



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101918448 A

(43) 申请公布日 2010.12.15

(21) 申请号 200880121581.7

C07K 16/30(2006.01)

(22) 申请日 2008.12.18

(30) 优先权数据

61/014,716 2007.12.18 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.06.18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/087515 2008.12.18

(87) PCT申请的公布数据

W02009/079649 EN 2009.06.25

(71) 申请人 生物联合公司

地址 荷兰阿姆斯特丹

(72) 发明人 林士瑶 林麗文 蔡育英

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 49 页 附图 10 页

(54) 发明名称

识别癌细胞上表达的 CD-43 和 CEA 的含糖表位的抗体及其使用方法

(57) 摘要

本发明提供了抗体,所述抗体(例如嵌合和人源化抗体)与非造血系统癌细胞表达的 CD43 和 CEA 上的表位特异性结合。此外,本发明还提供本文描述的抗体用于诊断和治疗目的的用途。

1. 包含重链和轻链的分离的抗体,其中
 - (a) 重链包含含有来自 SEQ ID NO :1 氨基酸序列的 3 个互补决定区 (CDR) 的重链可变区,和含有 SEQ ID NO :9 氨基酸序列的重链恒定区,其中重链恒定区的铰链区含有至少一个氨基酸插入、缺失或取代 ;和
 - (b) 轻链包含含有 SEQ ID NO :2 氨基酸序列的 3 个互补决定区 (CDR) 的轻链可变区,和含有 SEQ ID NO :10 氨基酸序列的轻链恒定区,或含有 SEQ ID NO :10 的氨基酸序列并还含有至少一个氨基酸插入的轻链恒定区。
2. 权利要求 1 的抗体,其中抗体为人源化抗体。
3. 权利要求 1 的抗体,其中抗体为嵌合抗体。
4. 权利要求 1 的抗体,其中重链恒定区含有选自 SEQ ID NO :25-30 的氨基酸序列,轻链恒定区含有选自 SEQ ID NO :10 和 31-37 的氨基酸序列。
5. 权利要求 4 的抗体,其中重链恒定区含有 SEQ ID NO :27 的氨基酸序列。
6. 权利要求 4 的抗体,其中重链可变区含有 SEQ ID NO :1 的 20-137 位残基的氨基酸序列,重链恒定区含有 SEQ ID NO :27 的氨基酸序列,轻链可变区含有 SEQ ID NO :2 的 20-131 位残基的氨基酸序列,轻链恒定区含有 SEQ ID NO :10 的氨基酸序列。
7. 权利要求 4 的抗体,其中重链恒定区含有 SEQ ID NO :29 的氨基酸序列。
8. 权利要求 4 的抗体,其中重链可变区含有 SEQ ID NO :1 的 20-137 位残基的氨基酸序列,重链恒定区含有 SEQ ID NO :29 的氨基酸序列,轻链可变区含有 SEQ ID NO :2 的 20-131 位残基的氨基酸序列,轻链恒定区含有 SEQ ID NO :34 的氨基酸序列。
9. 权利要求 4 的抗体,其中重链可变区含有 SEQ ID NO :1 的 20-137 位残基的氨基酸序列,重链恒定区含有 SEQ ID NO :29 的氨基酸序列,轻链可变区含有 SEQ ID NO :2 的 20-131 位残基的氨基酸序列,轻链恒定区含有 SEQ ID NO :35 的氨基酸序列。
10. 药物组合物,其包含权利要求 1-9 中任一项所述的抗体,和可药用的载体。
11. 多核苷酸,其包含编码权利要求 1-9 中任一项所述的抗体的核酸序列。
12. 载体,其包含编码权利要求 1-9 中任一项所述的抗体的核酸序列。
13. 宿主细胞,其包含权利要求 12 的载体。
14. 生产抗体的方法,其包含培养权利要求 13 的宿主细胞,该宿主细胞生产由所述核酸编码的抗体,和从细胞培养物中回收抗体。
15. 由权利要求 14 的方法生产的抗体。
16. 生产抗体的方法,其包含在宿主细胞中表达 :
 - (a) 多核苷酸,其包含的核酸序列编码重链,该重链包含含有来自 SEQ ID NO :1 氨基酸序列的 3 个 CDR 区的重链可变区和含有选自 SEQ ID NO :11-30 的氨基酸序列的重链恒定区 ;
 - (b) 多核苷酸,其包含的核酸序列编码轻链,该轻链包含含有来自 SEQ ID NO :2 氨基酸序列的 3 个 CDR 区的轻链可变区和含有选自 SEQ ID NO :10 和 31-37 的氨基酸序列的恒定区,其中编码重链和轻链的多核苷酸在所述宿主细胞中共表达。
17. 权利要求 16 的方法,其中所述抗体为分离的。
18. 用于在患有癌症的个体中治疗非造血系统癌症的方法,其包括给个体施用有效量的组合物,该组合物包含权利要求 1-9 和 15 中任一项所述的的抗体,其中所述抗体与个体中的癌细胞结合。

19. 权利要求 18 的方法,其中非造血系统癌症是结肠直肠癌、胰腺癌或胃癌。
20. 权利要求 18 的方法,其中所述抗体与细胞毒素缀合。
21. 用于在个体中治疗非造血系统癌症的方法,其包括给个体施用一定量的权利要求 1-9 和 15 中任一项所述的抗体,和一定量的另一种抗癌剂,其中所述抗体与个体中的癌细胞结合,并且由此所述抗体与所述抗癌剂组合在个体中提供对癌症的有效治疗。
22. 权利要求 21 的方法,其中非造血系统癌症是结肠直肠癌、胰腺癌或胃癌。
23. 权利要求 21 的方法,其中所述抗癌剂是化疗剂。
24. 试剂盒,其包括药物组合物,该药物组合物包含权利要求 1-9 和 15 中任一项所述的抗体,和用于给个体施用有效量的所述药物组合物以治疗非造血系统癌症的说明书。
25. 权利要求 24 的试剂盒,其中所述试剂盒还包括用于给个体组合施用所述药物组合物与另一种抗癌剂,以治疗非造血系统癌症的说明书。
26. 试剂盒,其包括包含权利要求 1-9 和 15 中任一项所述的抗体的第一种药物组合物,和包含另一种抗癌剂的第二种药物组合物,及用于给个体组合施用第一种药物组合物和第二种药物组合物以治疗非造血系统癌症的说明书。

识别癌细胞上表达的 CD-43 和 CEA 的含糖表位的抗体及其使用方法

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2007 年 12 月 18 日提交的美国临时申请序列号 61/014,716 的优先权,所述美国临时申请整体引入本文作为参考。

技术领域

[0003] 本发明涉及识别非造血系统肿瘤或癌细胞上表达的 CD-43 和癌胚抗原 (CEA) 的含糖表位的抗体 (例如嵌合和人源化抗体)。这些抗体具有在不存在细胞毒素缀合和免疫效应子功能的情况下,在这些非造血系统肿瘤或癌细胞中诱导细胞死亡 (例如,凋亡) 的性质。这些抗体可以用作诊断和治疗剂。

背景技术

[0004] CD43 (也称为涎福林或白涎蛋白)——一种高唾液酸化的分子——在大多数人白细胞,包括所有 T 细胞和血小板,上以高水平表达,具有 115,000-135,000 的分子量。CD43 表达在具有威-奥二氏综合症的男性的 T 细胞上有缺陷,所述威-奥二氏综合症是 X 染色体连锁的隐性遗传免疫缺陷病症 (Remold-O' Donnell 等人 (1987) Blood 70(1):104-9; Remold-O' Donnell 等人 (1984) J. Exp. Med. 159:1705-23)。

[0005] 功能研究证实抗 CD43 单克隆抗体刺激外周血 T 淋巴细胞的增殖 (Mentzer 等人 (1987) J. Exp. Med. 1:165(5):1383-92; Park 等人 (1991) Nature, 350:706-9) 和单核细胞的激活 (Nong 等人 (1989) J. Exp. Med. 1:170(1):259-67)。单克隆抗 CD43 抗体 L11 阻断 T 细胞与淋巴结和淋巴集结 HEV 结合。抗体 L11 抑制 T 细胞从血液外溢到集结的次级淋巴组织内 (McEvoy 等人 (1997) J. Exp. Med. 185:1493-8)。识别 CD43 分子的单克隆抗体诱导以高密度表达 CD34 的谱系标记阴性骨髓造血祖细胞 (HPCs) (Bazil 等人 (1996) Blood, 87(4):1272-81。) 和人 T 类淋巴母细胞 (Brown 等人 (1996) J. Biol. Chem. 271:27686-95) 的凋亡。近期研究进一步指出 CD43 可以充当人 T 细胞上的 E-选择蛋白的配体 (Matsumoto 等人 (2005) J. Immunol. 175:8042-50; Fuhlbrigge 等人 (2006) Blood, 107:1421-6)。

[0006] 有趣的是,科学家也已发现某些非造血系统肿瘤细胞,特别是结肠直肠癌,在细胞表面上的确表达 CD43 分子。Santamaria 等人 (1996) Cancer Research, 56:3526-9; Baeckstrom 等人 (1995) J. Biol. Chem. 270:13688-92; Baeckstrom 等人 (1997) J. Biol. Chem. 272:11503-9; Sikut 等人 (1997) Biochem. Biophys. Res. Commun. 238:612-6。已显示在结肠癌细胞系 (COLO 205) 中表达的 CD43 上的聚糖与白细胞 CD43 上的聚糖不同 (Baeckstrom 等人 (1997) J. Biol. Chem. 272:11503-9)。尽管已暗示 CD43 的过表达引起肿瘤抑制蛋白 p53 的激活 (Kadaja 等人 (2004) Oncogene 23:2523-30) 和抑制 NF- κ B 靶基因的子集 (部分地经由对 p65 转录活性的抑制 (Laos 等人 (2006) Int. J. Oncol. 28:695-704), 但仍缺乏证实 CD43 在结肠肿瘤发生中的原因性作用的直接证据。由于常规抗 CD43 抗体与肿瘤和免疫 T 细胞均有强结合,故其作为非造血系统肿瘤细胞的治疗剂的用途是不实际

的。还需要产生与非造血系统肿瘤或癌细胞上表达的 CD43 特异性结合,但不与造血系统起源的白细胞或其他细胞上表达的 CD43 结合的抗体。这些抗体作为用于治疗表达 CD43 的非造血系统癌症的治疗剂可能是有用的。

[0007] CEA 通常表达于各种腺上皮组织(例如胃肠道、呼吸道和泌尿生殖道)中,在其中它看起来位于细胞的顶端表面(apical surface)(Hammarstrom, S. (1999) *Semin. Cancer Biol.* 9,67-81.)。在起于这些组织的肿瘤中,存在从顶膜区域延伸到整个细胞表面的递增水平的 CEA 表达,以及该蛋白质向血液内的分泌(Hammarstrom, S. (1999) *Semin. Cancer Biol.* 9,67-81.)。CEA 的过量表达在许多类型的癌症中观察到,包括结肠直肠癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、肝细胞瘤、乳腺癌和甲状腺癌。因此,CEA 已用作肿瘤标记,并且测量癌症患者血液中升高量的 CEA 的免疫学测定法长久以来已在临床上用于癌症的预后和控制(Gold P, 等人 (1965) *J. Expl. Med.* 122 :467-81 ;Chevinsky, A. H. (1991) *Semin. Surg. Oncol.* 7, 162-166 ;Shively, J. E. 等人, (1985) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2, 355-399)。

[0008] 更重要的是,CEA 已成为用于靶向治疗的潜在有用的肿瘤相关抗原(Kuroki M, 等人 (2002) *Anticancer Res* 22 :4255-64)。已开发了使用 CEA 作为癌症免疫治疗的靶的 2 种主要策略。一种方法是通过抗 CEA 抗体使自杀基因(一氧化氮合酶(iNOS)基因)(Kuroki M. 等人, (2000) *Anticancer Res.* 20 (6A) :4067-71) 或同位素(Wilkinson R W. 等人, (2001) *PNAS USA* 98, 10256-60, Goldenberg, D. M. (1991) *Am. J. Gastroenterol.* ,86 : 1392-1403, Olafsen T. 等人, *Protein Engineering, Design & Selection*, 17, 21-27, 2004) 特异性靶向表达 CEA 的肿瘤细胞。这种方法已扩展至与治疗剂缀合的抗体或抗体片段的使用,所述治疗剂例如药物、毒素、放射性核苷酸、免疫调节剂或细胞因子。另一种方法使用免疫细胞溶解活性,特别是通过抗体依赖性细胞毒性(ADCC) 或补体依赖性细胞毒性(CDC), 以消除表达 CEA 的肿瘤细胞(Imakiire T 等人, (2004) *Int. J. Cancer.* :108, 564-570)。这些方法通常造成细胞因子释放,导致全身性副作用。

[0009] 识别非造血系统癌细胞上表达的 CD-43 和 CEA 的含糖表位的抗体在美国专利申请公开号 2008/0171043 和 PCT WO 07/146172 中已有描述。这些抗体在不存在细胞毒素缀合和免疫效应子功能的情况下能诱导这些非造血系统癌细胞的凋亡。

[0010] 本文公开的所有参考文献、出版物和专利申请在此整体引入作为参考。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供了抗体(例如嵌合和人源化抗体),所述抗体与非造血系统癌细胞表达的 CD43 和 / 或 CEA 上的表位特异性结合,但不与白细胞或 Jurkat 细胞表达的 CD43 特异性结合,并且所述抗体在不存在细胞毒素缀合和免疫效应子功能的情况下,在与非造血系统癌细胞的细胞表面上表达的表位结合后,能够诱导该非造血系统癌细胞凋亡,其中所述表位包含糖,并且抗体与表位的结合被包含 Le^a 结构、Le^a- 乳糖结构、LNFH II 结构、或 LNT 结构的糖抑制。在某些实施方案中,与抗体结合的表位是岩藻糖敏感的。

[0013] 在某些实施方案中,抗体是来源于在重链恒定区的铰链区具有至少一个氨基酸插入、缺失或取代的鼠类抗体 m5F1 的嵌合或人源化抗体。

[0014] 在某些实施方案中,本发明提供了分离的抗体,所述抗体包含重链和轻链,其中:(a) 重链包含重链可变区和重链恒定区,所述重链可变区包含来自 SEQ ID NO :1 氨基酸序列的 3 个互补决定区,所述重链恒定区来自人 IgG1,其中在重链恒定区的铰链区中包含至

少一个氨基酸插入、缺失或取代；和 (b) 轻链包含轻链可变区和轻链恒定区，所述轻链可变区包含来自 SEQ ID NO :2 氨基酸序列的 3 个互补决定区，所述轻链恒定区来自人 κ 轻链或为包含至少一个氨基酸插入、缺失或取代的人 κ 轻链的轻链恒定区。在某些实施方案中，重链恒定区包含 SEQ ID NO :27 或 SEQ ID NO :29 的氨基酸序列。

[0015] 在某些实施方案中，在人 IgG1 铰链区氨基酸 K218 的 N- 端插入 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸，其中残基的编号采用 EU 编号系统。参见 Burton, *Mol. Immunol.* 22 : 161-206, 1985。在某些实施方案中，在氨基酸 K218 的 N- 端插入氨基酸残基 KSD。

[0016] 在某些实施方案中，抗体包含：(a) 含有来自 SEQ ID NO :1 氨基酸序列的 3 个互补决定区的重链可变区和含有选自 SEQ ID NO :11-30 的氨基酸序列的重链恒定区；和 (b) 含有来自 SEQ ID NO :2 氨基酸序列的 3 个互补决定区的轻链可变区和含有选自 SEQ ID NO :10 和 31-37 的氨基酸序列的轻链恒定区。在某些实施方案中，抗体是人源化抗体。在某些实施方案中，抗体是嵌合抗体。在某些实施方案中，重链可变区包含选自 SEQ ID NO :1、3 和 87-91 的氨基酸序列。在某些实施方案中，轻链可变区包含选自 SEQ ID NO :2、4 和 92-96 的氨基酸序列。在某些实施方案中，抗体的重链可变区包含 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :3 的 20-137 位氨基酸序列残基，或 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :3 的可变区氨基酸序列。在某些实施方案中，抗体的轻链可变区包含 SEQ ID NO :2 的 20-131 位氨基酸序列残基，或 SEQ ID NO :2 的可变区氨基酸序列，SEQ ID NO :4 的 21-132 位氨基酸序列残基，或 SEQ ID NO :4 的可变区氨基酸序列。

[0017] 在某些实施方案中，本发明的抗体包含重链和轻链，其中重链包含重链可变区和重链恒定区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO :1 的 20-137 位氨基酸序列残基或 SEQ ID NO :1 的可变区氨基酸序列，所述重链恒定区包含 SEQ ID NO :27 的氨基酸序列；轻链包含轻链可变区和轻链恒定区，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO :2 的 20-131 位氨基酸序列残基或 SEQ ID NO :2 的可变区氨基酸序列，所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO :10 的氨基酸序列。

[0018] 在某些实施方案中，本发明的抗体包含重链和轻链，其中重链包含重链可变区和重链恒定区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO :1 的 20-137 位氨基酸序列残基或 SEQ ID NO :1 的可变区氨基酸序列，所述重链恒定区包含 SEQ ID NO :29 的氨基酸序列；轻链包含轻链可变区和轻链恒定区，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO :2 的 20-131 位氨基酸序列残基或 SEQ ID NO :2 的可变区氨基酸序列，所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO :34 的氨基酸序列。

[0019] 在某些实施方案中，本发明的抗体包含重链和轻链，其中重链包含重链可变区和重链恒定区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO :1 的 20-137 位氨基酸序列残基或 SEQ ID NO :1 的可变区氨基酸序列，所述重链恒定区包含 SEQ ID NO :29 的氨基酸序列；轻链包含轻链可变区和轻链恒定区，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO :2 的 20-131 位氨基酸序列残基或 SEQ ID NO :2 的可变区氨基酸序列，所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO :35 的氨基酸序列。

[0020] 本发明还提供了本文描述的抗体的抗原结合片段。

[0021] 本发明还提供了包含一种或多种本文描述的抗体或其抗原结合片段的药物组合物和可药用的载体。

[0022] 本发明提供了包含编码本文描述的抗体的重链和 / 或本文描述的抗体的轻链或其片段的核苷酸序列的多核苷酸和载体。在某些实施方案中，多核苷酸和载体包含编码重链的核苷酸序列，所述重链包含含有 SEQ ID NO :1 的 3 个 CDR 区氨基酸序列的重链可变区

和含有选自 SEQ ID NO :11-30 的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方案中,多核苷酸和载体包含编码轻链的核苷酸序列,所述轻链包含含有 SEQ ID NO :2 的 3 个 CDR 区氨基酸序列的轻链可变区和含有选自 SEQ ID NO :10 和 31-37 的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0023] 本发明还提供了包含本文描述的多核苷酸和载体的宿主细胞。

[0024] 本发明还提供了生产本文描述的任何抗体或其抗原结合片段的方法。所述方法可能包括在合适的宿主细胞中表达一个或多个编码抗体(其可能以单独的重链或轻链分别表达,或重链和轻链从一个载体上表达)或其抗原结合片段的多核苷酸的步骤。在某些实施方案中,表达的抗体或其抗原结合片段被回收和/或分离。本发明还提供了由所述方法生产的抗体或抗原结合片段。

[0025] 本发明提供了用于治疗患癌个体中的非造血系统癌症的方法,其包括给个体施用有效量的包含本文描述的一种或多种抗体的组合物,其中一种或多种抗体与个体中的癌细胞结合。在某些实施方案中,非造血系统癌症是结肠直肠癌、胰腺癌或胃癌。在某些实施方案中,所述抗体和细胞毒素缀合。

[0026] 本发明提供了用于延迟个体中的非造血系统癌症进展(例如延迟和/或抑制癌症的进展)的方法,其包括给个体施用有效量的包含本文描述的一种或多种抗体的组合物,其中一种或多种抗体与个体中的癌细胞结合。在某些实施方案中,非造血系统癌症是结肠直肠癌、胰腺癌或胃癌。在某些实施方案中,所述抗体和细胞毒素缀合。

[0027] 本发明还提供了用于治疗个体中的非造血系统癌症的方法,其包括给个体施用一定量的本文描述的一种或多种抗体、和一定量的另一种抗癌剂,其中一种或多种抗体与个体中的癌细胞结合,并且由此一种或多种抗体和抗癌剂组合提供对个体中的癌症的有效治疗。在某些实施方案中,非造血系统癌症是结肠直肠癌、胰腺癌或胃癌。在某些实施方案中,抗癌剂是化疗剂。

[0028] 本发明还提供了包含一种或多种本文描述的抗体的药物组合物的试剂盒。在某些实施方案中,所述试剂盒还包含用于给个体施用有效量的药物组合物以治疗非造血系统癌症的说明书。在某些实施方案中,所述试剂盒包含与另一种抗癌剂组合施用药物组合物的说明书。在某些实施方案中,抗体包含:(a)含有来自 SEQ ID NO :1 氨基酸序列的 3 个 CDR 区的重链可变区和含有选自 SEQ ID NO :11-30 的氨基酸序列的重链恒定区;和(b)含有来自 SEQ ID NO :2 氨基酸序列的 3 个 CDR 区的轻链可变区和含有选自 SEQ ID NO :10 和 31-37 的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0029] 本发明还提供了包含以下所述的试剂盒:第一种药物组合物包含本文描述的抗体或抗原结合片段,第二种药物组合物包含另一种抗癌剂,和用于对个体组合施用第一种药物组合物和第二种药物组合物以治疗非造血系统癌症的说明书。

