分的特异性针对 CPAA 的非人源可变区(V),所述抗体以高亲和性和/或高亲合力结合 CPAA 相关细胞的抑制性和/或中和性表位。本发明还包括此类抗体的片段或衍生物,例如抗体链的一个或多个部分,如重链恒定区、连接区、多样性区或可变区,或者轻链恒定区、连接区或可变区。抗体部分的实例有抗体的一个或多个互补决定区(CDR),其确定了与 CPAA 的特异性结合。

[0016] 本发明的另一目的是表征被所述单克隆抗体或其部分识别的 CPAA 肽。这样的抗原性肽可用于产生其它抗原结合配体或者用作疫苗或其它免疫刺激手段。

[0017] 还提供了制备和使用抗 CPAA 抗体和肽用于本发明多种用途的方法,例如但不限于杂交瘤、重组或化学合成方法来生产本发明的抗 CPAA 抗体或抗 CPAA 肽;检测溶液或细胞中的 CPAA;体外、原位或体内抑制带有 CPAA 之细胞的一种或多种生物活性,包括杀死这种带有 CPAA 的细胞。因此,这样的抑制和杀死可包括本发明用于减轻涉及带有 CPAA 之细胞的状况或病症(如恶性肿瘤)的治疗方法。

## 附图说明

[0018] 图 1 显示 Hollinshead “疫苗”(一种结直肠癌和胰腺癌细胞膜的纯化制备物)的 HPLC 洗脱谱图。

[0019] 图 2 表示 16C3 鼠抗体  $\kappa$  轻链的 DNA 序列。推定的 ATG 起始密码子用粗体/下划线表示,推定的 TAG 终止密码子用斜体/下划线表示。

[0020] 图 3 表示 16C3 抗体 IgG 重链的 DNA 序列。推定的 ATG 起始密码子用粗体 / 下划线表示,推定的 TGA 终止密码子用斜体 / 下划线表示。

[0021] 图 4 表示 16C3 抗体  $\kappa$  轻链的氨基酸序列。CDR 区域用粗体 / 下划线字体表示。

[0022] 图 5 表示 16C3 重链的氨基酸序列。CDR 区域用粗体 / 下划线字体表示。

[0023] 图 6 表示几种人源化 16C3 可变轻链。16C3 是鼠抗体序列,“ven16C3”已用人框架序列进行“镶嵌”,“cdr16C3”已用人 CDR 氨基酸重新改造,“abb16C3”表示缩短的 CDR 嫁接 (grafting),“sdr16C3”表示位点决定氨基酸改变,“fra16C3”表示通过使用多种人可变区“片段”的组合利用“Frankenstein”方法重新改造可变区。数字代表 Kabat 编号。

[0024] 图 7 表示几种人源化 16C3 可变重链。缩写和图 6 中的一致。

[0025] 图 8 是使用针对未经处理之 16C3 肿瘤抗原的 16C3 抗体对多种细胞系进行 western 印迹分析的放射自显影图。TU = 患者切除的肿瘤样品 (结直肠);LS = LS174;CF = CFPAC-1;AS = ASPC-1;HT = HT29。

[0026] 图 9 是代表经蛋白酶 V8 处理的 16C3 肿瘤抗原的 western 印迹的放射自显影图。用蛋白酶 V8 处理来自 LS174 细胞系的 16C3 抗原,以及利用 western 印迹进行抗原检测。LS = 未处理的抗原;V81 = 用蛋白酶 V8 在室温 (RT) 下孵育 1 小时;V83 = 用蛋白酶 V8 在室温下孵育 3 小时;V824 = 用蛋白酶 V8 在室温下孵育 24 小时。

[0027] 图 10 显示代表经 PNG 酶 -F (PNGase-F) 处理的 16C3 肿瘤抗原的 western 印迹。用 PNG 酶 -F (除去 N-连接糖基化) 处理来自 CFPAC-1 的 16C3 抗原不同时间。CFC = 抗原在室温下无酶孵育 24 小时;CF = 未经处理的对照抗原;CF1 = 用酶在室温下处理抗原 1 小时;CF5 = 用酶处理抗原 5 小时;CF24 = 用酶处理抗原 24 小时。高分子量的条带受到影响,但低分子量的条带未受影响。

[0028] 图 11 显示代表使用 16C3 抗体进行多种胎儿组织提取物中表达的 16C3 肿瘤抗原的 western 印迹。泳道:1 = 胎儿肠, Fx III (Hem), 8/22/72;2 = 胎儿肠, Fx II (Hem), 8/22/72;3 = 胎儿消化道 (fetal Gut), Fx III, 2/26/73;4 = 胎儿消化道, Fx II, HB 11/1/72;5 = 胎儿消化道, FxIII, 12/20/72;6 = 胎儿肠, Fx I, 6/24/75;7 = 胎儿消化道, Fx I, 12/20/72;8 = 胎儿消化道, Fx II, 3/1/73;9 = 胎儿肠 Reg 2 和 Reg 3A, 8/3/74。

[0029] 图 12 表示优化的、人源化 16C3 抗体的氨基酸序列。下划线、粗体氨基酸表示 CDR,“/”表示前导肽 / 成熟 N-端的连接以及可变 / 恒定结构域的连接。

[0030] 发明详述

[0031] 应当理解,本发明不限于本文所述的特定方法、操作步骤和试剂等,并因此可有所变化。本文所用术语仅出于描述具体实施方案的目的,不意在限制仅由权利要求限定的本发明的范围。

[0032] 除非另有指明,与本文所述抗体相关的科技术语应当具有本领域普通技术人员常规理解的含义。此外,除非上下文另有要求,非数量词限定的术语包括一个或多个的含义,复数术语应包括单数。通常,与本文所述的细胞和组织培养、分子生物学和蛋白质、寡核苷酸化学或多聚核苷酸化学以及杂交相关的术语和技术是本领域中公知且常用的。

[0033] 使用标准技术进行重组 DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转化 (例如电穿孔、脂质体转染)。根据制造商的说明或本领域通常所实现地或本文所述进行酶促反应和纯化技术。一般地,根据本领域公知的常规方法以及如本说明书所引用和论述的多种一般性和

更具体的参考文献中所述的方法实施上述技术和方法,参见,例如 Sambrook 等, MOLECULAR CLONING :LAB. MANUAL (第三版, Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001)。与本文所述的分析化学、合成有机化学以及医药化学相关的术语以及实验室方法和技术是本领域中公知且常用的。使用标准技术进行化学合成、化学分析、药物制备、配制、递送以及患者治疗。

[0034] 除了现有的实施例中或者另有指明,本文中所示的表示组分或反应条件的量的所有数字应当理解为在所有情况下用术语“约”修饰。

[0035] 所有指出的专利文献或其它出版物均通过参考明确并入本文中,旨在用于描述和公开例如这些出版物中描述的可能用于本发明中的方法。提供这些出版物仅由于它们在本申请提交日之前公开。在此方面,不应当理解为承认本发明人无权通过先发明或任何其它原因提早这种公开。所有关于这些文件之日期陈述以及对这些文件内容的描述均基于申请人可获得的信息,并不构成对这些文件之日期或内容的正确性的任何承认。

[0036] 本发明提供了重组单克隆抗体和肽,及其在临床和科学方法(包括诊断方法)中的用途,尤其当这种方法涉及人结直肠癌和胰腺癌相关抗原(CPAA)的检测以及涉及被所述重组单克隆抗体和肽识别的表位的表征时。本发明还提供了可用于本发明诊断和/或治疗方法的、采用诊断化合物和/或药物组合物形式的抗 CPAA 抗体和肽,其用于诊断和/或治疗结直肠癌和胰腺癌相关病症。先前已描述过一种这样的抗 CPAA 单克隆抗体,参见美国专利号 No. 7, 314, 622。然而,本文所述的抗原结合蛋白是新的。

[0037] 一般地,单克隆抗体是诊断中极为有用的试剂。事实上,由于其高特异性,它们在破译各种生物分子在难以洞悉的生物合成通路中的功能中发挥重要作用。这些也成为鉴定和表征肿瘤特异性抗原的可选试剂,并已成为癌症分类中很有用的工具。

[0038] 随着分子生物学方法和重组技术的到来,使得有可能通过重组手段产生抗体和抗体样分子,从而得到编码所述抗体多肽结构中存在的特定氨基酸序列的基因序列。这些抗体可通过克隆编码所述抗体之多肽链的基因序列来产生,或通过直接合成所述多肽链来产生,并将合成链组装以形成对特定表位和抗原决定簇具有亲和性的活性四聚体( $H_2L_2$ )结构。这使得易于产生特征在于来自不同物种和来源之中和抗体的抗体。

[0039] 无论所述抗体的来源如何,或者它们如何重组构建,或者它们如何利用转基因动物、实验室或商业规模的大量细胞培养物、转基因植物或通过直接化学合成(在所述方法的任何阶段均不使用活的有机体)在体外或体内合成,所有抗体均具有相似的整体三维结构。这种结构常表示为  $H_2L_2$ ,是指抗体通常包含两条轻(L)氨基酸链和两条重(H)氨基酸链。这两种链都具有能够与结构上互补的抗原性靶标相互作用的区域。与所述靶标相互作用的区域表示为“可变区”或“V”,其特征在于不同抗原特异性的抗体之间的氨基酸序列不同。H或L链的可变区都含有能够特异性结合抗原靶标的氨基酸序列。

[0040] 本文使用的术语“抗原结合区”是指含有与抗原相互作用并使抗体具有其针对抗原之特异性和亲和性的氨基酸残基的抗体分子部分。所述抗体区包含维持抗原结合残基的适当构象所必需的“框架”氨基酸残基。

[0041] 在提供抗原结合区的H或L链可变区内是因在不同特异性的抗体之间变化极大而称为“超变”的较短序列。这样的超变区还称为“互补决定区”或“CDR”区。这些 CDR 区决定了针对特定抗原决定簇结构的抗体基本特异性。

[0042] 所述 CDR 代表在可变区中非连续的氨基酸区段,但是已发现,无论物种如何,这些关键性氨基酸序列在可变的重链和轻链区域中的位置定位在可变链氨基酸中的相似位置。所有抗体的可变重链和轻链都具有三个 CDR 区,对于各轻链(L)和重链(H)来说,CDR 区彼此之间不连续(称为 L1、L2、L3、H1、H2、H3)。已被认可的 CDR 区由 Kabat 等,252J. Biol. Chem. 6609-16(1977)描述,通过在检测线性氨基酸序列时应用这些规则可鉴定 CDR 环。然而,用于定义 CDR-H3 环的规则可以有变化(参见 ANTIBODY ENGIN. METHODS & PROTOCOLS, 第 4 章(L0 编, Humana Press, Totowa, NJ, 2004)),如果没有例如圆二色谱、核磁共振或 X-射线晶体学的实验技术,则不能确定某些 CDR-H3 环的实际边界。

[0043] 在所有哺乳动物物种中,抗体肽包含恒定(即高度保守)和可变区,并且在后者中,存在 CDR 和所谓“框架区”,所述“框架区”由重链或轻链可变区内、CDR 之外的氨基酸序列构成。

[0044] 关于被抗体的 CDR 区域识别的抗原决定簇,也称作“表位”。换言之,表位是指任何能够被抗体(对应的抗体结合区域可称为“互补位”)识别并结合的分子之部分。一般地,表位由分子的化学活性表面基团组成,例如氨基酸或糖侧链,并具有特异性的三维结构特征以及特异性的电荷特征。

[0045] “抗原”是能够与抗体结合的分子或分子之部分,其还能够诱导动物产生能与该抗原之表位结合的抗体。抗原可具有一个或多个表位。所涉及的特异性反应是指所述抗原与其对应的抗体以高度选择性的方式反应,并且不与可由其它抗原引发的大量其它抗体反应。

[0046] 因此,术语“抗体”意在包括完整的免疫球蛋白分子及其部分、片段、肽和衍生物,例如 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、Fsc、CDR 区、互补位或者能够与抗原或表位结合的抗体的任何部分或肽序列。如果抗体能够特异性地与分子反应从而使分子与抗体结合,则认为抗体“能够结合”分子。

[0047] 抗体还包括嵌合抗体、人源化抗体、抗独特型(抗 Id)抗体乃至以可溶或结合的形式进行标记的抗体,以及通过任何已知的技术(例如但不限于酶切、肽合成或重组技术)提供的片段、部分、区域、肽或衍生物。本发明的这种抗体能够结合 CPAA 的部分或带有 CPAA 的细胞。抗体片段或部分可缺少完整抗体的 Fc 片段,从循环中更快地清除,其比完整抗体具有更低的非特异性组织结合。采用本领域公知的方法,可以从完整抗体中产生抗体片段,例如通过酶(如木瓜蛋白酶(产生 Fab 片段)或胃蛋白酶(产生 F(ab')<sub>2</sub> 片段))进行蛋白质水解来实现,参见例如 Wahl 等,24J. Nucl. Med. 316-25(1983)。抗体的部分可以由上述任何方法制备,或者可通过表达重组分子的一部分来制备。例如,可以分离重组抗体的 CDR 区并亚克隆至合适的表达载体中。参见例如美国专利 No. 6,680,053。

[0048] 克隆 16C3 寡核苷酸和氨基酸序列

[0049] 本发明提供了与 CPAA 特异性结合的新单克隆抗体。这种单克隆抗体被称作“16C3”,是指其杂交瘤克隆指定的编号。本文中,16C3 还指与 CPAA 表位(由于其能够与前述 16C3 抗体结合,故也称作“16C3”)特异性结合的单克隆抗体的部分、互补位或 CDR。本文所述的几种重组和人源化形式的 16C3 可具有相同的命名。

[0050] 在本发明范围内,包括编码本发明抗 CPAA 抗体的轻链和重链可变区的 DNA 序列。编码 16C3 抗体轻链可变区的核酸序列示于图 2。编码 16C3 抗体重链可变区的核酸序列示



于图 3。

[0051] 在本发明范围内,包括含有图 4 和图 12 所示氨基酸序列的 16C3 轻链肽;含有图 5 和图 12 所示氨基酸序列的 16C3 重链肽。此外,本发明包括针对 16C3  $\kappa$  轻链示出的 CDR 区,即图 4 中下划线所示的残基,其具有如下氨基酸:CDR 1:GASENIYGALN(SEQ ID NO:1);CDR 2:GASNLAD(SEQ ID NO:2) 以及 CDR 3:QNVLSSPYT(SEQ ID NO:3);图 12 中下划线所示的轻链氨基酸,其包括 CDR 1:QASENIYGALN(SEQ ID NO:4);CDR 2:GASNLAT(SEQ ID NO:5) 以及 CDR 3:QQVLSSPYT(SEQ ID NO:6)。类似地,本发明给出了重链的 CDR 区(在图 5 中以下划线表示),其包括如下氨基酸:CDR 1:GYTFTDYAMH(SEQ ID NO:7);CDR 2:LISTYSGDTKYNQNFQK(SEQ ID NO:8);以及 CDR 3:CDYSGSRYWFAY(SEQ ID NO:9);以及图 12 中下划线所示的重链氨基酸,其包括 CDR 1:GYTFTDYAMH(SEQ ID NO:7);CDR 2:ISTYSGDTKYNQNFQG(SEQ ID NO:10);以及 CDR 3:GDYSGSRYWFAY(SEQ ID NO:11)。

[0052] 本发明范围内还包括编码 16C3 或其肽之氨基酸序列的任何寡核苷酸序列。由于遗传密码是简并性的,可使用多于一种密码子来编码特定氨基酸。使用遗传密码,可鉴定一种或多种能够编码该氨基酸的不同寡核苷酸。可通过考虑异常的碱基配对关系以及特定密码子在表达抗 CPAA 抗体或部分的真核或原核表达细胞中的实际使用(编码特定氨基酸)频率来估计特定寡核苷酸实际构成 XXX 编码序列的可能性。这样的“密码子使用规则”公开于 Lathe 等,183J. Molec. Biol. 1-12(1985) 中。通过使用 Lathe 的“密码子使用规则”,鉴定出含有能够编码抗 CPAA 序列的理论上“最有可能”之核苷酸序列的单个寡核苷酸或一组寡核苷酸。

[0053] 尽管有时氨基酸序列仅由单一寡核苷酸编码,然而更常见地,氨基酸序列可以由一组相似的寡核苷酸中的任意几种来编码。重要的是,尽管该组中的所有成员都含有能够编码所述肽片段的寡核苷酸,并因此有可能含有与编码该肽片段之基因相同的寡核苷酸序列,然而该组中只有一个成员含有与所述基因的核苷酸序列相同的核苷酸序列。由于该成员存在于所述组中,并且即便在所述组的其它成员存在时也能够与 DNA 杂交,因此有可能以应用单一寡核苷酸来克隆编码所述蛋白质之基因之同样方式来应用未经分离的寡核苷酸组。

[0054] 使用含有能够编码抗 CPAA 抗体或肽(包括可变区或恒定区)的理论上“最有可能”序列的寡核苷酸或寡核苷酸组来鉴定能够与“最有可能”序列或序列组杂交的互补寡核苷酸或寡核苷酸组的序列。可使用含有这种互补序列的寡核苷酸作为鉴定和分离抗 CPAA 抗体基因之可变区或恒定区的探针(Sambrook 等,1989)。

[0055] 利用本领域公知的手段,针对从能够表达抗 CPAA 抗体或其可变区或恒定区的细胞得到的 DNA 或 cDNA 制备物,对能够编码 16C3 肽的适当寡核苷酸或寡核苷酸组(或者与这种寡核苷酸或寡核苷酸组互补的序列)进行鉴定(使用上述方法)、合成以及杂交。可使用本领域普通技术人员公知的方法来合成与“最有可能的”抗 CPAA 区肽编码序列互补的单链寡核苷酸分子。参见 Belagaje 等,254 J. Biol. Chem. 5765-80(1979);Maniatis 等,MOLEC. MECH. IN CONTROL OF GENE EXPRESSION(Nierlich 等编,Acad. Press, NY,1976);Wu 等,1978;Khorana,203 Science 614-25(1979)。

[0056] 此外,可通过使用自动合成仪进行 DNA 合成。Sambrook 等,1989 以及 Hayrnes 等,NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION, A PRACTICAL APPROACH(IRL Press, DC 1985) 中公开了

核酸杂交技术。杂交洗脱条件可包括  $0.2 \times \text{SSC}/0.1\%$  SDS 的洗脱溶液并在室温下振摇孵育 10 分钟（低严谨性洗脱），预热（ $42^\circ\text{C}$ ）的  $0.2 \times \text{SSC}/0.1\%$  SDS 的洗脱溶液并在  $42^\circ\text{C}$  下振摇孵育 15 分钟（中等严谨性洗脱），以及预热（ $68^\circ\text{C}$ ）的  $0.1 \times \text{SSC}/0.1\%$  SDS 的洗脱溶液并在  $68^\circ\text{C}$  下振摇孵育 15 分钟（高严谨性洗脱）。参见 Ausubel 等, ANTIBODIES :A LAB. MANUAL(Harlow&Lane 编, ColdSpring Harbor Lab., 1988)。如上所述的技术或类似技术已成功克隆了人醛脱氢酶基因 (Hsu 等, 82 P. N. A. S. USA 3771-75(1985))、纤粘连蛋白 (Suzuki 等, 4 Bur. Mol. Biol. Organ. J. 2519-24(1985))、人雌激素受体基因 (Walter 等, 82 Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 7889-93(1985))、组织型纤溶酶原激活因子 (Pennica 等, 301 Nature 214-21(1983)) 以及人足月胎盘碱性磷酸酶互补 DNA (Keun 等, 82 P. N. A. S. USA 8715-19(1985))。

[0057] 还意在可使用标准分子生物学技术、通过改变现有抗体基因来提供用于本发明的所述抗体编码区,从而产生本文所述的抗体和肽的变体(激动剂)。这种变体包括但不限于抗 CPAA 抗体或肽的氨基酸序列中的缺失、添加和替换。

[0058] 例如,替换中的一类是保守性氨基酸替换。这种替换是指用另一种性质相似的氨基酸替换抗 CPAA 抗体中的特定氨基酸。典型地,保守性替换是:脂族氨基酸 Ala、Val、Leu 和 Ile 之间的互换;羟基残基 Ser 和 Thr 的互换;酸性残基 Asp 和 Glu 的互换;酰胺残基 Asn 和 Gln 之间的替换;碱性残基 Lys 和 Arg 的互换;芳族残基 Phe、Tyr 的互换,等等。在 Bowie 等, 247 Science 1306-10(1990) 中,可以找到有关哪种氨基酸变化有可能导致表型沉默的指南。

[0059] 抗 CPAA 抗体的变体或激动剂或肽可以是功能完全的,或者可在一种或多种活性中缺少功能。功能完全的变体通常仅含有保守性变异或者非关键残基或非关键区域的变异。功能性变体还可以含有相似氨基酸的替换,其不导致功能上的变化或者导致不显著的变化。作为替代,这种替换可以以一定程度正向或负向影响功能。非功能性变体通常含有一种或多种非保守性氨基酸替换、缺失、插入、倒位或截短,或在关键残基或关键区域中的替换、插入、倒位、缺失。

[0060] 可通过本领域公知的方法鉴定对于功能来说必要的氨基酸,所述方法例如定点突变或丙氨酸扫描突变 (Alanine scanning mutagenesis)。Cunningham 等, 244 Science 1081-85(1989)。后一方法在分子中的每个残基处引入单个丙氨酸突变。然后测试所获得的突变分子的生物活性,例如表位结合或体外 ADCC 活性。还可通过结构分析(如晶体学、核磁共振或光亲和性标记 (photoaffinity labeling)) 确定对配体-受体结合来说关键性的位点。Smith 等, 224 J. Mol. Biol. 899-904(1992); de Vos 等, 255 Science 306-12(1992)。

[0061] 另外,多肽常含有除了“天然”氨基酸以外的氨基酸。此外,很多氨基酸(包括末端氨基酸)可以通过天然方法(例如加工或其它翻译后修饰)或本领域公知的化学修饰技术得以修饰。已知的修饰包括但不限于乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素的共价附着、原血红素部分的共价附着、核苷酸或核苷酸衍生物的共价附着、脂质或脂质衍生物的共价附着、磷脂酰肌醇的共价附着、交联、环化、二硫键的形成、去甲基化、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、 $\gamma$  羧基化、糖基化、GPI 锚定的形成、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、水解加工、磷酸化、异戊二烯化、消旋、硒化 (selenoylation)、硫化、tRNA 介导的向蛋白质中加入氨基酸(如精氨酸化和泛素化)。

[0062] 这些修饰是本领域技术人员公知的,并且在科学文献中已经有详尽描述。几种特别常见的修饰(例如糖基化、脂质附着、硫化、谷氨酸残基的 $\gamma$ 羧基化、羟基化和ADP-核糖基化)在大多数基础教科书(例如蛋白质——结构和分子性质(Proteins——Structure and Molecular Properties,第二版,T.E.Creighton,W.H.Freeman&Co.,NY,1993))中有所描述。就这一主题可以获得许多详细的综述,例如Wold,Posttranslational Covalent Modification of proteins,1-12(Johnson 编,Academic Press, NY,1983);Seifter 等,182Meth. Enzymol. 626-46(1990)以及 Rattan 等,663Ann. NY Acad, Sci. 48-62(1992)。

[0063] 因此,本发明的抗体和肽还包括衍生物或类似物,其中所替换的氨基酸残基不是由遗传密码编码的,其中替换基团包括如前所述的聚乙二醇化。

[0064] 类似地,所述氨基酸序列中的添加和替换以及上述变异和修饰可等同地适用于CPAA 抗原和/或其表位或肽的氨基酸序列,并因而涵盖在本发明的范围内。如上所述,编码本发明单克隆抗体的基因特异性地有效识别 CPAA。

[0065] 抗体的重组表达

[0066] 传统上,单克隆抗体作为鼠杂交瘤细胞系的天然分子而产生。除此技术之外,如下综述,本发明提供了单克隆抗体的重组 DNA 表达。这使得在选定的宿主物种中产生人源化抗体以及一系列抗体衍生物和融合蛋白。最近,出现了在细菌、酵母、转基因动物和鸡卵中产生抗体,作为基于杂交瘤的生产系统的最有前景的替代方案。转基因动物的主要优势在于从可更新的来源中获得潜在高产量。

[0067] 根据常规技术(包括平末端或粘末端连接、限制性酶切以提供合适的末端、视情况填补粘性末端、碱性磷酸酶处理以避免不期望的结合以及用合适的连接酶连接),可将编码至少一种本发明的抗 CPAA 抗体、部分或多肽的核酸序列与载体 DNA 进行重组。用于这些操作的技术公开于例如 Maniatis 等,MOLECULAR CLONING, LAB. MANUAL(Cold Spring Harbor Lab. Press, NY,1982 和 1989)以及 Ausubel,1987,1993,所述技术可用于构建编码单克隆抗体分子或其抗原结合区的核酸序列。

[0068] 如果核酸分子(例如 DNA)含有这样的核苷酸序列,即所述核苷酸序列包含转录和翻译调控信息且此序列与编码所述多肽的核苷酸序列“有效连接”,则认为所述核酸分子“能够表达”所述多肽。有效连接是指这样一种连接,其中调控性 DNA 序列与所要表达的 DNA 序列以如下方式连接,所述方式允许基因以可回收的量表达抗 CPAA 肽或抗体部分。基因表达所需的调控区的精确性质由于生物体的不同而不同,这在类似领域中是公知的。参见例如 Sambrook 等,1989;Ausubel 等,1987-1993。

[0069] 因此,本发明包括在原核或真核细胞中表达抗 CPAA 抗体或肽。合适的宿主包括细菌宿主或真核宿主(包括体内或原位的细菌、酵母、昆虫、真菌、鸟和哺乳动物细胞),或哺乳动物、昆虫、鸟或酵母来源的宿主细胞。哺乳动物细胞或组织可以是人、灵长类、仓鼠、兔、啮齿类、牛、猪、绵羊、马、山羊,狗或猫来源的,但也可以使用任何其它哺乳动物细胞。

[0070] 此外,通过使用例如酵母泛素水解酶系统,可实现泛素跨膜多肽融合蛋白的体内合成。这样产生的融合蛋白可以在体内加工或者在体外纯化和加工,从而使本发明的抗 CPAA 抗体或多肽的合成具有特定的氨基酸末端序列。此外,可以避免与起始密码子来源的甲硫氨酸残基保留在直接的酵母(或细菌)表达中有关的问题。Sabin 等,7(7)Bio/

Technol. 705-09(1989);Miller 等,7(7)Bio/Technol. 698-704(1989)。

[0071] 可使用一系列酵母基因表达系统中的任何一种(包括来自活跃表达基因的启动子和终止元件)获得本发明的抗 CPAA 抗体或肽,其中所述活跃表达的基因当酵母在富含葡萄糖的培养基中生长时编码产生大量的糖酵解酶。已知的糖酵解基因还可以提供非常有效的转录控制信号。例如,可以使用磷酸甘油酸激酶的启动子和终止子信号。

[0072] 在昆虫中产生抗 CPAA 抗体或肽或者其功能衍生物,可以通过本领域技术人员已知的方法来实现,例如,通过用经改造的杆状病毒感染昆虫宿主来表达跨膜多肽。参见 Ausubel 等,1987,1993。

[0073] 在一个实施方案中,所引入的核苷酸序列将并入能够在受体宿主中自主复制的质粒或病毒载体中。为此目的可使用多种载体中的任意一种。参见例如 Ausubel 等,1987,1993。在选择特定质粒或病毒载体时的重要因素包括:包含所述载体的受体细胞被识别以及从不含该载体的受体细胞中选择出来的难易程度;载体在特定宿主中期望的拷贝数;以及是否期望载体能够在不同物种的宿主细胞间“穿梭”。

[0074] 本领域已知的原核载体的实例包括能够在大肠杆菌(例如,pBR322、ColE1、pSC101、pACYC 184、 $\pi$  V<sub>X</sub>)中复制的质粒。这些质粒例如公开于 Maniatis 等,1989;Ausubel 等,1987,1993 中。Bacillus 质粒包括 pC194、pC221、pT127 等。这些质粒公开于 Gryczan, THE MOLEC. BIO. OF THE BACILLI 307-329(Academic Press, NY,1982)中。合适的链霉菌(Streptomyces)质粒包括 pIJ101(Kendall 等,169J. Bacteriol. 4177-83(1987)),链霉菌噬菌体例如  $\phi$ C31(Chater 等,SIXTH INT' L SYMPOSIUM ON ACTINOMYCETALES BIO. 45-54(AkademiaiKaido,Budapest,Hungary 1986)。假单胞菌(Pseudomonas)质粒综述于 John 等,8 Rev. Infect. Dis. 693-704(1986);Izaki,33 Jpn. J. Bacteriol. 729-42(1978)以及 Ausubel 等,1987,1993 中。

[0075] 作为替代,可用于表达编码抗 CPAA 抗体或肽之 cDNA 的基因表达元件包括但不限于(a)病毒转录启动子及其增强子元件,例如 SV40 早期启动子(Okayama 等,3Mol. Cell. Biol. 280(1983))、劳斯肉瘤病毒 LTR(Gorman 等,79 P. N. A. S. USA 6777(1982))以及 Moloney 鼠白血病病毒 LTR(Grosschedl 等,41Cell 885(1985));(b)剪接区域和多聚腺苷酸化位点,例如源自 SV40 晚期区域的那些(Okayama 等,1983);以及(c)多聚腺苷酸化位点,例如 SV40 中的位点(Okayama 等,1983)。

[0076] 可以如 Liu 等(如下)以及 Weidle 等,51 Gene 21(1987)所述表达免疫球蛋白 cDNA 基因,所使用的表达元件包括 SV40 早期启动子及其增强子、鼠免疫球蛋白 H 链启动子增强子、SV40 晚期区域 mRNA 剪接、兔 S-球蛋白间隔序列、免疫球蛋白和兔 S-球蛋白多聚腺苷酸化位点以及 SV40 多聚腺苷酸化元件。

[0077] 对于由部分 cDNA 和部分基因组 DNA 组成的免疫球蛋白基因(Whittle 等,1 Protein Engin. 499(1987)),转录启动子可以是人巨细胞病毒,启动子增强子可以是巨细胞病毒和鼠/人免疫球蛋白, mRNA 剪接和多聚腺苷酸化区域可以是天然染色体免疫球蛋白序列。

[0078] 在一个实施方案中,为了在啮齿类细胞中表达 cDNA 基因,转录启动子是病毒 LTR 序列,转录启动子增强子是鼠免疫球蛋白重链增强子或病毒 LTR 增强子或者两者兼有,剪接区域含有大于 31bp 的内含子,多聚腺苷酸化和转录终止区域源自对应于所合成免疫球

蛋白链的天然染色体序列。在另一些实施方案中,编码其它蛋白质的 cDNA 序列与上述表达元件组合以实现蛋白质在哺乳动物细胞中的表达。

[0079] 将每个融合基因组装进或插入表达载体中。然后将能够表达嵌合免疫球蛋白链基因产物的受体细胞与抗 CPAA 肽或嵌合的 H 链或嵌合的 L 链编码基因单独转染,或与嵌合的 H 链和嵌合的 L 链基因共转染。经转染的受体细胞在允许所并入基因表达的条件下进行培养,并从培养物中回收表达的免疫球蛋白链或者完整抗体或片段。

[0080] 在一个实施方案中,将编码抗 CPAA 肽或嵌合的 H 和 L 链或其部分的融合基因组装进单独的表达载体中,随后用所述表达载体共转染受体细胞。

[0081] 每个载体可包含两个选择基因,第一选择基因设计用于在细菌系统中选择,第二选择基因设计用于在真核系统中选择,其中各载体具有不同的基因对。这种策略使得载体首先指导融合基因在细菌系统中产生,并允许扩增。在细菌宿主中这样产生并扩增的基因随后用于共转染真核细胞,并允许选择携带所期望转染基因的共转染细胞。

[0082] 用于细菌系统的选择基因的实例有赋予青霉素抗性的基因以及赋予氯霉素抗性的基因。用于真核转染物的选择基因包括黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因(命名为 gpt)和来自 Tn5 的磷酸转移酶基因(命名为 neo)。

[0083] 表达 gpt 之细胞的选择基于这样的事实:由该基因编码的酶利用黄嘌呤作为合成嘌呤核苷酸的底物,而类似的内源酶则不能。在含有(1) 霉酚酸(其阻止肌苷单磷酸转化为黄嘌呤单磷酸)和(2) 黄嘌呤的培养基中,只有表达 gpt 基因的细胞可以存活。neo 的产物阻止抗生素 G418 和其它新霉素类抗生素对蛋白质合成的抑制。

[0084] 可同时或先后使用这两种选择方法,来选择通过两种不同的 DNA 载体引入真核细胞中的免疫球蛋白链基因的表达。对于真核细胞,没有必要包含不同的选择标记;各自含有相同选择标记的 H 链和 L 链载体可以共转染。选择适当抗性的细胞之后,大部分克隆将含有 H 链和 L 链载体和/或抗 CPAA 肽的整合拷贝。

[0085] 作为替代,编码嵌合 H 和 L 链的融合基因可组装到同一表达载体中。

[0086] 对于表达载体的转染和嵌合抗体的产生,受体细胞系可以是骨髓瘤细胞。骨髓瘤细胞可以合成、组装或分泌由转染的免疫球蛋白基因编码的免疫球蛋白,并具有免疫球蛋白的糖基化机制。例如,受体细胞是产生重组 Ig 的骨髓瘤细胞 SP2/0(ATCC#CRL 8287)。SP2/0 细胞仅产生由转染基因编码的免疫球蛋白。骨髓瘤细胞可以在培养物或者在小鼠腹腔中培养,其中分泌的免疫球蛋白可以从腹水中获得。其它合适的受体细胞包括淋巴细胞,例如人或非人源的 B 淋巴细胞、人或非人源的杂交瘤细胞或者种间异源杂交瘤细胞(interspecies heterohybridoma cell)。

[0087] 携带有本发明嵌合或人源化抗体构建物或抗 CPAA 多肽之载体的表达载体可通过多种合适的手段引入合适的宿主细胞中,所述手段包括如下生化手段:转化、转染、接合(conjugation)、原生质体融合、磷酸钙沉淀以及使用聚阳离子(例如二乙氨基乙基(DEAE)葡聚糖),以及如下机械手段:电穿孔、直接显微注射和微弹轰击(microprojectile bombardment)。Johnston 等,240 Science 1538(1988)。

[0088] 向淋巴细胞引入 DNA 的另一种方法是电穿孔。Potter 等,81 P. N. A. S. USA 7161(1984);Yoshikawa 等,77 Jpn. J. Cancer Res. 1122-33(1986)。在该方法中在待并入的 DNA 存在下对受体细胞进行电脉冲处理。通常,转染后,使细胞在完全培养基中恢复约 24 小

时,随后接种于存在选择培养基的 96 孔板中。进行 G418 选择使用约 0.4mg/ml ~ 0.8mg/ml 的 G418。进行霉酚酸选择使用约 6  $\mu$ g/ml,再加上约 0.25mg/ml 的黄嘌呤。对于 Sp2/0 细胞来说,电穿孔技术预期产生约  $10^{-5}$  ~ 约  $10^{-4}$  的转染频率。在原生质体融合方法中,使用溶菌酶从具有含嵌合抗体基因的重组质粒的卡他 (catarrhal) 剥离细胞壁。用聚乙二醇将得到的原生质球与骨髓瘤细胞融合。本发明的免疫球蛋白基因还可以在哺乳动物非淋巴细胞或其它真核细胞 (例如酵母) 或原核细胞 (尤其是细菌) 中表达。

[0089] 就产生免疫球蛋白 H 链和 L 链而言,酵母比细菌提供了更多的优势。酵母进行翻译后肽修饰 (包括糖基化)。目前存在多种使用强启动子序列和高拷贝数质粒的重组 DNA 策略,可用于在酵母中产生期望的蛋白质。酵母识别所克隆的哺乳动物基因产物的前导序列,并分泌带有前导序列的肽 (即,前肽 (pre-peptide))。Hitzman 等,11th Int'l Conference on Yeast, Genetics & Molec. Biol. (Montpellier, France, 1982)。

[0090] 可常规地评估酵母基因表达系统针对抗 CPAA 肽、抗体以及组装的鼠抗体和嵌合或人源化抗体及其片段和区域的产生、分泌和稳定性水平。可使用一系列酵母基因表达系统中的任何一种,其中包含来自活跃表达基因 (当酵母在富含葡萄糖的培养基中生长时,其编码大量产生的糖酵解酶) 的启动子和终止元件。已知的糖酵解基因还可以提供非常有效的转录控制信号。例如,可使用磷酸甘油酸激酶 (PGK) 的启动子和终止子信号。可采用多种方法来评价在酵母中表达克隆的免疫球蛋白 cDNA 的最佳表达质粒。参见 II DNA Cloning, 45-66 (Glover 编, IRL Press, 1985)。

[0091] 也可使用细菌株作为产生本发明所述抗体分子或肽的宿主,可使用 E. coli K12 菌株 (例如 E. coli W3110 (ATCC 27325)) 和其它肠细菌 (例如鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 或粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)) 以及多种假单胞菌属物种。

[0092] 源自与宿主细胞相容之物种的含复制子和调控序列的质粒载体与这些细菌宿主联合使用。所述载体带有复制位点以及能够在转化细胞中提供表型选择的特定基因。可以采用多种方法来评价表达质粒在细菌产生所克隆免疫球蛋白 cDNA 编码的鼠和嵌合或人源化抗体、片段和区域或抗体链 (参见 Glover, 1985; Ausubel, 1987, 1993; Sambrook, 1989; Colligan, 1992-1996)。

[0093] 宿主哺乳动物细胞可以在体外或体内培养。哺乳动物细胞提供了对免疫球蛋白分子的翻译后修饰,包括去除前导肽、H 链和 L 链的折叠和组装、抗体分子的糖基化以及功能性抗体蛋白质的分泌。

[0094] 除了上述淋巴来源的细胞以外,可用作产生抗体蛋白质之宿主的哺乳动物细胞还包括成纤维细胞来源的细胞,例如 Vero (ATCC CRL81) 或 CHO-K1 (ATCC CRL61) 细胞。

[0095] 许多载体系统可用于在哺乳动物细胞中表达所克隆的抗 CPAA 肽 H 和 L 链基因 (参见 Glover, 1985)。可根据不同的方法来获得完整的 H<sub>2</sub>L<sub>2</sub> 抗体。如上所述,有可能在同一细胞中共表达 H 和 L 链,以实现 H 链和 L 链在细胞内结合并连接成完整的四聚体 H<sub>2</sub>L<sub>2</sub> 抗体和 / 或抗 CPAA 肽。可通过在同一宿主中使用相同或不同的质粒进行共表达。可以将 H 链和 L 链和 / 或抗 CPAA 肽的基因置于同一质粒中,然后转染至细胞中,从而直接选择表达两种链的细胞。作为替代,可以先用编码一条链例如 L 链的质粒转染细胞,随后用含有第二选择标记的 H 链质粒转染所得到的细胞系。可以用编码额外肽拷贝、H 链、L 链、或 H 加 L 链连同额外的选择标记的质粒通过各自的途径转染产生抗 CPAA 肽和 / 或 H<sub>2</sub>L<sub>2</sub> 分子的细胞系,以获

得增强特性的细胞系,例如更多地产生经组装 H<sub>2</sub>L<sub>2</sub> 抗体分子或者经转染细胞系的稳定性增强。

[0096] 此外,最近出现了将植物作为方便、安全且经济的替代性主流表达系统用于产生重组抗体,其基于微生物或动物细胞的大规模培养。抗体可以在植物细胞培养或常规生长的植物中表达。在植物中的表达可以是整体性的、局限于亚细胞质体或局限于种子(胚乳)。参见例如美国专利申请公开号 No. 20030167531;美国专利号 No. 6,080,560 和 No. 6,512,162;以及 WO 0129242。几种源自植物的抗体已到达开发的高级阶段,包括临床试验(参见例如 Biorex, Pittsboro, NC)。

[0097] 杂交瘤技术

[0098] 本发明提供了产生对 CPAA 具有高度特异性和亲和性的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。本发明还涉及特征在于上述细节的杂交瘤细胞系的变体和突变体,其自发发生或者可使用已知的方法人为产生,并且其仍具有初始材料的特性,也就是说,其仍然能够产生本发明的抗体或其衍生物并将它们分泌到周围培养基中。

[0099] 本发明还包括产生所述杂交瘤细胞系的方法以及产生所述单克隆抗体的方法。杂交瘤细胞系的克隆和亚克隆应当理解为,通过重复克隆从初始克隆产生的杂交瘤并且其仍具有对本发明来说必要的初始克隆之特征。

[0100] 更特别地,可利用本发明的核酸、蛋白质或肽分子来开发与 CPAA 结合的单克隆或多克隆抗体。对于制备本发明的 CPAA 结合抗体来说,可以使用通过培养连续细胞系产生抗体分子的任何技术。例如,可以使用最初由 Kohler 和 Milstein 开发的杂交瘤技术(256Nature 495-497(1975))。还可参见美国专利 No. 4,376,110;Ausubel 等,1988;CURR. PROT. IMMUNOL. (Colligan 等编, Greene Pub. Assoc. & Wiley Interscience NY, 1992-1996)。

[0101] 产生高亲和性和/或高亲和力人抗体的另一优选途径涉及在体外对人天然脾细胞进行抗原引发(antigen priming),将所得的经体外抗原引发的脾细胞转移到免疫受损的供体(例如 SCID 小鼠)中,用抗原激发所述免疫受损的供体,从供体中分离分泌人抗体的 B 细胞(IgG 分泌),EBV 转化经分离的人抗体分泌细胞,如美国专利 No. 6,537,809 中所述。嵌合人源化以及完全人源化抗体

[0102] 本发明的抗体包括含有部分人抗体和部分小鼠抗体的嵌合抗体,其中来自人抗体的恒定区被克隆至来自小鼠轻链和重链的可变区。在一些情形中,保留了 70% 的人序列。人源化抗体是保留了可能 90% 人抗体框架并仅结合鼠互补决定区的嵌合抗体。本发明还包括完全人源化抗体。

[0103] 本文提供了与 16C3 表位(其包含在 CPAA 的氨基酸残基中)结合的重组鼠抗体或者嵌合鼠-人抗体或人-人抗体,并且可以基于本文的教导使用已知技术来产生,参见例如 Ausubel 等,1987、1992 和 1993;Sambrook 等,1989。例如,可根据 EP0239400,通过将所需 CDR 移植到人框架上对抗体进行人源化。

[0104] 编码本发明抗 CPAA 抗体的 DNA 可以是基因组 DNA 或 cDNA,其编码重链恒定区(H<sub>c</sub>)、重链可变区(H<sub>v</sub>)、轻链可变区(L<sub>v</sub>)和轻链恒定区(L<sub>c</sub>)的至少一种。针对使用染色体基因片段作为编码鼠 V 区抗原结合区段之 DNA 来源的一种方便的替代方案是使用用于构建嵌合免疫球蛋白基因的 cDNA。参见例如 Liu 等,84 P. N. A. S. USA 3439(1987); 139 J. Immunol. 3521(1987)。使用 cDNA 要求适于宿主细胞的基因表达元件与基因结合以实现

期望蛋白质的合成。使用 cDNA 序列比基因组序列（其含有内含子）的优势在于：cDNA 序列可以在缺乏适当的 RNA 剪接系统的细菌或其它宿主中表达。

[0105] 例如，可基于使用图 2-5 中所示的 DNA 序列，采用已知方法提供编码具有抗 CPAA 活性的鼠 V 和 C 区抗原结合区段的 cDNA。利用已知的方法，可使用与图 2 或图 3 所示 DNA 序列的一部分结合的探针从表达本文所述抗 CPAA 抗体、片段或区域的杂交瘤中分离 DNA。

[0106] 代表 CPAA 结合抗体轻链和重链的寡核苷酸示于图 2 和图 3 中，可用于筛选存在的同源基因以及用于克隆编码抗 CPAA 抗体可变区或恒定区的这些基因。此类探针通常与编码图 4 或图 5 中下划线所示氨基酸序列（其轻链或重链 CDR 区与 CPAA 的表位结合）的 DNA 序列（cDNA、基因组 DNA 或任何其它 DNA）结合。合成此类寡核苷酸的这些技术是公知的。参见例如 Wu 等，21Prog. Nucl. Acids Res. Molec. Biol. 101-41(1978)；Ausubel 等，1987，1993。