[0030] 应当理解,本文描述的多种实施方案中的一项、一些或全部产权可以结合以形成本发明的其他实施方案。本发明的这些和其他方面对本领域技术人员而言是显而易见的。

[0031] 附图简述

[0032] 图 1 显示了鼠类 IgG3 重链恒定区(SEQ ID NO :138)和人 IgG1 重链恒定区(SEQ ID NO :139)的氨基酸序列比较和比对。下划线为铰链区。如图所示,氨基酸同一性为 214/333(64.3%),相似性为 261/333(78.4%),空位为 6/333(1.8%)。

[0033] 图 2(A-E)显示了未修饰的和经修饰的人 IgG1 重链恒定区的氨基酸序列比较和比

对,图 2F 显示了未修饰的和经修饰的人 IgG1 κ 轻链恒定区的氨基酸序列比较和比对。

[0034] 图 3 显示了在流式细胞分析中不同浓度(从 0.125 μ g/ml 到 4 μ g/ml)的抗体 m5F1、c5F1v0、c5F1v15 和 c5F1v16 与 Co1o 205 的结合。对照抗体的背景信号(MFI)为:抗-小鼠二抗:3;抗-人二抗:3;小鼠 IgG:4;人 IgG:5。与背景信号相比,所有抗体 m5F1、c5F1v0、c5F1v15 和 c5F1v16 显示了与 Co1o 205 细胞的显著结合。

[0035] 图 4(A 和 B)显示了 h5F1M、h5F1 A Va、h5F1 A Vs、h5F1M Va 和 h5F1M Vs 的 VH(a) 和 VL(b) 之间的氨基酸序列比较和比对。

[0036] 发明详述

[0037] 定义

[0038] “抗体”是通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个抗原识别位点而能够与靶特异性结合的免疫球蛋白分子,所述靶例如糖、多核苷酸、脂质、多肽等。如本文所使用的,该术语不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,还包括其片段(例如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(ScFv)、突变体、包含抗体部分的融合蛋白、以及包含抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他经修饰的构型。抗体包括任何类型的抗体,例如 IgG、IgA 或 IgM(或其亚类),并且抗体无需是任何特定类型。依赖其重链的恒定结构域的抗体氨基酸序列,免疫球蛋白可以分为不同类。存在 5 大类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,并且其中的几类可以进一步分成亚类(同种型),例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。对应不同类的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。

[0039] 本发明的抗体还旨在包括具有抗体的至少一个 CDR 区域所赋予的多肽亲和力的双特异性、多特异性、单链、以及嵌合和人源化分子。本发明的抗体还包括单结构域抗体,其是抗体重链的可变结构域或抗体轻链的可变结构域。Holt 等人, Trends Biotechnol. 21: 484-490, 2003。制备结构域抗体的方法也是本领域已知的,所述结构域抗体包含抗体重链的可变结构域或抗体轻链的可变结构域,包含来自抗体的 6 个天然互补决定区中的 3 个。参见例如, Muijldermans, Rev. Mol. Biotechnol. 74:277-302, 2001。

[0040] 如本文所使用的,“单克隆抗体”指基本上均质的抗体中的抗体,即该群体中包含的各个单个抗体除了可能以小量存在的天然突变外,都是相同的。单克隆抗体一般是高特异性的,针对单个抗原位点。此外,与一般包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制品不同,每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。修饰词“单克隆”指抗体具有得自基本上均质的抗体群体的特征,而不应解释为需要通过任何特定方法生产抗体。例如,待依照本发明使用的单克隆抗体可以通过首先由 Kohler 和 Milstein, 1975, Nature, 256:495 描述的杂交瘤方法进行制备,或可以通过例如在美国专利号 4,816,567 中描述的重组 DNA 方法进行制备。单克隆抗体还可以从使用例如 McCafferty 等人, 1990, Nature, 348:552-554 中描述的技术产生的噬菌体文库中分离。

[0041] 如本文所使用的,“嵌合抗体”指具有来自第一物种的可变区或可变区的一部分和来自第二物种的恒定区的抗体。完整的嵌合抗体包含嵌合轻链的 2 个拷贝和嵌合重链的 2 个拷贝。嵌合抗体的生产是本领域已知的(Cabilly 等人(1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3273-3277; Harlow 和 Lane(1988), Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory)。一般地,在这些嵌合抗体中,轻和重链的可变区模拟源自一个

哺乳动物物种的抗体的可变区,而恒定区部分与源自另一哺乳动物物种的抗体的序列同源。在某些实施方案中,可变区和/或恒定区内可进行氨基酸修饰。

[0042] “分离的”抗体是已得到鉴定且与其天然环境的组分分离和/或从其中回收的抗体。

[0043] 如本文所使用的,“基本上纯的”指至少 50% 纯(即,不含污染物)、更优选至少 90% 纯、更优选至少 95% 纯、更优选至少 98% 纯、更优选至少 99% 纯的材料。

[0044] 如本文所使用的,“人源化”抗体指包含最少衍生自非人免疫球蛋白的序列的非人(例如鼠类)抗体形式,其是特异性嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链、或其片段(例如,抗体的 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或其他抗原结合子序列)。就大部分而言,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基由来自具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)例如小鼠、大鼠或兔的 CDR 的残基替换。在某些情况下,人免疫球蛋白的 Fv 构架区(FR)残基由相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可以包含这样的残基,其在受体抗体和导入的 CDR 或构架序列中均不存在,但被包括以进一步改善和最优化抗体性能。一般而言,人源化抗体将包含至少一个、和一般 2 个可变结构域的基本上全部,其中所有或基本上所有的 CDR 区对应非人免疫球蛋白的那些 CDR 区,而所有或基本上所有的 FR 区是具有人免疫球蛋白共有序列的那些 FR 区。人源化抗体最佳地还将包含至少部分免疫球蛋白(典型地,人免疫球蛋白)恒定区或结构域(Fc)。抗体可以具有如 WO 99/58572 中所述修饰的 Fc 区。其他形式的人源化抗体具有就原始抗体而言改变了的一个或多个 CDRs(1、2、3、4、5、6 个),其也称为“衍生自”原始抗体的一个或多个 CDRs 的一个或多个 CDRs。

[0045] 如本文所使用的,“人抗体”意指具有对应于人生产的抗体的氨基酸序列的抗体,和/或已使用本领域已知的或本文公开的用于制备人抗体的任何技术进行制备的抗体。人抗体的这个定义包括包含至少一个人重链多肽或至少一个人轻链多肽的抗体。一个此类例子是包含鼠类轻链和人重链多肽的抗体。人抗体可以使用本领域已知的各种技术进行生产。在一个实施方案中,人抗体选自噬菌体文库,其中所述噬菌体文库表达人抗体(Vaughan 等人,1996, *Nature Biotechnology*, 14 :309-314; Sheets 等人, (1998), *PNAS*, (USA) 95 :6157-6162; Hoogenboom 和 Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227 :381; Marks 等人, (1991), *J. Mol. Biol.*, 222 :581)。人抗体还可以通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物内例如小鼠内进行制备,在所述转基因动物中内源性免疫球蛋白基因已被部分或完全灭活。这种方法在美国专利号 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 和 5,661,016 中得到描述。可替代地,人抗体可以通过使产生抗靶抗原的抗体的人 B 淋巴细胞永生(此类 B 淋巴细胞可以从个体中回收或可以已在体外被免疫)而制备。参见例如, Cole 等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第 77 页 (1985); Boerner 等人, (1991), *J. Immunol.*, 147(1) :86-95; 和美国专利号 5,750,373。

[0046] 抗体的“可变区”指单独或组合的抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区。重和轻链的可变区各自由通过 3 个互补决定区(CDRs)连接的 4 个构架区(FR)组成,所述 CDRs 也称为高变区。每条链中的 CDRs 通过 FRs 紧靠在一起,并且与来自另一条链的 CDRs 一起促成抗体的抗原结合位点的形成。存在用于确定 CDRs 的至少 2 种技术:(1) 基于交叉物种序列变异性的方法(即, Kabat 等人 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*,

(第 5 版, 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD); 和 (2) 基于抗原 - 抗体复合物的晶体学研究的方法 (Al-lazikani 等人 (1997) *J. Molec. Biol.* 273 :927-948))。如本文所使用的, CDR 可以指由任一方法或 2 种方法的组合定义的 CDRs。

[0047] 抗体的“恒定区”指单独或组合的抗体轻链的恒定区或抗体重链的恒定区。抗体的恒定区一般提供结构稳定性和其他生物学功能, 例如抗体链结合、分泌、跨胎盘的移动和补体结合, 但不参与和抗原的结合。恒定区基因中的氨基酸序列和相应的外显子序列将取决于其所来源的物种; 但是, 在一个物种中对于特定的恒定区, 导致同种异型的氨基酸序列变异是相对有限的。每条链的可变区通过连接多肽序列与恒定区连接。连接序列由轻链基因中的“J”序列, 以及重链基因中的“D”序列和“J”序列的组合编码。

[0048] 如本文所使用的, “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”指细胞介导的反应, 其中表达 Fc 受体 (FcRs) 的非特异性细胞毒性细胞 (例如, 自然杀伤 (NK) 细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞) 识别靶细胞上结合的抗体, 且随后引起靶细胞的裂解。目的分子的 ADCC 活性可以使用体外 ADCC 测定法进行评估, 例如美国专利号 5, 500, 362 或 5, 821, 337 中描述的 ADCC 测定法。对于此类测定法有用的效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和 NK 细胞。可替代地, 或另外地, 目的分子的 ADCC 活性可以在体内例如在动物模型中进行评估, 所述动物模型例如在 Clynes 等人, 1998, *PNAS (USA)*, 95 :652-656 中公开的。

[0049] “补体依赖性细胞毒性”和“CDC”指在补体存在下对靶的裂解。补体激活途径由补体系统的第一组分 (C1q) 与复合了关联抗原的分子 (例如抗体) 的结合来起始。为了评估补体激活, 可以执行例如如 Gazzano-Santoro 等人, *J. Immunol. Methods*, 202 :163 (1996) 中描述的 CDC 测定法。

[0050] 术语“多肽”、“寡肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用, 指任何长度的氨基酸的聚合物。聚合物可以是线性的或分支的, 它可以包含经修饰的氨基酸, 并且它可以由非氨基酸间断。该术语还包含已天然或通过干预进行修饰的氨基酸聚合物; 例如二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化、或任何其他操作或修饰, 例如与标记组分缀合。这个定义内还包括的是例如包含氨基酸的一种或多种类似物 (包括例如, 非天然氨基酸等) 的多肽, 以及本领域已知的其他修饰。应当理解, 因为本发明的多肽基于抗体, 所以该多肽可以以单链或结合的链的形式存在。

[0051] 如本文可互换使用的, “多核苷酸”或“核酸”指任何长度的核苷酸的聚合物, 且包括 DNA 和 RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核苷酸或碱基、和 / 或其类似物、或可以通过 DNA 或 RNA 聚合酶掺入聚合物内的任何底物。多核苷酸可以包含经修饰的核苷酸, 例如甲基化的核苷酸及其类似物。如果存在对核苷酸结构的修饰, 则该修饰可以在聚合物装配前或后赋予。核苷酸的序列可以由非核苷酸组分间断。多核苷酸可以在聚合后进一步修饰, 例如通过与标记组分缀合。其他类型的修饰包括例如, “加帽”、用类似物取代一个或多个天然存在的核苷酸、核苷酸间修饰, 例如具有不带电荷的键 (例如, 甲基磷酸酯、磷酸三酯、磷酸胺酯 (phosphoamidate)、氨基甲酸酯等) 和具有带电荷的键 (例如, 硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等) 的那些修饰, 包含悬挂部分例如蛋白质 (例如, 核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚 L- 赖氨酸等) 的那些修饰, 具有嵌合剂 (例如吡啶、补骨脂素等) 的那些修饰, 包含螯合剂 (例如, 金属、放射性金属、硼、氧化性金属等) 的那些修饰, 包含烷化剂的那些, 具有经修饰的键 (例如, α 异头核酸等) 的那些修饰, 以及未经修饰的多核苷酸形式。

此外,糖中通常存在的任何羟基可以例如由磷酸酯基团、磷酸酯基取代,由标准保护基团保护,或激活以制备与另外的核苷酸的另外连接,或可以与固体载体缀合。5' 和 3' 末端 OH 可以进行磷酸化,或用 1-20 个碳原子的胺或有机封端基团部分进行取代。其他羟基也可以衍生化成标准保护基团。多核苷酸还可以包含本领域一般已知的核糖或脱氧核糖的类似形式,包括例如 2' -O- 甲基-, 2' -O- 烯丙基-, 2' - 氟 - 或 2' - 叠氮基 - 核糖, 碳环糖类类似物, 糖的 α - 异头物, 糖的差向异构体例如阿拉伯糖、木糖或来苏糖, 吡喃糖, 呋喃糖, 景天庚酮糖, 无环类似物和无碱基核苷类似物例如甲基核苷。一个或多个磷酸二酯键可以由可替代的连接基团替换。这些可替代的连接基团包括但不限于, 其中磷酸酯由 P(O)S(“硫代酯”)、P(S)S(“二硫代酯”)、" (O)NR₂(“酰胺酯”)、P(O)R、P(O)OR'、CO 或 CH₂(亚甲基缩醛“formacetal”) 替换的实施方案, 其中每个 R 或 R' 独立地是 H 或取代的或未取代的烷基 (1-20C), 所述烷基任选包含醚 (-O-) 键、芳基、链烯基、环烷基、环烯基或 araldyl。多核苷酸中的所有键不必都相同。先前描述适用于本文提及的所有多核苷酸, 包括 RNA 和 DNA。

[0052] 如本文所使用的,“载体”意指能够在宿主细胞中递送和优选表达一种或多种目的基因或序列的构建体。载体的例子包括但不限于病毒载体、裸 DNA 或 RNA 表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子缩合剂 (condensing agent) 结合的 DNA 或 RNA 表达载体、封装在脂质体中的 DNA 或 RNA 表达载体、和某些真核细胞例如生产细胞。

[0053] 如本文所使用的,“表达控制序列”意指指导核酸转录的核酸序列。表达控制序列可以是启动子,例如组成型或诱导型启动子,或增强子。表达控制序列与待转录的核酸序列可操作地连接。

[0054] 如本文所使用的,药物、化合物或药物组合物的“有效剂量”或“有效量”是足以实现有利或期望结果的量。对于预防用途,有利或期望结果包括这样的结果,例如消除或减少疾病的危险、减轻疾病的严重度、或延迟疾病的发作,所述疾病包括疾病的生物化学、组织学和 / 或行为症状、其并发症和在疾病发展期间呈现的中间病理表型。对于治疗用途,有利或期望结果包括临床结果,例如减少起因于疾病的一种或多种症状,增加患有疾病的个体的生活质量,减少治疗疾病所需的其他药物的剂量,例如经由靶向作用增强另一种药物的效果,延迟疾病的进展,和 / 或延长存活。在癌症或肿瘤的情况下,药物的有效量可以在下述方面具有作用:减少癌细胞数目;减少肿瘤大小;抑制(即,一定程度地减慢和优选终止)癌细胞向外周器官的浸润;抑制(即,一定程度地减慢和优选终止)肿瘤转移;一定程度地抑制肿瘤生长;和 / 或一定程度地减轻与病症相关的一种或多种症状。有效剂量可以在一次或多次施用中给予。为了本发明的目的,药物、化合物或药物组合物的有效剂量是足以直接或间接地实现预防或治疗的量。如临床中所理解的,药物、化合物或药物组合物的有效剂量可以通过与另一种药物、化合物或药物组合物组合或不组合而达到。因此,在施用一种或多种治疗剂的情况下可以考虑“有效剂量”,并且如果单个活性剂组合一种或多种其它活性剂达到了或者可以达到期望结果,则可以认为该单个活性剂是以有效量给予的。

[0055] 如本文所使用的,“与 组合”指除了一种治疗形式外还施用另一种治疗形式。由此,“与 组合”指一种治疗形式在另一种治疗形式施用于个体之前、之时或之后施用。

[0056] 如本文所使用的,“治疗”是用于获得有利或期望结果,包括和优选临床结果的方

法。为了本发明的目的,有利或所需临床结果包括但不限于,下述中的一种或多种:减少(或破坏)癌细胞的增殖、减少起于疾病的症状、增加患有疾病的个体的生活质量、减少治疗疾病所需的其他药物的剂量,延迟疾病的进展,和/或延长个体的存活。

[0057] 如本文所使用的,“延迟疾病的进展”意指推迟、阻碍、减慢、延迟、稳定、和/或推迟疾病(例如癌症)的进展。依赖于待治疗的个体和/或疾病史,这种延迟可以具有不同的时间长度。如对于本领域技术人员显而易见的,足够或显著的延迟事实上可以包含预防,即个体不出现该疾病。例如,晚期癌症,例如转移的发生,可以被延迟。

[0058] “个体”或“受试者”是哺乳动物,更优选人。哺乳动物还包括但不限于,家畜、运动动物、宠物(例如猫、犬、马)、灵长类动物、小鼠和大鼠。

[0059] 如本文所使用的,术语“特异性识别”或“特异性结合”指靶和抗体之间的可测量和可再现的相互作用,例如吸引或结合,这可以在异质分子(包括生物分子)群体存在下确定靶的存在。例如,与表位特异性或优先结合的抗体是这样的抗体,该抗体与该表位的结合,相比较于该抗体与靶的其他表位或非靶表位的结合,具有更大的亲和性、亲合力、更为容易、和/或持续更长的时间。通过阅读此定义,也应当理解,例如,与第一靶特异性或优先结合的抗体(或部分或表位)可能可以或可能不可以与第二靶特异性或优先结合。由此,“特异性结合”或“优先结合”不一定要(尽管它可以包括)专一结合。与靶特异性结合的抗体可以具有至少约 $10^3 M^{-1}$ 或 $10^4 M^{-1}$,有时约 $10^5 M^{-1}$ 或 $10^6 M^{-1}$,在其他情况下约 $10^6 M^{-1}$ 或 $10^7 M^{-1}$ 、约 $10^8 M^{-1}$ 至 $10^9 M^{-1}$ 、或约 $10^{10} M^{-1}$ 至 $10^{11} M^{-1}$ 或更高的结合常数。各种免疫测定法形式均可以用于选择与特定蛋白质发生特异性免疫反应的抗体。例如,固相 ELISA 免疫测定法常规用于选择与蛋白质发生特异性免疫反应的单克隆抗体。关于可以用于测定特定免疫反应性的免疫测定法形式和条件的描述,参见例如,Harlow 和 Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York。

[0060] 如本文所使用的,术语“癌症”、“肿瘤”、“癌性”和“恶性”指或描述哺乳动物中典型特征在于不受调节的细胞生长的生理情况。癌症的例子包括但不限于,癌,包括腺癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、黑素瘤和肉瘤。此类癌症的更具体的例子包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、胃肠癌、何杰金氏和非何杰金氏淋巴瘤、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、神经胶质瘤、卵巢癌、肝脏癌症例如肝癌和肝细胞瘤、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌例如肾细胞癌和肾胚细胞瘤、基底细胞癌、黑素瘤、前列腺癌、甲状腺癌、睾丸癌、食管癌、和各种类型的头颈癌。

[0061] 如本文和后附权利要求中所使用的,除非上下文另有明确说明,单数形式“a”、“an”和“the”包括对复数的提及。例如,提及“an”“抗体”是提及一个至多个抗体,例如摩尔量,且包括本领域技术人员已知的其等价形式等等。

[0062] 应当理解本文描述的本发明的方面和变化包括由方面和变化“组成”和/或基本上由方面和变化“组成”。

[0063] 与非造血系统癌细胞上表达的 CD43 和 CEA 上的糖表位特异性结合的抗体和多肽

[0064] 本发明提供了分离的抗体和衍生自抗体的多肽,所述抗体和多肽与非造血系统癌细胞表达的 CD43 和/或 CEA 上的表位特异性结合,但不与白细胞(例如外周 T 细胞)或 Jurkat 细胞表达的 CD43 特异性结合。

[0065] 在某些实施方案中,本发明提供的抗体包含:含有 SEQ ID NO:1 一个或多个 CDR 区

的重链可变区和人 IgG1 的重链恒定区。在某些实施方案中,抗体包含含有 SEQ ID NO :2 一个或多个 CDR 区的轻链可变区和 κ 轻链恒定区。

[0066] 在某些实施方案中,抗体的重链恒定区和 / 或轻链恒定区的一个或多个氨基酸残基被修饰 (包括氨基酸插入、缺失和取代)。例如,实施例中所示的氨基酸残基可被修饰。