[0107] 在一种克隆编码抗 CPAA 可变区或恒定区之多肽的替代方式中，通过将 DNA 或 cDNA（来自能够表达抗 CPAA 抗体或者可变区或恒定区的细胞）克隆进表达载体中来制备表达载体文库。然后，从所述文库中筛选能够表达竞争性抑制抗 CPAA 抗体（如 A2 或 cA2）之结合的蛋白质并且具有能够编码肽（其具有与抗 CPAA 抗体或其片段相同的氨基酸序列）的核苷酸序列的成员。在这种实施方案中，从能够表达抗 CPAA 抗体或片段的细胞中提取并纯化 DNA（例如 cDNA）。将纯化的 cDNA 片段化（通过剪切、内切酶消化等）以产生 DNA 或 cDNA 片段的集合。然后，将该集合中的 DNA 或 cDNA 片段克隆进表达载体从而产生基因组文库的表达载体，其每一成员均包含唯一的克隆 DNA 或 cDNA 片段，例如在  $\lambda$  噬菌体文库中，表达在原核细胞（例如细菌）或真核细胞（例如哺乳动物、酵母、昆虫或真菌）中。参见例如 Ausubel，1987，1993；Harlow，1988；Colligan，1992-1996；Nyyssonen 等，11Bio/Technology591-95(1993)；Marks 等，11Bio/Technology 1145-49(1993)。

[0108] 编码这种抗 CPAA 抗体可变区或恒定区的核酸一经分离，则所述核酸可以连同编码其它恒定或可变的轻链或重链核酸在宿主细胞中一起适当表达，从而提供具有抑制活性的与 CPAA 结合的重组单克隆抗体。这种抗体可包含含有框架残基的鼠或人抗 CPAA 可变区，其具有决定抗原结合的互补决定残基。在一个实施方案中，由上述核酸编码的抗 CPAA 可变轻链或重链与表位的至少五个氨基酸结合。这种抗 CPAA 可变轻链或重链的氨基酸序列在图 4、图 5 和图 12 中用下划线表示。

[0109] 可通过已知的方法，从人胎肝文库获得编码本发明鼠抗体和嵌合抗体、片段和区域之恒定区（C）的人基因。人 C 区基因可以来自任意的人细胞，包括那些表达并产生人免疫球蛋白的细胞。人 C<sub>H</sub> 区可以来自任何已知的人 H 链类型或同种型，包括  $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$  或  $\epsilon$  及其亚型，如 G1、G2、G3 和 G4。由于 H 链同种型与抗体的多种效应功能有关，因此根据期望的效应功能（例如补体结合或抗体依赖的细胞介导的细胞毒性（ADCC）的活性）来指导 C<sub>H</sub> 区的选择。例如，C<sub>H</sub> 区源自  $\gamma$  1 (IgG1)、 $\gamma$  3 (IgG3)、 $\gamma$  4 (IgG4) 或  $\mu$  (IgM)。人 C<sub>L</sub> 区可以来自人 L 链同种型—— $\kappa$  或  $\lambda$ 。

[0110] 利用标准克隆技术，从人细胞获得编码人免疫球蛋白 C 区的基因（Sambrook 等，1989；Ausubel 等，1987，1993）。从已知的克隆中可容易地获得人 C 区基因，其中所述克隆含有代表了两类 L 链、五类 H 链及其亚类的基因。可通过设计嵌合 H 链基因（经过适当截短）来制备嵌合抗体片段，如 F(ab')<sub>2</sub> 和 Fab。例如，编码 F(ab')<sub>2</sub> 片段 H 链部分的嵌合



基因包含编码 H 链的 CH<sub>1</sub> 结构域和铰链区的 DNA 序列以及随后的翻译终止密码子,从而产生截短分子。

[0111] 通常,本发明的鼠、人或鼠和嵌合抗体、片段和区域如下产生:克隆编码 CPAA 特异性抗体 H 链和 L 链抗原结合区的 DNA 区段,并将这些 DNA 区段分别与编码 C<sub>H</sub> 和 C<sub>L</sub> 区的 DNA 区段连接,从而产生鼠、人或嵌合免疫球蛋白编码基因。

[0112] 因此,在一个实施方案中,产生了融合的嵌合基因,其包含编码至少非人源的抗原结合区的第一 DNA 区段(例如具有连接(J)区段的功能重排的 V 区),其与编码至少部分之人 C 区的第二 DNA 区段连接。

[0113] 因此,根据本发明编码抗体 V 和 C 区的 cDNA、产生嵌合抗体的方法包括多个步骤,概述如下:

[0114] 1. 从产生抗 CPAA 抗体的细胞系中以及从提供重链和轻链恒定区的可选其它抗体中分离信使 RNA (mRNA); 从中进行克隆和产生 cDNA;

[0115] 2. 从纯化的 mRNA 制备全长 cDNA 文库,从而 L 链和 H 链基因的合适 V 和 / 或 C 区基因区段可以:(i) 用合适的探针进行鉴定;(ii) 测序;以及 (iii) 使其与来自另一抗体的 C 或 V 基因区段相容以用于嵌合抗体;

[0116] 3. 通过将如上所述的克隆的特定 V 区基因区段与克隆的 C 区基因连接来构建完整的 H 或 L 链编码序列;

[0117] 4. 在选定的宿主(包括原核和真核细胞)中表达并产生 L 和 H 链,来提供鼠-鼠、人-鼠、人-人或人鼠抗体。

[0118] 所有免疫球蛋白 H 和 L 链基因及其所编码 mRNA 的共同特征是 J 区。H 链和 L 链的 J 区具有不同的序列,但是在各组中存在高度的序列同源性(大于 80%),尤其是在 C 区附近。在这种方法中利用该同源性,可使用 H 链和 L 链 J 区的一致序列来设计寡核苷酸用作引物向 J 区引入可用的限制性位点,以用于随后将 V 区区段与人 C 区区段连接。

[0119] 可通过定点突变修饰从人细胞制备的 C 区 cDNA 载体,从而将限制性位点置于人序列的相似位置处。例如,可以克隆完整的人 κ 链 C(C<sub>κ</sub>) 区和完整的人 γ-1C 区(C<sub>γ-1</sub>)。在这种情况下,基于基因组 C 区克隆作为 C 区载体来源的替代方法将不允许这些基因在细菌系统中表达,这是因为其中不存在除去间隔序列所需的酶。克隆的 V 区区段被切下并连接至 L 或 H 链 C 区载体。作为替代,可以通过引入终止密码子来修饰人 C<sub>γ-1</sub> 区,从而产生编码 Fab 分子之 H 链部分的基因序列。然后,将具有连接的 V 和 C 区的编码序列转染至合适的表达载体中用于在合适的宿主(原核或真核)中表达。

[0120] 如果连接形成连续可翻译的序列而未改变或干扰三联体读码框,则两段编码 DNA 序列被称为“有效连接”。如果连接导致基因表达元件具有适当的功能,从而导致编码序列的表达,则 DNA 编码序列与基因表达元件有效连接。

[0121] 表达载体包括质粒或其它载体。其中包括携带有功能完整的人 C<sub>H</sub> 或 C<sub>L</sub> 链序列的载体,其具有经改造的合适的限制性位点,从而任何具有合适粘性末端的 V<sub>H</sub> 或 V<sub>L</sub> 链序列可容易地插入其中。因此,含有人 C<sub>H</sub> 或 C<sub>L</sub> 链序列的载体作为在任何合适的宿主中表达任何期望的完整 H 或 L 链的中间体。

[0122] 嵌合抗体(例如鼠-人或人-人)通常由小鼠 H 和 L 链 V 区的天然染色体基因启动子驱动基因所合成;剪接通常发生在小鼠 J 区中剪接供体位点与人 C 区前的剪接受体

位点之间,并且也发生在人 C 区内的剪接区处;多聚腺苷酸化和转录终止发生在人编码区域下游的天然染色体位点。参见美国专利 No. 6, 835, 823。

[0123] 本发明还涵盖抗 CPAA 的“完全人源化抗体”。完全人源化抗体是含有人免疫球蛋白可变区和恒定区的分子。完全人源化抗体可潜在地用于治疗性用途,其中慢性和复发性疾病(例如自身免疫病)需要重复治疗。制备完全人抗体的一种方法通过将小鼠体液免疫系统“人源化”来实现,即通过将人免疫球蛋白(Ig)基因座引入小鼠(其中内源性 Ig 基因已被失活),从而得到能够产生人 Ig 的小鼠品系(Xenomice)。就物理结构和基因重排以及最终产生广泛免疫应答所需的表达过程而言,Ig 基因座是极为复杂的。抗体多样性主要由 Ig 基因座中存在的不同 V、D 和 J 基因的组合重排而产生。这些基因座还含有散置的调控元件,其控制抗体表达、等位排斥(allelic exclusion)、类型转换以及亲和性成熟。将未重排的人 Ig 转基因引入小鼠已证明,小鼠的重组机制与人基因是相容的。此外,可通过用抗原免疫 Xenomice 来获得分泌多种同种型的抗原特异性 hu-mAb 的杂交瘤。完全人源化抗体及其产生方法是本领域已知的。参见例如美国专利 No. 7, 276, 239 和 No. 6, 835, 823。

[0124] 本发明的一方面提供人源化抗体的产生,其根据本发明通过如下过程制备,所述过程包括在每条链得以表达的条件下维持宿主,所述宿主转化有编码人源化抗体轻链的第一表达载体以及编码人源化抗体重链的第二表达载体,并将如此表达的链组装而成的人源化抗体分离。所述第一和第二表达载体可以是同一载体。本发明还提供了:编码人源化抗体轻链或重链的 DNA 序列;引入所述 DNA 序列的表达载体;以及转化有所述表达载体的宿主。

[0125] 从本文提供的序列产生人源化抗体可以由本领域技术人员实施,而无需过度的实验。在一种方法中,使用四个一般性步骤来使单克隆抗体人源化,参见例如美国专利 No. 5, 585, 089、No. 6, 835, 823 和 No. 6, 824, 989。它们是:(1) 确定初始抗体轻链和重链可变结构域的核苷酸和预期氨基酸序列;(2) 设计人源化抗体,即决定在人源化方法中使用何种抗体框架区域;(3) 实际的人源化方法/技术;以及(4) 人源化抗体的转染和表达。

[0126] 涉及核苷酸和预期氨基酸序列,有两种一般性方法用于克隆给定抗体的重链和轻链可变结构域 cDNA:(a) 通过常规的 cDNA 文库,或(b) 通过聚合酶链式反应(PCR)。这两种方法都是公知的,参见例如美国专利申请公开 No. 20030166871。给出 cDNA 的核苷酸序列,将该信息翻译成抗体可变结构域的预期氨基酸序列是很简单的。在这种情形中,16C3 抗体的轻链和重链核苷酸序列分别如图 2 和图 3 所示。16C3 抗体的轻链和重链的预期氨基酸序列分别如图 4 和图 5 所示。

[0127] 就人源化抗体的设计而言,在决定人源化中使用何种人抗体序列时,要考虑几个因素。轻链和重链的人源化要独立考虑,但是各自的原则基本类似。这种选择过程基于如下原理:给定抗体的抗原特异性和亲和性主要是由可变区 CDR 的氨基酸序列决定的。可变结构域的框架残基对此没有或几乎没有直接贡献。框架区的主要功能是保持 CDR 以其适宜的空间取向来识别抗原。因此,如果人可变结构域框架与它们所来源的啮齿类可变结构域高度同源,则将啮齿类 CDR(如图 4 或图 5 中下划线所示的)替换为人可变结构域框架是极有可能导致维持其正确的空间取向。因此,可以选择与啮齿类可变结构域高度同源的人可变结构域。

[0128] 可如下选择合适的人抗体可变结构域序列:

[0129] 1. 使用计算机程序,检索所有可获得的蛋白质(以及DNA)数据库,找出那些与啮齿类抗体可变结构域同源性最高的人抗体可变结构域序列。合适程序的结果是与啮齿类抗体同源性最高的列表、与各序列的同源性百分比以及各序列与啮齿类序列的比对。针对重链和轻链可变结构域序列,此操作独立进行。如果只包括人免疫球蛋白序列,则上述分析更易于实现。

[0130] 2. 列出人抗体可变结构域序列,并比较同源性。主要地,针对CDR(除了重链CDR3以外,其变化很大)的长度进行比较。人重链以及 $\kappa$ 和 $\lambda$ 轻链分为不同的亚群;重链为3个亚群, $\kappa$ 链为4个亚群, $\lambda$ 链为6个亚群。各亚群内的CDR大小相似,但亚群之间则不同。通常有可能将啮齿类抗体CDR与人亚群之一匹配作为第一同源性近似。然后,将具有相似长度CDR的抗体进行氨基酸序列同源性比较,尤其在CDR内,然而也比较周围框架区内。同源性最高的人可变结构域被选为人源化的框架。

[0131] 实际的人源化方法和技术也在本领域普通技术人员掌握的范围内。因此,可以以那些CDR希望被重新改造的人DNA为起始,制备编码所需重新改造抗体的DNA序列。将含有所需CDR的啮齿类可变结构域氨基酸序列与所选定的人抗体可变结构域序列的氨基酸序列进行比较。将需要换为啮齿类中对应残基的人可变结构域中的残基进行标记,从而使可变区中并入啮齿类CDR。还可以有需要在人序列中替换、添加或缺失的残基。

[0132] 合成可用于突变人可变结构域框架以包含期望残基的寡核苷酸。这些寡核苷酸可采用任何方便的大小。由于可获得的特定合成仪的能力,通常仅在长度上受限。由寡核苷酸介导的体外突变方法是本领域公知的。

[0133] 作为替代,可使用美国专利No. 5, 858, 725中的重组聚合酶链式反应(PCR)方法来实现人源化。使用这种方法,CDR可以在人抗体框架区之间被剪接。一般地,美国专利No. 5, 858, 725的技术可使用包含两个人框架区(AB和CD及其之间部分)的模板来进行,其中CD要被替换为供体CDR。引物A和B用于扩增框架区CD。然而,引物B和C在5'端各自还含有额外的对应于所有或至少部分供体CDR序列的序列。引物B和C重叠的长度足以允许其5'端在允许进行PCR的条件下彼此进行退火。因此,所扩增区域AB和CD可通过重叠延伸来进行基因剪接,从而在单个反应中产生人源化产物。

[0134] 作为替代,可通过化学合成编码人源化免疫球蛋白或其片段的DNA实现人源化,其使用标准分子生物学技术对合成的基因进行扩增并将其亚克隆至合适的表达载体中。在这种情形中,化学合成并纯化具有重叠序列的多个有义和反义寡核苷酸,其涵盖人源化抗体基因的整个编码区。然后,将寡核苷酸混合在一起,从而使重叠的有义链寡核苷酸可以与其反义链伙伴退火,并且可以使用聚合酶链式反应将整个基因扩增至足够的量。然后,可使用常规改造的限制性酶将靶基因克隆至表达质粒中。

[0135] 根据本文所述的多种技术设计的人源化16C3抗体的几种轻链和重链序列如图6、图7和图12所示。更具体地,展示了五种不同的用于将鼠16C3抗体转化成人源化的、治疗上可用的抗体设计。所述设计基于已知的鼠和人抗体序列的结构信息。例如,针对图6和图7,“ven16C3”已用人框架序列进行“镶嵌”,“cdr16C3”已用人CDR氨基酸重新改造,“abb16C3”表示缩短的CDR嫁接,“sdr16C3”表示位点决定氨基酸改变,“fra16C3”表示通过使用多种人可变区“片段”的组合利用“Frankenstein”方法重新改造可变区。使用人种系IgG序列作为框架序列。

[0136] 此外,如以下实施例所述,还可进一步优化重组人源化抗体来降低潜在的免疫原性,同时在用于人的治疗中维持功能活性。在这方面,功能活性表示多肽能够表现出一种或多种与本发明 16C3 抗体有关的已知功能活性。这些功能活性包括生物活性以及结合 16C3 多肽之配体的能力。此外,多肽具有功能活性是指多肽表现出与本发明 16C3 多肽(包括成熟形式)活性相似但不必要一致的活性(其通过特定测定来测量),例如生物学测定、是否具有剂量依赖性。在存在剂量依赖性情形中,不需要与 16C3 多肽的一致,而是与本发明 16C3 多肽的给定活性剂量依赖性基本相似(即,与本发明的 16C3 多肽相比,候选多肽表现出更高的活性,或者活性不低于超过约 25 倍、约 10 倍或约 3 倍)。

[0137] 优化的人源化 16C3 抗体(命名为 H16C3-Abb\*) 包含图 12 中所示的氨基酸残基。注意到,抗体 CDR 中的某些氨基酸残基是从原始鼠 CDR 中存在的残基变化而来。不同的 CDR 被视为彼此的变体实例,具有功能等价性,也在本申请的范围之内。

[0138] 在重新改造抗体的突变反应之后,可将突变的 DNA 与编码轻链或重链恒定区的合适 DNA 连接,克隆至表达载体中,并转化到宿主细胞(例如哺乳动物细胞)中。这些步骤可按常规方式进行。因此,重新改造的抗体可以通过如下方法制备,所述方法包括:

[0139] (a) 制备第一可复制表达载体,其包含与编码至少 Ig 重链或轻链可变结构域的 DNA 序列有效连接的合适启动子,所述可变结构域包含来自人抗体的框架区和本发明人源化抗体所需的 CDR;

[0140] (b) 制备第二可复制表达载体,其包含分别与编码至少互补 Ig 轻链或重链可变结构域的 DNA 序列有效连接的合适启动子,

[0141] (c) 用所述第一制备载体或所述两种制备载体转化细胞系;以及

[0142] (d) 培养所述转化细胞系以产生所述改变的抗体。

[0143] 步骤(a)中的 DNA 序列可编码人抗体链的两种可变结构域和/或每种恒定结构域。可使用任何合适的重组表达系统制备所述人源化抗体。被转化用以产生改变抗体的细胞系可以是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系或永生化哺乳动物细胞系,其优选为淋巴来源的,例如骨髓瘤、杂交瘤、三源杂交瘤(trioma)或四源杂交瘤(quadroma)细胞系。所述细胞系还可包括正常淋巴细胞,例如已通过用病毒(例如 EB 病毒)转化使其永生化的 B 细胞。例如,所述永生化细胞系是骨髓瘤细胞系或其衍生物。

[0144] 用于表达本发明抗体的 CHO 细胞可以是二氢叶酸还原酶(dhfr)缺陷型细胞,因此其生长依赖于胸苷和次黄嘌呤,参见 Urlaub 等,77P. N. A. S. U. S. A. 4216-20(1980)。用编码所述抗体和 dhfr 的 DNA 转染亲代 dhfr CHO 细胞系,从而能够选出 dhfr 阳性表型的 CHO 细胞转染体。通过在缺少胸苷和次黄嘌呤的培养基上培养克隆来进行选择,这种缺少阻止未转染细胞的生长,而经转染细胞通过补救(resalvaging)叶酸通路从而绕过选择系统。通过所转染的目的 DNA 和编码 dhfr 的 DNA 的共整合,这些转染体通常表达低水平的目的 DNA。可通过使用氨甲蝶呤(MTX)进行扩增来提高编码抗体之 DNA 的表达水平。该药物是酶 dhfr 的直接抑制剂,其使得可以分离抗性克隆,所述克隆扩增其 dhfr 基因的拷贝数以使得足以在这些条件下存活。由于编码 dhfr 和抗体的 DNA 序列在原始转染体中是紧密连接的,因此通常有伴随的扩增,从而提高所需抗体的表达。

[0145] 另一用于 CHO 或骨髓瘤细胞的表达系统是谷氨酰胺合成酶(GS)扩增系统,描述于例如美国专利 No. 5,122,464 中。该系统包括用编码 GS 酶的 DNA 和编码所需抗体的 DNA 转

染细胞。然后,通过无谷氨酰胺的培养基中培养来选择细胞,并可因此假定其具有整合的编码 GS 的 DNA。随后,使用甲硫氨酸砒亚胺 (methionine sulphoximine, Msx) 对这些选出的克隆进行 GS 酶的抑制。为了存活,所述细胞将扩增编码 GS 的 DNA,同时伴随着扩增编码抗体的 DNA。

[0146] 尽管用于产生人源化抗体的细胞系可以是哺乳动物细胞系,然而也可替代使用任何其它合适的细胞系(例如细菌细胞系或酵母细胞系)。例如,在不需体内翻译后修饰的情形中(例如不需糖基化的情形中),估计可以使用源自 *E. coli* 的细菌株。对所获得的抗体进行功能性检验。如果功能性丧失,则有必要回到步骤(2)并改变抗体的框架。

[0147] 一经表达,本发明的完整抗体、其二聚体、单独的轻链和重链或其它免疫球蛋白形式可通过已知技术回收和纯化,所述技术例如免疫吸附或免疫亲和层析(层析方法例如 HPLC(高效液相层析)、硫酸铵沉淀、凝胶电泳或这些的任意组合。一般地,参见 Scopes, PROT. PURIF. (Springer-Verlag, NY, 1982)。优选至少约 90%~95% 同质性的基本纯的免疫球蛋白,以及具有 98%~99% 或更高同质性的免疫球蛋白,特别是对于药物用途来说。一经纯化(根据需要,部分纯化或直至同质),人源化抗体便可用于治疗性用途或用于开发和进行测定方法、免疫荧光染色等。一般地,参见卷 I&II Immunol. Meth. (Lefkovits&Pernis 编, Acad. Press, NY, 1979 和 1981)。

[0148] 噬菌体文库和替代性重组表达系统

[0149] 除了上述产生技术以外,还有体外系统(例如完全人抗体和抗体肽的噬菌体展示方法),目前已认识到人抗体在诊断学和治疗学方面的许多优势。

[0150] 本发明的重组抗体及其序列允许构建大量具有抗 PCAA 抗体结合活性的衍生物和配体结合分子。例如,可将 CDR 与抗体文库(例如 n-CoDeR 人 scFV 文库)重组,以产生高特异性的功能性抗体片段。参见 Moore, 426, Nature, 725-31 (2003)。

[0151] 还可根据基于单链 DNA 位点特异性切割的克隆方法来产生完全人抗体或其部分的文库,如美国专利申请公开 No. 20030232333 中所述。

[0152] 可通过本文所包括的 DNA 序列信息以及本发明提供的有关 PCAA 表位的知识构建的另一种配体结合分子包括构建 **ANTICALINS®** lipocalins, 其是一组广泛的小且强力的蛋白质,其通常参与化学敏感或不溶性化合物的生理转运或储存。几种天然 lipocalin 存在于人组织或体液中。尽管相互之间的序列同源性低,但是 lipocalin 在一端共有结构保守的支持四个环的  $\beta$ -桶,其形成结合袋(binding pocket)的入口。所述环在各 lipocalin 之间表现出很大的构象差异,从而产生多样的天然配体特异性。这种蛋白质结构与免疫球蛋白相似,其高度可变的环位于刚性框架的顶部。与抗体或某些抗体片段不同的是, lipocalin 由具有 160~180 个氨基酸残基的单一多肽链组成,仅比单个免疫球蛋白结构域略大一些。构成结合袋的四环集合显示出结构可塑性,并耐受多种侧链。因此,可以重新改造结合位点从而以高亲性和特异性识别不同形状的预定靶分子。已对 **ANTICALINS®** lipocalins 进行改造,使其识别半抗原样化合物、肽和靶蛋白质,例如细胞表面受体的细胞外结构域。也已成功制备带有酶的融合蛋白以及双特异性结合蛋白(所谓 **DUOCALINS®** 双特异性结合蛋白, Pieris AG, Freising-Weihenstephan, Germany)。已进行临床前实验。参见例如 **Korndörfer** 等, 330J. Mol. Biol. 385-96 (2003)。

[0153] 另一适用于本文所述本发明的抗体类型包括骆驼 (camilid) 免疫球蛋白, 其具有功能性重链但缺少轻链。这些抗体组装自专用的 V 和 C $\gamma$  基因。已使用噬菌体展示技术对其进行克隆以及调整, 以产生具有内在高稳定性的抗原特异性单结构域抗体片段。美国专利申请公开 No. 20030088074。

[0154] 另一种相关的衍生物利用新技术提供了细菌产生的抗体片段, 其可以将抗原和抗体效应物 (Fc 区分子) 进行交联, 称为 PEPBODIES™ 抗体片段。参见美国专利申请公开 No. 20040101905。因此, 将包含抗 PCAA 位点抗原结合位点的结合分子与表现出 Fc 区相关效应物之一或多种功能的肽进行遗传融合, 并提供例如与细胞受体相互作用以及补体活化等功能。

[0155] 来自鲨鱼的新型抗原受体 (IgNAR) 分子也可视为“衍生的”抗体分子。所述 NAR 是两条蛋白质链经二硫键结合形成的二聚体, 各链均含有一个可变结构域和五个恒定结构域, 并发挥抗体功能。Nuttall 等, 270Eur. J. Biochem., 3543-54 (2003)。本发明 PCAA 结合抗体的序列可以构建到 NAR 可变区中, 以产生并入合成 CDR 区的体外文库。这样得到单个结构域结合试剂。

[0156] 癌细胞生物学中的一个最新进展涉及发现可表现出癌细胞标志物的祖细胞系。例如, 已鉴定了人胰腺上皮祖细胞, 并在培养物中培养。这些细胞可随后用于得到可用于开发单克隆抗体等的抗原。美国专利 No. 6, 436, 704。因此, 所述 PCAA 结合抗体可用于鉴定祖细胞。这些祖细胞可作为施用于异源受者 (例如小鼠) 的免疫原, 用于衍生出 PCAA 结合抗体的其它谱系。

[0157] 总之, 本文提供的寡核苷酸和氨基酸序列能够实现具有 PCAA 结合活性的多种可能分子, 本发明的范围不限于获得那些分子的方法。抗体衍生物

[0158] 抗体的“衍生物”包含通常不是蛋白质之部分的额外化学部分。本发明的范围内包括蛋白质的共价修饰。可以通过使抗体的靶向氨基酸残基与有机衍生化试剂 (其能够与选定的侧链或末端残基反应) 反应将此类修饰引入分子中。例如, 本领域公知的使用双功能试剂进行衍生化可用于将抗体或片段与水不溶性支持基质或其它大分子载体交联。

[0159] 衍生物还包括放射性标记的单克隆抗体, 其标记有例如放射性碘 (<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I)、碳 (<sup>14</sup>C)、硫 (<sup>35</sup>S)、铟 (<sup>111</sup>In)、氡 (<sup>3</sup>H) 等; 带有生物素或亲和素的单克隆抗体缀合物, 带有酶 (例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、葡糖淀粉酶、羧酸酐酶、乙酰胆碱酯酶、溶菌酶、苹果酸脱氢酶或葡萄糖-6-磷酸脱氢酶) 的缀合物; 以及带有生物发光剂 (如萤光素酶)、化学发光剂 (如吖啶酯) 或荧光剂 (如藻胆蛋白) 的单克隆抗体缀合物。本发明抗体衍生物的一个实例是抗体-小分子药物缀合物, 例如抗体-美登醇 (maytansinoid) 缀合物, 其表现出细胞毒活性。参见美国专利申请公开 No. 20040039176。临床前评估显示, 该缀合物作为肿瘤活化的前药在异种移植模型中表现出强效抗肿瘤活性。其它细胞毒性抗体衍生物在下文中讨论。

[0160] 本发明另一种衍生双功能抗体是双特异性抗体, 通过将识别两种不同抗原基团的两个单独抗体的部分结合而产生。这可以通过交联或重组技术来实现。此外, 可以向抗体或其部分中加入延长体内半衰期的部分 (例如通过延长从血流中清除的时间来实现)。此类技术包括例如添加 PEG 部分 (也称为聚乙二醇化), 并且是本领域公知的。参见美国专利申请公开 No. 20030031671。

**[0161] 抗独特型抗体**

**[0162]** 除了单克隆抗体或嵌合抗 CPAA 抗体以外,本发明还涉及特异性针对本发明抗 CPAA 抗体的抗独特型(抗-Id)抗体。抗独特型抗体是识别通常与另一种抗体的抗原结合区有关之独特决定簇的抗体。特异性针对 CPAA 的抗体称作独特型或 Id 抗体。可通过用独特型抗体或其抗原结合区免疫与独特型抗体来源相同之物种和基因型(例如小鼠品系)的动物,来制备抗独特型抗体。经免疫的动物会识别并响应于免疫抗体的独特型决定簇,从而产生抗独特型抗体。所述抗独特型抗体还可用作“免疫原”在另一种动物中诱导免疫应答,产生所谓的“抗-抗独特型抗体”。所述抗-抗独特型抗体可以与诱导抗独特型抗体的原始抗体在表位上一致。因此,通过使用针对 mAb 独特型决定簇的抗体,有可能鉴定表达相同特异性之抗体的其它克隆。

**[0163]** 因此,根据本发明产生的针对 CPAA 的单克隆抗体可用于在合适的动物(例如 BALB/c 小鼠)中诱导抗独特型抗体。来自这种免疫小鼠的脾细胞可用于产生分泌抗独特型 mAb 的抗独特型杂交瘤。此外,抗独特型 mAb 可与载体(例如匙孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH))缀合,并用于免疫另外的 BALB/c 小鼠。来自这些小鼠的血清会含有具有特异性针对 CPAA 表位之原始 mAb 的结合特性的抗-抗-独特型抗体。

**[0164] 独特型,抗独特型**

**[0165]** 此外,抗 CPAA 抗体、其类似物、部分、片段、肽或其衍生物可用于在合适的动物(如 BALB/c 小鼠)中诱导抗独特型抗体。来自这种免疫小鼠的脾细胞可用于产生分泌抗独特型 mAb 的抗独特型杂交瘤。此外,抗独特型抗体可与载体(例如匙孔血蓝蛋白(KLH))偶联,并用于免疫另外的 BALB/c 小鼠。来自这些小鼠的血清会含有具有特异性针对 CPAA 之原始 mAb 的结合特性的抗-抗-独特型抗体、或其类似物、片段和衍生物。所述抗独特型抗体因而具有结构上类似于所评价之表位的自身独特型表位或“独特位(idiotope)”。

**[0166]** 抗独特型(抗 Id)抗体是识别通常与抗体之抗原结合位点有关的独特决定簇的抗体。可通过用 mAb(制备抗独特型抗体所针对的 mAb)免疫与所述 mAb 来源相同物种和基因型(例如小鼠品系)的动物来制备抗独特型抗体。经免疫的动物通过产生针对这些独特型决定簇的抗体(抗独特型抗体)来识别并响应于免疫抗体的独特型决定簇。参见例如美国专利 No. 4,699,880 和 No. 6,835,823。所述抗独特型抗体还可用作“免疫原”在另一种动物中诱导免疫应答,产生所谓的抗-抗独特型抗体。所述抗-抗独特型抗体可以与诱导抗独特型抗体的原始 mAb 在表位上一致。因此,通过使用针对 mAb 独特型决定簇的抗体,有可能鉴定表达相同特异性之抗体的其它克隆。

**[0167] 抗 CPAA 抗体和抗 CPAA 肽的结构类似物**

**[0168]** 基于本文的教导和指导,通过已知的方法步骤提供本发明的抗 CPAA 抗体和肽的结构类似物。

**[0169]** 对蛋白质三维结构的认识对于理解它们如何发挥作用是重要的。目前在蛋白质结构数据库中可获得数百种蛋白质的三维结构(相比而言,序列数据库中已有数千种已知蛋白质序列)。对这些结构的分析表明,它们属于可识别的基序类别。因此,基于蛋白质与已知结构的相关蛋白的同源性,有可能建立蛋白质的三维结构模型。还已知具有相对低同源性的两种蛋白质可具有非常相似的三维结构或基序的许多实例。

**[0170]** 近年来,通过核磁共振(NMR)已有可能确定高达 15kDa 的蛋白质的三维结构。

该技术需要纯蛋白质浓缩溶液：不需要结晶或同晶型衍生物。通过这种方法已经确定了多种蛋白质的结构。NMR 结构测定的细节是本领域公知的。参见例如 Wuthrich, NMR OF PROTEINS&NUCLEIC ACIDS(Wiley, N. Y., 1986) ;Wuthrich, 243Science 45-50(1989) ; Clore 等, 24Critical Rev. Biochem. Molec. Biol. 479-564(1989) ; Cooke 等, 8 Bioassays 52-56(1988)。

[0171] 在应用该方法中, 收集针对本发明抗 CPAA 抗体和 / 或抗 CPAA 肽的各种  $^1\text{H}$  NMR 2D 数据集。有两种主要类型。一种类型是 COSY(Correlated Spectroscopy, 相关光谱), 其鉴定通过化学键连接的质子共振。这些谱提供了有关通过 3 个或更少共价键连接的质子的信息。NOESY(nuclear Overhauser enhancement spectroscopy, 核 Overhauser 增强光谱) 鉴定在空间中接近的质子(少于 0.5nm)。完整的自旋系统判定之后, 通过 NOESY 确定二级结构。肽一级结构中相邻的残基之间以及相距小于 0.5nm 的质子可发现交叉的峰(核 Overhauser 效应(nuclear Overhauser effect) 或 NOE)。从连续 NOE 收集的数据结合酰胺质子偶合常数以及临近二级结构的非相邻氨基酸的 NOE, 用于表征肽的二级结构。除了预测二级结构以外, NOE 还指出质子在一级氨基酸序列和二级结构的空间中的距离。考虑所有数据之后, 通过“最佳拟合(best-fit)”外推法来确定三级结构预测。

[0172] 首先利用“通过键连接(through-bond connectivity)”来确定氨基酸的类型。之后, 利用对邻近残基的“通过空间连接(through-space connectivity)”连同已知的氨基酸序列来确定特定氨基酸。随后将结构信息列表显示, 主要分为三种: NOE 确定空间中临近的质子对, 偶合常数给出有关二面角的信息, 缓慢交换的酰胺质子给出有关氢键位置的信息。利用距离几何计算类型以及随后用限制性分子动力学进行细化, 将限制性(restraint)用于计算结构。这些计算机程序的结果是与实验数据相符的一群结构(即, 成对设定 < 0.5nm 距离限制)。结构越好地用数据定义, 则结构群可越好地进行叠加(即, 结构解析越好)。在使用 NMR 较好确定的结构中, 可以确定出与晶体学获得的结构中同样清晰的大多数骨架(即, 酰胺、 $\text{C}\alpha$  和羰基原子)和那些埋在分子核心中的氨基酸侧链的位置。然而, 暴露于表面上的氨基酸残基的侧链常常得不到精确确定。这可能反映出这些表面残基更易于移动并且可能不具有固定的位置。(在晶体结构中, 这可视为弥散的电子密度(diffuse electron density))。

[0173] 因此, 根据本发明, 将使用 NMR 光谱数据与计算机建模相结合, 基于对拓扑学(topography) 的结构认识得到抗 CPAA 抗体和肽的至少一部分的结构类似物。利用这种信息, 本领域普通技术人员将了解如何获得抗 CPAA 抗体或肽的结构类似物, 例如通过合理的氨基酸替换使得产生肽来实现, 其中根据期望的分子治疗或诊断用途的要求(例如获得更高的 CPAA 结合特异性)来调节 CPAA 的结合亲和性或亲合力。

[0174] 作为替代, 具有适合用作抗 CPAA 治疗和诊断之结构和化学特征的化合物提供了具有选择性 CPAA 亲和性的结构类似物。使用如 **MacroModel®** (**Schrödinger**, LLC, NY)、**Insight®** II 和 **Discover®** (Accelrys Software Inc., Burlington, MA) 的程序, 对 CPAA 结合化合物(如 CPAA 受体、抗 CPAA 抗体或其它 CPAA 结合分子)的分子建模研究提供了本发明抗 CPAA 抗体和 / 或肽的这种空间要求和取向。因此, 本发明的这种结构类似物提供了选择性的定性且定量的体外、原位和 / 或体内抗 CPAA 活性。

[0175] 诊断应用



[0176] 本发明还提供了上述抗 CPAA 抗体和肽用于在已知或疑似患有胰腺癌或结肠癌的患者中检测 CPAA 的诊断方法。在本发明的另一方面中,所述抗体可以在形态学正常的细胞中检测分子标志物来提供无疾病个体的早期检测筛查。

[0177] 本发明的抗 CPAA 抗体和 / 或肽可用于免疫测定,其中在样品中检测或定量 CPAA 或抗 CPAA 抗体。针对 CPAA 的免疫测定通常包括在经可检测标记的高亲和性(或高亲和力)的本发明抗 CPAA 抗体或多肽(能够选择性结合 CPAA)存在下孵育临床样品或生物样品,然后检测样品中所结合的经标记肽或抗体。各种临床测定方法是本领域公知的。参见例如 IMMUNOASSAYS FOR THE 80'S(Voller 等编,Univ. Park,1981)。这样的样品包括组织活检样品、血液、血清和粪便样品、或者通过灌肠、结肠镜或口服泻药溶液从结直肠道收集的液体,随后进行如下所述的 ELISA 分析。

[0178] 因此,抗 CPAA 抗体或多肽可固定至硝酸纤维素或其它能够固定细胞、细胞颗粒或可溶性蛋白的固体支持物。然后,可以用合适的缓冲液清洗所述支持物,之后用经可检测标记的 CPAA 特异性肽或抗体进行处理。然后可以用缓冲液再清洗固相支持物一次,以除去未结合的肽或抗体。然后,可通过已知的方法步骤检测固体支持物上所结合标记的量。

[0179] “固相支持物”或“载体”是指任何能够与肽、抗原或抗体结合的支持物。公知的支持物或载体包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚偏氟乙烯(PVDF)、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和改性的纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁石。为了本发明的目的,所述载体的性质可以是在一定程度上可溶的或者不溶性的。支持材料可以具有实际上任何可能的结构构型,只要所偶联的分子能够结合 CPAA 或抗 CPAA 抗体即可。因此,支持物的构型可以为球形(如在珠中)或圆柱形(如在试管的内表面或柱的外表面中)。作为替代,所述表面可以是平的,例如薄板、培养皿、测试条等。例如,支持物可包括聚苯乙烯珠。本领域技术人员会知晓用于结合抗体、肽或抗原的许多其它合适的载体,或者可通过常规实验进行确定。

[0180] 公知的方法步骤可确定给定量的抗 CPAA 肽和 / 或抗体的结合活性。本领域技术人员可通过常规实验来确定可操作性的和最佳的测定条件。

[0181] 通过与用于酶免疫测定(EIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)的酶连接,可实现对 CPAA 特异性肽和 / 或抗体的可检测标记。所连接的酶与暴露的底物发生反应生成可检测的化学部分,所述检测可通过例如分光光度法、荧光光度法或可视手段来实现。可用于对本发明 CPAA 特异性抗体进行可检测标记的酶包括但不限于:苹果酸脱氢酶、金黄色葡萄球菌核酸酶、 $\delta$ -5-类固醇异构酶、酵母醇脱氢酶、 $\alpha$ -磷酸甘油脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。

[0182] 通过对 CPAA 特异性抗体进行放射性标记,有可能通过使用放射免疫测定(RIA)来检测 CPAA。参见 Work 等,LAB. TECHNIQUES&BIOCHEM. IN MOLEC. BIO. (No. Holland Pub. Co., NY,1978)。可通过例如使用伽玛计数器或闪烁计数器等手段或者通过放射自显影来检测放射性同位素。特别适用于本发明目的的同位素包括  $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$  和  $^{125}\text{I}$ 。

[0183] 还可用荧光化合物来标记 CPAA 特异性抗体。当经荧光标记的抗体暴露于适当波长的光时,由于发出荧光,因此可检测其存在。最常用的荧光标记化合物包括异硫氰酸酯、罗丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二醛和荧光胺。

[0184] 还可使用发荧光的金属(例如  $^{125}\text{Eu}$  或镧系的其它金属)来可检测标记 CPAA 特异

性抗体。可使用二乙烯三胺五乙酸 (DTPA) 或乙二胺四乙酸 (EDTA) 等金属螯合基团将金属附着至 CPAA 特异性抗体。

[0185] 还可通过与化学发光化合物偶联来对 CPAA 特异性抗体进行可检测标记。然后,通过检测在化学反应过程中产生的发光的存在来测定经化学发光标记的抗体的存在。可用的化学发光标记化合物的实例有鲁米诺 (luminol)、异鲁米诺 (isoluminol)、theromatic 吡啶酯、咪唑、吡啶盐和草酸酯。

[0186] 同样地,可使用生物发光化合物来标记本发明的 CPAA 特异性抗体、部分、片段、多肽或衍生物。生物发光是在生物系统中发现的一类化学发光,其中催化性蛋白质提高化学发光反应的效率。通过检测发光的存在来测定生物发光蛋白质的存在。用于标记的重要生物发光化合物有萤光素、萤光素酶和水母发光蛋白 (aequorin)。

[0187] 可通过闪烁计数器(例如,如果可检测标记是放射性伽马发射体)或通过荧光光度计(例如,如果标记是荧光材料)实现对 CPAA 特异性抗体、部分、片段、多肽或衍生物的检测。在酶标记的情形中,可通过采用酶之底物的比色法来实现检测。也可通过对底物的酶促反应程度与类似制备的标准品进行视觉比较来实现检测。

[0188] 针对本发明的目的,通过上述测定检测的 CPAA 可存在于生物样品中。可使用含有 CPAA 的任何样品。例如,所述样品为生物液体,如血液、血清、淋巴液、尿、粪便、炎性渗出物、脑脊液、羊水、组织提取物或匀浆等。然而,本发明不仅限于使用这些样品的测定,本领域普通技术人员根据本说明书可以确定允许使用其它样品的适当条件。

[0189] 通过从患者取出组织样本,并提供针对该样本的本发明经标记抗体的组合,可实现原位检测。可通过向生物样品施用或覆盖经标记抗体(或部分)来提供所述抗体(或其部分)。通过使用这样的方法,不仅可以测定 CPAA 的存在,还能测定 CPAA 在所检测组织中的分布。使用本发明,本领域普通技术人员会容易地想到,可对多种组织学方法(如染色方法)中的任意种进行改造从而实现这样的原位检测。

[0190] 可以对本发明的抗体、片段或衍生物进行调整以用于免疫测定,也称为“双位点”或“夹心”测定。在一个典型的免疫测定中,将一定量的未标记抗体(或抗体片段)与所测试液体中不溶的固体支持物结合,加入一定量经可检测标记的可溶性抗体以允许检测和/或定量在固相抗体、抗原和经标记抗体之间形成的三元复合物。

[0191] 典型地,免疫测定包括“正向”测定,其中首先将结合至固相的抗体与待测试样品接触,通过形成固相抗体-CPAA 二元复合物将 CPAA 从样品中提取出。在适当的孵育期后,清洗固体支持物以除去残留的液体样品(如果存在的话,包括未反应的 CPAA),然后与含有已知量标记抗体(其作为“报告分子”)的溶液接触。再次孵育使标记抗体与通过未标记抗体结合至固体支持物的 CPAA 形成复合物,再次清洗固体支持物以除去未反应的标记抗体。这种正向夹心测定可以是简单的“有/无”测定以确定 CPAA 是否存在,或者可通过对标记抗体的测量值与含有已知量 CPAA 的标准样品进行比较来实现定量测定。这种“双位点”或“夹心”测定描述于 Wide, RADIOIMMUNE ASSAY METHODS, 199-206 (Kirkham 编, Livingstone, Edinburgh, 1970) 中。

[0192] 也可用于 CPAA 的其它类型“夹心”测定即所谓的“同步”和“反向”测定。同步测定包括单个孵育步骤,其中将结合至固体支持物的抗体和标记抗体一起加入待测样品中。孵育完成后,清洗固体支持物以除去残留的液体样品和未形成复合体的标记抗体。然后,如

常规的“正向”夹心测定中所述测定与固体支持物结合的标记抗体的存在。

[0193] 在“反向”测定中,采用逐步加入,首先向液体样品中加入标记抗体溶液,随后在适当的孵育期后加入结合至固体支持物的未标记抗体。再次孵育后,以常规方式清洗固体支持物以除去残留的所测试样品和未反应的标记抗体溶液。然后,如“同步”和“正向”测定中所述测定与固体支持物结合的标记抗体。在一个实施方案中,可使用特异性针对单独表位的本发明抗体的组合构建灵敏的三位点免疫放射测定。

[0194] 此外,示例的抗体可用于 T- 细胞分型、用于分离具有 CPAA 的特异性细胞或片段、用于疫苗制备等。所述抗体可用于定量或定性检测样品中的 CPAA 或检测表达 CPAA 之细胞的存在。这可以通过免疫荧光技术来实现,其中采用了荧光标记的抗体(如下)连同荧光显微镜、流式细胞检测或荧光检测。为了诊断目的,所述抗体可以是标记的或未标记的。未标记抗体可以与其它与人源化抗体反应的标记抗体(第二抗体,例如特异性针对人免疫球蛋白恒定区的抗体)组合使用。作为替代,抗体可以直接进行标记。可使用各种标记,如放射性核素、氟、酶、酶底物、酶辅因子、酶抑制剂、配体(特别是半抗原)等。众多类型的免疫分析(如前面讨论的)是可获得的并且是本领域技术人员公知的。

[0195] 可用于本发明的抗体可用于组织学应用,如在免疫荧光或免疫电镜中,用于原位检测本发明的 CPAA。可通过从患者取出组织样本,并向该样本提供本发明的标记抗体来实现原位检测。可通过向生物样品施用或覆盖标记抗体(或片段)来提供所述抗体(或片段)。通过使用这样的方法,不仅可以确定 CPAA 的存在,还可确定 CPAA 在所检测组织中的分布。使用本发明,普通技术人员会容易想到可以对多种组织学方法(如染色方法)的任意种进行改造从而实现这种原位检测。