[0067] 在某些实施方案中,本发明提供的抗体包含:(a) 含有来自 SEQ ID NO :1 氨基酸序列的一个或多个 CDR 区的重链可变区和含有选自 SEQ ID NO :11-30 的氨基酸序列的重链恒定区;和 (b) 含有来自 SEQ ID NO :2 氨基酸序列的一个或多个 CDR 区的轻链可变区和含有选自 SEQ ID NO :10 和 31-37 的氨基酸序列的轻链恒定区。在某些实施方案中,来自 SEQ ID NO :1 氨基酸序列的一个或多个 CDR 区为来自 SEQ ID NO :1 氨基酸序列的 3 个 CDR 区。在某些实施方案中,来自 SEQ ID NO :2 氨基酸序列的一个或多个 CDR 区为来自 SEQ ID NO :2 氨基酸序列的 3 个 CDR 区。在某些实施方案中,重链中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 分别包含氨基酸序列 SYVMH (SEQ ID NO :168)、YINPYNGGTQYNEKFKG (SEQ ID NO :169) 和 RTFPYYFDY (SEQ ID NO :170)。在某些实施方案中,轻链中的 CDR1、CDR2 和 CDR 3 分别包含氨基酸序列 RSSQSILHSNGNTYLE (SEQ ID NO :171)、KVSNRFS (SEQ ID NO :172) 和 FQGSHPALT (SEQ ID NO :173)。在某些实施方案中,重链可变区包含来自 SEQ ID NO :1 或 3 的可变区氨基酸序列。在某些实施方案中,轻链可变区包含来自 SEQ ID NO :2 或 4 的可变区氨基酸序列。

[0068] 在某些实施方案中,来自 SEQ ID NO :1 和 / 或 SEQ ID NO :2 的一个或多个 CDR 与 SEQ ID NO :1 和 / 或 SEQ ID NO :2 的至少 1 个、至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个或至少 6 个 CDR 具有至少约 85%、至少约 86%、至少约 87%、至少约 88%、至少约 89%、至少约 90%、至少约 91%、至少约 92%、至少约 93%、至少约 94%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98% 或至少约 99% 的同一性。

[0069] 本发明的抗体和多肽还可以具有一个或多个下述特征:(a) 如果包含表位的分子用 α -1 \rightarrow (2,3,4)-岩藻糖苷酶处理,那么抗体或多肽与表位的结合将减少;(b) 抗体或多肽与表位的结合受包含 Le^a 结构、Le^a-乳糖结构、LNDFH II 结构、和 / 或 LNT 结构的糖抑制;(c) 在不存在细胞毒素缀合和免疫效应子功能的情况下,在与癌细胞的细胞表面上表达的表位结合后,诱导非造血系统癌细胞死亡 (例如通过凋亡);(d) 在与癌细胞的细胞表面上表达的表位结合后,抑制非造血系统癌细胞的细胞生长或增殖;和 (e) 治疗或预防个体中在细胞表面上表达表位的非造血系统癌症,例如结肠直肠癌和胃癌。

[0070] 如本文所使用的,术语“抑制”包括部分和完全抑制。例如,抗体或多肽与 CD43 和 CEA 上的表位的结合被包含 Le^a 结构、Le^a-乳糖结构、LNDFH I 结构、或 LNT 结构的糖抑制至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、或至少约 90%。抗体与表位的结合可以被直接竞争或被其他机制抑制。

[0071] 表达表位的非造血系统癌细胞的例子包括但不限于,结肠直肠癌细胞 (例如 COLO 205 和 DLD-1) 和胃癌细胞 (例如 NCI-N87),和胰腺癌细胞 (例如 SU. 86. 86, ATCC No. CRL-1837)。

[0072] 本发明的抗体和多肽可以识别非造血系统癌细胞上存在的 CD43 的胞外域,但不与白细胞 CD43 (例如,外周 T 细胞) 的胞外域、或 Jurkat 细胞 (类淋巴母细胞性白血病细胞) 上表达的 CD43 的胞外域结合。在某些实施方案中,本发明的新抗体或多肽不与造血系统起源的细胞表达的 CD43 特异性结合。

[0073] 本发明包含对本文描述的抗体或多肽的修饰,包括不会显著影响其性质的功能上等价的抗体,和具有增强的或减少的活性和/或亲和力的变体。例如,抗体的氨基酸序列可以进行突变,以获得对于癌细胞表达的 CD43 或 CEA 具有所需结合亲和力的抗体。多肽的修饰是本领域的常规实践,无需在本文中详细描述。经修饰的多肽的例子包括如下多肽,所述多肽具有氨基酸残基的保守取代,不会显著不利地改变功能活性的一个或多个氨基酸的缺失或添加、或化学类似物的使用。

[0074] 氨基酸序列插入包括长度从 1 个残基到包含 100 个或更多残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有 N 末端甲硫氨酰残基的抗体或与表位标签融合的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的 N 或 C 末端与酶或增加抗体的血清半衰期的酶或多肽的融合。

[0075] 取代变体在抗体分子中去除了至少一个氨基酸残基并在其位置上插入了不同残基。对于取代诱变具有最大意义的位点包括高变区,但 FR 改变也可以考虑。保守取代在下表中的“保守取代”标题下显示。如果此类取代导致生物活性的改变,那么可以引入在下表中命名为“示例性取代”,或如下文就氨基酸类别而言进一步描述的更实质的变化,且筛选产物。

[0076] 表 1 :氨基酸取代

[0077]

原始残基	保守取代	示例性取代
Ala (A)	Val	Val ;Leu ;Ile
Arg (R)	Lys	Lys ;Gln ;Asn
Asn (N)	Gln	Gln ;His ;Asp, Lys ; Arg
Asp (D)	Glu	Glu ;Asn
Cys (C)	Ser	Ser ;Ala
Gln (Q)	Asn	Asn ;Glu
Glu (E)	Asp	Asp ;Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn ;Gln ;Lys ;Arg ;
Ile (I)	Leu	Leu ;Val ;Met ;Ala ; Phe ;正亮氨酸

Leu (L)	Ile	正亮氨酸 ;Ile ;Val ; Met ;Ala ;Phe
Lys (K)	Arg	Arg ;Gln ;Asn
Met (M)	Leu	Leu ;Phe ;Ile
Phe (F)	Tyr	Leu ;Val ;Ile ;Ala ; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr ;Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp ;Phe ;Thr ;Ser
Val (V)	Leu	Ile ;Leu ;Met ;Phe ; Ala ;正亮氨酸

[0078]

[0079] 抗体生物学性质的实质性修饰可以通过选择在维持下述方面的作用上具有显著不同的取代来完成：(a) 取代区域中的多肽主链的结构，例如作为片层或螺旋构象，(b) 分子在靶位点上的电荷或疏水性，或 (c) 侧链的体积。天然存在的残基基于共同的侧链性质分成以下组：

[0080] (1) 非极性：正亮氨酸，Met，Ala，Val，Leu，Ile；

[0081] (2) 不带电荷的极性：Cys，Ser，Thr，Asn，Gln；

[0082] (3) 酸性（带负电荷）：Asp，Glu；

[0083] (4) 碱性（带正电荷）：Lys，Arg；

[0084] (5) 影响链取向的残基：Gly，Pro；和

[0085] (6) 芳香族：Trp，Tyr，Phe，His。

[0086] 非保守取代通过将这类别之一的成员换成另一个类别来实现。

[0087] 不涉及抗体的正确构象维持的任何半胱氨酸残基也可以一般用丝氨酸进行取代，以改善分子的抗氧化性且阻止异常交联。相反，半胱氨酸键可以加入抗体中以改善其稳定性，特别是当抗体是抗体片段例如 Fv 片段时。

[0088] 氨基酸修饰可以从变化或修饰一个或多个氨基酸到完全重新设计区域例如可变区。可变区中的变化可以改变结合亲和力和 / 或特异性。在某些实施方案中，在 CDR 结构域内进行不超过 1-5 个保守氨基酸取代。在其他实施方案中，在 CDR 结构域内进行不超过

1-3 个保守氨基酸取代。在另外其他的实施方案中, CDR 结构域是 CDRH3 和 / 或 CDR L3。

[0089] 修饰还包括糖基化和非糖基化的多肽, 以及具有其他翻译后修饰的多肽, 例如具有不同糖的糖基化、乙酰化和磷酸化。抗体在其恒定区中在保守位置上进行糖基化 (Jefferis 和 Lund, (1997), Chem. Immunol. 65 :111-128 ;Wright 和 Morrison, (1997), TibTECH 15 :26-32)。免疫球蛋白的寡糖侧链影响蛋白质的功能 (Boyd 等人, (1996), Mol. Immunol. 32 :1311-1318 ;Wittwe 和 Howard, (1990), Biochem. 29 :4175-4180) 和糖蛋白的部分之间的分子内相互作用, 这可以影响糖蛋白的构象和呈现的三维表面 (Hefferis 和 Lund, 同上 ;Wyss 和 Wagner, (1996), Current Opin. Biotech. 7 :409-416)。基于特异识别结构, 寡糖也可以用于使给定糖蛋白靶向某些分子。抗体的糖基化已报道影响抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。特别地, 具有四环素调节的 β (1,4)-N-乙酰葡萄糖氨基转移酶 III (GnTIII) 表达的 CHO 细胞被报道具有改善的 ADCC 活性 (Umana 等人, 1999, Mature Biotech. 17 :176-180), 所述 GnTIII 是催化平分型 (bisecting) GlcNAc 形成的糖基转移酶。

[0090] 抗体的糖基化一般是 N 联或 O 联的。N 联指糖部分与天冬酰胺残基的侧链附着。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸、天冬酰胺-X-苏氨酸、和天冬酰胺-X-半胱氨酸是糖部分与天冬酰胺侧链进行酶促附着的识别序列, 其中 X 是除脯氨酸外的任何氨基酸。因此, 这些三肽序列之任一在多肽中的存在都将造成潜在糖基化位点。O 联糖基化指糖 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一与羟基氨基酸的附着, 最常见地丝氨酸或苏氨酸, 尽管 5-羟脯氨酸或 5-羟赖氨酸也可以使用。

[0091] 给抗体添加糖基化位点可以通过改变氨基酸序列, 使得它包含上述三肽序列中的一个或多个 (对于 N 联糖基化位点) 而方便地完成。改变还可以通过给原始抗体的序列添加或取代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来完成 (对于 O 联糖基化位点)。

[0092] 也可以改变抗体的糖基化模式而不改变基础核苷酸序列。糖基化在很大程度上依赖于用于表达抗体的宿主细胞。因为用于表达重组糖蛋白例如抗体作为潜在治疗剂的细胞类型很少是天然细胞, 所以可以预期抗体的糖基化模式的变化 (参见例如 Hse 等人, (1997), J. Biol. Chem. 272 :9062-9070)。

[0093] 本发明的抗体可以包括抗体片段 (例如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fc 等)、嵌合抗体、单链 (ScFv)、它们的突变体、包含抗体部分的融合蛋白、以及包含所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他经修饰的构型。抗体可以是小鼠、大鼠、骆驼、人、或任何其他起源 (包括人源化抗体)。

[0094] 多肽 (包括抗体) 与 CD43 或 CEA 的结合亲和力可以小于约 500nM、约 400nM、约 300nM、约 200nM、约 100nM、约 50nM、约 10nM、约 1nM、约 500pM、约 100pM 或约 50pM 中的任何一个。如本领域众所周知的, 结合亲和力可以表示为 K_D 、或解离常数, 增加的结合亲和力对应减少的 K_D 。测定抗体与 CD43 或 CEA 的结合亲和力的一种方法是测量抗体的单功能 Fab 片段的结合亲和力。为了获得单功能 Fab 片段, 抗体 (例如, IgG) 可以用木瓜蛋白酶进行切割或重组表达。抗体的 Fab 片段的亲和力可以通过表面等离子体共振 (BIAcore3000 表面等离子体共振 (SPR) 系统, BIAcore, INC, Piscaway NJ) 和 ELISA 进行测定。获得动力学结合速率 (K_{on}) 和解离速率 (K_{off}) (一般在 25°C 测量); 并且平衡解离常数 (K_D) 值计算为 K_{off}/K_{on} 。

[0095] 在某些实施方案中, 本发明的抗体和多肽减少癌细胞数目, 和 / 或抑制具有表位

的肿瘤或癌细胞的细胞生长或增殖。优选地,与未用抗体或多肽处理的细胞比较,细胞数目中的减少或者细胞生长或增殖的抑制是至少约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 65%、约 75%或更高。癌细胞包括但不限于结肠直肠癌、胰腺癌、肺癌、胃癌。

[0096] 在某些实施方案中,在与非造血系统癌细胞的细胞表面上表达的表位结合后,本发明的抗体和多肽能够单独诱导细胞死亡,例如通过凋亡途径。如本文所使用的,术语“诱导细胞死亡”意指本发明的抗体或多肽可以与细胞表面上表达的分子直接相互作用,并且该结合/相互作用单独足以在细胞中诱导细胞死亡而无需其他因素例如细胞毒素缀合或其他免疫效应子功能(即补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、或吞噬作用)的帮助。

[0097] 如本文所使用的,术语“凋亡”指由基因指导的细胞内细胞毁坏过程。凋亡不同于坏死;它包括细胞骨架破坏、细胞质收缩和浓缩、磷脂酰丝氨酸在细胞膜的外表面上的表达和起泡,从而导致细胞膜结合性小泡或凋亡小体的形成。该过程也称为“程序性细胞死亡”。在凋亡期间,观察到特征性现象例如弯曲的细胞表面、核染色质的浓缩、染色体 DNA 的断裂、和线粒体功能的丧失。各种已知的技术可以用于检测凋亡,例如用膜联蛋白 V、碘化丙啶、DNA 断裂测定法和 YO-PRO-1 (Invitrogen) 染色细胞。

[0098] 检测细胞死亡(例如凋亡)的方法包括但不限于检测形态、DNA 断裂、酶活性、和多肽降解等。参见引入本文作为参考的 Siman 等人,美国专利号 6,048,703;Martin 和 Green(1995), Cell, 82 :349-52;Thomberry 和 Lazebnik(1998), Science, 281 :1312-6; Zou 等人,美国专利号 6,291,643;Scovassi 和 Poirier(1999), Mol. Cell Biochem., 199 :125-37;Wyllie 等人,(1980), Int. Rev. Cytol, 68 :251-306;Belhocine 等人(2004), Technol. Cancer Res. Treat., 3(1) :23-32。

[0099] 在某些实施方案中,本发明的抗体和多肽识别在非造血系统癌细胞上表达的构象表位,这种表位包括与三肽 N'-Trp-Pro-Ile-C' 所形成的结构具有等价的物理和化学特征的结构。如本文所使用的,“表位包括与肽所形成的结构具有等价的物理和化学特征的结构”意指 2 种结构具有相似的与抗体结合相关的物理和化学性质,从而使得与一种结构特异性结合的抗体将与 2 种结构均可以发生结合。在某些实施方案中,抗体和多肽与在 N 端包含 N'-Trp-Pro-Ile-C' 氨基酸序列的多肽结合。

[0100] 在某些实施方案中,本发明的抗体和多肽与抗体 m5F1 或 h5F1 竞争结合癌细胞的细胞表面上表达的表位。在某些实施方案中,本发明的抗体或多肽与抗体 m5F1 或 h5F1 中的至少一种所结合的 CD43 或 CEA 上的表位结合。

[0101] 竞争测定法可以用于确定 2 种抗体是否可以通过识别相同或空间上重叠的表位而结合相同表位,或一种抗体是否可以竞争性抑制另一种抗体与抗原的结合。这些测定法是本领域已知的,并且在实施例中详细描述。一般地,将抗原或抗原表达细胞固定在多孔板上,并且测量未标记的抗体阻断标记抗体结合的能力。用于此类竞争测定法的常用标记是放射性标记或酶标记。

[0102] 在某些实施方案中,CDR 是 Kabat CDR。在其他实施方案中,CDR 是 Chothia CDR。在其他实施方案中,CDR 是 Kabat 和 Chothia CDR 的组合(也称为“组合的 CDR”或“扩展的 CDR”)。换言之,对于包含超过一个 CDR 的任何给定实施方案,CDR 可以是 Kabat、Chothia 和/或组合的 CDR 中的任何一种。

[0103] 制备抗体和衍生自抗体的多肽的方法是本领域已知的且在本文中公开。抗体可以就与非造血系统癌症或肿瘤细胞表达的 CD-43 或 CEA 上的表位具有特异性结合、但与表达 CD43 的白细胞、Jurkat 细胞、和 / 或其他造血系统起源的 CD43 表达细胞无特异性结合而进行检测。包含表位的癌细胞或胞外域 (包括其片段) 可以用于检测。

[0104] Jurkat 细胞系是类淋巴母细胞性白血病细胞,由 Schneider 等人从 14 岁男孩的外周血建立。Schneider 等人, *Int. J. Cancer* 19 :621*626,1977。各种 Jurkat 细胞系可以例如从美国典型培养物保藏中心商购获得 (例如, ATCC TIB-152、ATCC TIB-153、ATCC CRL-2678)。

[0105] 生产的抗体的结合特异性可通过免疫沉淀或通过体外结合测定法测定,例如放射性免疫测定法 (RIA) 或酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 进行测定。此类技术和测定法是本领域已知的。单克隆抗体的结合亲和力可以例如通过 Munson 和 Pollard (1980), *Anal. Biochem.*, 107 :220 的 Scatchard 分析进行测定。

[0106] 鉴定的抗体可以使用本领域已知的和本文描述的方法就其诱导细胞死亡 (例如, 凋亡)、和 / 或抑制细胞生长或增殖的能力进行进一步测试。

[0107] 本发明的抗体还可以通过重组 DNA 方法进行制备,例如在此引入作为参考的美国专利号 4,816,567 和 6,331,415 中描述的那些,例如编码本发明的单克隆抗体的 DNA 可以使用常规操作容易地分离和测序 (例如,通过使用能够与编码鼠类抗体的重和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。本发明的杂交瘤细胞充当此类 DNA 的优选来源。分离后, DNA 可以置入表达载体内,所述表达载体随后转染到原本不生产免疫球蛋白的宿主细胞内,例如猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞,以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。DNA 还可以例如通过用人重和轻链恒定结构域的编码序列代替同源鼠类序列 (美国专利号 4,816,567),或通过将非免疫球蛋白多肽的所有或部分编码序列与免疫球蛋白编码序列共价连接,而进行修饰。此类非免疫球蛋白多肽可以替换本发明的抗体的恒定结构域,或可以替换本发明抗体的一个抗原结合部位的可变结构域,以产生嵌合双价抗体。

[0108] 在某些实施方案中,本发明的抗体由 2 种表达载体表达。第一种表达载体编码抗体 (例如,人源化抗体) 的重链,包含编码抗体重链可变区的第一部分,和编码抗体重链恒定区的第二部分。在某些实施方案中,第一部分编码重链,所述重链包含含有来自 SEQ ID NO :1 氨基酸序列的一个或多个 CDR 区的重链可变区和含有选自 SEQ ID NO :10-30 的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方案中,来自 SEQ ID NO :1 氨基酸序列的一个或多个 CDR 区为来自 SEQ ID NO :1 氨基酸序列的 3 个 CDR 区。第二种表达载体编码抗体的轻链,包含编码抗体轻链可变区的第一部分,和编码抗体轻链恒定区的第二部分。在某些实施方案中,第一部分编码轻链,所述轻链包含含有来自 SEQ ID NO :2 氨基酸序列的一个或多个 CDR 区的轻链可变区和含有选自 SEQ ID NO :10 和 31-37 的氨基酸序列的轻链恒定区。在某些实施方案中,来自 SEQ ID NO :2 氨基酸序列的一个或多个 CDR 区为来自 SEQ ID NO :1 氨基酸序列的 3 个 CDR 区。

[0109] 可替代地,本发明的抗体 (例如,人源化抗体) 由单个表达载体表达。该单个表达载体编码本发明抗体的重链和轻链。在某些实施方案中,该表达载体包含多核苷酸序列,其编码包含含有来自 SEQ ID NO :1 氨基酸序列的一个或多个 CDR 区的重链可变区和含有选自

SEQ ID NO:11-30 的氨基酸序列的重链恒定区的重链,含有来自 SEQ ID NO:2 氨基酸序列的一个或多个 CDR 区的轻链可变区和含有选自 SEQ ID NO:10 和 31-37 的氨基酸序列的轻链恒定区。在某些实施方案中,来自 SEQ ID NO:1 氨基酸序列的一个或多个 CDR 区为来自 SEQ ID NO:1 氨基酸序列的 3 个 CDR 区。在某些实施方案中,来自 SEQ ID NO:2 氨基酸序列的一个或多个 CDR 区为来自 SEQ ID NO:2 氨基酸序列的 3 个 CDR 区。

[0110] 通常表达载体具有源自与宿主细胞相容的物种的转录和翻译调节序列。此外,载体通常携带能够在转化细胞中提供表型选择的特定基因。

[0111] 大量的用于真核细胞的重组宿主载体表达系统是已知的且可以在本发明中使用。例如,酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或通常的面包酵母是真核微生物中最常用的,但许多其他菌株例如巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 也是可用的。衍生自多细胞生物例如可从 ATCC 获得的 Sp2/0 或中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 的细胞系也可以用作宿主。适合于真核细胞转化的一般载体质粒是例如 pSV2neo 和 pSV2gpt (ATCC), pSVL 和 pSVK3 (Pharmacia), 和 pBPV-1/pML2d (International Biotechnology, Inc.)。