[0196] 重要的是,本发明的抗体可有助于诊断某些类型结直肠癌和胰腺癌的侵袭性。更具体地,本发明的抗体可以鉴定患有进展缓慢癌症(与进展较快的侵袭性癌症相比,其生长多年)的患者中存在的 CPAA。因此,本发明的抗体可提供重要的免疫组化工具。

[0197] 本发明的抗体可用于抗体阵列,非常适于测量包括翻译后修饰的基因表达谱,还可用于检测较小分子(如肽类激素和碳水化合物)。最近已采用了多种方法来确定抗体阵列的适宜性和效果。在一些情形中,已使用噬菌体展示的抗体制备阵列,并通过 SELDI(surface-enhanced laser desorption/ionization,表面增强激光解吸/电离)进行检测和分析,或以基于滤膜的酶联免疫吸附测定(ELISA)的高通量形式。检测系统的其它实例包括荧光标签和纳米电极,对于较小的阵列来说,可使用表面等离子体共振和 MALDI-TOF(基质辅助激光解吸电离-飞行时间)质谱。也可通过首先产生结合抗原的阵列,随后抗体捕获并用亲和配体(如与检测探针结合的蛋白 L 或蛋白 A)检测,进行蛋白质组分析。

[0198] 第三种方法涉及将含有抗体基因的细菌以高密度网格化涂布于滤膜上,随后与含有附着检测探针的亲亲和配体或抗原的另一滤膜相互作用,如 ELISA。这种方法不需要对液体进行处理,可以平行筛选抗多种抗原的上万抗体来鉴定差异表达的最终蛋白质。最后一种方法涉及使用组合化学在芯片上直接合成抗体的可能性。即便结合抗原的抗体结构域最少由 120 个氨基酸组成,但是,现有的技术在某种程度上受限于合成,除非使用预先合成的多肽构建模块来产生抗体框架并随后添加个别氨基酸。

[0199] 本发明还提供了确定抗 CPAA 活性的筛选方法。具体来说,如实施例 6 会进一步

描述地,本发明的抗体与抗体依赖的细胞毒性 (ADCC) 活性有关。本发明涵盖了可选自如下的抗 CPAA 化合物;在体外、原位或体内引发含 CPAA 之细胞的死亡的抗体或其片段或部分、肽、肽模拟化合物 (peptido mimetic compound) 或有机模拟化合物 (organomimetic compound)。可用于确定抗 CPAA 化合物的 ADCC 活性的筛选方法可包括体外或体内测定。这样的体外测定可包括 CPAA 细胞毒性测定,例如放射免疫测定,其通过接触 CPAA (例如分离或重组形式的黑猩猩或人 CPAA) 来确定细胞死亡的减少,其中同时存在 CPAA 中和化合物降低了细胞死亡程度或细胞死亡率。

#### [0200] 诊断试剂盒

[0201] 还可以提供试剂盒与目标抗体一起用于保护或检测细胞活性或者选定抗原的存在。因此,本发明的抗体通常可以容器中的冻干形式,单独或连同其它期望细胞类型的特异性抗体一起提供。所述抗体可以与标记物或毒素缀合或不缀合,并与缓冲剂(例如 Tris、磷酸盐、碳酸盐等)、稳定剂、杀生物剂、惰性蛋白质(例如血清白蛋白等)一起包含在试剂盒中。一般地,这些材料以基于活性抗体量的低于 5% wt 存在,基于抗体浓度,其通常以总量至少约 0.001% wt 存在。通常,需要包含惰性补充剂或赋形剂来稀释活性成分,其中赋形剂可以全部组合物的约 1%~99% wt 存在。当测定中使用能够与第一抗体结合的第二抗体时,通常将在分开的容器中存在。第二抗体通常与标记物缀合,并以与上述抗体配制类似的方式进行配制。试剂盒通常还包含一套使用说明。

#### [0202] 药物应用

[0203] 本发明的抗 CPAA 抗体或肽可用于例如癌及相关病症的治疗。更具体地,本发明还提供了包含药物可接受载体或稀释剂以及作为活性成分的本发明抗体或肽的药物组合物。免疫毒素的递送组分是本发明的人源化抗体。还涵盖了完整的免疫球蛋白或其结合片段,如 Fab。通常,免疫毒素中的抗体是人 IgA、IgM 或 IgG 同种型,但根据需要可使用其它的哺乳动物恒定区。所述组合物还可包含本发明的免疫毒素。本发明的人源化抗体、免疫毒素及其药物组合物可用于肠胃外施用,例如皮下,肌内或静脉内施用。

[0204] 本发明的抗 CPAA 抗体和/或肽可作为单独的治疗剂施用或者与其它治疗剂组合施用。它们可以单独施用,但通常与药物载体(其基于所选施用途径和标准制药实践来选择)一起施用。

[0205] 对于肠胃外施用来说,抗 CPAA 抗体或肽可与药物可接受的胃肠外载体一起配置成溶液、混悬液、乳液或冻干粉末。例如,所述载体可以是抗体或其混合物溶于可接受载体(carrier)(例如水性载体,如水、盐水、林格氏溶液、葡聚糖溶液,或 5% 人血清白蛋白、0.4% 盐水、0.3% 甘氨酸等)的溶液。也可使用脂质体和非水性载体(例如不挥发性油)。这些溶液是无菌的,并且通常不含颗粒物质。可通过常规的公知灭菌技术对这些组合物灭菌。所述组合物可包含接近生理条件所需的药物可接受辅助物质,如 pH 调节剂和缓冲剂、毒性调节剂等,例如醋酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些制剂中的抗体浓度可以有很大的不同,例如按重量从低于约 0.5%、通常为或至少约 1% 直高达 15% 或 20%,主要基于液体体积、粘度等以及所选的特定施用模式来选择。所述载体或冻干粉末可包含维持等渗性(例如,氯化钠、甘露醇)和化学稳定性(例如,缓冲剂和防腐剂)的添加剂。通过常用的技术对制剂进行灭菌。

[0206] 因此,肌内注射的典型药物组合物的构成可含有 1ml 无菌缓冲水和 50mg 抗体。

静脉内输注的典型组合物的构成可含有 250ml 无菌林格氏液和 150mg 抗体。制备肠胃外可施用组合物的实际方法是已知的或者对本领域技术人员来说是显而易见的, 详见例如 REMINGTON' SPHARMA. SCI. (第 15 版, Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980)。

[0207] 本发明的抗体可冻干用于储存, 并在使用前用合适的载体重溶。该技术已显示出对常规免疫球蛋白有效。可采用任何合适的冻干和重溶技术。本领域技术人员应当理解, 冻干和重溶可导致不同程度的抗体活性损失(例如, 就常规的免疫球蛋白而言, IgM 抗体往往比 IgG 抗体具有更大的活性损失), 并且使用水平可能需要进行调整以得到补偿。

[0208] 可施用含有本发明人样抗体或其混合物的组合物用于预防已有疾病的复发和/或治疗。在最新版本 of REMINGTON' SPHARMACEUTICAL SCIENCES (本领域的标准参考教科书) 中描述了合适的药物载体。例如, 通过将 1.5% (重量) 的活性成分溶于 0.9% 氯化钠溶液中来制备适用于通过注射施用的肠胃外组合物。通过其针对表面结合有 CPAA 之细胞介导抗体依赖的细胞毒性 (ADCC) 和/或凋亡和/或补体依赖的细胞毒性 (CDC) 的能力, 本发明的抗 CPAA 肽和/或抗体可以经调整用于治疗功效。针对这些活性来说, 可以使用内源性来源或外源性来源的效应细胞(对于 ADCC 来说)或补体组分(对于 CDC 来说)。

[0209] 在治疗应用中, 以足以治愈或至少部分阻抑或减轻疾病及其并发症的量, 向已患有疾病的患者施用组合物。足以实现此目的的量定义为“治疗有效量”。该用途的有效量取决于恶性严重程度和患者自身免疫系统的总体状况, 但通常从每剂量约 1mg 至约 200mg 抗体, 更常使用每名患者 5mg ~ 25mg 的剂量。须记住, 本发明的材料可一般性地用于严重的疾病状态, 常常是危及生命或可能危及生命的情形。在这种情况下, 考虑到由本发明的人样抗体实现无关物质最小化以及降低“外源物质”排斥的可能性, 通过治疗医师施用大大过量的这些抗体是可能的并且可能是所期望的。

[0210] 取决于已知的因素(例如特定试剂的药代动力学特性以及其施用模式和途径; 接受者的年龄、健康状况和重量; 症状的性质和程度、并行治疗的种类、治疗频率和预期效果), 所施用的剂量显然不同。通常每天、每周或每两周的活性成分剂量可以为约 100mg/m<sup>2</sup> 至 250mg/m<sup>2</sup> (体重), 其递送 4 ~ 6 小时。

[0211] 作为一个非限制性实例, 治疗 CPAA 相关病症, 可向人或动物提供每天、每周或每两周剂量的本发明抗 CPAA 肽、单克隆嵌合和/或鼠抗体, 每天、每周或每两周的剂量范围从 0.1mg/kg 至 100mg/kg。

[0212] 根据本发明, 用于人治疗用途的抗体实例是具有强的体内抗 CPAA 活性的高亲和性(抑或高亲合力)鼠和嵌合抗体以及片段、区域和衍生物。

[0213] 适用于内部施用的剂量形式(组合物)通常含有每单位约 0.1mg 至约 500mg 的活性成分。在这些药物组合物中, 活性成分通常以基于组合物总重量的约 0.5% ~ 95% (按重量)的量存在。

[0214] 可采用治疗医师选择的剂量水平和模式进行组合物的单次或多次施用。在任何情况下, 药物制剂应提供足以有效治疗患者的量的本发明抗体。

[0215] 所述抗体还可以用作与化疗剂或免疫抑制剂联用的单独施用的组合物。通常, 所述试剂将包括环孢菌素 A 或嘌呤类似物(例如, 甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤等), 但是也可使用本领域技术人员公知的多种其它试剂(例如环磷酰胺、强的松等)。

[0216] 本发明的抗体可形成免疫毒素的一部分。免疫毒素的特征在于两种组分以及可用

于在体外或体内杀死选定细胞。一种组分是细胞毒性剂,当被附着或被吸收时,其通常对细胞是致死的。第二种组分被称为“递送载体”,其提供将毒性剂递送至特定细胞类型(例如包含癌细胞的细胞)的手段。这两种组分通常通过多种公知化学方法的任意种被化学键合在一起。例如,当细胞毒性剂是蛋白质且第二种组分是完整免疫球蛋白时,连接可通过异双功能交联剂(例如 SPDF、碳二亚胺、戊二醛等)来实现。多种免疫毒素的产生是本领域公知的,并且可在例如 Thorpe 等, *Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet*, *MONOCLONAL ANTIBODIES IN CLIN. MED.* 168-90 (Acad. Press, 1982) 中找到。

[0217] 多种细胞毒性剂适用于免疫毒素。细胞毒性药物干扰关键的细胞过程,包括 DNA、RNA 和蛋白质的合成。细胞毒性剂可以包括放射性核素,例如包括  $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{188}\text{Re}$  和  $^{90}\text{Y}$ ; 数种化疗药物,如长春地辛、甲氨蝶呤、阿霉素和顺铂; 细胞毒性蛋白,例如核糖体抑制蛋白如商陆抗病毒蛋白 (pokeweed antiviral protein)。假单胞菌外毒素 A、蓖麻毒素、白喉毒素、蓖麻毒素 A 链等,或在细胞表面具有活性的试剂,例如 磷脂酶 (如磷脂酶 C)。一般地,参见 Olsnes & Phil, *Chimeric Toxins*, *25 Pharmac. Ther.* 335-81 (1982); *MONOCLONAL ANTIBODIES FOR CANCER DETECTION & THERAPY*, 159-79, 224-66 (Baldwin & Byers 编, Acad. Press, 1985)。

[0218] 所述抗体或肽和衍生物可作为免疫缀合物用于治疗。参见 Dillman, *111 Ann. Internal Med.* 592-603 (1989)。这样的抗体或多肽可以与细胞毒性蛋白质 (包括但不限于蓖麻毒素 A、假单胞菌毒素和白喉毒素) 偶联。与抗体或其它配体或肽缀合的毒素在本领域是公知的。参见例如 Olsnes 等, *10 Immunol Today* 291-95 (1989)。植物和细菌毒素通常通过扰乱蛋白质合成机制来杀死细胞。可以与抗 CPAA 肽和 / 或抗体缀合并随后用于体内治疗的细胞毒性药物包括但不限于柔红霉素、阿霉素、甲氨蝶呤和丝裂霉素 C。对于这类本领域公知药物的描述及其作用机制,参见 Goodman & Gilman 的 *PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS* (第 8 版, Macmillan Pub. Co., 1990)。

[0219] 此外,本发明的抗体可以与化疗剂一起递送,所述化疗剂例如奥沙利铂 (oxaliplatin)、依立替康 (irinotecan)、拓扑替康 (topotecan)、亚叶酸 (leucovorin)、卡莫司汀 (carmustine)、长春新碱、氟尿嘧啶、链佐托星 (streptozocin) 和吉西他滨 (gemcitabine)。这些化合物与其它抗体的组合已用于晚期结直肠癌患者中。参见例如美国专利申请公开 No. 20020187144。

[0220] 本发明的抗 CPAA 抗体和 / 或肽可有利地与其它单克隆抗体或者鼠和嵌合抗体、片段和区域组合使用,或者与淋巴因子或造血生长因子等组合使用,其用于提高与所述抗体相互作用之效应细胞的数量或活性。例如,本发明的抗体可以与人单克隆抗体共同施用,所述人单克隆抗体与疾病相关之细胞上的其它标志物反应。例如,合适的 T 细胞标志物可包括那些归类为所谓“分化簇”(由第一届国际白细胞分化研讨会命名)的标志物, *LEUKOCYTE TYPING* (Bernard 等编, Springer-Verlag, NY, 1984)。

[0221] 16C3 抗原

[0222] 与 16C3 抗体结合的抗原显示出在某些 (但非全部) 培养的人肿瘤细胞系中、在某些 (但非全部) 正常的人胚胎消化道组织中以及在大多数结肠和胰腺肿瘤组织中表达。如以下实施例中所述地,通过对多种肿瘤样品进行 western 印迹,16C3 抗体识别 ~ 200kDa 的肽种类和 ~ 110kDa 的肽种类。染色的强度 (其可反映每种蛋白质种类在特定样品中的量) 在结直肠癌肿瘤样品和胰腺肿瘤样品之间显示出不同。16C3 抗原显示出在大多数

结肠和胰腺肿瘤组织中表达,并且可能具有癌胚起源。16C3 抗原在细胞表面表达,并且是糖蛋白。可能存在 16C3 抗体识别的同一抗原之两个相关种类,每个种类在结肠和胰腺肿瘤组织中的相对量不同。

[0223] 经 western 印迹的 16C3 抗原结合不受去污剂(如 SDS 和 NP-40)或还原试剂(如二硫苏糖醇和 2-巯基乙醇)处理的破坏;这表明与特异性表位结合不是构象依赖的,16C3 抗体可识别 CPAA 上的线性表位。此外,16C3 表位不受 V8 蛋白酶、胰蛋白酶或 PNG 酶-F 处理的影响,但是免疫反应性抗原在 SDS-PAGE 上的整体迁移发生了改变,这反映出蛋白水解和去糖基化修饰。在  $\beta$ -消除化学反应中用氢氧化钠处理,显示出导致免疫反应性的损失,这表明 16C3 表位可能包括 O-糖基化修饰,或者临近 O-糖基化修饰残基。进一步研究确定与 16C3 抗体反应的确切表位。

[0224] 对 16C3 表位的表征还可导致对 CPAA 基因的确切,从而可向翻译拮抗剂或其它阻断表达的手段提供靶标,或者了解 CPAA 的活性从而使其可成为拮抗剂(特别是阻断功能活性(例如,受体与其相关配体的结合;运输功能;信号传导功能)的小分子或抗体)的靶标。

[0225] 癌症疫苗

[0226] 本发明的另一方面提供了癌症疫苗。“疫苗”是指用于刺激活生物体免疫系统的试剂。在此方面,免疫应答例如通过减轻已有症状可提供预防或在患病生物体中提供积极作用。具体地,癌症疫苗意在治疗性处理已有的恶性肿瘤和/或预防已有的恶性肿瘤的进展或转移。

[0227] 使用肿瘤相关抗原可实现特异性的活性免疫治疗是公知的。实际上,用于实施本文所示之其它发明的单克隆抗体的最初半纯化的抗原制备物,显示出在人体中提供特异性、活性、持久的保护性免疫力。Hollinshead 等,1985。此时,患者已接受肿瘤切除,然后以如下的量免疫接种来自肿瘤膜的抗原性物质,所述量为在混合有额外 0.2ml 弗氏佐剂的 0.2ml 分散系中 200  $\mu$ g、300  $\mu$ g 或 500  $\mu$ g 的量。持续 3 个月每月给予 300  $\mu$ g 的剂量经证明是安全的。

[0228] 使用本文所述的重组抗体,现在可以定义也适用于针对这些癌症之疫苗的高度纯化 CPAA 抗原或表位肽。例如,16C3 可用于结合 CPAA 蛋白及其相应的氨基酸序列可通过任何已知技术从中鉴定的组织或细胞样品。可进一步定位所述表位并精细确定分子性质。参见例如 Baerga-Oritz 等,11Protein Sci. 1300-08(2002);Jemmerson, & Paterson, 4 BioTechniques 18-31(1986)。

[0229] 鉴定有效抗原性肽的替代技术涉及使用 16C3 抗体或肽来筛选被抗体识别的模拟蛋白质或模拟表位(mimotope)的表达文库(例如噬菌体展示文库)。已使用这种技术来鉴定引发体内保护性免疫应答的抗原性肽。参见 Beenhouwer 等,169J. Immunol. 6992-99(2002);也参见美国专利 No. 5,837,550;Visvanathan 等,48Arthritis&Rheumatism,737-45(2003);Sato 等,371 Biochem. J. 603-08(2003)。注意到,这种技术已用于鉴定碳水化合物和糖蛋白抗原的蛋白质模拟物,发现这种蛋白质比对应的天然碳水化合物具有更高的免疫原性。实际上,考虑到产生能力、安全性、半衰期或其它方面等因素,可以分离比已知抗原更有利的模拟物。

[0230] CPAA 免疫原性蛋白可以例如作为皮下或粘膜疫苗单独地制备和递送,或者与佐剂

或载体一起制备和递送,或者作为佐剂或蛋白质缀合物的部分制备和递送。包括了通过脂质体微粒、病毒样颗粒、DNA 疫苗、重组活载体(例如鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*))以及可能的 ISCOM 的递送。所有这些系统对于本领域普通技术人员是公知的,并且无需过度的实验即可实施。参见例如 Michalek 等, *MUCOSAL IMMUNOLOGY* (Mestecky 等编, Elsevier, 2005)。

[0231] 此外,CPAA 肽可与类毒素载体(例如霍乱类毒素、肠类毒素或蓖麻类毒素)进行遗传或化学缀合。参见例如美国专利 No. 6,846,488。另一种衍生自细菌的有利蛋白质载体是 PorB 蛋白质载体。参见例如美国专利 No. 6,613,336。另一种有前景的基于蛋白质的粘膜佐剂是来自鼠伤寒沙门氏菌的鞭毛蛋白。在本发明的一个实施方案中,CPAA 蛋白质与鞭毛蛋白(FliB)通过例如鼻内粘膜途径共同施用。在美国专利申请公开 No. 20040219164 中描述了包含鸭肝炎核心抗原的有利蛋白质平台。

[0232] 本发明的 CPAA 还可以作为 DNA 疫苗递送,用于体内表达免疫原性构建体。例如,在鼻内免疫接种中,可使用阳离子微粒递送 DNA 表达盒。这种系统已诱导例如鼻内递送含有编码 HIV-1gag 蛋白之 DNA 的疫苗后的免疫应答。Michalek 等,2005。在本发明的一个实施方案中,经由 DNA 表达盒递送 CPAA 免疫原性肽,其随后在体内表达。

[0233] 此外,所述免疫原性制备物可用于离体“攻击(charge)”供体来源的树突细胞,然后返回到患者中,在其中它们归巢至淋巴器官并引发有效的免疫应答。参见例如 Liao 等,9(6) *Neurosurg. Focus*, e8(2000); Baar,4(2) *Oncologist* 140-44(1999)。这种疫苗方法已在人的试验中用于治疗例如黑素瘤和脑癌。更多信息可在网上找到,例如在美国国立卫生研究院的临床试验网站。作为替代,如上所述的 DNA 疫苗可通过皮肤贴剂被递送至郎格汉斯细胞,该细胞随后成熟为树突细胞并归巢至淋巴器官。美国专利 No. 6,420,176。

[0234] 本发明免疫原性组合物的递送可经由肠胃外、皮下或肌肉注射、静脉内注射、肠、皮内、插管、或鼻、口或直肠疫苗来施用。也可局部递送疫苗,包括鼻内、经腭扁桃体、或递送至唾液腺。换言之,本发明涉及的疫苗可通过任何已知或标准技术向患者施用。

[0235] 现通过非限制性实施例进一步描述本发明。

## 实施例

[0236] 实施例 1. 从人肿瘤样本制备胰腺癌和结直肠癌相关抗原(CPAA)

[0237] 根据 Hollinshead 等,56 *Cancer* 480(1985);美国专利 No. 5,688,657 所述的方法,从混合的结直肠癌膜获得免疫原性肿瘤相关抗原制备物。纯化该抗原性物质,至膜级分中不含 HL-A 抗原并与多数非免疫原性糖蛋白级分分离的程度。

[0238] 从新鲜的手术室样本制备生理盐水中的肿瘤细胞悬液。通过切碎实体瘤获得单细胞悬液,以  $400 \times g$  离心 10 分钟,保留上清液。用磷酸盐缓冲液(PBS)重悬细胞沉淀物,并再次离心。通过电子显微镜检查膜物质以确保只存在膜物质(而无完整细胞),利用 Lowry 法测定蛋白质含量。然后对膜物质进行连续低频超声,并重悬为膜蛋白的可溶性混合物。利用 Sephadex-6200 通过凝胶过滤分离可溶性超声产物。收集 2ml 级分,并记录 220nm 和 280nm 处的吸收谱。将包含各蛋白质峰的级分合并,并通过 Diaflo 超滤使合并物浓缩。如 Hollinshead 等,1985 所述,Sephadex-G200 级分 IB 和 IIA 通过梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)进一步纯化。测试级分在患有结直肠癌的患者中引起阳性迟发型皮肤超敏反应的能



力。具有免疫原性活性的级分被认为含有结直肠癌相关抗原,并用作免疫原以及单克隆抗体制备中的筛选试剂。

[0239] 通过梯度 PAGE, 鉴定并分离出不同于癌胚抗原的双条带抗原。Gold 等, 122 J. Exp. Med. 467-81(1965); Hollinshead 等, 1985; Hollinshead 等, 1(7658) Lancet 1191-1195(1970); Hollinshead 等, 177 Science 887-89(1972)。含有该抗原的条带迁移了 6.3cm 和 6.6cm, 区别于示踪染料。对该抗原的生化分析表明, 该蛋白质是糖蛋白。基于转铁蛋白的电泳迁移率 (6.4cm ~ 6.5cm) 估计该抗原的分子量, 一种分离物具有 76.5kDa 的分子量。详细研究了半纯化抗原, 包括评估血清抗体、细胞介导的免疫性和患者存活。Hollinshead 等, Abstract, Ann. Meeting Am. Soc 'y Clin. Oncol., Washington, DC(1990); Hollinshead 等, 56 Proc. 6th Int 'l Conf. Adjuvant Therapy Cancer (Salmon 编, W. B. Saunders Inc., Phila., PA, 1990)。进行另外的研究来评价免疫-化疗组合的用途。Hollinshead 等, 1990a; Hollinshead 等, 1990b; Hollinshead, 7 Semin. Surg. Oncol. 199-210(1991); Hollinshead 等, 10(1) J. Exper. Clin. Cancer 43-53(1991); 还参见 Hollinshead & Herberman, Proc. 2nd Int 'l Symp. Cancer Detection & Prevent. 616-20, (Bologna, Italy, 1973); Hollinshead, Experience with combo, immuno-chemotherapy of colon cancer: steps pertinent to successful therapy based upon dosage & timing of admin of 5-FU. NIH Workshop on Levamisole: Mechanism of anti-tumor action (Bethesda, MD, 1990 年 6 月 11 日); Hollinshead, 7 Semin. Surg. Oncol., 199-210(1991); Hollinshead, 8(153) Clin. Exper. Metastasis 89(1990)。

[0240] 实施例 2. 免疫和杂交瘤的制备

[0241] 通过杂交体的产生及克隆来获得针对人胰腺癌和结直肠癌相关抗原的单克隆抗体, 所述杂交体由小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0-Ag14 与来自 BALB/c 小鼠的脾细胞融合而成, 其中所述小鼠已经上述 CPAA 进行免疫。建立杂交克隆, 当利用 ELISA 进行测定时, 该杂交克隆与 CPAA 以及与结肠癌细胞系 (LS174T) 强烈反应。

[0242] 免疫和细胞融合: 用乳化于完全弗氏佐剂的 100  $\mu$ g CPAA 通过腹膜内注射免疫 BALB/c 小鼠。如 Hollinshead 在临床试验中所述地制备 CPAA。4 周后, 用乳化于不完全弗氏佐剂的 50  $\mu$ g CPAA 进行第二次免疫。14 天后, 小鼠接受腹膜内加强注射乳化于不完全弗氏佐剂的 50  $\mu$ g CPAA。三天后处死小鼠, 制备脾细胞单细胞悬液。通过在 40% 聚乙二醇 (MW = 1500) 中孵育 5e7 小鼠脾细胞与 10e7 Sp2/0-Ag14 骨髓瘤细胞进行细胞融合。

[0243] 筛选杂交瘤克隆: 使用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测产生特异性针对 PCAA 之抗体的杂交瘤克隆。结肠肿瘤细胞膜提取物 (10ng/孔的 LS174T 或 HT-29) 用作结肠癌抗原的替代来源, 并固定在聚苯乙烯微量滴定板上。使测试上清液中存在的抗体与经固定的抗原结合一小时。用特异性针对小鼠免疫球蛋白的缀合有磷酸酶的第二抗体来检测是否存在结合的鼠 mAb。清洗孔, 然后加入碱性磷酸酶的生色底物 (pNPP)。显示颜色反应并产生大于或等于 0.500 个单位吸光度的孔评分为阳性。阴性对照得到 0.01 ~ 0.09 的吸光度单位值。选择通过 ELISA 评分为阳性的杂交瘤孔用于扩增, 通过有限稀释克隆方法重复细胞克隆过程。通过 ELISA 来确定对产生 mAb 之阳性杂交瘤细胞的选择。在培养物中扩增阳性单克隆细胞, 将细胞等份在液氮中冷冻用于长期保存。

[0244] 实施例 3. 16C3mAb 的同种型

[0245] 从编码重链 (55kD) 和轻链 (25kD ~ 29kD) 的单独基因表达鼠免疫球蛋白。有四种 IgG 亚类重链 (IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3) 和两种轻链 ( $\kappa$ 、 $\lambda$ )，其可经重排而产生鼠免疫球蛋白的集合。

[0246] 使用 Southern Biotechnology Inc. 的小鼠同种型分型试剂盒来确定 16C3mAb 的同种型。所述 16C3mAb 被测定为 IgG1 重链和  $\kappa$  轻链。

[0247] 实施例 4. 独特 DNA 序列编码 16C3 抗体

[0248] 与已知序列的所有其它所述 mAb 相比，mAb 的线性氨基酸序列确定其唯一性。可通过首先测定编码所述多肽分子的 DNA 线性序列来确定所述线性氨基酸序列。测定编码 16C3mAb 的 DNA 序列，使用通用的哺乳动物密码子使用表将读码框翻译成氨基酸序列，从而描述 16C3 分子的线性序列身份。

[0249] 用于克隆鼠 IgG1 重链  $\kappa$  轻链的寡核苷酸引物来自出版物 Rapidcloning of any rearranged mouse immunoglobulin variable genes, Dattamajumdar 等, 43Immunogenetics 141-51(1996)。

[0250] 16C3 核酸的分离：如制造商所述，使用 RNeasy-Midi 试剂盒（货号 74104, Qiagen, Valencia, CA）从产生 16C3 的杂交瘤细胞中分离核糖核酸 (RNA)。在锥形管中对 400 万个细胞进行离心，裂解细胞以释放含 RNA 的细胞核和细胞质核酸。然后，使用 RNeasy 离心柱 (spinocolumn) 从裂解物中纯化 RNA。最后，用水洗脱 RNA，使用分光光度计通过在 260nm 和 280nm 处的吸光度来分析产率和纯度。将分离的 RNA 储存在  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

[0251] 制备 cDNA：使用脱氧核苷三磷酸 dNTP 混合物 (dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、cDNA 合成缓冲液、RNA 酶抑制剂、逆转录酶和寡聚 (dT)<sub>20</sub>，首先将 RNA (2  $\mu\text{g}$ ) 逆转录为 cDNA。根据 Invitrogen Superscript III 试剂盒（货号 18080-051）中制造商的说明进行 cDNA 合成反应。按照 Invitrogen 的 Accuprime Pfx DNA 聚合酶试剂盒（货号 12344-024）推荐的说明，使用上述针对重链和轻链的正向和反向引物，通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增靶 cDNA (小鼠 IgG1 重链和  $\kappa$  轻链) 以用于测序。对所述混合物进行  $94^{\circ}\text{C}$  2 分钟，随后 30 个循环的  $94^{\circ}\text{C}$  15 秒、 $58^{\circ}\text{C}$  30 秒、 $68^{\circ}\text{C}$  30 秒，然后  $68^{\circ}\text{C}$  10 分钟。然后，利用 4% 的 NuSieve 3 : 1plus 琼脂糖凝胶 (Lonza-Rockland, 货号 54925) 对所扩增的重链和轻链 DNA 片段进行电泳。从凝胶切下靶 DNA 条带，然后使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒（货号 28704, Qiagen）从琼脂糖中纯化。

[0252] DNA 测序和分析：根据制造商的说明 (Invitrogen, 货号 K4530-20)，对代表 16C3 抗体重链和轻链可变区的所扩增靶 DNA 经 TOPO 克隆用于测序。选出几种 TOPO 克隆并进行 DNA 测序。根据制造商的说明 (Roche Applied Sci., 货号 03-353)，使用 5' /3' RACE 试剂盒获得 16C3 抗体的全长序列。将获得的 DNA 序列以三种读码框进行翻译，没有终止密码子并且与其它鼠重链和轻链比对时呈同源的框，即确定为真正的读码框。使用该 DNA 序列作为检索美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库 (GenBank+RefSeq Nucleotides+EMBL+DDBJ+PDB 的所有序列) 的查询序列。BLAST 检索得到 15 条与 16C3 查询序列相似之核苷酸序列的数据库信息。没有 DNA 序列与 16C3DNA 序列一致，这表明本文所述之 16C3mAb 的唯一性。

[0253] 实施例 5. 经 BLAST 数据库检索证实的 16C3 抗体的唯一性

[0254] 针对美国国家生物技术信息中心 (NCBI, 其为国立卫生研究院的国立医学图书

馆)的蛋白质和核酸数据库,对16C3mAb的序列进行Blast检索(基本局部比对检索工具)。对经BLAST检索发现的与16C3mAb重链或16C3mAb轻链查询序列相似的序列的研究表明,16C3mAb重链和轻链可变区是唯一序列。因此,16C3mAb重链和轻链代表新的唯一的抗体分子。

[0255] 实施例6.16C3mAb的特异性细胞结合

[0256] 使用蛋白L-琼脂糖基质,通过亲和层析对由杂交瘤产生的16C3mAb进行纯化。使用如下表1中所示的多种肿瘤细胞,通过间接免疫荧光对纯化16C3mAb进行表征。所有肿瘤细胞系均来自ATCC。细胞与稀释于磷酸盐缓冲液(PBS)中的纯化16C3抗体在4℃孵育1小时。然后清洗细胞,并与荧光素标记的山羊抗小鼠mAb一起孵育。然后,所述细胞用PBS清洗三次,并使用Becton-Dickinson FACSCalibur™和CellQuest分析软件、利用流式细胞仪进行检测。结果显示于表1中(FACS数据)。这些数据表明,16C3mAb特异性结合结直肠癌和胰腺癌肿瘤细胞系,而非前列腺或鳞状肿瘤细胞系。

[0257] 表1.16C3mAb的FACS数据:与肿瘤细胞系的结合

[0258]

肿瘤细胞系	细胞染色百分数(mfi)	
	只有FITC-Ab	Rockland 16C3-E12
LS174T 结直肠肿瘤	0.94 (15)	40.56 (59)
HT-29 结直肠肿瘤	0.84 (10)	90.99 (78)
CFPAC-1 胰腺肿瘤	0.83 (14)	96.19 (323)
AsPC-1 胰腺肿瘤	2.68 (30)	69.90 (36)
22Rv-1 前列腺肿瘤	2.74 (61)	1.62 (30)
PC-3 前列腺肿瘤	0.28 (20)	2.44 (22)
H226 鳞状肿瘤	0.90 (18)	0.62 (14)
SiHa 鳞状肿瘤	1.07 (19)	1.08 (20)

[0259] 实施例6.16C3的ADCC活性表明抗肿瘤细胞毒性

[0260] 特异性针对免疫原性肿瘤抗原的可治疗用mAb可具有如下特性中至少之一:(a)高肿瘤组织特异性,(b)与正常人组织无交叉反应,以及(c)与破坏肿瘤有关的生物活性,例如抗体依赖的细胞毒性(ADCC)。以结肠SW1463、胰腺CFPAC-1和AsPc-1癌系作为靶细胞,测试16C3mAb的ADCC活性。将黑素瘤细胞系(SK-MEL)作为特异性对照。使用正常人PBMC作为效应细胞,使用常规的4小时<sup>111</sup>In释放测定来分析ADCC,结果于表2中显示为同位素释放百分比(裂解百分比)(ADCC数据)。与阴性对照抗体(UPC-10)相比,该数据指示鼠IgG1抗体的适中杀伤活性,而重要的是,这种杀伤活性显然对结肠和胰腺肿瘤系具有特异性。具有人框架序列(包括Fc区)的人源化或嵌合抗体的杀伤活性可提高,其在该ADCC测定中与人效应细胞相互作用。

[0261] 表2鼠16C3mAb的ADCC测定

[0262]

肿瘤靶标	效应物: 靶标之比值	特异性ADCC活性百分数 ( $\pm$ SEM)	
		16C3 mAb	UPC-10
SW1463 (结直肠腺瘤)	50:1	4.1 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.3
	25:1	5.2 $\pm$ 0.3	-0.2 $\pm$ 0.1
CFPAC-1 (胰腺肿瘤)	50:1	11.1 $\pm$ 2.7	0.2 $\pm$ 0.6
	25:1	1.4 $\pm$ 0.7	-0.2 $\pm$ 0.3
AsPC-1 (胰腺肿瘤)	50:1	16.1 $\pm$ 0.8	0.9 $\pm$ 0.3
	25:1	10.6 $\pm$ 1.0	0.4 $\pm$ 0.2
SK-MEL (黑素瘤)	50:1	-3.0 $\pm$ 0.2	-0.5 $\pm$ 0.2
	25:1	-3.3 $\pm$ 0.1	-2.0 $\pm$ 0.2

[0263] 经  $^{111}\text{In}$  标记的靶细胞, 抗体以  $5\ \mu\text{g}/\text{孔}$  使用, IL-2 活化的人 PBMC 用作效应细胞, 在  $37^\circ\text{C}$  下孵育 4 小时后收获。

[0264] 实施例 7. 16C3 抗体的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

[0265] 鼠免疫球蛋白  $\gamma$  (IgG1) 的天然构型由四条多肽组成, 其中重链和轻链各两条多肽。一条重链 (55kDa) 与一条轻链 (25kDa ~ 29kDa) 结合, 该二聚体与一个同样的二聚体通过二硫键连接, 形成完整的功能性四聚体大分子。IgG 分子可解离成其组成部分——重链和轻链, 并可在变性剂 (SDS, 十二烷基磺酸钠) 和还原二硫桥 (其连接两个异二聚体) 的试剂 (DTT, 二硫苏糖醇) 存在时按照大小在聚丙烯酰胺凝胶基质中分开。凝胶电泳是用于测定蛋白质物质 (如抗体) 分子量的常见分析方法。

[0266] 在还原剂 (DTT) 存在下, 通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳对纯化的 16C3mAb 进行分析。将  $5\ \mu\text{g}$  纯化的 16C3mAb 与 DTT 和  $4\times$  样品缓冲液 (其含有 SDS、甘油和溴酚蓝染料) 混合。将该混合物加热至  $95^\circ\text{C}$  2 分钟, 于冰上冷却, 然后加样至 SDS 梯度聚丙烯酰胺凝胶 (4% ~ 20% 梯度) 上, 加载电流以分离 16C3mAb 制备物中的变性分子种类。电泳后, 用考马斯亮蓝染料对凝胶染色, 从而使凝胶上的蛋白质显现, 用水脱色, 并在多孔塑料薄片之间干燥。该数据显示两条分子量为 55kDa 的蛋白条带 (其代表重链) 以及 28kDa 的蛋白条带 (其代表轻链分子种类)。这些数据显示经纯化的物质对应已知分子大小的鼠 IgG1 重链和轻链蛋白质。

[0267] 实施例 8. 使用 16C3mAb 和人恶性组织的免疫组化染色

[0268] 通过多种人组织样品 (癌和正常样品) 的免疫组化染色来测量 16C3mAb 表现出的抗原结合特异性。用  $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$  纯化的小鼠 16C3mAb (IgG1) 对石蜡和鲜冻的人组织样品进行染色, 然后用缀合有过氧化物酶的抗小鼠 IgG 第二抗体进行检测。染色强度示于表 3, 其反映了 0-4 评级体系: 0 表示无交叉反应; 4 表示与抗原具有非常高的交叉反应或者抗原在给定的样本中高表达。

[0269] 表 3. 指示 16C3 特异性的免疫组化染色

[0270]

样品制备方法	阳性数 / 总数	染色强度
石蜡 - 结肠癌	31/33	3+, 4+
石蜡 - 正常结肠	0/18	0
石蜡 - 胰腺癌	17/18	3+, 4+

石蜡 - 正常胰腺	0/8	0
石蜡 - 结肠癌	2/2	2+, 3+
石蜡 - 肺腺癌	2/2	1+, 2+
石蜡 - 粘液性卵巢癌	2/2	2+, 3+
石蜡 - 肝胆管癌	2/2	1+
石蜡 - 胃癌	2/2	3+, 4+
石蜡 - 子宫 - 子宫颈癌	2/2	1+, 2+
石蜡 - 子宫内膜癌	0/2	0
石蜡 - 前列腺癌	0/40	0
石蜡 - 浆液性卵巢癌	0/2	0
石蜡 - 膀胱移行细胞癌	0/2	0
石蜡 - 肾癌	0/2	0
石蜡 - 肺鳞状癌	0/2	0
石蜡 - 肾癌	0/2	0
石蜡 - 肺鳞状癌	0/2	0
石蜡 - 食管鳞状癌	0/2	0
石蜡 - 肝细胞癌	0/2	0
石蜡 - 甲状腺乳头状癌	0/2	0
石蜡 - 甲状腺滤泡性癌	0/2	0
石蜡 - 乳腺导管癌	0/2	0
石蜡 - 皮肤鳞状癌	0/2	0
石蜡 - 胃印戒细胞癌	0/2	0
石蜡 - 多种正常样品	0/54	0
鲜冻 - 结肠癌	2/3	2+, 3+
鲜冻 - 正常结肠	0/2	0
鲜冻 - 胰腺癌	2/3	2+, 3+
鲜冻 - 正常胰腺	0/2	0

[0271] [0271] 综合考虑, 这些数据显示针对结肠癌组织 (35/38) 和胰腺癌组织 (19/21) 超过 90% 的结合特异性, 而对任何正常人组织则无交叉反应 (所测试 58 个中有 0 个)。还存在针对其它肿瘤类型的某些交叉反应, 包括肺腺癌 (2/2)、粘液性卵巢癌 (2/2)、肝胆管癌 (2/2)、胃癌 (2/2) 和子宫 - 子宫颈癌 (2/2)。

[0272] 实施例 9. 鼠 16C3 单克隆抗体的人源化

[0273] 为了提高作为治疗性药物治疗人恶性肿瘤的可用性, 可将小鼠单克隆抗体转换成嵌合或人源化抗体, 从而使该药物可以重复施用并具有更低的毒性。本领域公知, 施用鼠蛋白质有时可导致针对外源蛋白质的广泛免疫和毒性应答。因此, 人源化抗体可证实对人类治疗更加有效。

[0274] 治疗性应用的小鼠抗体人源化是众所周知的, 制备人源化 mAb 的几种技术描述于上文中。例如, 根据 Fankenstein 方法, 认为人框架区与相关的非人抗体各框架区具有高的序列同源性, 并将非人抗体的 CDR 嫁接到不同人框架的组成 (composite) 中。参见美国专利申请公开 No. 20060088522。还可用于制备本发明抗体的相关方法描述于美国专利申请公开 No. 20030040606 中。

[0275] 设计了 5 种不同的替代序列用于将鼠 16C3 抗体转换为入源化、治疗上可用的抗体。该设计是基于已知的鼠和人抗体序列的结构信息。将这些可变区的每一个与已知的人 IgG1 框架抗体同框融合, 所述框架抗体常用于其它治疗性抗体 (如 CC49 和 CC83)。化学合成这些基因, 验证序列, 然后将重链和轻链基因插入物克隆进 CMV 启动子控制下的哺乳动物表达质粒中。应当注意, 针对 VEN16C3 和 CDR16C3 的变体轻链设计是一致的, 因此仅合成

由该序列设计指定的一条轻链基因。使用标准的基于脂质体的方法和试剂,将编码各重链和轻链的质粒共转染进入 293T 细胞中。

[0276] 如图 6(轻链序列)和图 7(重链序列)所示的人源化 mAb 序列代表用于治疗人恶性肿瘤的 16C3 抗体潜在治疗性形式。人谱系 IgG 序列用作框架序列。缩写如下:“16C3”是鼠抗体序列,“ven16C3”已用人框架序列进行“镶嵌”,“cdr16C3”已用人 CDR 氨基酸重新改造,“abb16C3”表示缩短的 CDR 嫁接,“sdr16C3”表示位点决定氨基酸改变,“fra16C3”表示通过使用多种人可变区“片段”的组合利用“Frankenstein”方法重新改造可变区。编号代表 Kabat 编号。

[0277] 实施例 10. 重组小鼠 16C3mAb 的特异性细胞结合

[0278] 使用蛋白 L-琼脂糖基质,经亲和层析来纯化杂交瘤产生的小鼠 16C3mAb。使用蛋白 A-琼脂糖凝胶基质,经亲和层析来纯化中国仓鼠卵巢细胞(CHO)产生的重组小鼠 16C3mAb。使用如下所示的人结直肠 LS174T 或胰腺 AsPC-1 肿瘤细胞,通过间接免疫荧光法表征经纯化的 16C3 制备物或经转染细胞的上清液。将细胞与稀释于磷酸盐缓冲液(PBS)中的纯化 16C3(小鼠或人源化的)在 4°C 下孵育 1 小时。清洗所述细胞,用荧光素标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白抗体孵育。然后,将所述细胞用 PBS 清洗,使用 Becton-Dickinson FACSCalibur 和 CellQuest 分析软件通过流式细胞术进行检测。数据表明,从杂交瘤得到的小鼠 16C3 和从重组 CHO 得到的小鼠 16C3 对结直肠癌和胰腺癌肿瘤细胞系的特异性结合是非常类似的,但是不与前列腺或鳞状肿瘤细胞系结合。

[0279] 表 4. 杂交瘤 vs 重组小鼠 16C3 结合肿瘤系的 FACS 数据

[0280]

抗体样品	LS174T 肿瘤细胞结合百分数 (MFI)
山羊抗小鼠 IgG-FITC 对照	1.63(43)
纯化的 m16C3, 来自 H12hyb. 525, 2ug	43.11(118)
纯化的 m16C3, 来自 H12hyb. 712, 2ug	43.56(113)
纯化的 m16C3, 来自 H12hyb. 713, 2ug	37.79(110)
纯化的 m16C3, 来自 H12hyb. 840, 2ug	35.72(92)
纯化的 m16C3, 来自重组 CHO, 1019, 2ug	41.45(112)
纯化的 m16C3, 来自重组 CHO, 1115, 2ug	42.51(114)
纯化的 m16C3, 来自重组 CHO, 1220, 2ug	37.46(110)
抗体样品	经染色的 AsPC-1 细胞百分数 (mfi)
山羊抗小鼠 FITC 对照	1.01(8)
小鼠 16C3 杂交瘤对照, 712, 1ug	89.50(138)
小鼠 16C3 杂交瘤对照, 713, 5uL	81.42(34)
重组 CHO m16C3 上清 #1	82.66(28)
重组 CHO m16C3 上清 #2	83.86(27)
重组 CHO m16C3 上清 #3	79.50(18)
重组 CHO m16C3 上清 #4	83.08(25)