[0112] 在本发明中有用的真核宿主细胞优选是杂交瘤、骨髓瘤、浆细胞瘤或淋巴瘤细胞。然而,可以适宜地使用其他真核宿主细胞,条件是哺乳动物宿主细胞能够识别用于表达蛋白质的转录和翻译 DNA 序列;通过前导序列的切割来加工前导肽和分泌蛋白质;且提供蛋白质的翻译后修饰,例如糖基化。

[0113] 因此,本发明提供了真核宿主细胞,其被包含本文公开的 DNA 构建体的重组表达载体转化,并且能够表达本发明的抗体或多肽。因此,在某些实施方案中,本发明的转化的宿主细胞包含至少一种 DNA 构建体,其包含本文描述的轻和重链 DNA 序列、以及相对于轻和重链编码 DNA 序列放置以指导抗体或多肽表达的转录和翻译调节序列。

[0114] 本发明中使用的宿主细胞可以通过本领域众所周知的标准转染方法以各种方式进行转化。在可以使用的标准转染方法中有电穿孔技术、原生质体融合和磷酸钙沉淀技术。此类技术由 F. Toneguzzo 等人 (1986), *Mol. Cell Biol*, 6:703-706; G. Chu 等人, *Nucleic Acid Res.* (1987), 15:1311-1325; D. Rice 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1979), 79:7862-7865; 和 V. Oi 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983), 80:825-829 作了一般描述。

[0115] 在 2 种表达载体的情况下,2 种表达载体可以一个一个分开地或一起 (共转移或共转染) 转移到宿主细胞内。

[0116] 本发明还提供了用于生产抗体或多肽的方法,其包括培养包含编码抗体或多肽的表达载体的宿主细胞,和通过本领域技术人员众所周知的方法从培养物中回收抗体或多肽。在某些实施方案中,抗体可以通过常规免疫球蛋白纯化操作分离或纯化,所述纯化操作例如蛋白 A-琼脂糖、羟基磷灰石层析法、凝胶电泳、透析或亲和层析法。

[0117] 此外,所需抗体可以在转基因动物中进行生产。合适的转基因动物可以根据标准方法来获得,所述方法包括将合适的表达载体显微注射到卵内,将卵转移到假孕的雌性体内且选择表达所需抗体的后代。

[0118] 本发明还提供了特异性识别癌细胞表达的 CD43 和 CEA 上的表位的嵌合抗体。例如,嵌合抗体的可变区和恒定区来自不同的物种。在某些实施方案中,重链和轻链的可变区来自本文描述的鼠类抗体。在某些实施方案中,可变区包含 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 中可变区所示的氨基酸序列,或 SEQ ID NO:1 的 20-137 位残基和 SEQ ID NO:2 的 20-131

位残基。在某些实施方案中,重链和轻链的恒定区均来自人抗体。

[0119] 本发明的嵌合抗体可以通过本领域充分建立的技术进行制备。参见例如美国专利号 6,808,901、美国专利号 6,652,852、美国专利号 6,329,508、美国专利号 6,120,767 和美国专利号 5,677,427,所述专利各自在此引入作为参考。一般而言,嵌合抗体可以通过下述进行制备:获得编码抗体的重和轻链可变区的 cDNAs,将 cDNAs 插入表达载体内,随后将所述表达载体引入真核宿主细胞内,表达本发明的嵌合抗体。优选地,表达载体携带功能上完全的恒定重或轻链序列,从而使得可以容易地将任何可变重或轻链序列插入表达载体内。

[0120] 本发明提供了特异性识别由非造血系统癌细胞表达的 CD43 和 CEA 上的表位的人源化抗体。人源化抗体一般是人抗体,其中来自 CDR 的残基由来自具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种例如小鼠、大鼠或兔的 CDR 的残基替代。在某些情况下,人抗体的 Fv 构架残基由相应的非人残基替代。

[0121] 使单克隆抗体人源化有 4 个一般步骤。它们是:(1) 测定起始抗体轻和重可变结构域的核苷酸序列和预测的氨基酸序列,(2) 设计人源化抗体,即决定何种抗体构架区在人源化过程中使用,(3) 实际的人源化方法/技术,和(4) 人源化抗体的转染和表达。参见例如,美国专利号 4,816,567 ;5,807,715 ;5,866,692 ;6,331,415 ;5,530,101 ;5,693,761 ;5,693,762 ;5,585,089 ;6,180,370 ;和 6,548,640。例如,如果抗体在人的临床试验和治疗中使用,那么恒定区可以改造成更类似于人恒定区,以避免免疫应答。参见例如,美国专利号 5,997,867 和 5,866,692。

[0122] 重要的是抗体在进行人源化时保留对于抗原的高亲和力和其他有利的生物性质。为了达到这个目的,人源化抗体可以通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念上的人源化产物而制备。三维免疫球蛋白模型是通常可得的且是本领域技术人员熟悉的。可以获得计算机程序用于描述和展示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构。对这些展示的检查使得可以分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,即,分析影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。以这种方式,可以从共有序列和输入序列选择 FR 残基并组合,以便获得所需的抗体特征,例如对于靶抗原增加的亲和力。一般而言,CDR 残基直接且大多数基本上参与影响抗原结合。人源化抗体还可以包含在铰链区中的修饰以改善抗体的一种或多种特征。

[0123] 在另一种可替代方案中,可以通过噬菌体展示技术筛选和重组制备抗体。参见例如,美国专利号 5,565,332 ;5,580,717 ;5,733,743 和 6,265,150 ;和 Winter 等人, *Annu. Rev. Immunol.* 12 :433-455(1994)。可替代地,噬菌体展示技术 (McCafferty 等人, *Nature* 348 :552-553(1990)) 可以用于由来自未免疫的供体的免疫球蛋白可变 (V) 结构域基因库在体外生产人抗体和抗体片段。根据这种技术,将抗体 V 结构域基因以符合读框的方式克隆到丝状噬菌体例如 M13 或 fd 的主要或次要外壳蛋白基因内,且作为功能抗体片段展示在噬菌体颗粒的表面上。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝,所以基于抗体的功能性质的选择也导致编码显示那些性质的抗体的基因的选择。因此,噬菌体模拟了 B 细胞的某些性质。噬菌体展示可以以各种方式来进行;关于综述参见例如,Johnson, Kevin S. 和 Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3,564-571(1993)。几种来源的 V 基因片段可以用于噬菌体展示。Clackson 等人, *Nature* 352 :624-628(1991) 从衍生自免疫小鼠脾的 V 基因的小型随机组合文库中分离了一系列多样的抗噁唑酮抗体。

可以构建来自未免疫人供体的 V 基因库,且可以基本上根据 Mark 等人, *J. Mol. Biol.* 222 : 581-597(1991) 或 Griffith 等人, *EMBO J.* 12 :725-734(1993) 描述的技术分离针对一系列多样抗原(包括自身抗原)的抗体。在天然免疫应答中,抗体基因以高速率积聚突变(体细胞高变)。引入的某些改变将赋予更高的亲和力,且显示高亲和力表面免疫球蛋白的 B 细胞在随后的抗原攻击过程中将优先复制和分化。这种天然过程可以通过使用称为“链改组”的技术进行模拟。Marks, 等人, *Bio/Technol.* 10 :779-783(1992)。以这种方法,通过噬菌体展示获得的“初级”人抗体的亲和力可以通过下述得到改善:用得自未免疫个体的 V 结构域基因的天然变体(库)顺次替代重和轻链 V 区基因。这种技术允许产生具有 pM-nM 范围内的亲和力的抗体和抗体片段。用于制备极大型噬菌体抗体库(也称为“所有文库之母”)的策略已由 Waterhouse 等人, *Nucl. Acids Res.* 21 :2265-2266(1993) 描述。基因改组也可以用于由啮齿类动物抗体获得人抗体,其中人抗体具有与起始啮齿类动物抗体相似的亲和力和特异性。根据也称为“表位印迹”的方法,通过噬菌体展示技术获得的啮齿类动物抗体的重或轻链 V 结构域基因由人 V 结构域基因的库替代,产生啮齿类动物-人嵌合体。对抗原的选择导致能够恢复功能抗原结合位点的人可变区的分离,即表位控制(印迹)配偶体的选择。当重复该过程以替代其余的啮齿类动物 V 结构域时,获得人抗体(参见 1993 年 4 月 1 日公开的 PCT 公开号 WO 93/06213)。与通过 CDR 嫁接的啮齿类动物抗体的常规人源化不同,这种技术提供了全人抗体,其不具有啮齿类动物起源的构架或 CDR 残基。显然尽管上述讨论涉及人源化抗体,但所讨论的一般原则可应用于定制用于例如在犬、猫、灵长类动物、马和牛动物中使用的抗体。

[0124] 在某些实施方案中,抗体是全人抗体。特异性结合抗原的非人抗体可以用于生产与该抗原结合的全人抗体。例如,本领域技术人员可以使用链交换技术,其中非人抗体的重链与表达不同人轻链的表达文库共表达。包含 1 条人轻链和 1 条非人重链的所得到的杂合抗体随后就抗原结合进行筛选。参与抗原结合的轻链随后与人抗体重链文库共表达。所得到的全人抗体再一次就抗原结合进行筛选。诸如此类的技术在美国专利 5,565,332 中进一步描述。此外,抗原可以用于接种人免疫球蛋白基因的转基因动物。参见例如,美国专利 5,661,016。

[0125] 抗体可以是双特异性抗体,即对于至少 2 种不同抗原具有结合特异性的单克隆抗体,其可以使用本文公开的抗体进行制备。用于制备双特异性抗体的方法是本领域已知的(参见例如 Suresh 等人,1986, *Methods in Enzymology* 121 :210)。通常,双特异性抗体的重组生产基于 2 个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中 2 条重链具有不同的特异性(Millstein 和 Cuello,1983, *Nature* 305,537-539)。

[0126] 根据制备双特异性抗体的一种方法,使具有所需结合特异性(抗体-抗原结合部位)的抗体可变结构域与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。融合物优选具有免疫球蛋白重链恒定结构域,包含至少部分的铰链、CH2 和 CH3 区域。优选具有包含轻链结合所需位点的第一重链恒定区(CH1),存在于融合物的至少一个中。将编码免疫球蛋白重链融合物和如期望的话免疫球蛋白轻链的 DNAs 插入分开的表达载体内,且共转染到合适的宿主生物中。当构建体中使用的 3 条多肽链的不等比率提供最优产量时,这提供了调整 3 个多肽片段的相互比例的极大灵活性。然而当至少 2 条多肽链以相同比率表达导致高产量时或当比例没有特别意义时,可以将 2 条或所有 3 条多肽链的编码序列插入一个表达载体中。

[0127] 在一种方法中,双特异性抗体由在一条臂中具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链,和在另一条臂中的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。在双特异性分子的仅一半中具有免疫球蛋白轻链的这种不对称结构,将有利于所需双特异性化合物与不需要的免疫球蛋白链组合的分离。这种方法在1994年3月3日公开的PCT公开号W094/04690中得到描述。

[0128] 包含2个共价连接的抗体的杂缀合抗体(heteroconjugate antibody)也在本发明的范围内。此类抗体已用于使免疫系统细胞靶向不需要的细胞(美国专利号4,676,980)和用于治疗HIV感染(PCT公开号WO 91/00360和WO 92/200373;和EP 03089)。杂缀合抗体可以使用任何方便的交联法进行制备。合适的交联试剂和技术是本领域众所周知的,且在美国专利号4,676,980中得到描述。

[0129] 单链Fv片段还可以例如如Iliades等人,1997,FEBS Letters,409:437-441中描述的进行生产。此类单链片段使用各种接头的偶联在Kortt等人,1997,Protein Engineering,10:423-433中得到描述。用于抗体的重组生产和处理的各种技术是本领域众所周知的。

[0130] 本发明旨在不仅包括上文描述的单克隆抗体,还包括其含有抗体的活性结合区域的任何片段,例如Fab、F(ab')₂、scFv、Fv片段等。此类片段可以使用本领域充分建立的技术由本文描述的单克隆抗体进行生产(Rousseaux等人(1986),in Methods Enzymol,121:663-69 AcademicPress)。

[0131] 制备抗体片段的方法是本领域众所周知的。例如,抗体片段可以通过用胃蛋白酶酶促切割抗体来生产,以提供命名为F(ab')₂的100Kd片段。这个片段可以使用硫醇还原剂和任选地保护基团(用于因二硫键断裂形成的巯基),进行进一步断裂,以产生50Kd Fab'单价片段。可替代地,使用木瓜蛋白酶的酶促切割直接产生2个单价Fab片段和Fc片段。这些方法例如由美国专利号4,036,945和4,331,647以及其中包含的参考文献进行描述,所述专利引入本文作为参考。同样,参见Nisonoff等人(1960),Arch Biochem. Biophys. 89:230;Porter(1959),Biochem. J. 73:119,Edelman等人,in METHODS IN ENZYMOLOGY VOL. 1,第422页(AcademicPress 1967)。

[0132] 可替代地,Fab可以通过下述产生:将编码抗体Fab的DNA插入用于原核生物的表达载体或用于真核生物的表达载体内,并且将载体引入原核生物或真核生物内以表达Fab。

[0133] 除了宿主细胞的选择外,在抗体的重组生产过程中影响糖基化的因素还包括生长方式、培养基配方、培养密度、氧合、pH、纯化方案等。已提出改变特定宿主生物中的糖基化模式的各种方法,包括引入或过表达参与寡糖生产的某些酶(美国专利号5,047,335;5,510,261和5,278,299)。糖基化或某些类型的糖基化可以例如使用内切糖苷酶H(Endo H)、N糖苷酶F、内切糖苷酶F1、内切糖苷酶F2、内切糖苷酶F3从糖蛋白中酶促去除。此外,重组宿主细胞可以进行遗传改造以在加工某些类型的多糖方面产生缺陷。这些和类似技术是本领域众所周知的。

[0134] 在某些实施方案中,本发明的抗体可使用本领域已知的偶联技术进行修饰,包括但不限于酶促手段、氧化取代(oxidative substitution)和螯合。修饰可以例如用于标记物的附着以用于免疫测定法。经修饰的多肽可以使用本领域建立的方法来制备,并且可以使用本领域已知的标准测定法进行筛选,其中某些在下文和实施例中描述。

[0135] 本发明的抗体或多肽可以与试剂例如治疗剂和标记物缀合（例如，连接）。治疗剂的例子是放射性结构部分、细胞毒素、或化学治疗分子。

[0136] 本发明的抗体（或多肽）可以与标记物连接，所述标记物例如荧光分子、放射性分子、酶、或本领域已知的任何其他标记物。如本文所使用的，术语“标记物”指可以检测的任何分子。在某一实施方案中，抗体可以通过掺入放射性标记的氨基酸进行标记。在某一实施方案中，可以通过标记的抗生物素蛋白（例如，包含可以通过光学或比色法进行检测的荧光标记或酶促活性的链霉抗生物素蛋白）进行检测的生物素部分可以与抗体附着。在某些实施方案中，标记物可以掺入另一种试剂内或与另一种试剂附着，所述另一种试剂又可以与目的抗体结合。例如，标记物可以掺入抗体内或与抗体附着，所述抗体又可以特异性结合目的抗体。在某些实施方案中，标签或标记物也可以是治疗性的。标记多肽和糖蛋白的各种方法是本领域已知的且可以使用。某些一般种类的标记物包括但不限于，酶、荧光、化学发光和放射性标记物。用于多肽的标记物的例子包括但不限于：放射性同位素或放射性核苷酸（例如，³H、¹⁴C、¹⁵N、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I），荧光标记物（例如，异硫氰酸荧光素（FITC）、罗丹明、镧系元素磷光体、藻红蛋白（PE）），酶标记物（例如，辣根过氧化物酶、β-半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、醇脱氢酶、苹果酸脱氢酶、青霉素酶、萤光素酶），化学发光物，生物素基，由第二报道分子（例如，亮氨酸拉链对序列、二级抗体的识别位点、金属结合结构域、表位标签）识别的预定的多肽表位。在某些实施方案中，标记物与各种长度的间隔臂连接以减少潜在的空间位阻。

[0137] 本发明还提供了包含本文描述的抗体或多肽、和可药用的载体或赋形剂的药物组合物。可药用的赋形剂是本领域已知的，并且是有利于药理学有效物质的施用的相对惰性物质。例如，赋形剂可以造成形状或稠度，或充当稀释剂。合适的赋形剂包括但不限于稳定剂、湿润剂和乳化剂、用于改变摩尔渗透压浓度的盐、囊化剂、缓冲剂和皮肤穿透促进剂。用于肠胃外和非肠胃外药物递送的赋形剂以及制剂在 Remington, The Science and Practice of Pharmacy 第 20 版, Mack Publishing(2000) 中阐述。

[0138] 在某些实施方案中，本发明提供了用于在本文描述的任何方法中使用的组合物（本文描述的），无论是在作为药物使用的情况中和 / 或用于制备药物的用途中。

[0139] 多核苷酸、载体和宿主细胞

[0140] 本发明还提供了包含编码本文描述的任何单克隆抗体和多肽的核苷酸序列的多核苷酸。在某些实施方案中，多肽包含轻链和 / 或重链可变区的序列。

[0141] 在某些实施方案中，多核苷酸包含编码重链和 / 或轻链的核酸序列，所述重链包含含有来自 SEQ ID NO :1 氨基酸序列的一个或多个 CDR 区的重链可变区，和含有选自 SEQ ID NO :11-30 的氨基酸序列的重链恒定区，所述轻链包含含有来自 SEQ ID NO :2 氨基酸序列的一个或多个 CDR 区的轻链可变区，和含有选自 SEQ ID NO :10 和 31-37 的氨基酸序列的轻链恒定区。在某些实施方案中，多核苷酸包含编码重链和 / 或轻链的核酸序列，所述重链包含含有来自 SEQ ID NO :1 氨基酸序列的 3 个 CDR 区的重链可变区，和含有选自 SEQ ID NO :11-30 的氨基酸序列的重链恒定区，所述轻链包含含有来自 SEQ ID NO :2 氨基酸序列的 3 个 CDR 区的轻链可变区，和含有选自 SEQ ID NO :10 和 31-37 的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0142] 本领域普通技术人员应当理解，作为遗传密码简并的结果，存在编码如本文所描述的多肽的许多核苷酸序列。这些多核苷酸中的一些与任何天然基因的核苷酸序列都具有

极小的同源性。因此,由于密码子使用的差异而不同的多核苷酸是本发明特别考虑的。此外,包含本文提供的多核苷酸序列的基因的等位基因也在本发明的范围内。等位基因是作为一个或多个核苷酸的突变例如缺失、添加和 / 或取代的结果而改变的内源基因。所得到的 mRNA 和蛋白质可以但无需具有改变的结构或功能。等位基因可以使用标准技术(例如杂交、扩增和 / 或数据库序列比较)进行鉴定。

[0143] 本发明的多核苷酸可以使用化学合成、重组方法或 PCR 来获得。化学多核苷酸合成的方法是本领域众所周知的,并且无需在本文中详细描述。本领域技术人员可以使用本文提供的序列和商业 DNA 合成仪生产所需 DNA 序列。

[0144] 如本文进一步讨论的,对于使用重组方法制备多核苷酸,可以将包含所需序列的多核苷酸插入合适的载体内,而载体可以引入合适的宿主细胞内进行复制和扩增。多核苷酸可以通过本领域已知的任何方法插入宿主细胞内。细胞通过直接摄取、胞吞作用、转染、F 交配或电穿孔引入外源多核苷酸而转化。引入后,外源多核苷酸可以以非整合载体(例如质粒)形式维持在细胞内或整合到宿主细胞基因组内。如此扩增的多核苷酸可以通过本领域众所周知的方法从宿主细胞中分离。参见例如,Sambrook 等人(1989)。

[0145] 可替代地,PCR 允许 DNA 序列的复制。PCR 技术是本领域众所周知的,并且在美国专利号 4,683,195、4,800,159、4,754,065 和 4,683,202 以及 PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis 等人编辑, Birkauser Press, Boston (1994) 中得到描述。

[0146] 本发明还提供了包含编码本文描述的任何多肽(包括抗体)的核酸序列的载体(例如,克隆载体、表达载体)。合适的克隆载体可以根据标准技术进行构建,或可以选自本领域可得的大量克隆载体。尽管所选择的克隆载体可以依预期使用的宿主细胞而变,但有用的克隆载体一般具有自我复制的能力,可以具有特定限制性内切酶的单一靶位点,和 / 或可以携带能用于选择包含载体的克隆的标志基因。合适的例子包括质粒和细菌病毒,例如 pUC18、pUC19、Bluescript(例如 pBS SK+) 及其衍生物、mp18、mp19、pBR322、pMB9、CoIE1、pCR1、RP4、噬菌体 DNAs, 以及穿梭载体 pSA3 和 pAT28。这些和许多其他克隆载体可从商业厂商例如 BioRad、Stratagene 和 Invitrogen 获得。