[0281] [0281] 实施例 11. 使用重组小鼠 16C3 抗体的人组织免疫组化染色

[0282] 通过对多种人组织样品(癌和正常样本)进行免疫组化染色来测量 16C3 抗体表现出的抗原结合特异性。用 5 μg/ml 纯化的小鼠 16C3 抗体(IgG1)对组织微阵列、石蜡包埋

的组织 and 新鲜冷冻人组织样品进行染色,然后用过氧化物酶缀合的抗小鼠 IgG 第二抗体进行检测。染色强度用 0-4 评级体系表示:0 表示无交叉反应;4 表示与抗原具有非常高的交叉反应或者给定样本中抗原高表达。测试了从杂交瘤得到的 16C3 抗体和重组 16C3 抗体。结果总结于表 5 和 6 中:

[0283] 表 5. 用从杂交瘤细胞纯化的小鼠 16C3 进行染色

[0284]

人组织样品	阳性数 / 染色数	染色强度
结肠癌	17/18	+3 至 +4
结肠癌 mets	18/18	+3 至 +4
胰腺癌	28/33	+1 至 +3
多种其它癌组织	8/18	+1 至 +3
正常结肠、胰腺以及其它组织	0/74	

[0285] 表 6. 用从 CHO 细胞纯化的小鼠 16C3 进行染色

[0286]

人组织样品	阳性数 / 染色数	染色强度
结肠癌	45/45	+2 至 +3
胰腺癌	24/30	+1 至 +3
多种其它癌组织	116/191	弱至 +4
正常结肠、胰腺以及其它组织	22/50	弱至 +2

[0287] 综合考虑,这些数据表明对结肠癌超过 95% 的结合特异性 (80/81),对胰腺癌约 80%~85% 的结合特异性 (52/63),以及对其它类型癌症 (主要是腺癌) 40%~60% 的结合特异性。对一小群正常组织 (最显著为肺和卵巢组织) 具有一些交叉反应,总的交叉反应约为 44% (22/50)。令人感兴趣的是,与 16C3 抗体发生交叉反应的所有正常人组织是与重组产生的抗体进行的 (观察到,用杂交瘤产生的 16C3 与正常人组织无交叉反应),这提示交叉反应可能与 CHO 细胞产生过程的人为因素有关,而并非与抗体本身有关。

[0288] 实施例 12. 测试 16C3 的人源化变体

[0289] 用于将鼠 16C3 抗体转化为人源化的、治疗上可用的抗体的五种不同设计示于图 5 和图 6 中。293T 细胞中表达重组人源化 16C3,在基质实验中共转染五种变体。将瞬时转染的上清液归一化为 2ng/mL,然后进行稀释以估计与纯化的重组小鼠 16C3 相比的亲合力,之后与重组小鼠 16C3 抗体相比,通过 FACS 测试对 AsPC-1 胰腺肿瘤细胞的抗原结合潜力。表 7 中所示的数据表明,五种重链变体的每一种均可以与各四种轻链变体的每一种正确折叠,从而产生抗原结合活性。将人源化重链和轻链之各种组合的结合与原始的小鼠 16C3 抗体的结合进行比较。数据显示,通过五种不同方法中的任一种使 16C3 免疫球蛋白人源化未改变所得抗体的抗原识别位点。各种结合可用一定量的抗体进行滴定,其中各种组合显示出相似的滴定模式。

[0290] 表 7. 重组人源化 16C3 的 FACS 数据

[0291]

抗体样品	AsPC-1 肿瘤细胞结合百分数 (MFI)
山羊抗小鼠 IgG-FITC 对照	1.55 (70)
重组 m16C3 对照, 100ng	61.66 (228)
重组 m16C3 对照, 20ng	47.91 (69)
重组 m16C3 对照, 4ng	4.26 (52)
重组 m16C3 对照, 0.8ng	1.28 (615)

兔抗人 IgG-FITC 对照 (重链/轻链)	2.05(59)
Rh16C3 上清 8 :VEN/VEN-100uL	68.14(1090)
Rh16C3 上清 8 :VEN/VEN-20uL	65.93(240)
Rh16C3 上清 8 :VEN/VEN-4uL	46.11(65)
Rh16C3 上清 10 :VEN/ABB-100uL	64.19(549)
Rh16C3 上清 10 :VEN/ABB-20uL	62.24(122)
Rh16C3 上清 10 :VEN/ABB-4uL	22.10(52)
Rh16C3 上清 11 :VEN/SDR-100uL	67.99(808)
Rh16C3 上清 11 :VEN/SDR-20uL	66.45(191)
Rh16C3 上清 11 :VEN/SDR-4uL	32.30(57)
Rh16C3 上清 12 :VEN/FRA-100uL	67.22(674)
Rh16C3 上清 12 :VEN/FRA-20uL	64.11(143)
Rh16C3 上清 12 :VEN/FRA-4uL	25.65(51)
Rh16C3 上清 14 :CDR/VEN-100uL	62.66(568)
Rh16C3 上清 14 :CDR/VEN-20uL	59.92(112)
Rh16C3 上清 14 :CDR/VEN4uL	16.89(49)
Rh16C3 上清 16 :CDR/ABB-100uL	64.49(254)
Rh16C3 上清 16 :CDR/ABB-20uL	49.61(73)
Rh 16C3 上清 16 :CDR/ABB-4uL	5.85(70)
Rh16C3 上清 17 :CDR/SDR-100uL	68.02(376)
Rh16C3 上清 17 :CDR/SDR-20uL	54.78(89)
Rh16C3 上清 17 :CDR/SDR-4uL	10.21(53)
Rh16C3 上清 18 :CDR/FRA-100uL	61.54(557)
Rh16C3 上清 18 :CDR/FRA-20uL	57.34(98)
Rh16C3 上清 18 :CDR/FRA-4uL	17.55(51)
Rh16C3 上清 20 :ABB/VEN-100uL	65.72(374)
Rh16C3 上清 20 :ABB/VEN-20uL	57.34(89)
Rh16C3 上清 20 :ABB/VEN-4uL	6.39(54)
抗体样品	AsPC-1 肿瘤细胞结合百分数 (MFI)
Rh16C3 上清 22 :ABB/ABB-100uL	66.31(318)
Rh16C3 上清 22 :ABB/ABB-20uL	50.30(78)
Rh16C3 上清 22 :ABB/ABB-4uL	7.63(50)
Rh16C3 上清 23 :ABB/SDR-100uL	66.33(293)
Rh16C3 上清 23 :ABB/SDR-20uL	52.12(75)
Rh16C3 上清 23 :ABB/SDR-4uL	6.58(59)
Rh16C3 上清 24 :ABB/FRA-100uL	65.15(403)
Rh16C3 上清 24 :ABB/FRA-20uL	57.63(98)
Rh16C3 上清 24 :ABB/FRA-4uL	12.29(50)



Rh16C3 上清 26 :SDR/VEN-100uL	67.94(495)
Rh16C3 上清 26 :SDR/VEN-20uL	62.15(140)
Rh16C3 上清 26 :SDR/VEN-4uL	12.69(59)
Rh16C3 上清 28 :SDR/ABB-100uL	66.58(314)
Rh16C3 上清 28 :SDR/ABB-20uL	54.71(87)
Rh16C3 上清 28 :SDR/ABB-4uL	8.59(51)
Rh16C3 上清 29 :SDR/SDR-100uL	67.95(503)
Rh16C3 上清 29 :SDR/SDR-20uL	61.56(114)
Rh16C3 上清 29 :SDR/SDR-4uL	15.87(56)
Rh16C3 上清 30 :SDR/FRA-100uL	65.87(702)
Rh16C3 上清 30 :SDR/FRA-20uL	64.45(156)
Rh16C3 上清 30 :SDR/FRA-4uL	29.29(53)
Rh16C3 上清 32 :FRA/VEN-100uL	66.03(585)
Rh16C3 上清 32 :FRA/VEN-20uL	63.64(147)
Rh16C3 上清 32 :FRA/VEN-4uL	22.69(52)
Rh16C3 上清 34 :FRA/ABB-100uL	67.38(395)
Rh16C3 上清 34 :FRA/ABB-20uL	58.89(99)
Rh16C3 上清 34 :FRA/ABB-4uL	12.30(51)
Rh16C3 上清 35 :FRA/SDR-100uL	68.01(465)
Rh16C3 上清 35 :FRA/SDR-20uL	61.35(114)
Rh16C3 上清 35 :FRA/SDR-4uL	14.23(59)
Rh16C3 上清 36 :FRA/FRA-100uL	67.88(432)
Rh16C3 上清 36 :FRA/FRA-20uL	59.15(99)
Rh16C3 上清 36 :FRA/FRA-4uL	8.68(53)

[0292] 实施例 13. 重组人源化 16C3 抗体的优化和测试

[0293] 此外,计算机 (in silico) 分析工具可用于预测蛋白质中可能的 T 细胞表位。这种算法可用于设计改进的重组蛋白,其在人中具有可能降低的免疫原性。为了利用这种预测技术,分析五种变体人源化 16C3 重链和轻链基因,显示具有一个或多个预测的 T 细胞表位,所述表位可能在人中诱导某些 HLA 单倍体型的免疫应答。使用如 Epimer 或 EpiMatrix 的软件(计算机表位作图 (in silico epitope-mapping) 工具) 或者通过供应商(如 Antitope, Ltd, Cambridge, UK) 可以进行这种分析。在一种试图除去这些 T- 细胞表位以减少潜在治疗性 16C3 抗体之可能免疫原性的尝试中,进行特定的点突变来除去 T- 细胞表位,并替换特定的氨基酸从而产生功能完整但免疫原性更低的抗体分子。优化的人源化 16C3 抗体的蛋白质序列如图 12 所示,粗体氨基酸表示 CDR,“/”表示前导肽 / 成熟 N- 端的连接处以及可变 / 恒定结构域的连接处。

[0294] 通过突变现有变体基因产生期望的 DNA 序列来制备 h16C3-Abb\* 抗体的基因。然后,将 h16C3-Abb\* 重链和轻链基因克隆到哺乳动物表达质粒中并转染至 CHO 细胞中。使用兔抗人 IgG-FITC 作为对照,通过 FACS 测试几种所得克隆的上清液对 LS174T(结肠) 和 CFPAC-1(胰腺) 肿瘤细胞的结合。表 8 中显示的数据表明,优化的人源化 16C3(H16C3) 基因设计产生具有很好抗原识别活性的抗体。这种特定的 h16C3-Abb\* 设计代表了在表达靶

抗原的癌症中作为治疗性抗体的、具有高结合活性以及潜在的低免疫原性和 / 或毒性的抗体。

[0295] 表 8. 人源化 16C3-Abb\* 转染上清液的 FACS 实验结果

[0296]

抗体样品	结合至 LS174T 细胞的百分数 (mfi)	结合至 CFPAC-1 细胞的百分数 (mfi)
对照	3.49(33)	2.10(20)
H16C3-Abb* 上清 1	54.40(374)	98.62(411)
H16C3-Abb* 上清 2	51.10(299)	97.70(299)
H16C3-Abb* 上清 3	55.20(402)	98.60(486)
H16C3-Abb* 上清 4	53.75(333)	98.68(371)
H16C3-Abb* 上清 5	56.24(407)	99.14(447)

[0297] 以胰腺 CFPAC-1 和 AsPC-1 癌细胞系作为靶细胞测试 h16C3-Abb\* 的 ADCC 活性。黑素瘤细胞系 (SK-MEL) 作为肿瘤细胞特异性对照。使用常规的四小时 <sup>111</sup>In 释放测定, 用正常人 PBMC 作为效应细胞进行 ADCC 测定, 结果显示为以下的同位素释放百分比 (裂解百分数)。与阴性对照抗体 UPC-10 相比, 该数据表明人源化 16C3 抗体的抗体特异性杀伤活性。该杀伤活性似乎对胰腺肿瘤细胞系具有特异性, 因为未观察到抗黑素瘤阴性对照细胞的裂解。这些数据显示, 抗体的杀伤活性可以通过小鼠 16C3 抗体的人源化得以改造。与小鼠 16C3 抗体相比, 人源化 16C3 抗体显示优异的杀伤活性, 这很可能是由于人 Fc 区比鼠 Fc 区可更有效地与人效应细胞相互作用所致。

[0298] 表 9. h16C3-Abb\* 抗体的 ADCC 测定

[0299]

肿瘤靶标	效应物: 靶标之比值	特异性 ADCC 活性百分数 (± SEM)	特异性 ADCC 活性百分数 (± SEM)
		h16C3-Abb*	UPC-10 对照
AsPC-1 (胰腺瘤)	100	32.2 ± 0.56	0.4 ± 0.38
	50	18.4 ± 2.67	-0.1 ± 0.54
	25	14.4 ± 1.66	0.2 ± 0.36
CFPAC-1 (胰腺瘤)	100	48.7 ± 3.22	1.9 ± 0.26
	50	40.9 ± 4.11	2.6 ± 0.49
	25	19.4 ± 2.07	2.1 ± 0.20
SK-MEL (黑素瘤)	100	0.1 ± 1.28	-0.6 ± 0.18
	50	-1.2 ± 0.78	-1.8 ± 0.34
	25	0.1 ± 0.2	-1.1 ± 0.83

[0300] 经 <sup>111</sup>In 标记的靶细胞, 抗体以 5 μg/孔使用, IL-2 活化的人 PBMC 用作效应细胞, 在 37°C 下孵育 4 小时后收获。

[0301] 实施例 14. 表征 16C3 所识别的 CPAA

[0302] 在使用多种处理的 Western 印迹中检测了 16C3 抗体所结合的抗原的几种特性。表 10 中的数据表明, 所述 16C3 抗原存在于某些但非所有的培养的结直肠肿瘤和胰腺肿瘤细胞中。重要的是, 所述 16C3 抗原存在于来自消化道和肠的胎儿组织提取物中。级分 I 阳性样本代表用切下的胚胎组织经 Sephadex G-200 柱层析运行的洗脱物 (级分 I), 并进行膜蛋白提取和纯化的 Hollinshead 方法。经手术方法获得结直肠肿瘤样本。将组织切碎并使

用去污剂进行总蛋白提取。表 10 显示通过这些细胞提取物的 Western 印迹, 16C3 肿瘤抗原在多种肿瘤细胞中表达的数据。这些数据表明, 16C3 肿瘤抗原可以在生命的胚胎阶段以及癌症中表达。因此, 16C3 抗原的表达可受发育调控而在胚胎组织发育期间表达以及在癌症发生期间再次表达。

[0303] 表 10. 16C3 肿瘤抗原在多种肿瘤细胞中的表达

[0304]

<b>细胞系:</b>	<b>16C3 抗原</b>
<b>SW1116 (结直肠肿瘤)</b>	<b>阳性 (MW 约为 220 kDa)</b>
<b>SW480 (结直肠肿瘤)</b>	<b>阴性</b>
<b>SW1463 (结直肠肿瘤)</b>	<b>阴性</b>
<b>COLO205 (结直肠肿瘤)</b>	<b>阳性 (MW 约为 220 kDa)</b>
<b>CALU1 (肺肿瘤)</b>	<b>阴性</b>
<b>PANC 1 (胰腺肿瘤)</b>	<b>阴性</b>
<b>PR 22 (前列腺肿瘤)</b>	<b>阴性</b>
<b>HT29 (结直肠肿瘤)</b>	<b>阳性 (MW 约为 220 kDa 以及 110 kDa)</b>
<b>LS174T (结直肠肿瘤)</b>	<b>阳性 (MW 约为 220 kDa 以及 110 kDa (较少))</b>
<b>CFPAC 1 (胰腺肿瘤)</b>	<b>阳性 (MW 约为 220 kDa 以及 110 kDa)</b>
<b>ASPC1 (胰腺肿瘤)</b>	<b>阳性 (MW 约为 220 kDa 以及 110 kDa)</b>
<b>人组织制备物:</b>	
<b>胎儿消化道, 级分 I, 12/20/72</b>	<b>阳性 (MW 约为 220 kDa 以及 110 kDa)</b>
<b>胎肠, 级分 I, 6/24/75</b>	<b>阳性 (MW 约为 220 kDa 以及 110 kDa)</b>
<b>结直肠肿瘤组织, 切除</b>	<b>阳性 (MW 约为 220 kDa 以及 110 kDa)</b>

[0305] 经多种化学处理, 用 Western 印迹分析, 实现对结直肠肿瘤细胞系和胰腺肿瘤细胞系所表达 16C3 肿瘤抗原的定性描述。这些结果示于图 8 ~ 图 11 以及表 11 中。

[0306] 表 11. 经多种化学处理的 Western 印迹分析

[0307]

特征	肿瘤细胞系		
	LS174T	CFPAC	ASPC-1
半定量的上清液中抗原表达 (以 LS174 表达为 100%)	通过 Western 印迹 相对量 100%	通过 Western 印迹 相对量 300%	通过 Western 印迹 相对量~30%
半定量的细胞沉淀物中抗原的表达 (以 LS174 表达为 100%)	通过 Western 印迹 相对量 100%	通过 Western 印迹 相对量 200%	通过 Western 印迹 相对量 80%
细胞沉淀物 vs 上清液中存在的比	100/20	100/20	100/20
通过 Western 印迹测定的 SDS 凝胶中的大致分子量	~200 kDa 和 110 kDa (较少组分)	~200 kDa 和 110 kDa	~200 kDa 和 110 kDa
还原剂 DDT 或 2-ME 的作用	对抗原性或分子量无作用	对抗原性或分子量无作用	对抗原性或分子量无作用
糖苷酶处理	抗原性不受糖苷酶处理影响, 但 PNG 酶 F 使分子量为 200 kDa 的条带降至~130 kDa. 较低的带(110 kDa)不受 PNG 酶 F 影响		
使用 NaOH 的 $\beta$ 消除	损失抗原性		
25°C 或 37°C 下胰蛋白酶处理 24 小时	抗原性不受影响, 但分子量降低(弥散的宽带)		未进行
25°C 下蛋白酶 V8 处理 24 小时	抗原性不受影响, 但分子量降低(弥散的宽带)		未进行

[0309] 尽管本发明是结合其具体的实施方案进行描述的, 但应当理解其能够作进一步修改。本申请意在覆盖通常情况下遵循本发明原则的本发明任何变型、用途或调整, 并包括超出本公开内容的但是在本发明所属领域中公知或常规实践范围内、并且可适用于所附权利要求范围内指出的上述必要特征的那些。

序列表 <110> 尼尔杰内斯肿瘤公司

<120> 针对结肠癌和胰腺癌的重组单克隆抗体和对应抗原

<130>044127 003000

<150>US 60/996, 255

<151>2007-11-08

<160>29

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>11

<212>PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400>1

Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1                      5                      10

<210>2

<211>7

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>2

Gly Ala Ser Asn Leu Ala Asp

1                      5

<210>3

<211>9

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>3

Gln Asn Val Leu Ser Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210>4

<211>11

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>4

Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210>5

<211>7

<212>PRT

<213> 人

<400>5

Gly Ala Ser Asn Leu Ala Thr

1 5

<210>6

<211>9

<212>PRT

<213> 人

<400>6

Gln Gln Val Leu Ser Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210>7

<211>10

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>7

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala Met His  
1                      5                      10

<210>8

<211>17

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>8

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

<210>9

<211>12

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>9

Cys Asp Tyr Ser Gly Ser Arg Tyr Trp Phe Ala Tyr  
1                      5                      10

<210>10

<211>16

<212>PRT

<213> 人

<400>10

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

<210>11

<211>12

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt;11

Gly Asp Tyr Ser Gly Ser Arg Tyr Trp Phe Ala Tyr

1

5

10

&lt;210&gt;12

&lt;211&gt;965

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt; 小鼠

&lt;400&gt;12

```

gcggggcagc ctcacacaga acacacacag atatgggtgt acccactcag ctctgttgc      60
tgtggccttac agtcgtagtt gtcagatgtg acatccagat gactcagtct ccagcttcac      120
tgtctgcate tgtgggagaa actgtcacca tcacatgtgg agcaagtgag aatatttacg      180
gtgctttaaa ttggtatcag cggaaacagg gaaaatctcc tcagctcctg atttatggcg      240
caagtaattt ggcagatggc atgtcatcga ggttcagtgg cagtggatct ggtagacagt      300
attctctcaa gatcagtagc ctgcatcctg acgatgttgc aacgtattac tgtcaaaatg      360
tattaagtag tccgtacacg ttcggagggg ggaccaagct ggaaataaaa cgggctgatg      420
ctgcaccaac tgtatecate tteccacat ccagtgagca gttaacatct ggaggtgcct      480
cagtcgtgtg cttcttgaac aacttctacc ccaaagacat caatgtcaag tggaagattg      540
atggcagtga acgacaaaat ggcgtcctga acagttggac tgatcaggac agcaaagaca      600
gcacctacag catgagcagc accctcacgt tgaccaagga cgagtatgaa cgacataaca      660
gctataacctg tgaggccact cacaagacac caacttcacc cattgtcaag agcttcaaca      720
ggaatgagtg ttagagacaa aggtcctgag acgccaccac cagctcccca gctccatcct      780
atcttccctt ctaaggtctt ggaggttcc ccacaagcga cctaccactg ttgcggtgct      840
ccaaacctcc tccccacctc cttctectec tectcccttt ccttggcttt tatcatgcta      900
atatttgcag aaaatattca ataaagtgag tctttgcaca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      960
aaaaa                                             965

```

&lt;210&gt;13

&lt;211&gt;1575

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt; 小鼠

&lt;400&gt;13

```

acgcgggaca cagtagtctc tacagtcaca ggagtacaca ggacattgcc atgggttgg      60