[0147] 表达载体一般是包含本发明多核苷酸的可复制的多核苷酸构建体。表达载体可以在宿主细胞中作为附加体或作为染色体 DNA 的一个组成部分进行复制。合适的表达载体包括但不限于质粒,病毒载体,包括腺病毒、腺伴随病毒、逆转录病毒,粘粒和 PCT 公开号 WO 87/04462 中公开的表达载体。载体组分一般可以包括但不限于,下述中的一种或多种:信号序列;复制起点;一种或多种标志基因;合适的转录控制元件(例如启动子、增强子和终止子)。对于表达(即翻译),通常还需要一种或多种翻译控制元件,例如核糖体结合位点、翻译起始位点和终止密码子。

[0148] 包含目的多核苷酸的载体可以通过许多合适的方法中的任何一种引入宿主细胞内,包括电穿孔,使用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖或其他物质的转染;微粒轰击;脂转染;和感染(例如,当载体是感染剂例如痘苗病毒时)。引入载体或多核苷酸的选择通常依赖宿主细胞的特征。

[0149] 本发明还提供了包含本文描述的任何多核苷酸或载体的宿主细胞。能够过表达异源 DNAs 的任何宿主细胞均可以用于分离编码目的抗体、多肽或蛋白质的基因的用途。哺乳动物宿主细胞的非限制性例子包括但不限于 COS、HeLa 和 CHO 细胞。还参见 PCT 公开号 WO

87/04462。合适的非哺乳动物宿主细胞包括原核生物（例如，大肠杆菌 (*E. coli*) 或枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)) 和酵母（例如酿酒酵母、粟酒裂殖酵母 (*S. pombe*) ;或乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*))。

[0150] 诊断用途

[0151] 本发明提供了使用本发明的抗体、多肽和多核苷酸用于检测、诊断和监控与表位表达（相对于正常样品增加或减少，和 / 或不合适的表达，例如在通常缺乏表位表达的组织 和 / 或细胞中表达的存在）相关的疾病、病症或病状的方法。

[0152] 在某些实施方案中，该方法包括在得自疑似患有癌症的受试者的样品中检测表位表达，所述癌症例如结肠直肠、胰腺、胃和肺的癌。优选地，检测方法包括使样品与本发明的抗体、多肽或多核苷酸接触，和测定与对照或比较样品相比结合水平是否不同。该方法还可用于确定本文描述的抗体或多肽是否是患者的合适治疗剂。

[0153] 如本文所使用的，术语“样品”或“生物样品”指完整生物或其组织、细胞或组分（例如，体液，包括但不限于血液、粘液、淋巴液、滑液、脑脊髓液、唾液、羊膜液、羊膜脐带血、尿液、阴道液和精液）的子集。“样品”或“生物样品”还指由完整生物或其组织、细胞或组分的子集、或其级分或部分（包括但不限于例如，血浆，血清，脊髓液，淋巴液，皮肤外部、呼吸道、肠道和泌尿生殖道，泪，唾液，乳，血细胞，肿瘤，器官）制备的匀浆物、裂解物或提取物。最通常地，样品已从动物中取出，但术语“样品”或“生物样品”还可以指在体内分析的细胞或组织，即无需从动物中取出。一般地，“样品”或“生物样品”将包含来自动物的细胞，但该术语还可以指可以用于测量癌症相关多核苷酸或多肽水平的非细胞生物材料，例如血液、唾液或尿液的非细胞级分。“样品”或“生物样品”进一步指培养基，例如生物已在其中进行繁殖的营养肉汤或凝胶，其包含细胞组分，例如蛋白质或核酸分子。

[0154] 在一个实施方案中，使细胞或细胞 / 组织裂解物与抗体接触，并且测定抗体和细胞之间的结合。当与相同组织类型的对照细胞比较，测试细胞显示结合活性时，这可以指示测试细胞是癌性的。在某些实施方案中，测试细胞来自人组织。

[0155] 可以使用本领域已知用于检测特异性抗体 - 抗原结合的各种方法。可以根据本发明进行的示例性免疫测定法包括荧光偏振免疫测定法 (FPiA)、荧光免疫测定法 (FIA)、酶免疫测定法 (EIA)、比浊抑制免疫测定法 (NIA)、酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 和放射免疫测定法 (RIA)。指示剂结构部分或标记物基团可以与目的抗体附着，并且可以经选择以便符合方法的各种应用的需要，这通常取决于试验设备和相容的免疫测定法的可得性。合适的标记物包括但不限于放射性核酸（例如，¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S、³H 或 ³²P），酶（例如，碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、萤光素酶或 β -半乳糖苷酶），荧光部分或蛋白质（例如，荧光素、罗丹明、藻红蛋白、GFP 或 BFP），或发光部分（例如，由 Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA 供应的 Qdot 纳米颗粒）。用于执行上文所述的各种免疫测定法的一般技术是本领域普通技术人员已知的。

[0156] 为了诊断目的，多肽（包括抗体）可以用可检测部分进行标记，包括但不限于放射性同位素、荧光标记物、和本领域已知的各种酶 - 底物标记物。使标记物与抗体缀合的方法是本领域已知的。

[0157] 在某些实施方案中，多肽（包括本发明的抗体）无需是标记的，并且它的存在可以使用与本发明的抗体结合的标记抗体进行检测。

[0158] 本发明的抗体可以在任何已知的测定方法中使用,例如竞争结合测定法、直接和间接夹心测定法、和免疫沉淀测定法。Zola, MonoclonalAntibodies :A Manual of Techniques,第147-158页(CRC Press, Inc. 1987)。

[0159] 抗体和多肽还可以用于体内诊断测定法,例如体内成像。一般地,抗体或多肽用放射性核素(例如¹¹¹In、⁹⁹Tc、¹⁴C、¹³¹I、¹²⁵I或³H)进行标记,从而使得目的细胞或组织可以使用免疫闪烁成像法进行定位。

[0160] 抗体还可以使用本领域众所周知的技术在病理学中用作着色试剂。

[0161] 治疗用途

[0162] 本发明抗体能够诱导非造血系统癌细胞死亡。因此,本发明提供了本发明的抗体和多肽在治疗和/或延迟癌症进展中的治疗用途,所述癌症例如结肠直肠癌、肺癌、胰腺癌、胃癌、乳腺癌、肝细胞癌和甲状腺癌。可以治疗任何癌症,包括结肠癌、结肠直肠癌、肺癌、乳腺癌、脑瘤、恶性黑素瘤、肾细胞癌、膀胱癌、淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、胃癌、胰腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、食管癌、肝癌、头与颈鳞状细胞癌、皮肤癌、泌尿道癌、前列腺癌、绒毛膜癌、咽癌、喉癌、泡膜细胞增生症、男性细胞瘤、子宫内膜增生、子宫内膜异位症、胚胎瘤、纤维肉瘤、卡波西肉瘤、血管瘤、海绵状血管瘤、成血管细胞瘤、成视网膜细胞瘤、星形细胞瘤、神经纤维瘤、少突神经胶质瘤、成神经管细胞瘤、神经节神经母细胞瘤、神经胶质瘤、横纹肌肉瘤、错构胚细胞瘤、骨原性肉瘤、平滑肌肉瘤、甲状腺肉瘤和肾胚细胞瘤,条件是癌细胞表达由本文描述的抗体识别的表位。该方法可以进一步包括检测本文描述的抗体或多肽和待治疗的个体中的肿瘤或癌细胞之间的结合的步骤。

[0163] 一般地,将包含抗体或多肽的组合物的有效量施用于需要治疗的受试者,从而抑制癌细胞的生长和/或诱导癌细胞的死亡。优选地组合物用可药用的载体进行配制。

[0164] 在一个实施方案中,组合物配制用于通过腹膜内、静脉内、皮下和肌内注射,以及其他施用形式,例如口、粘膜、经由吸入、舌下等施用。

[0165] 在另一个实施方案中,本发明还考虑包含与其他分子缀合的本发明抗体或多肽的组合物的施用,所述其他分子例如可检测标记物、或治疗性或细胞毒性剂。这些试剂可以包括但不限于放射性同位素、毒素、类毒素、炎性因子、酶、反义分子、肽、细胞因子或化疗剂。使抗体与此类分子缀合的方法是本领域技术人员一般已知的。参见例如PCT公开WO 92/08495;WO 91/14438;WO 89/12624;美国专利号5,314,995;和EP 396,387;所述专利的公开内容整体引入本文作为参考。

[0166] 在一个实施方案中,组合物包含与细胞毒性剂缀合的抗体或多肽。细胞毒性剂可以包括对细胞有害的任何试剂。可以与抗体或片段缀合的细胞毒性剂的优选类别可以包括但不限于紫杉醇(paclitaxol)、细胞松弛素B(cytochalasin B)、短杆菌肽D(gramicidin D)、溴化乙啶、依米丁(emetine)、丝裂霉素、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、秋水仙碱(colchicin)、多柔比星(doxorubicin)、道诺红霉素(daunorubicin)、二羟基蒽醌(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光辉霉素(mithramycin)、放线菌素D(actinomycin D)、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)、和嘌呤霉素及其类似物或同系物。

[0167] 治疗所需的剂量依赖施用途径的选择, 制剂性质, 受试者疾病的性质, 受试者的大小、重量、表面积、年龄和性别; 施用的其他药物, 和主治医师的判断。合适的剂量在 0.01-1000.0mg/kg 的范围内。

[0168] 一般地, 可以使用任何下述剂量: 施用至少约 50mg/kg 体重; 至少约 10mg/kg 体重; 至少约 3mg/kg 体重; 至少约 1mg/kg 体重; 至少约 750 μ g/kg 体重; 至少约 500 μ g/kg 体重; 至少约 250 μ g/kg 体重; 至少约 100 μ g/kg 体重; 至少约 50 μ g/kg 体重; 至少约 10 μ g/kg 体重; 至少约 1 μ g/kg 体重或更少的剂量。对于经过数天或更长时间的重复施用, 依赖病状, 治疗持续直至疾病症状出现期望的抑制。示例性给药方案包括施用约 6mg/kg 抗体的每周剂量。然而, 依赖于医师所希望达到的药代动力学衰减模式, 其他给药方案可能是有用的。经验性考虑例如半衰期一般将有助于剂量的确定。这种疗法的进程通过常规技术和测定法可以容易地监控。

[0169] 在某些受试者中, 可能需要超过一次剂量。施用频率可以在治疗过程中进行确定和调整。例如, 基于待治疗的癌症的类型和阶段、药剂施用是用于预防还是治疗目的、先前疗法, 患者的临床病史和对药剂的应答, 以及主治医师的判断, 可以确定或调整施用频率。一般地临床医生将施用治疗性抗体 (例如, 嵌合 5F1 抗体), 直至达到合适剂量以实现期望结果。在某些情况下, 抗体的持续缓释制剂可能是合适的。用于达到持续释放的各种制剂和装置是本领域已知的。

[0170] 在一个实施方案中, 抗体或多肽的剂量可以在已给予一次或多次施用的受试者中按经验确定。可以给予受试者递增剂量的抗体或多肽。为了评估抗体或多肽的功效, 可以监控疾病症状的标志例如 CD43 或 CEA。体内功效还可以通过评估肿瘤负荷或体积、疾病进展时间 (TDP) 和 / 或测定应答率 (RR) 进行测量。

[0171] 依照本发明方法的抗体或多肽的施用可以是连续的或间断的, 这依赖于例如受体的生理条件, 施用的目的是预防还是治疗性的, 和有经验的医师已知的其他因素。抗体或多肽的施用可以在预选的时间段基本上连续或可以是一系列间隔剂量。

[0172] 其他制剂包括本领域已知的合适的递送形式, 包括但不限于载体例如脂质体。参见例如, Mahato 等人 (1997) Pharm. Res. 14 :853-859。脂质体制剂包括但不限于细胞转染剂、多层脂质体和单层脂质体。

[0173] 在另一个实施方案中, 组合物可以包含一种或多种抗癌剂, 本文描述的一种或多种抗体, 或连同与不同抗原结合的抗体或多肽。此类组合物可以包含至少 1 种、至少 2 种、至少 3 种、至少 4 种、至少 5 种不同抗体。抗体和其他抗癌剂可以在相同制剂中 (例如, 在混合物中, 如在本领域中通常指出的), 或在分开制剂中但同时或顺次施用, 这在治疗更广泛范围的个体群体时特别有用。

[0174] 编码本发明的任何抗体或多肽的多核苷酸也可以用于在所需细胞中递送和表达本发明的任何抗体或多肽。显而易见的是表达载体可以用于指导抗体或多肽的表达。表达载体可以通过本领域已知的任何方式施用, 例如腹膜内、静脉内、肌内、皮下、鞘内、心室内、经口、肠内、肠胃外、鼻内、真皮、舌下或通过吸入。例如, 表达载体的施用包括局部或全身施用, 包括注射、口服、粒子枪或插管施用, 和局部施用。本领域技术人员熟悉表达载体的施用以获得外源蛋白质在体内的表达。参见例如, 美国专利号 6, 436, 908 ; 6, 413, 942 ; 和 6, 376, 471。

[0175] 还可以使用包含编码本发明任何抗体或多肽的多核苷酸的治疗组合物的靶向递送。受体介导的 DNA 递送技术在例如下述参考文献中得到描述:Findeis 等人, Trends Biotechnol. (1993) 11 :202 ;Chiou 等人, GeneTherapeutics :Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J. A. Wolff, 编辑) (1994) ;Wu 等人, J. Biol. Chem. (1988) 263 : 621 ;Wu 等人, J. Biol. Chem. (1994) 269 :542 ;Zenke 等人 (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 :3655 ;Wu 等人 (1991), J. Biol. Chem. 266 :338。在基因治疗方案中包含多核苷酸的治疗组合物可以以约 100ng 至约 200mg DNA 的范围施用,用于局部施用。在基因治疗方案期间还可以使用约 500ng- 约 50mg、约 1 μ g- 约 2mg、约 5 μ g- 约 500 μ g、和约 20 μ g- 约 100 μ g DNA 的浓度范围。

[0176] 本发明的治疗性多核苷酸和多肽可以使用基因递送载体进行递送。基因递送载体可以是病毒或非病毒来源的(一般参见, Jolly (1994), Cancer Gene Therapy 1 :51 ; Kimura (1994), Human Gene Therapy 5 :845 ;Connelly (1985), Human Gene Therapy 1 : 185 ;和 Kaplitt (1994), Nature Genetics 6 :148)。此类编码序列的表达可以使用内源哺乳动物或异源启动子进行诱导。编码序列的表达可以是组成性或受调节的。

[0177] 用于在所需细胞中递送所需多核苷酸和表达的基于病毒的载体是本领域众所周知的。示例性基于病毒的载体包括但不限于, 重组逆转录病毒, 例如, PCT 公开号 WO 90/07936 ;WO 94/03622 ;WO 93/25698 ;WO 93/25234 ;WO 93/11230 ;WO 93/10218 ; WO 91/02805 ;美国专利号 5, 219, 740 ;4, 777, 127 ;GB 专利号 2, 200, 651 ;和 EP 专利号 0 345 242 ;基于甲病毒的载体, 例如, 辛德毕斯病毒载体, 塞姆利基森林病毒 (ATCC VR-67 ; ATCCVR-1247), 罗斯河病毒 (ATCC VR-373 ;ATCC VR-1246) 和委内瑞拉马脑炎病毒 (ATCC VR-923 ;ATCC VR-1250 ;ATCC VR 1249 ;ATCC VR-532), 和腺伴随病毒 (AAV) 载体, 例如, PCT 公开号 WO 94/12649, WO 93/03769 ;WO 93/19191 ;WO 94/28938 ;WO 95/11984 和 WO 95/00655。还可以施用如 Curiel (1992), Hum. Gene Ther. 3 :147 中所述的与处死的腺病毒连接的 DNA。

[0178] 还可以使用非病毒递送载体和方法, 包括但不限于与处死的腺病毒连接或未连接的单独聚阳离子浓缩的 DNA (参见例如, Curiel (1992), Hum. Gene Ther. 3 :147) ;配体连接的 DNA (参见例如, Wu (1989), J. Biol. Chem. 264 :16985) ;真核细胞递送载体细胞 (参见例如, 美国专利号 5, 814, 482 ;PCT 公开号 WO 95/07994 ;WO 96/17072 ;WO 95/30763 ;和 WO97/42338) 以及核电荷中和或与细胞膜融合。

[0179] 还可以使用裸 DNA。示例性裸 DNA 引入方法在 PCT 公开号 WO 90/11092 和美国专利号 5, 580, 859 中得到描述。可以充当基因递送载体的脂质体在美国专利号 5, 422, 120 ; PCT 公开号 WO 95/13796 ;WO 94/23697 ;WO91/14445 ;和 EP 专利号 0 524 968 中得到描述。另外的方法在 Philip (1994), Mol. Cell Biol. 14 :2411 和 Woffendin (1994), PNAS 91 :1581 中得到描述。

[0180] 此外, 本发明提供了用于治疗个体中癌症的方法, 所述方法包含 :a) 对个体施用有效量的包含本发明的抗体的组合物, 和 b) 对个体应用第二种癌症治疗。在某些实施方案中, 第二种治疗包括手术、放疗、激素治疗、基因治疗、其他抗体治疗和化疗。包含抗体的组合物和第二种治疗可同时应用 (例如同时施用) 和 / 或相继应用 (例如相继施用)。例如, 包含抗体的组合物和第二种治疗在不超过约 15 分钟的时间间隔内应用, 例如不超过约 10、

5 或 1 分钟中的任一。可选的,包含抗体的组合物和第二种治疗在超过约 15 分钟的时间间隔内应用,例如约 20、30、40、50 或 60 分钟、1 天、2 天、3 天、1 周、2 周、或 1 个月、或更长时间中的任一。

[0181] 包含本发明的抗体的组合物可以与一种或多种其他治疗剂顺次或同时施用,所述其他治疗剂例如化疗剂(例如,5-FU、5-FU/MTX、5-FU/甲酰四氢叶酸(leucovorin)、左旋咪唑(levamisole)、依立替康(irinotecan)、奥沙利铂(oxaliplatin)、卡培他滨(capecitabin)或尿嘧啶/替加氟(tegafur)),免疫佐剂,生长抑制剂,细胞毒性剂和细胞因子等。抗体和治疗剂的量依赖使用何种类型的药物、待治疗的病理状态、以及施用的时间安排和途径,但一般将小于各自单独施用时。

[0182] 包含本文描述的抗体的组合物施用后,组合物的功效可以通过本领域普通技术人员众所周知的各种方法在体外和体内进行评估。用于测试候选组合物的抗癌活性的各种动物模型是众所周知的。这些包括异种移植到无胸腺裸鼠或 scid/scid 小鼠内的人肿瘤,或遗传鼠类肿瘤模型例如 p53 敲除小鼠。这些动物模型的体内性质使得它们特别可以预示在人患者中的应答。此类模型可以通过使用标准技术,例如皮下注射、尾静脉注射、脾植入、腹膜内植入和在肾小囊下植入等,将细胞引入同基因小鼠内来产生。

[0183] 试剂盒

[0184] 本发明还提供了用于在本发明方法中使用的试剂盒。本发明的试剂盒包括一个或多个容器和用于依照本文描述的本发明的任何方法使用的说明书,所述容器包含本文描述的纯化抗体或多肽。在某些实施方案中,这些说明书包含根据本文描述的任何方法施用抗体以治疗和/或延迟非造血系统癌症的进展,例如结肠直肠癌。试剂盒可以进一步包含基于鉴定个体是否患有疾病和疾病的阶段、或表位是否在个体的癌细胞上表达,选择适合于治疗的个体的描述。

[0185] 在某些实施方案中,用于检测样品中的癌细胞的试剂盒包含本文描述的抗体或多肽,和用于检测抗体或多肽与样品中的细胞的结合的试剂。

[0186] 涉及抗体或多肽治疗或延迟癌症进展用途的说明书一般包括有关剂量、给药方案和施用途用于预期治疗的信息。容器可以是单位剂量、大包装(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。在本发明的试剂盒中提供的说明书一般是在标签或包装插页上的书面说明书(例如包括在试剂盒中的纸页),但机读说明书(例如在磁盘或光盘上携带的说明书)也是可应用的。

[0187] 标签或包装插页说明组合物用于治疗本文描述的癌症。可以提供说明书用于实践本文描述的任何方法。

[0188] 本发明的试剂盒可以在合适的包装中。合适的包装包括但不限于,小瓶、瓶、罐、软包装(例如密封的 Mylar 或塑料袋)等。还可以考虑用于与特定装置组合使用的包装,所述装置例如吸入器、鼻施用装置(例如,喷雾器)或输注装置例如微型泵。试剂盒可以具有无菌获取口(例如容器可以是具有可被皮下注射针头穿透的塞子的静脉溶液袋或小瓶)。容器也可以具有无菌获取口(例如容器可以是具有可被皮下注射针头穿透的塞子的静脉溶液袋或小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是本文描述的抗体。容器可以进一步包含第二药学活性剂。

[0189] 试剂盒可以任选提供另外组分例如缓冲剂和解释信息。通常,试剂盒包含容器和

在容器上或伴随容器的标签或包装插页。

实施例

[0190] 提供下述实施例以举例说明而不是限制本发明。

[0191] 实施例 1 :5F1 轻链和重链可变区的克隆

[0192] 如 2007 年 6 月 7 日提交的美国申请号 11/811, 303(以美国公开号 2008/0171043 公开)所示,5F1 轻链和重链可变区的 cDNA 可变区经 PCR 扩增,合成的 cDNA 亚克隆至 pCRII(Invitrogen)用于序列测定。核苷酸序列由若干独立的克隆得到并分析。选择从独立克隆得到的相同 cDNA 序列代表各个抗体的轻链或重链 V 区。以下的表 2 显示了鼠类 5F1(m5F1)和人源化的 5F1Vc(h5F1Vc)轻链和重链 V 区翻译后的氨基酸序列和编码其的核苷酸序列。

[0193] 表 2 抗体可变区的氨基酸序列,和编码抗体可变区的核酸序列(下划线为 CDR;斜体为信号肽序列)

[0194] m5F1 的重链氨基酸序列 (SEQ ID NO :1) 和核苷酸序列 (SEQ ID NO :5)

[0195] 1 M E W S W I F L F L L S G T A G V H S E
 [0196] 1 ATGGAATGGAGTTGGATATTTCTCTTTCTCCTGTCAGGAACTGCAGGTGTCCACTCTGAG
 [0197] 21 V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V R M S
 [0198] 61 GTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAGGATGTCC
 [0199] 41 C T A S G Y T F T S Y V M H W I K Q K P
 [0200] 121 TGCACGGCTTCTGGATACACATTCAGTATGTTATGCAGCTGGATAAAGCAGAAGCCT
 [0201] 61 G Q G L D W I G Y I N P Y N G G T Q Y N
 [0202] 181 GGGCAGGGCCTTGACTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGGTGGTACTCAGTACAAT
 [0203] 81 E K F K G K A T L T S D K S S S T A Y M
 [0204] 241 GAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG
 [0205] 101 E L S S L T S E D S A V Y Y C A R R T F
 [0206] 301 GAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACCGGACCTTC
 [0207] 121 P Y Y F D Y W G Q G T T L T V S S
 [0208] 361 CCGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

[0209] m5F1 的轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO :2) 和核苷酸序列 (SEQ ID NO :6)

[0210] 1 M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D
 [0211] 1 ATGAAGTTGCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTGAT
 [0212] 21 V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I
 [0213] 61 GTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATC
 [0214] 41 S C R S S Q S I L H S N G N T Y L E W Y
 [0215] 121 TCTTGAGATCTAGTCAGAGCATTTTACATAGTAATGGAAAACCTATTTAGAAATGGTAC
 [0216] 61 L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S
 [0217] 181 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCT
 [0218] 81 G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S
 [0219] 241 GGGGTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTCACTCAAGATCAGC

- [0220] 101 R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H A P L
- [0221] 301 AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTACTACTGCTTTCAAGGTTACATGCTCCTCTC
- [0222] 121 T F G A G T K L E L K
- [0223] 361 ACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
- [0224] h5F1Vc 的重链氨基酸序列 (SEQ ID NO :3) 和核苷酸序列 (SEQ ID NO :7)
- [0225] 1 M G W S W I F L F L L S G T A G V H S Q
- [0226] 1 ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCTCCTCTGTCAGGTACCGCGGGCGTGCACCTCTCAG
- [0227] 21 V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S
- [0228] 61 GTCCAGCTTGTCCAGTCTGGGGCTGAAGTCAAGAAACCTGGCTCGAGCGTGAAGGTCTCC
- [0229] 41 C K A S G Y T F T S Y V M H W V R Q A P
- [0230] 121 TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGCTATGTTATGCACTGGGTAAGGCAGGCCCT
- [0231] 61 G Q G L E W I G Y I N P Y N G G T Q Y N
- [0232] 181 GGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGGTGGTACTCAGTACAAT
- [0233] 81 E K F K G K A T I T A D E S T N T A Y M
- [0234] 241 GAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACAATTACTGCAGACGAATCCACCAATACAGCCTACATG
- [0235] 101 E L S S L T S E D S A V Y Y C A R R T F
- [0236] 301 GAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACAGCGCAGTCTATTACTGTGCAAGACGGACCTTC
- [0237] 121 P Y Y F D Y W G Q G T T L T V S S
- [0238] 361 CCGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCACGCTCACAGTCTCCTCA
- [0239] h5F1Vc 的轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO :4) 和核苷酸序列 (SEQ ID NO :8)
- [0240] 1 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
- [0241] 1 ATGGAGACCGATAACCTCCTGCTATGGGTCTCCTGCTATGGGTCCCAGGATCAACCGGA
- [0242] 21 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
- [0243] 61 GATATTCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTCTCTGCTAGCGTCGGGGATAGGGTCACC
- [0244] 41 T T C R S S Q S I L H S N G N T Y L E W
- [0245] 121 ATAACCTGCAGATCTAGTCAGAGCATTTTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAAATGG
- [0246] 61 Y Q Q K P G K A P K L L I Y K V S N R F
- [0247] 181 TACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCTCCCAAGCTTCTAATCTATAAAAGTTTCCAACCGATTT
- [0248] 81 S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I
- [0249] 241 TCTGGAGTCCCTTACGCTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCGATTTACCCTCACAATC
- [0250] 101 S S L Q P D D F A T Y Y C F Q G S H A P
- [0251] 301 AGCTCTCTGCAGCCAGATGATTTCCGCACTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGCTCCT
- [0252] 121 L T F G Q G T K V E L K
- [0253] 361 CTCACGTTCCGGTCAGGGACCAAGGTGGAGCTGAAA
- [0254] 实施例 2 :嵌合 5F1 变体的修饰版本
- [0255] 小鼠 5F1 抗体的同种型是鼠类 IgG3。为在人体内排除人抗-小鼠抗体 (HAMA) 反应的问题和得到更有效的 Fc- 依赖的功能,将鼠类 5F1 抗体的可变 (V) 区和人 IgG1 的恒定区结合以生成 5F1 抗体的嵌合形式 (c5F1) (c5F1v0 ;重链为 :SEQ ID NO. 1 (VH), NO. 9 (CH) ;轻链为 SEQ IDNO. 2 (VL), NO. 10 (CL), 见表 2 和图 2)。人 IgG1 和鼠类 IgG3 的重链恒定区 (其

包含 CH1、铰链、CH2 和 CH3 结构域) 的氨基酸序列也被比较。如序列比较所示, CH1- 铰链区显示了鼠类 IgG3 和人 IgG1 的最大差异 (图 1)。此处使用的序列比较中, “*” 表示在该列的残基在所有比对的序列中是相同的, “:” 表示已观察到保守取代, “.” 表示观察到半保守取代。为使 c5F1 具有和鼠类 5F1 相当的诱导凋亡的活性, 在 c5F1 重链的 CH1 和 / 或铰链结构域进行了若干修饰 (表 3; 表 3 的残基编号采用如 Burton, Mol. Immunol. 22 :161-206, 1985 所描述的 EU 编号系统), 并在 c5F1 的轻链 (表 4) 中进行了若干修饰。在某些情况中, 经修饰的重链和 c- 端修饰的轻链共同表达 (表 5)。重链和轻链的氨基酸序列也见图 2。

[0256] 表 3: 基于人 IgG1 恒定区的 v0[H] 重链的修饰

[0257]

版本	CH1 修饰	突变引物	扩增引物	铰链修饰	突变引物	扩增引物
v1	S131C	M23, M24	A3, A4	C220S	M2	
v2	¹³¹ SSK → CSR	M25, M26				
v3	¹²⁹ APSSKS (SEQ ID NO: 140) → VPGCSD (SEQ ID NO: 141)	M21, M22				
v4	¹³¹ SSKS (SEQ ID NO: 142) → GCSD (SEQ ID NO: 143)	M19, M20				
v5	S131C	M23, M24	A3, A4	C220S, C226G	M2, M7, M8	A1, A2
v6	¹³¹ SSK → CSR	M25, M26				
v7	S131C	M23, M24	A3, A4	C220S, ²²⁶ CPP → GSS	M2, M9, M10	
v8	¹³¹ SSK → CSR	M25, M26				
v9	S131C	M23, M24	A3, A4	C220S, ²²⁴ HTCPP (SEQ ID NO: 144) → PPGSS (SEQ ID NO: 145)	M2, M11, M12	
v10	¹³¹ SSK → CSR	M25, M26				
v11	¹²⁹ APSSKS (SEQ ID NO: 146) → VPGCSD (SEQ ID NO: 147)	M21, M22				
v12	¹³¹ SSKS (SEQ ID	M19, M20				

[0258]

	NO: 148) → GCSD (SEQ ID NO: 149)					
v13	S131C	M23, M24	A3, A4	²¹⁸ KSCDKTHTCPP (SEQ ID NO: 150) → RIPKPSTPPGSS (SEQ ID NO: 151) (Replace by mIgG3 hinge)	M13, M14	
v14	¹³¹ SSK → CSR	M25, M26				
v15				delete 220C (SD)	M1	
v16				C220S (SSD)	M2	
v17				²¹⁸ KSCDK (SEQ ID NO: 152) → KSSCDK (SEQ ID NO: 153)	M15, M16	A1, A2
v18				²¹⁸ KSCDK (SEQ ID NO: 154) → KSCDK (SEQ ID NO: 155)	M17, M18	
v19				²¹⁸ KSCDK (SEQ ID NO: 156) → KSDKSCDK (SEQ ID NO: 157)	M3, M4	
v20				²¹⁸ KSCDK (SEQ ID NO: 158) → KSCDKSDK (SEQ ID NO: 159)	M5, M6	

[0259] 表 4: 基于人 IgG1 κ 链的 v0[L] 轻链恒定区的修饰

版本	LC: κ 修饰	突变引物	扩增引物
v0[L]	PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 160)		A5, A6
v21	PVTKSFNRGEGEC (SEQ ID NO: 161)	M35, M36	
v22	PVTKSFNRGGEGEC (SEQ ID NO: 162)	M37, M38	
v23	PVTKSFNRGGGEGEC (SEQ ID NO: 163)	M39, M40	
v24	PVTKSFNRGGEC (SEQ ID NO: 164)	M33, M34	
v25	PVTKSFNRGGGEC (SEQ ID NO: 165)	M31, M32	
v26	PVTKSFNRGGGGEC (SEQ ID NO: 166)	M29, M30	
v27	PVTKSFNRGGGGGEC (SEQ ID NO: 167)	M27, M28	

[0261] 表 5: 包含结合经修饰的重链和 / 或轻链恒定区的组合的嵌合抗体

[0262]

抗体	重链	轻链
c5F1v0	v0[H]	v0[L]
c5F1v1	v1	v0[L]
c5F1v2	v2	v0[L]
c5F1v3	v3	v0[L]
c5F1v4	v4	v0[L]
c5F1v5	v5	v0[L]
c5F1v6	v6	v0[L]
c5F1v7	v7	v0[L]
c5F1v8	v8	v0[L]
c5F1v9	v9	v0[L]
c5F1v10	v10	v0[L]
c5F1v11	v11	v0[L]
c5F1v12	v12	v0[L]
c5F1v13	v13	v0[L]
c5F1v14	v14	v0[L]
c5F1v15	v15	v0[L]
c5F1v16	v16	v0[L]
c5F1v17	v17	v0[L]
c5F1v18	v18	v0[L]
c5F1v19	v19	v0[L]

c5F1v20	v20	v0[L]
c5F1v21	v19	v21
c5F1v22	v19	v22
c5F1v23	v19	v23
c5F1v24	v19	v24
c5F1v25	v19	v25
c5F1v26	v19	v26
c5F1v27	v19	v27

[0263] 实施例 3. 在嵌合 5F1 抗体的重链和轻链恒定区中引入改变

[0264] 为易于抗体生产和纯化, 使用包含人 IgG1 重链和 κ 轻链的恒定区的 pcDNA5-FRT-hIgG1 (产自 AbGenomics) 表达嵌合 5F1 (c5F1)。m5F1 重链和轻链的可变区基因经 PCR 分别扩增, 分别使用引物对 m5F1HC-XbaI f/m5F1HC-XbaI r 和 m5F1LC-XbaI f/m5F1LC-XbaI r (表 6, 引物 A3/A7 和 A8/A9)。PCR 产物经 XbaI 消化并顺序插入 pcDNA5-FRT-hIgG1。包含 c5F1 重链基因和轻链基因的完全组装的 c5F1 表达质粒 c5F1/pcDNA5-FRT-hIgG1 用于表达未修饰的 c5F1 抗体。同样的质粒也作为模板用于引入 c5F1 的修饰。

[0265] 使用基于 PCR 的定点诱变生成在残基 220 位 (EU 编号) 具有缺失 (v15) 或 S 取代 (v16) 的构建体, 使用引物 (表 6) 在 c5F1/pcDNA5-FRT-hIgG1 的基因中引入突变, 依照制造商的说明书使用 QuikChange Multi SiteDirected Mutagenesis 试剂盒 (Stratagene, Cat#200531-5)。使用寡核苷酸 M1 (5' -CAGAGCCCAAATCTGACAAAACACAC-3' (SEQ ID NO: 47)) 以删除残基 220 位的 Cys (v15), 使用寡核苷酸 M2 (5' -CAGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACACAC-3' (SEQ ID NO: 48)) 以产生残基 220 位的 Ser 取代 (v16)。为排除在定点诱变中由 PCR 引入的随机突变的可能性, 包含修饰的 DNA 片段经 AgeI (在 CH1 区域内) 和 Xma I (在 CH3 区域内) 切除并重新克隆进原始的 c5F1/pcDNA5-FRT-hIgG1, 以替换原始的未修饰区域。

[0266] 可选的, 还使用重叠 PCR 以生成所有其余修饰 (表 3-6)。简而言之, 使用 2 个 PCR 反应以生成 2 段共享至少 20 个核苷酸的重叠序列的、包含期望突变的 DNA 产物片段。这 2 段 PCR 产物之后经混合、变性和经再退火。之后使用另一个使用 2 条外引物 (来自之前的 2 次 PCR) 的 PCR 反应以扩增组装的全长 DNA 片段。例如, 对于 v1, 使用引物对 A4/M23 和 M24/A3 (表 6) 以经 PCR 生成开始的 2 个片段。之后这两个 PCR 片段经混合、再退火, 使用外引物 (A3 和 A4) 以生成全长 PCR 产物。最后, 包含修饰的 DNA 片段被重新克隆至原始的 c5F1/pcDNA5-FRT-hIgG1。包含 CH1 修饰的片段经 XbaI (在重链 V 区的开端内) 和 AgeI (在

CH1 区内) 位点重新克隆。包含铰链修饰的片段经 AgeI (在 CH1 区内) 和 Xma I (在 CH3 区内) 位点重新克隆。为生成轻链的 c- 端修饰, PCR 产物经 AvrII (在轻链的 V 区末端内) 和 BamHI (在轻链编码序列的下游内) 位点克隆, 以替换原始的未修饰序列。

[0267] 之后具有或不具有修饰的质粒经 lipofetamine2000 (Invitrogen, 目录号 11668-019) 转染进 Flp-In-CHO 细胞 ((Invitrogen, 目录号 R758-07)。收集包含未修饰或经修饰的 c5F1 抗体的培养基, 用蛋白质 A 纯化抗体。在 COLO 205 细胞中检测纯化的抗体的结合和诱导凋亡的活性。

[0268] 结合实验

[0269] 纯化的 m5F1、c5F1-v0、c5F1-v15 和 c5F1-v16 抗体以 0.125 至 4ug/ml 的浓度加入 1.5×10^5 COLO 205 细胞中, 4°C 孵育 30 分钟, 用包含 2% FBS 和 0.05% NaN_3 的 PBS 洗 2 次, 接下来和 1ug/ml 相应的二抗 (R-PE 缀合的山羊 F(ab')₂ 抗小鼠 IgG(H+L), Southern Biotech, 目录号 1032-09; 或 R-PE 缀合的山羊抗人 IgG, Southern Biotech, 目录号 2040-09) 4°C 孵育 30 分钟。染色结束时, 样品用包含 2% FBS 和 0.05% NaN_3 的 PBS 洗 2 次并用流式细胞仪分析。所有流式细胞分析在 BD-LSR 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 上进行, 使用 Cell Quest 软件。

[0270] 凋亡实验

[0271] 1.5×10^5 的 COLO 205 细胞接种于 96 孔板的孔中。在培养液中新鲜准备等份试样的纯化 m5F1、c5F1v0、c5F1v15、c5F1v16 和对照抗体以 2 至 32 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度加入至每个孔。使用 m9E10 和 h16C11A 处理的样品被用作同种型对照。在用 FACS 分析凋亡前, 将处理的细胞在 37°C 孵育器中维持 6 小时。细胞凋亡实验中, 依照制造商的说明书使用膜联蛋白 V-FITC 凋亡检测试剂盒 (Strong Biotech, 目录号 AVK250) 检测膜联蛋白 V 染色。简而言之, 于室温收集处理的细胞, 重悬于包含膜联蛋白 V-FITC 的膜联蛋白 V 结合缓冲液。在黑暗中孵育 15 分钟后, 用 200 μl 膜联蛋白 V 结合缓冲液清洗细胞 2 次。在 FACS 分析前, 加入 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 碘化丙锭 (PI)。所有流式细胞分析在 BD-LSR 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 上进行, 使用 Cell Quest 软件。膜联蛋白 VI 阳性和 / 或 PI 阳性细胞被认为是凋亡细胞。

[0272] 表 6 : 用于在 c5F1 基因中引入突变的引物

[0273]

引物名称	引物序列 (5' → 3')	SEQ ID NO
(A1) hIgG1CH1f	ACCACCTCTCTTGCAGCCTC	SEQ ID NO :38
(A2) hIgG1CH3r	CATTGCTCTCCCACTCCA	SEQ ID NO :39
(A3) m5F1HC-XbaI f	TCTATCTAGATGGAATGGAGTTGGATATTTCTCTTTC	SEQ ID NO :40
(A4) hIgG1 内含子 r	ATATGGCTCTTGGCAGGTCT	SEQ ID NO :41
引物名称	引物序列 (5' → 3')	SEQ ID NO
(A5) pcDNA5FRT-hG1LC 3' BamHI/BglIII-r	GGGAGATCTGGATCCTAGAAG	SEQ ID NO :42

(A6)m5F1 LC AvrII-f	TAATCCTAGGAATTCTAAACTCTG	SEQ ID NO :43
(A7)m5F1HC-XbaI r	ACCCTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT GCC	SEQ ID NO :44
(A8)m5F1LC-XbaI f	TCTATCTAGATGAAGTTGCCTGTTAGGCTG	SEQ ID NO :45
(A9)m5F1LC-XbaI r	ACCCTCTAGAATTAGGAAAGTGCACCTACGTTTCAGCTCCAGC	SEQ ID NO :46
(M1)hIgG1 铰链 d220C-f (v15)	CAGAGCCCAAATCTGACAAAACCTCACAC	SEQ ID NO :47
(M2)hIgG1 铰链 C220S-f (v16)	CAGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACAC	SEQ ID NO :48
(M3)hIgG1 铰链 KSD f (v19)	GAGCCCAAATCTGACAAATCTTGTGACAAAACCTCACAC	SEQ ID NO :49
(M4)hIgG1 铰链 KSD r (v19)	GATTTGTCAGATTTGGGCTCTGCAGAGAGAAGATTGG	SEQ ID NO :50
(M5)hIgG1 铰链 SDK f (v20)	TGTGACAAATCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCC	SEQ ID NO :51
(M6)hIgG1 铰链 SDK r (v20)	GTTTTGTCAGATTTGTACAAGATTTGGGCTCTGCAGAGAG	SEQ ID NO :52
(M7)hIgG1 铰链 C226G f	AACTCACACAGGTCCACCGTGCCAGGTAAGCCAGCCCAG	SEQ ID NO :53
(M8)hIgG1 铰链 C226G r	CACGGTGGACCTGTGTGAGTTTTGTGACAAGATTGGGCT	SEQ ID NO :54
(M9)hIgG1 铰链 226CPP → GSS f	CACACAGGTTCTTCATGCCAGGTAAGCCAGCCCAGGCCT	SEQ ID NO :55
(M10)hIgG1 铰链 226CPP → GSS r	GGGCATGAAGAACCTGTGTGAGTTTTGTGACAAGATTGG	SEQ ID NO :56
(M11)hIgG1 铰链 ³²⁴ HTCPP → PPGSS f	CTCCCCAGGTTCTTCATGCCAGGTAAGCCAGCCCAGGC	SEQ ID NO :57
(M12)hIgG1 铰链 ²²⁴ HTCPP → PPGSS r	GCATGAAGAACCTGGGGGAGTTTTGTGACAAGATTGGGC	SEQ ID NO :58