```



gctgtatcat	cttctttctg	gtagcaacag	ctacaggtgt	gcactcccag	gtccagctgc	120
agcagtctgg	gcctgaggtg	gtgaggcctg	gggtctcagt	gaagatttcc	tgcaagggtt	180
ccggctacac	attcactgat	tatgctatgc	actgggtgaa	gcagagtcac	gcaaagagtc	240
tcgagtggat	tggacttatt	agtacttaca	gtggtgatac	aaagtacaac	cagaacttta	300
agggcaagge	cacaatgact	gtagacaaat	cetccaacac	agcctatatg	gaacttgcca	360
gattgacate	tgaggattct	gccatctatt	actgtgcaag	aggggattat	tccggtagta	420
ggtactggtt	tgcttactgg	ggccaaggga	ctctggtcac	tgtctctgca	gccaaaacga	480
cacccccate	tgtctateca	ctggccccctg	gatctgctgc	ccaaactaac	tccatgggtg	540
ccctgggatg	cctgggtcaag	ggctatttcc	ctgagccagt	gacagtgacc	tggaactctg	600
gatccctgtc	cagcgggtgtg	cacaccttcc	cagctgtcct	gcagtctgac	ctctacactc	660
tgagcagctc	agtgactgtc	ccctccagca	cctggcccag	cgagaccgtc	acctgcaacg	720
ttgccacccc	ggccagcagc	accaaggtgg	acaagaaaat	tgtgcccagg	gattgtggtt	780
gtaagccttg	catatgtaca	gtcccagaag	tatcatctgt	cttcatcttc	ccccaaagc	840
ccaaggatgt	gctcaccatt	actctgactc	ctaaggtcac	gtgtgttgtg	gtagacatca	900
gcaaggatga	tcccagggtc	cagttcagct	ggtttgtaga	tgatgtggag	gtgcacacag	960
ctcagacgca	accccgggag	gagcagttca	acagcacttt	ccgctcagtc	agtgaacttc	1020
ccatcatgca	ccaggactgg	ctcaatggca	aggagttaa	atgcagggtc	aacagtgcag	1080
ctttccctgc	ccccategag	aaaaccatct	ccaaaaccaa	aggcagaccg	aaggctccac	1140
aggtgtacac	cattccacct	ccaaggagc	agatggccaa	ggataaagtc	agtctgacct	1200
gcatgataac	agactttctc	cctgaagaca	ttactgtgga	gtggcagtg	aatgggcagc	1260
cagcggagaa	ctacaagaac	actcagccca	tcattggacac	agatggctct	tacttcgtct	1320
acagcaagct	caatgtgcag	aagagcaact	gggaggcagg	aaatacttcc	acctgctctg	1380
tgttacatga	gggcctgcac	aaccaccata	ctgagaagag	cctctcccac	tctcctggta	1440
aatgatccca	gtgtccttgg	agccctctgg	ccctacagga	ctttgacacc	tacctccacc	1500
cctccctgta	taaataaagc	accagcact	gcctcgggac	cctgcataaa	aaaaaaaaaa	1560
aaaaaaaaaa	aaaaa					1575

<210>14

<211>107

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>14

Leu Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr  
 1                    5                    10                    15  
 Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn  
                   20                    25                    30  
 Trp Tyr Gln Arg Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly

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

&lt;210&gt;15

&lt;211&gt;116

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 小鼠

&lt;400&gt;15

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

&lt;210&gt;16

&lt;211&gt;107

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 小鼠

&lt;400&gt;16

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala  
                   20                    25                    30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile  
                   35                    40                    45  
 Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Ala Asp Gly Met Ser Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                    55                    60  
 Ser Gly Ser Gly Arg Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu His Pro  
 6                    570                    75                    80  
 Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Ser Ser Pro Tyr  
                   85                    90                    95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                    105

&lt;210&gt;17

&lt;211&gt;107

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;人源化 mAb 序列

&lt;400&gt;17

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

100

105

&lt;210&gt;18

&lt;211&gt;107

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;人源化 mAb 序列

&lt;400&gt;18

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

&lt;210&gt;19

&lt;211&gt;107

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;人源化 mAb 序列

&lt;400&gt;19

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala		

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

&lt;210&gt;20

&lt;211&gt;107

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;人源化 mAb 序列

&lt;400&gt;20

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

&lt;210&gt;21

&lt;211&gt;107

&lt;212&gt;PRT

<213> 人工序列

<400>21

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

<210>22

<211>121

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>22

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

	100		105		110
Gln Gly Thr	Leu Val Thr Val	Ser Ala			
	115		120		
<210>23					
<211>121					
<212>PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 人源化 mAb 序列					
<400>23					
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala					
1	5		10		15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr					
	20		25		30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile					
	35		40		45
Gly Leu Tle Ser Thr Tyr Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gln Asn Phe					
	50		55		60
Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr					
65	70		75		80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
	85		90		95
Ala Arg Gly Asp Tyr Ser Gly Ser Arg Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly					
	100		105		110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
	115		120		

&lt;210&gt;24

&lt;211&gt;121

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人源化 mAb 序列

&lt;400&gt;24

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
                   20                   25                   30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                   40                   45  
 Gly Leu Tle Ser Thr Tyr Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gln Asn Phe  
                   50                   55                   60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95  
 Ala Arg Gly Asp Tyr Ser Gly Ser Arg Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly  
                   100                   105                   110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115                   120

<210>25

<211>121

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化 mAb 序列

<400>25

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



	85		90		95
Ala Arg Gly Asp Tyr Ser Gly Ser Arg Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly					
	100		105		110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
	115		120		

&lt;210&gt;26

&lt;211&gt;121

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人源化 mAb 序列

&lt;400&gt;26

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

&lt;210&gt;27

&lt;211&gt;121

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人源化 mAb 序列

<400>27

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

<210>28

<211>470

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 优化的人源化 mAb 序列

<400>28

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

65	70	75	80
Gln Asn Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser			
	85	90	95
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val			
	100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Tyr Ser Gly Ser Arg Tyr Trp Phe Ala			
	115	120	125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys			
	130	135	140
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly			
145	150	155	160
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro			
	165	170	175
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr			
	180	185	190
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val			
	195	200	205
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn			
	210	215	220
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro			
225	230	235	240
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu			
	245	250	255
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp			
	260	265	270
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp			
	275	280	285
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly			
	290	295	300
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn			
305	310	315	320
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp			
	325	330	335
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro			
	340	345	350
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
	355	360	365
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn			
	370	375	380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460  
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210>29

<211>233

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 优化的人源化 mAb 序列

<400>29

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

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 130 135 140  
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
 145 150 155 160  
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 165 170 175  
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr  
 180 185 190  
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His  
 195 200 205  
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
 210 215 220  
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

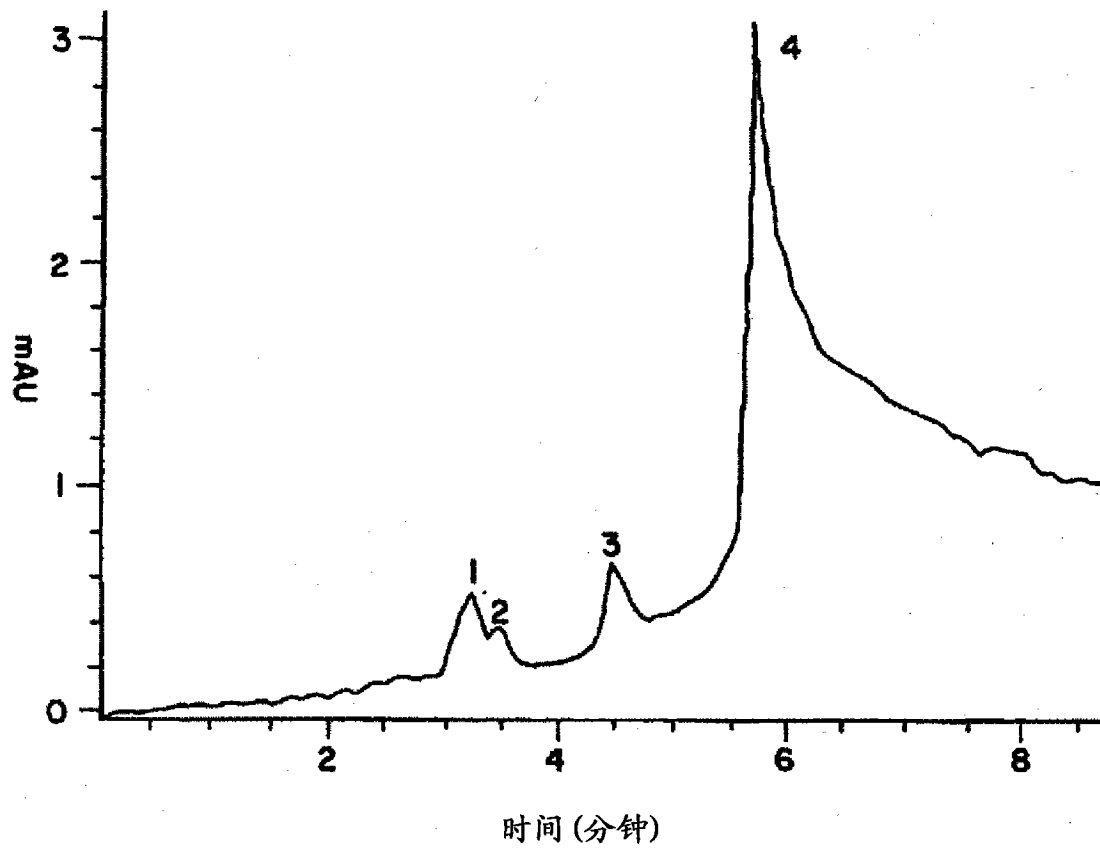


图 1

16C3杂交瘤 κ 轻链DNA, 全长序列:

GCGGGGCAGCCTCACACAGAACACACACAGAT**ATGGGTGTACCCACTCA**  
GCTCCTGTTGCTGTGGCTTACAGTCGTAGTTGTCAGATGTGACATCCAGAT  
GACTCAGTCTCCAGCTTCACTGTCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACCAT  
CACATGTGGAGCAAGTGAGAATATTTACGGTGCTTTAAATTGGTATCAGC  
GGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGATTTATGGCGCAAGTAATTTG  
GCAGATGGCATGTCATCGAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTAGACAGTA  
TTCTCTCAAGATCAGTAGCCTGCATCCTGACGATGTTGCAACGTATTAAGT  
TCAAAATGTATTAAGTAGTCCGTACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGG  
AAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCC  
AGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAA  
CTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAAC  
GACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAG  
CACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAAC  
GACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACACCAACTTCACCC  
ATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT  
**TAGAGACAAAGGTCCTGAGACGCCACCACCAGCTCCCCAGCTCCATCCTA**  
TCTTCCCTTCTAAGGTCTTGGAGGCTTCCCCACAAGCGACCTACCACTGTT  
GCGGTGCTCCAAACCTCCTCCCCACCTCCTTCTCCTCCTCCTCCCTTTCCTT  
GGCTTTTATCATGCTAATATTTGCAGAAAATATTCAATAAAGTGAGTCTTT  
GCACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO:12)

图 2

16C3杂交瘤IgG重链DNA, 全长序列:

ACGCGGGACACAGTAGTCTCTACAGTCACAGGAGTACACAGGACATTGCC  
ATGGGTTGGAGCTGTATCATCTTCTTTCTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTG  
 CACTCCCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGGTGGTGAGGCCTGG  
 GGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGGTTCGGCTACACATTCCTGATTA  
 TGCTATGCACTGGGTGAAGCAGAGTCATGCAAAGAGTCTCGAGTGGATTG  
 GACTTATTAGTACTTACAGTGGTGATACAAAGTACAACCAGAACTTTAAG  
 GGCAAGGCCACAATGACTGTAGACAAATCCTCCAACACAGCCTATATGGA  
 ACTTGCCAGATTGACATCTGAGGATTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGAGG  
 GGATTATCCGGTAGTAGGTAAGTGGTTTGGTTACTGGGGCCAAGGGACTCT  
 GGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGC  
 CCCTGGATCTGCTGCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGT  
 CAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCC  
 TGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACA  
 CTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACC  
 GTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAA  
 AATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCAATATGTACAGTCCCAGA  
 AGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCAT  
 TACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATG  
 ATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACA  
 GCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCGGCTCAGT  
 CAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCA  
 AATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCTGCCCCATCGAGAAAACCATC  
 TCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACC  
 TCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAA  
 CAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGCAG  
 CCAGCGGAGAATAACAAGAACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTC  
 TACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAG  
 GAAATACTTTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATA  
 CTGAGAAGAGCCTCTCCACTCTCCTGGTAAATGATCCCAGTGTCTTGGGA  
 GCCCTCTGGCCCTACAGGACTTTGACACCTACCTCCACCCCTCCCTGTATA  
 AATAAAGCACCCAGCACTGCCTCGGGACCCTGCATAAAAAAAAAAAAAAAAA  
 AAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO:13)

图 3

LMTQSPASLSASVGETVTITCGASENIYGALN WYQRKQKSPQLLIYGASNL  
ADGMSSRFSGSGRQYSLKISSLHPDDVATYYCQNVLSSPYTFGGGTKLEIK  
 KG (SEQ ID NO:14)

图 4



**LEESGPEVVRPGVSVKISCKGSGYTFTDYAMHWVKQSHAKSLEWIGLISTYS**  
**GDTKYNONFKGKATMTVDKSSNTAYMELARLTSEDSAIYYCARGDYSGSR**  
**YWEAYWGQGTTVTR (SEQ ID NO:15)**

图 5

**VL:**

	10	20	27	abc	def	30	35	40	49
16C3	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC	GASE-----	NIYGALN	WYQRKQ	GKSPQLLIY				
ven16C3	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITC	GASE-----	NIYGALN	WYQRKPGKSPKLLIY					
cdr16C3	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITC	GASE-----	NIYGALN	WYQRKPGKSPKLLIY					
abb16C3	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITC	QASE-----	NIYGALN	WYQRKPGKSPKLLIY					
sdr16C3	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITC	QASE-----	NIYGALN	WYQRKPGKSPKLLIY					
fra16C3	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITC	GASE-----	NIYGALN	WYQRKPGKSPNLLIY					

	60	70	80	88	95ab
16C3	GASNLAD	GMSSRFGSGSGRQYSLKISSLHPDDVATYYC	QNVLSSP--YT		
ven16C3	GASNLAD	GMPSRFGSGSGRQYTLTISSLPEDVATYYC	QNVLSSP--YT		
cdr16C3	GASNLAD	GMPSRFGSGSGRQYTLTISSLPEDVATYYC	QNVLSSP--YT		
abb16C3	GASNLAT	GMPSRFGSGSGTDTYFTTISSLPEDIATYYC	QNVLSSP--YT		
sdr16C3	GASNLAT	GMPSRFGSGSGRQYFTTISSLPEDIATYYC	QQVLSSP--YT		
fra16C3	GASNLAD	GMPSRFGSGSGRQYTLTISSLPEDVATYYC	QNVLSSP--YT		

	98	107
16C3	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:16)	
ven16C3	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:17)	
cdr16C3	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:18)	
abb16C3	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:19)	
sdr16C3	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:20)	
fra16C3	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:21)	

图 6

**VH:**

	10	20	30	ab	35	40	49
16C3	QVQLQQSGPEVVRPGVSVKISCKGSGYTFT			--DYAMH	WVKQSHAKSLEWIG		
ven16C3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCKGSGYTFT			--DYAMH	WVRQ <b>APGQR</b> LEWIG		
cdr16C3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCKGSGYTFT			--DYAMH	WVRQ <b>APGQGLE</b> WIG		
abb16C3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCKASGYTFT			--DYAMH	WVRQ <b>APGQR</b> LEW <b>MG</b>		
sdr16C3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCKASGYTFT			--DYAMH	WVRQ <b>APGQR</b> LEWIG		
fra16C3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCKGSGYTFT			--DYAMH	WVRQ <b>VHAQGLE</b> WIG		

	52abc	60	66	70	82abc	90	94
16C3	LIST--YSGDTKYNQNFKG	KATMTVDKSSNTAYMELARLTSEDSAIYYCAR					
ven16C3	LIST--YSGDTKYNQNFKG	KATMTVDKS <b>ASTAYMELSSLR</b> SEDTAVYYCAR					
cdr16C3	LIST--YSGDTKYNQNFKG	KATMTVD <b>TSISTAYMELSR</b> LRSDDTAIYYCAR					
abb16C3	LIST--YSGDTKYS <b>QKFQG</b>	RVTMTVDKS <b>ASTAYMELSSLR</b> SEDTAVYYCAR					
sdr16C3	LIST--YSGDTKYN <b>QKFOG</b>	KATMTVDKS <b>ASTAYMELSSLR</b> SEDTAVYYCAR					
fra16C3	LIST--YSGDTKYNQNFKG	KATMTVDK <b>STAYMELSSLR</b> SEDTAVYYCAR					

	100	abcdefghij	103	113
16C3	GDYSGSRYWF-----AY	WGQGT	LVTVSA	(SEQ ID NO:22)
ven16C3	GDYSGSRYWF-----AY	WGQGT	LVTV <b>SS</b>	(SEQ ID NO:23)
cdr16C3	GDYSGSRYWF-----AY	WGQGT	LVTV <b>SS</b>	(SEQ ID NO:24)
abb16C3	GDYSGSRYWF-----AY	WGQGT	LVTV <b>SS</b>	(SEQ ID NO:25)
sdr16C3	GDYSGSRYWF-----AY	WGQGT	LVTV <b>SS</b>	(SEQ ID NO:26)
fra16C3	GDYSGSRYWF-----AY	WGQGT	LVTV <b>SS</b>	(SEQ ID NO:27)

图 7

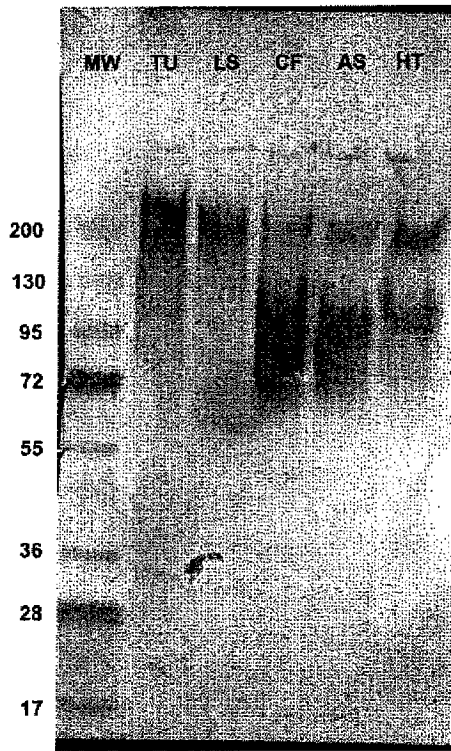


图 8

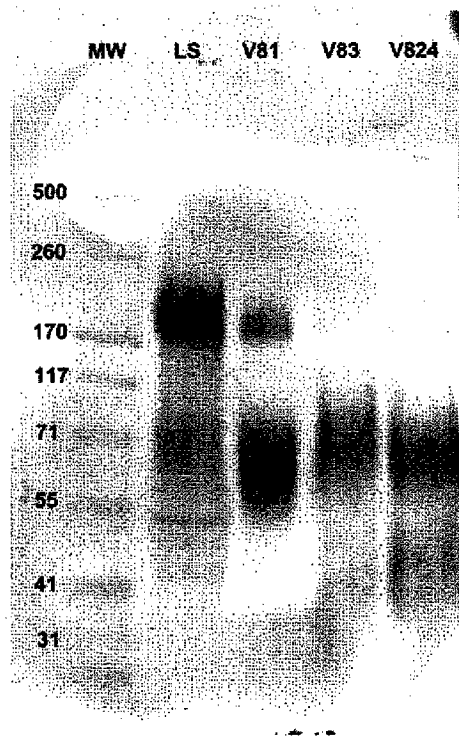


图 9

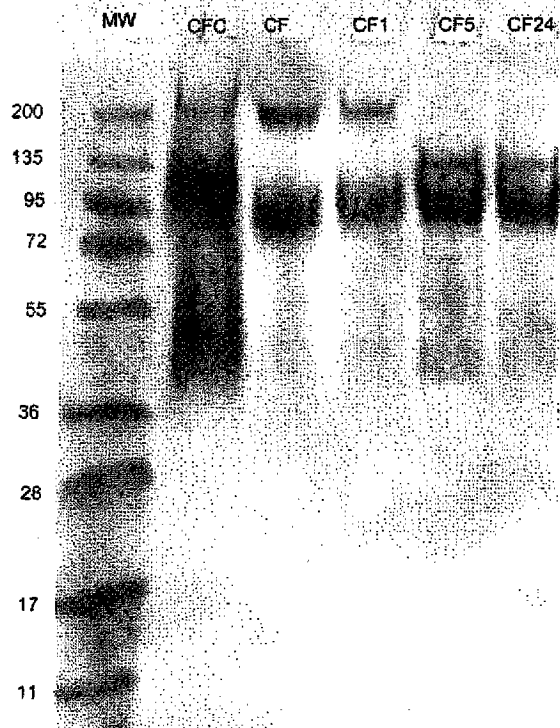


图 10

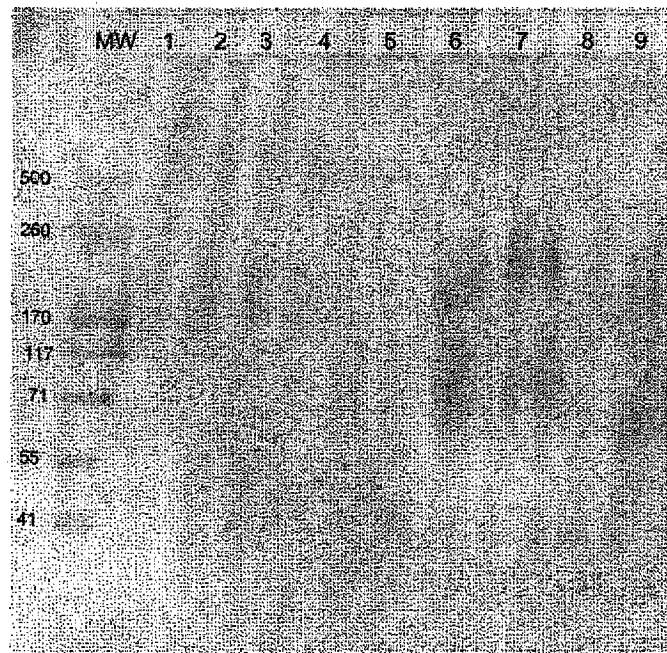


图 11

H16C3-Abb\* 重链:

MGWSCIIFFLVATATGVHS/QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDY  
AMHWVRQAPGQRLEWMGLISTYSGDTKYNONFOGRVTMTVDKSASTAY  
 MELSSLRSEDTAVYYCARGDYSGRYWFAYWGQGLVTVSS/ASTKGPSVFP  
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY  
 SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE  
 LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
 NYKTTTPVLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSKCSVMHEALHNHYTQKS  
 LSLSPGK (SEQ ID NO:28)

H16C3-Abb\* 轻链:

MGVPTQLLLLWLTVVVVRVRC/DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASENIYGAL  
NWYQRKPGKSPKLLIYGASNLATGMPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLQPEDATY  
 YC  
QOVLSSPYTFGGGTKLEIKR/TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP  
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVY  
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:29)

图 12