(M13)hIgG1 铰链 mIgG3r (²¹⁸ KSCDKTHTCPP → RIPKPSTPPGSS)	CTGGGGGGTACTGGGCTTGGGTATTCTGGGCTCTGCAGAGAGAAGAT T	SEQ ID NO :59
(M14)hIgG1 铰链 mIgG3f (²¹⁸ KSCDKTHTCPP → RIPKPSTPPGSS)	CAAGCCCAGTACCCCCCAGGTTCTTCATGCCCAGGTAAGCCAGCCCA G	SEQ ID NO :60
引物名称	引物序列 (5' → 3')	SEQ ID NO
(M15)hIgG1 铰链 ²¹⁸ KSCDK → KSSCDK f(v17)	AGCCCAAATCTTCTTGTGACAAAACCTCACAC	SEQ ID NO :61
(M16)hIgG1 铰链 ²¹⁸ KSCDK → KSSCDK r(v17)	GTCACAAGAAGATTTGGGCTCTGCAGAGAGAA	SEQ ID NO :62
(M17)hIgG1 铰链 ²¹⁸ KSCDK → KCSDK f(v18)	GCCCAAATGTTCTGACAAAACCTCACACATGCC	SEQ ID NO :63
(M18)hIgG1 铰链 ²¹⁸ KSCDK → KCSDK r(v18)	TTTTGTGACAACATTTGGGCTCTGCAGAGAGAA	SEQ ID NO :64
(M19)hIgG1CH1 (¹³¹ SSKS → GCSD) r	AGGTGTCACTGCAGCCGGGTGCCAGGGGAAGACCGAT	SEQ ID NO :65
(M20)hIgG1CH1 (¹³¹ SSKS → GCSD) f	ACCCGGCTGCAGTGACACCTCTGGGGGCACAGCGGCC	SEQ ID NO :66
(M21)hIgG1 CH1 (¹²⁹ APSSKS → VPGCSD) r	TGTCACTGCAGCCGGGACCAGGGGAAGACCGATGGGC	SEQ ID NO :67
(M22)hIgG1 CH1 (¹²⁹ APSSKS → VPGCSD) f	GGTCCCCGGCTGCAGTGACACCTCTGGGGGCACAGCGGC	SEQ ID NO :68
(M23)hIgG1 CH1 S131C f	CCTGGCACCTGCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA	SEQ ID NO :69
(M24)hIgG1 CH1 S131C r	AGGTGCTCTTGAGCAGGGTCCAGGGGAAGACCGAT	SEQ ID NO :70

(M25)hIgG1 CH1 ¹³¹ SSK → CSR f	CCTGGCACCTGCTCCAGGAGCACCTCTGGGGCACAGCG	SEQ ID NO :71
(M26)hIgG1 CH1 ¹³¹ SSK → CSR r	CAGAGGTGCTCCTGGAGCAGGGTGCCAGGGGAAGACCGA	SEQ ID NO :72
(M27)LC_GGG-r	CACTCTCCACCACCTCCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTG	SEQ ID NO :73
(M28)LC_GGG-f	GGGGAGGAGGTGGTGGAGAGTGTAGAGGGAGAAGTG	SEQ ID NO :74
(M29)LC_GG-r	ACACTCTCCACCTCCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTG	SEQ ID NO :75
(M30)LC_GG-f	AGGGGAGGAGGTGGAGAGTGTAGAGGGAGAAGTG	SEQ ID NO :76
(M31)LC_GG-r	AACACTCTCCTCCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTG	SEQ ID NO :77
(M32)LC_GG-f	CAGGGGAGGAGGAGAGTGTAGAGGGAGAAGTG	SEQ ID NO :78
(M33)LC_G-r	AACACTCTCCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTG	SEQ ID NO :79
(M34)LC_G-f	CAGGGGAGGAGAGTGTAGAGGGAGAAGTG	SEQ ID NO :80
(M35)LC_GE-r	AACACTCTCCTCCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTG	SEQ ID NO :81
(M36)LC_GE-f	CAGGGGAGGAGGAGAGTGTAGAGGGAGAAGTG	SEQ ID NO :82
(M37)LC_GGE-r	CACTCTCCCTCACCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTG	SEQ ID NO :83
(M38)LC_GGE-f	CAGGGGAGGTGAGGGAGAGTGTAGAGGGAGAAG	SEQ ID NO :84
(M39)LC_GGGE-r	CACTCTCCCTCACCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTG	SEQ ID NO :85
引物名称	引物序列 (5' → 3')	SEQ ID NO
(M40)LC_GGGE-f	CAGGGGAGGTGGTGGAGGAGAGTGTAGAGGGAGAAG	SEQ ID NO :86

[0274]

[0275]

[0276]

[0277] 结果

[0278] 流式细胞分析得到的变体 5F1 抗体的结合和诱导凋亡效果显示于图 3 和下表 7。c5F1v0, c5F1v15 和 c5F1v16 结合 COLO 205 细胞并在 COLO 205 细胞中诱导凋亡, 正如其的小鼠对应抗体 m5F1。与 c5F1 相比, c5F1v15 和 c5F1v16 与 COLO 205 细胞结合相对较少。就诱导凋亡而言, c5F1v0 处理的细胞中观察到的效果不如 m5F1 有效。然而, 当使用铰链修饰形式 (c5F1v15 和 c5F1v16) 时, 诱导凋亡的活性被修复了。c5F1v15 和 c5F1v16 几乎和 m5F1 一样在 COLO 205 细胞中有效诱导凋亡, 尽管 c5F1v15 和 c5F1v16 与 COLO 205 细胞的结合活性似乎低于 c5F1v0。32 μg/ml 的同种型对照抗体 9E10 (小鼠 Ig 对照) 和 h16C11A (人

Ig 对照) 没有在 COLO 205 细胞中诱导凋亡。

[0279] 表 7 :5F1 抗体在 COLO 205 细胞中的 6 小时凋亡实验

[0280]

(ug/ml)	2	4	8	16	32
m5F1	35	53	76	92	93
c5F1 v0		33	46	68	78
c5F1 v15		64	82	93	96
c5F1 v16		58	78	92	96
m9E10					23
h16C11A					25

[0281] (膜联蛋白 V 阳性和 / 或 PI 阳性细胞的%)

[0282] 实施例 4. 5F1 抗体的人源化

[0283] 5F1 的人源化版本也被研制 (图 4) 并掺入至具有恒定区修饰的表达质粒 (见实施例 2 和 3)。

[0284] 使用互补决定区 (CDR) 移植以生成人源化 5F1 (h5F1M) 的可变区, 其中使用重组 DNA 技术将小鼠 5F1 可变区的 CDR 掺入人 IgG1 可变区 (受体抗体) 的框架内。为决定鼠类 5F1 的最适受体抗体, 鼠类 5F1 的可变区序列和在 AbGenomics 生成的免疫球蛋白数据库一起分析。鼠类抗体 M195 (ManSung Co 等, J Immunol. 148 (4) :1149-1154 (2. 15. 1992)) 显示为鼠类 5F1 的最适抗体。人抗体 Eu (Man Sung Co 等, J Immunol. 148 (4) : 1149-1154 (2. 15. 1992)) 因此被选为受体抗体。设计并合成了核苷酸序列以生成人源化 5F1 版本, 其中鼠类 5F1 的 3 个 CDR 区并入抗体 Eu 的可变区框架。

[0285] 为改造 h5F1M 的每个 V 基因, 合成了 4 对长 55-70 个碱基的、顺序地共有至少为 18 个核苷酸的重叠区域的寡核苷酸 (表 8。对于重链 :H1-H8, 对于轻链 :L1-L8)。完整 V 基因的组装和扩增分 4 步实施 :1) 4 对互补寡核苷酸 (用于重链 :H1/H2、H3/H4、H5/H6 和 H7/H8 ; 用于轻链 :L1/L2、L3/L4、L5/L6 和 L7/L8) 经退火, 之后 3' 凹缺区用 Klenow 片段经分别的反应补平以形成 4 个双链 DNA (dsDNA) 片段 ;2) 得到的 4 个 dsDNA 片段经配对混合、变性、再退火, 之后 3' 凹缺区经 2 个分别的反应补平以生成 2 条 dsDNA 片段 ;3) 得到的 2 个 dsDNA 片段经混合、变性、再退火, 之后 3' 凹缺区经补平以生成全长 dsDNA ;4) 之后使用 2 条包含 XbaI 位点的外引物 (用于重链 :A10 和 A11, 用于轻链 :A12 和 A13 (表 8) 进行 PCR 反应以扩增组装的 VL 和 VH 片段。

[0286] 包含 XbaI 的 VH 和 VL 片段之后经 NheI 位点和 AvrII 位点插入 pcDNA5-FRT-hIgG1 载体, 分别用于重链和轻链。包含 h5F1M 重链和轻链基因的、完全组装的 h5F1M 表达质粒 h5F1M/pcDNA5-FRT-hIgG1 被用于表达未修饰的 h5F1M 抗体。同样的质粒也作为模板用于 h5F1M 修饰的引入 (图 4)。

[0287] h5F1M 的修饰

[0288] 使用重叠 PCR 和基于 PCR 的定点诱变以修饰 h5F1M 的可变区 (图 4), 使用列于表 8 和 9 的引物。未修饰的或经修饰的 h5F1 的可变区并入人 IgG 恒定区 (未修饰的或经修饰的), 如实施例 2-3 中所提及。之后将表达质粒转染进 CHO 细胞。收集上清并用蛋白质 A 纯化抗体。在 COLO 205 细胞中检测纯化抗体的结合和诱导凋亡的功能。

[0289] 表 8 :在人工改造人源化 5F1 抗体的变体中使用的引物列表

[0290]

引物名称	引物序列 (5' → 3')	SEQ ID NO
(A10) 5F1MH-A (65mer)	TCTATCTAGATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCCCTCCTGTCAGGTAC CGGGGGCGTGCACTC	SEQ ID NO :97
(A11) 5F1MH-B (56mer)	ACCCCTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACTGTGACCCAGGGTTTC CTTGGC	SEQ ID NO :98
(H1) 5F1MH-1f (69mer)	GTCAGGTACCCGGGGCGTGCACCTCTCAGGTCCAGCTTGTCCAGTCTGGGG CTGAAGTCAAGAAACCTGG	SEQ ID NO :99
(H2) 5F1MH-2r (66mer)	AGTAAAGGTGTAGCCAGAAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACGGCTCGAGCCAG GTTTCTTGACTTCAGC	SEQ ID NO :100
(H3) 5F1MH-3f (67mer)	GCTTCTGGCTACACCTTTACTAGCTATGTTATGCACCTGGGTAAGGCAGGC CCCTGGACAGGGTCTGG	SEQ ID NO :101
(H4) 5F1MH-4r (66mer)	TTGTACTGAGTACCACCAATTGTAAGGATTAATATATATCCAAATCCATTCACG ACCCGTCCAGGGGCC	SEQ ID NO :102
(H5) 5F1MH-5f (62mer)	ATGGTGGTACTCAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACAATTACT GCAGACGAATCC	SEQ ID NO :103
(H6) 5F1MH-6r (63mer)	CCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGTCCATGTAGGCTGTATTGGTGGATTCCG TCTGCAGTAATTG	SEQ ID NO :104

(H7) 5F1MH-7f (64mer)	GAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCAGTCTATTACTGTGCAAGACGGGA CCTTCCCGTACTAC	SEQ ID NO :105
(H8) 5F1MH-8r (60mer)	TGAGGAGACTGTGACCAGGGTTCCTTGGCCCCAGTAGTCAAAGTAGTACG GGAAGGTCCG	SEQ ID NO :106
(A12) 5F1ML-A (59mer)	TCTATCTAGATGGAGACCGATACCCCTCCTGCTATGGGTCCCTCCTGCTATG GGTCCCAGG	SEQ ID NO :107
(A13) 5F1ML-B (58mer)	ACCCTCTAGAATTAGGAAAGTGCACCTTACGTTTCAGCTCCACCTTGGTCC CCTGACCG	SEQ ID NO :108
(L1) 5F1ML-1f (62mer)	TCCTGCTATGGGTCCCAGGATCAACCGGAGATATTCAGATGACCCAGTCT CCATCTTCCCTC	SEQ ID NO :109
(L2) 5F1ML-2r (60mer)	GATCTGCAGGTTATGGTGACCCCTATCCCCGACGCTAGCAGAGAGGGGAAGA TGGAGACTGG	SEQ ID NO :110
(L3) 5F1ML-3f (64mer)	CACCATAACCTGCAGATCTAGTCAGAGCATTTTACATAGTAATGGAAACA CCTATTTAGAATGG	SEQ ID NO :111
(L4) 5F1ML-4r (60mer)	GATTAGAAGCTTGGGAGCTTTGCCCTGGCTTCTGCTGGTACCAATCTAAAT AGGTGTTTCC	SEQ ID NO :112
(L5) 5F1ML-5f (66mer)	GCTCCCAAGCTTCTAATCTATAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGAGTCCC TTCACGCTTCAGTGGC	SEQ ID NO :113

(L6) 5F1ML-6r (61mer)	GCAGAGAGCTGATTGTGAGGGTGAAAATCGGTCCCAGATCCCACTGCCACTG AAGCGTGAAGG	SEQ ID NO : 114
(L7) 5F1ML-7f (56mer)	CTCACAATCAGCTCTCTGCAGCCAGATGATTTTCGCCACTTATTACTGCTT TCAAGG	SEQ ID NO : 115
(L8) 5F1ML-8r (63mer)	CCACCTTGGTCCCCCTGACCGAACGTGAGAGGAGCATGTGAACCTTGAAAG CAGTAATAAGTGG	SEQ ID NO : 116
(A14) h5F1ALC- B r (58mer)	ACCCTCTAGAATTAGGAAAGTGCACCTTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCC CCTGACCG	SEQ ID NO : 117
(M41) h5F1A/M/ D HC-R106T, T110S f	GCAGCCTGACATCTGAGGACAGCGC	SEQ ID NO : 118
(M42) h5F1A/M/ D HC-R106T, T110S r	GACTGGCTGTCCCTCAGATGTCAGGCTGCTCAGTTCCATG	SEQ ID NO : 119
(M43) h5F1M HC E93T-r	TTGGTGGATGTGTCTGCAGTAATTGTGGCCT	SEQ ID NO : 120
(M44) h5F1M HC E93T-f	ACTGCAGACACATCCACCAATACAGCCTACA	SEQ ID NO : 121

(M45) h5F1M LC Fw3-r	TCCCAGATCCTCAGCCTCCACTCTGCTGATCTTGAGGGTGAATCGGTCC CA	SEQ ID NO :122
(M46) h5F1M LC Fw3-f	AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAACCTTATTACTGCTTTCAAGG	SEQ ID NO :123
(M47) h5F1A-HC A95S-f	GACACATCCTCCAGTACAGCCTACATGGAA	SEQ ID NO :124
(M48) h5F1A-HC A95S-r	GCTGTACTGGAGGATGTGTCTGAAGTAATTG	SEQ ID NO :125
(M49) h5F1A LC Fw3-r	TCCCAGATCTTCAGCCTCCACTCTGCTGATCTTGAGGGTGAATCGGTCC CAGATC	SEQ ID NO :126
(M50) h5F1A LC Fw3-f	AGAGTGGAGGCTGAAGATCTGGGAACCTTATTACTGCTTTCAAGG	SEQ ID NO :127
(M51) h5F1AHC- S35A f	GTC AAGAAACCTGGCGGAGCGTGAAGGTC	SEQ ID NO :128
(M52) h5F1AHC- K86R, A87V f	CAAAGGCAGGCTCACAATTACTGCAGACCGAATC	SEQ ID NO :129

(M53) h5F1AHC- K86R, A87V r	TAAATTGTGACCCCTGCCCTTTTGAACCTTCTCATTG	SEQ ID NO :130
(M54) h5F1A HC-A91S, E93T, T95A, N96S f	TTCAGACACATCCGCCAGTACAGCCTACATGGAACCTGAG	SEQ ID NO :131
(M55) h5F1A HC-A91S, E93T, T95A, N96S r	TACTGGCGGATGTGTCTGAAGTAAATTGTGACCCCTGCCCTTTG	SEQ ID NO :132
(M56) h5F1A HC-G63R, I67M f	AGCGTCTGGAATGGATGGGATATATTAATCCTTACAA	SEQ ID NO :133
(M57) h5F1A HC-G63R, I67M r	TCCCATCCATTCCAGACGCTGTCCAGGGGCCCTGCCCTTA	SEQ ID NO :134
(M58) h5F1A LC-L98F f	GGACCGATTTCCACCTTCACAATCAGCTCTC	SEQ ID NO :135

(M59) h5F1A LC-D106E, F107I f	CAGCCAGAAGATATCGCCACTTATTACTGCTTT	SEQ ID NO :136
(M60) h5F1A LC-D106E, F107I r	GTGGCGATATCTTCTGGCTGCAGAGAGCTGAT	SEQ ID NO :137

[0291]

[0292]

[0293] 表 9 :用于修饰 h5F1M 的引物

[0294]

	VH		VL	
	突变引物	扩增引物	突变引物	扩增引物
h5F1M Va	M41/M42	A10/A11	--	--
h5F1M Vs	M41/M42, M43/M44	A10/A11	M45/M46	A12/A13
h5F1A Va	M41/M42, M51, M52/M53, M54/M55, M56/M57,	A10/A11	M58, M59/M60	A12/A14
h5F1A Vs	M51, M52/M53, M54/M55, M56/M57, M41/M42, M47/M48	A10/A11	M58, M59/M60, M49/M50	A12/A14

[0295] 实施例 5. 嵌合 5F1 变体的表征

[0296] 抗体与 Colo205 细胞的结合

[0297] 1 μ g/ml 纯化的 m5F1、c5F1v0、c5F1v17、c5F1v24 和 c5F1v25 抗体加入 2×10^5 Colo 205 细胞中, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, 用包含 1% FBS 的 PBS 清洗 2 次, 之后与 1 μ g/ml 相应的二抗 (R-PE 缀合的山羊 F(ab')₂ 抗小鼠 IgG(H+L), Southern Biotech, 目录号 1032-09; 或 R-PE 缀合的山羊抗人 IgG, Southern Biotech, 目录号 2040-09) 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。染色结束后, 样品用包含 1% FBS 和 0.05% NaN₃ 的 PBS 洗 2 次并用流式细胞仪分析。所有流式细胞分析在 BD-LSR 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 上进行, 使用 Cell Quest 软件。表 10 的数据表明所有检测的 5F1 抗体版本可以和 Colo205 细胞结合。

[0298] 表 10. 与 Colo205 细胞的结合

[0299]

抗体	荧光强度中值 (MFI)
mIgG3	7
m5F1	800
hIgG1	6
c5F1v0	2760
c5F1v17	2303
c5F1v24	3134
c5F1v25	3174

[0300] 凋亡实验

[0301] 1.5×10^5 的 COLO 205 细胞接种于 96 孔板的孔中。在培养液中新鲜准备等份试样的纯化 m5F1、c5F1、c5F1v17、c5F1v24、c5F1v25 和对照抗体, 以 8 至 32 μ g/ml 的浓度加入

至每个孔。在用 FACS 分析凋亡前,将处理的细胞在 37° 恒温箱中维持 6 小时。细胞凋亡实验中,依照制造商的说明书使用膜联蛋白 V-FITC 凋亡检测试剂盒 (Strong Biotech, 目录号 AVK250) 检测膜联蛋白 V 染色。简而言之,经处理的细胞于室温收集和重悬于包含膜联蛋白 V-FITC 的膜联蛋白 V 结合缓冲液。在黑暗中孵育 15 分钟后,用 200 μ l 膜联蛋白 V 结合缓冲液清洗细胞 2 次。在 FACS 分析前,加入 0.25 μ g/ml 碘化丙啶 (PI)。所有流式细胞分析在 BD-LSR 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 上进行,使用 Cell Quest 软件。膜联蛋白 VI 阳性和 / 或 PI 阳性细胞被认为是凋亡细胞。表 11 的数据显示所有检测的 5F1 抗体版本可以在 Colo205 细胞中诱导凋亡。

[0302] 表 11(a, b). Colo205 细胞中的凋亡诱导

[0303] (a) 实验 1

[0304]

	8ug/ml	16ug/ml	32ug/ml
m5F1	88	92	92
c5F1v0	34	60	70
c5F1v24	33	52	62
c5F1v25	26	43	50
mIgG1			17
hIgG1			18

[0305] (膜联蛋白 V 阳性和 / 或 PI 阳性细胞的%)

[0306] (b) 实验 2

[0307]

	8ug/ml	16ug/ml	32ug/ml
m5F1	89	94	96
c5F1v0	54	63	69
c5F1v17	51	56	60
mIgG1			26
hIgG1			27

[0308]

[0309] (膜联蛋白 V 阳性和 / 或 PI 阳性细胞的%)

[0310] 异种移植研究

[0311] 5×10^6 Colo205 细胞在第 0 天经皮下植入 6-7 周龄 SCID 小鼠的后肋区。在接种完肿瘤细胞后从第 0 天开始腹腔内注射 30mg/kg 的抗体处理,并在第 4、7、11、14 和 18 天重复。每个实验组使用 6 只小鼠。肿瘤生长的评估基于每周 2 次用卡尺测量的肿瘤体积 (mm^3),肿瘤的大小使用以下公式计算: $\pi / 6 \times \text{大直径} \times (\text{小直径})^2$ (Kievit E, CancerResearch, 60 : 6649-55)。第 21 天处死小鼠,分离肿瘤并测量其重量。表 12 显示的结果表明,和用 PBS 处理相比所有被检测的抗体的抗肿瘤作用。

[0312] 表 12. 异种移植研究

[0313]

	肿瘤大小 (mm^3)	肿瘤重量 (g)
PBS	521.695 ± 129.006	0.3228 ± 0.0707
c5F1v17 (30mg/kgx6)	$169.698 \pm 68.798^*$	$0.0925 \pm 0.0360^*$
c5F1v24 (30mg/kgx6)	$44.108 \pm 37.382^*$	$0.0170 \pm 0.0154^*$
c5F1v25 (30mg/kgx6)	$111.093 \pm 56.051^*$	$0.0682 \pm 0.0320^*$

[0314] * 第 21 天和 PBS 处理相比 $P < 0.01$ (斯氏 t 检验)。

[0315] 5F1 抗体与奥沙利铂组合诱导 Colo205 细胞凋亡的协同作用

[0316] 1.4×10^5 Colo205 细胞接种于 96 孔板的孔中。临时准备等份试样的重建于 5% 葡萄糖溶液的奥沙利铂并以 1 和 $10 \mu\text{g/ml}$ 的终浓度加入至每个孔,单独或与终浓度为 10 和 $30 \mu\text{g/ml}$ 的等份试样纯化的 c5F1v17、c5F1v24、c5F1v25 和对照抗体组合加入。在用 FACS 分析凋亡前,将处理的细胞在 37°C 恒温箱中维持 24 小时。细胞凋亡实验中,依照制造商的说明书使用膜联蛋白 V-FITC 凋亡检测试剂盒 (Strong Biotech, 目录号 AVK250) 检测膜联蛋白 V 染色。简而言之,处理的细胞于室温收集和重悬于包含膜联蛋白 V-FITC 的膜联蛋白 V 结合缓冲液。在黑暗中孵育 15 分钟后,用 $200 \mu\text{l}$ 膜联蛋白 V 结合缓冲液清洗细胞 2 次。在 FACS 分析前,加入 $0.5 \mu\text{l}$ 碘化丙啶 (PI)。所有流式细胞分析在 BD-LSR 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 上进行,使用 Cell Quest 软件。膜联蛋白 V 阳性和 / 或 PI 阳性细胞被认为是凋亡细胞。表 13 的数据显示所有检测的 5F1 抗体与奥沙利铂组合诱导 Colo205 癌细胞凋亡的协同作用。

[0317] 表 13. 5F1 抗体与奥沙利铂组合的作用

[0318]

%凋亡 *	奥沙利铂 0	奥沙利铂 $1 \mu\text{g/ml}$	奥沙利铂 $10 \mu\text{g/ml}$
抗体 0	0	2	6
HIg $30 \mu\text{g/ml}$	1	4	2

G5F1v17 10ug/ml	27	30	46
c5F1v17 30ug/ml	49	55	62
c5F1v24 10ug/ml	19	30	42
c5F1v24 30ug/ml	31	49	54
c5F1v25 10ug/ml	20	35	53
c5F1v25 30ug/ml	44	54	63

[0319] * 已减去背景

[0320] m5F1 抗体与 SU86.86 胰腺癌细胞的结合和诱导凋亡

[0321] 纯化的 m5F1 和对照抗体以 $1 \mu\text{g/ml}$ 加入 2×10^5 SU. 86.86 细胞中, 4°C 孵育 1 小时, 用包含 1% FBS 的 PBS 洗 2 次, 之后和 $1 \mu\text{g/ml}$ 相应的二抗 (R-PE- 缀合的山羊 F(ab')₂ 抗小鼠 IgG (FRL), Southern Biotech, 目录号 1032-09) 4°C 孵育 1 小时。染色结束后, 样品用包含 1% FBS 的 PBS 洗 2 次并用流式细胞仪分析。所有流式细胞分析在 BD-LSR 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 上进行, 使用 Cell Quest 软件。

[0322] 表 14. 5F1 和 Su. 86.86 细胞的结合

[0323]

抗体	MFI
仅 2 nd 抗	6
m5F1	131

[0324] 将 2×10^5 SU86.86 细胞接种于 12 孔板的孔中。在培养液中临时准备浓度为 2 至 $32 \mu\text{g/ml}$ 的等份试样的纯化 m5F1 并加入至每个孔中。包括 $32 \mu\text{g/ml}$ 的对照抗体用于背景信号的测量。在用 FACS 分析凋亡前, 将处理的细胞在 37°C 恒温箱中维持 6 小时。细胞凋亡实验中, 依照制造商的说明书使用膜联蛋白 V-FITC 凋亡检测试剂盒 (Strong Biotech, 目录号 AVK250) 检测膜联蛋白 V 染色。简而言之, 被处理的细胞于室温被收集和重悬于包含膜联蛋白 V-FITC 的膜联蛋白 V 结合缓冲液。在黑暗中孵育 15 分钟后, 用 $200 \mu\text{l}$ 膜联蛋白 V 结合缓冲液清洗细胞 2 次。在 FACS 分析前, 加入 $0.25 \mu\text{g/ml}$ 碘化丙锭 (PI)。所有流式细胞分析在 BD-LSR 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 上进行, 使用 Cell Quest 软件。膜联蛋白 VI 阳性和 / 或 PI 阳性细胞被认为是凋亡细胞。

[0325] 表 15. m5F1 抗体诱导的 SU86.86 凋亡

[0326]

	0	2ug/ml	4ug/ml	8ug/ml	16ug/ml	32ug/ml
--	---	--------	--------	--------	---------	---------

mIgG1	ND	ND	ND	ND	ND	36
m5F1	36	60	72	78	89	91

[0327] (膜联蛋白 V 阳性和 / 或 PI 阳性细胞的%)

[0328] 表 14 和 15 所示的数据显示, m5F1 可以和胰腺癌细胞系 SU. 86. 86 结合, m5G1 的结合在 SU. 86. 86 细胞中诱导凋亡。

[0329] 结合实验使用抗体 c5F1. v15、c5F1. v16 和 c5F1. c24。这些抗体显示了与 SU. 86. 86 细胞的显著结合。对抗体 c5F1. v15 进行凋亡实验。数据表明 $8 \mu\text{g/ml}$ 和 $32 \mu\text{g/ml}$ 的该抗体仅在 Fc γ 片段特异的交联剂 (cross-linker) 小鼠抗 - 人 IgG 存在时诱导 SU. 86. 86 细胞的凋亡 (Jackson ImmunoResearch 209-005-098)。

[0330] 文献

[0331] Pimenidou, A., Madden, L. A., Topping, K. P., Smith, K. A., Monson, J. R. 和 Greenman, J. (2004) Novel CD43 specific phageantibodies react with early stage colorectal tumours. *Oncol. Rep.* 11(2) :327-31.

[0332] Fernandez-Rodriguez, J., Andersson, C. X., Laos, S., Baeckstrom, D., Sikut, A., Sikut, R. 和 Hansson, G. C. (2002) The leukocyte antigen CD43 is expressed in different cell lines of nonhematopoietic origin. *Tumour Biol.* 23(4) :193-201.

[0333] Cermak, L., Simova, S., Pintzas, A., Horejci, V. 和 Andera, L. (2002) Molecular mechanisms involved in CD43-mediated apoptosis of TF-1 cells. Roles of transcription Daxx expression, and adhesion molecules. *J Biol Chem.* 8 ;277(10) : 7955-61.

[0334] Carlow, D. A., Corbel, S. Y. 和 Ziltener, H. J. (2001) Absence of CD43 fails to alter T cell development and responsiveness. *J Immunol.* 166(1) :256-61.

[0335] Nieto, M., Rodriguez-Fernandez, J. L., Navarro, F., Sancho, D., Frade, J. M., Mellado, M., Martinez-A, C., Cabanas, C. 和 Sanchez-Madrid, F. (1999) Signaling through CD43 induces natural killer cell activation, chemokine release, and PYK-2 activation. *Blood.* 94(8) :2767-77.

[0336] Sikut, R., Andersson, C. X., Sikut, A., Fernandez-Rodriguez, J., Karlsson, N. G. 和 Hansson, G. C. (1999) Detection of CD43 (leukosialin) in colon adenoma and adenocarcinoma by novel monoclonal antibodies against its intracellular domain. *Int. J. Cancer.* 82(1) :52-8.

[0337] Lopez, S., Seveau, S., Lesavre, P., Robinson, M. K. 和 Halbwachs-Mecarelli, L. (1998) CD43 (sialophorin, leukosialin) shedding is an initial event during neutrophil migration, which could be closely related to the spreading of adherent cells. *Cell Adhes. Commun.* 5(2) :151-60.

[0338] Stockton, B. M., Cheng, G., Manjunath, N., Ardman, B. 和 von Andrian, U. H. (1998) Negative regulation of T cell homing by CD43. *Immunity.* 8(3) :373-81.

[0339] McEvoy, L. M., Jutila, M. A., Tsao, P. S., Cooke, J. P. 和 Butcher, E. C. (1997) Anti-CD43 inhibits monocyte-endothelial adhesion in inflammation and

atherogenesis. *Blood*. 90(9) :3587-94.

[0340] Manjunath, N., Correa, M., Ardman, M. 和 Ardman, B. (1995) Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. *Nature*. 377(6549) :535-8

[0341] Pallant, A., Eskenazi, A., Mattei, M.G., Fournier, R. E. K., Carlsson, S. R., Fukuda, M. 和 Frelinger, J. G. (1989) Characterization of cDNA encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome 16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 :1328-32.

[0342] Shelley, C. S., Remold-O'Donnell, E., Davis III, A. E., Bruns, G. A. P., Rosen, F. S., Carroll, M. C. 和 Whitehead, A. S. (1989) Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 :2819-23.

```

HuIgG1_CR  ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHFFPAVLQSS 60
MuIgG3      ATTTAPSVYPLVPGCSDTSGSSVTLGCLVKGYFPEPVTVKWNYGALSSGVRTVSSVLQS- 59
*:*. . .*:*. . .*:*. . .*:*. . .*:*. . .*:*. . .*:*. . .*:*. . .*:*. . .*:*. . .*:*. . .*

HuIgG1_CR  GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP--PCPAPELL 118
MuIgG3      GFYSLSSLVTVPSSTWPSQTVICNVAHPASKTELIKRIEPR-IPKPSTPPGSSCPPGNIL 118
*:*****:*****:  **:**** * .*:*: :*:**  * . * * .** . :*:

HuIgG1_CR  GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ 178
MuIgG3      GGPSVFIFFPKPKDALMISLTPEVTCVVVDVSEDDPDVHVSWFVDNKEVHTAWTQPREAQ 178
*****:*****:**** **:*****:*:*: .*:*. .*:*. .**.* *:*** *

HuIgG1_CR  YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR 238
MuIgG3      YNSTFRVVSALPIQHQDWMRGKEFKCKVNKALPAPIERTISKPKGRAQTPQVYTIIPPR 238
****:****.*.: ****:.**:****.*****:****.**:.: *****:*. *

HuIgG1_CR  DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 298
MuIgG3      EQMSKKKVSLTCLVTNFFSEAI SVEWERNGELEDYKNTPPILDSDGTYFLYSKLTVDTD 298
::*:*:*****.*:.. *:**** **: *:*. .*:*. .*:*. .*:*. .*:*. .*:*. .*

HuIgG1_CR  RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 330
MuIgG3      SWLQGEIFTCSVVHEALHNHHTQKNLSRSPGK 330
* **.:*:***:*****:****.* ** ****
    
```

图 1

序列表

CH1

V0 [H]	(SEQ ID NO:9)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V1	(SEQ ID NO:11)	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V2	(SEQ ID NO:12)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V3	(SEQ ID NO:13)	ASTKGPSVFPLVPGCSDTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V4	(SEQ ID NO:14)	ASTKGPSVFPLAPGCDTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V5	(SEQ ID NO:15)	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V6	(SEQ ID NO:16)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V7	(SEQ ID NO:17)	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V8	(SEQ ID NO:18)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V9	(SEQ ID NO:19)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V10	(SEQ ID NO:20)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V11	(SEQ ID NO:21)	ASTKGPSVFPLVPGCSDTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V12	(SEQ ID NO:22)	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V13	(SEQ ID NO:23)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V14	(SEQ ID NO:24)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V15	(SEQ ID NO:25)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V16	(SEQ ID NO:26)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V17	(SEQ ID NO:27)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V18	(SEQ ID NO:28)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V19	(SEQ ID NO:29)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
V20	(SEQ ID NO:30)	***** * . ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	60

续

V0 [H]	GLYLSVVVTVPSSSLGTQTYICNVNPKSNTKVDKKV	EPKS---CDKTHTCPPCP	APEL	117
V1	GLYLSVVVTVPSSSLGTQTYICNVNPKSNTKVDKKV	EPKS---SDKTHTCPPCP	APEL	117
V2	GLYLSVVVTVPSSSLGTQTYICNVNPKSNTKVDKKV	EPKS---SDKTHTCPPCP	APEL	117
V3	GLYLSVVVTVPSSSLGTQTYICNVNPKSNTKVDKKV	EPKS---SDKTHTCPPCP	APEL	117
V4	GLYLSVVVTVPSSSLGTQTYICNVNPKSNTKVDKKV	EPKS---SDKTHTCPPCP	APEL	117

图 2A

V5	GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKKV	EPKS---	SDKTHTGPPCP	APEL	117
V6	GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKKV	EPKS---	SDKTHTGPPCP	APEL	117
V7	GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKKV	EPKS---	SDKTHTGSSCP	APEL	117
V8	GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKKV	EPKS---	SDKTHTGSSCP	APEL	117
V9	GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKKV	EPKS---	SD-KTPPGSSCP	APEL	117
V10	GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKKV	EPKS---	SD-KTPPGSSCP	APEL	117
V11	GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKKV	EPKS---	SD-KTPPGSSCP	APEL	117
V12	GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKKV	EPKS---	SD-KTPPGSSCP	APEL	117
V13	GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKKV	EPRI---	PKPSTPPGSSCP	APEL	118
V14	GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKKV	EPRI---	PKPSTPPGSSCP	APEL	118
V15	GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKKV	EPK---	SDKTHTCPPCP	APEL	116
V16	GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKKV	EPKS---	SDKTHTCPPCP	APEL	117
V17	GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKKV	EPKS---	SDKTHTCPPCP	APEL	118
V18	GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKKV	EPKC---	SDKTHTCPPCP	APEL	117
V19	GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKKV	EPKSKDKSDKTHTCPPCP	EPKSKDKSDKTHTCPPCP	APEL	120
V20	GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKKV	EPKSKDKSDKTHTCPPCP	EPKSKDKSDKTHTCPPCP	APEL	120

*****:*.*****

LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE 177

LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE 177

LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE 177

LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE 177

LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE 177

LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE 177

LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE 177

LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE 177

LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE 177

LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE 177

LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE 177

图 2B

V12	LGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE	177
V13	LGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE	178
V14	LGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE	178
V15	LGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE	176
V16	LGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE	177
V17	LGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE	178
V18	LGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE	177
V19	LGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE	180
V20	LGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE	180

	CH2	
V0 [H]	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V1	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V2	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V3	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V4	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V5	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V6	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V7	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V8	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V9	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V10	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V11	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V12	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V13	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	238
V14	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	238
V15	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	236
V16	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V17	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	238
V18	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
	CH3	
V0 [H]	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V1	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V2	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V3	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V4	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V5	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V6	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V7	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V8	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V9	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V10	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V11	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V12	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V13	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	238
V14	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	238
V15	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	236
V16	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237
V17	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	238
V18	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	237

图 2C

V19 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPS 240
 V20 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPS 240

CH3

V0 [H] RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 297
 V1 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 297
 V2 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 297
 V3 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 297
 V4 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 297
 V5 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 297
 V6 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 297
 V7 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 297
 V8 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 297
 V9 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 297
 V10 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 297
 V11 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 297
 V12 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 297
 V13 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 298
 V14 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 298
 V15 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 296
 V16 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 297
 V17 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 298
 V18 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 297
 V19 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 300
 V20 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSFGSFFLYSKLTVDK 300

图 2D

CH3		
V0 [H]	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	330
V1	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	330
V2	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	330
V3	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	330
V4	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	330
V5	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	330
V6	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	330
V7	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	330
V8	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	330
V9	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	330
V10	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	330
V11	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	330
V12	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	330
V13	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	331
V14	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	331
V15	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	329
V16	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	330
V17	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	331
V18	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	330
V19	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	333
V20	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	333

图 2E

```

k      seq (V19+修饰的 LC)
V0 [L] (SEQ ID NO: 10) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD 60
V21    (SEQ ID NO: 31) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD 60
V22    (SEQ ID NO: 32) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD 60
V23    (SEQ ID NO: 33) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD 60
V24    (SEQ ID NO: 34) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD 60
V25    (SEQ ID NO: 35) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD 60
V26    (SEQ ID NO: 36) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD 60
V27    (SEQ ID NO: 37) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD 60
*****
SKDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG-----EC 107
V21    SKDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG--EGEC 109
V22    SKDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGG-EGEC 110
V23    SKDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGGEGEC 111
V24    SKDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGG---EC 108
V25    SKDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGG--EC 109
V26    SKDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGGGG-EC 109
V27    SKDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGGGGEC 109
*****

```

图 2F

不同变体 5F1 抗体与 COLO 205 的结合

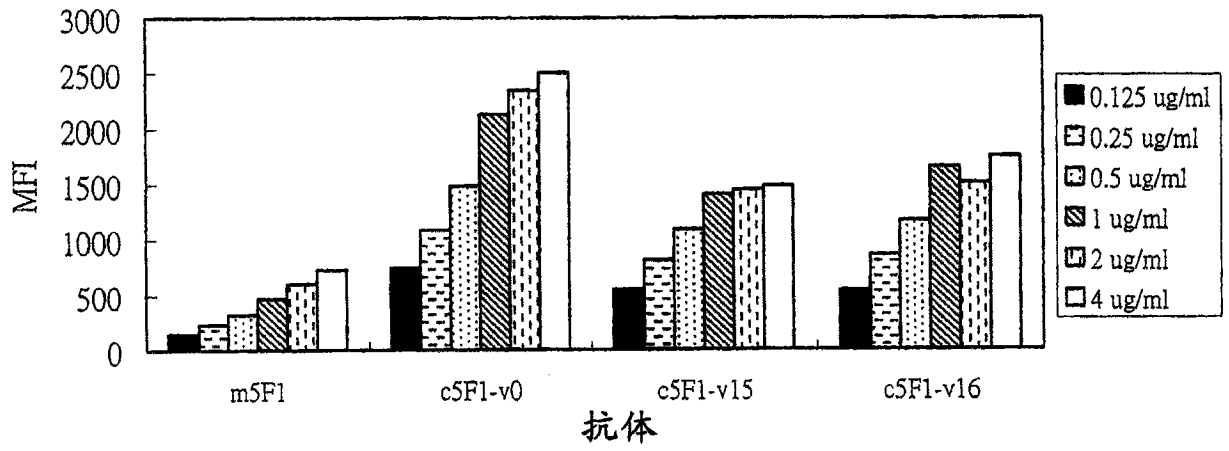


图 3

修饰的人源化 5F1 抗体的列表。对比 h5F1M, h5F1M Va, h5F1M Vs, h5F1A Va 和 h5F1A Vs 的 V_H(a) 和 V_L(b) 的氨基酸进行比较

(a)		Fw1	CDR1	Fw3
h5F1M_HC_SEQ	ID NO: 87	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFT	SYVMH	WVRQAP
h5F1Mva_HC_SEQ	ID NO: 88	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFT	SYVMH	WVRQAP
h5F1Mvs_HC_SEQ	ID NO: 89	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFT	SYVMH	WVRQAP
h5F1Ava_HC_SEQ	ID NO: 90	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT	SYVMH	WVRQAP
h5F1AVs_HC_SEQ	ID NO: 91	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT	SYVMH	WVRQAP
		*****	*****	*****
		Fw2	CDR2	Fw3
h5F1M_HC	GQGLEWIG	YINPYNQGGTQYNEKFKG	KATITADESTNTAYMELSSLSRSED	TAVYYCAR RTF
h5F1Mva_HC	GQGLEWIG	YINPYNQGGTQYNEKFKG	KATITADESTNTAYMELSSLSRSED	TAVYYCAR RTF
h5F1Mvs_HC	GQGLEWIG	YINPYNQGGTQYNEKFKG	KATITADTSTNTAYMELSSLSRSED	TAVYYCAR RTF
h5F1Ava_HC	GQRLEWMG	YINPYNQGGTQYNEKFKG	RVTIITSDTSSSTAYMELSSLSRSED	TAVYYCAR RTF
h5F1AVs_HC	GQRLEWMG	YINPYNQGGTQYNEKFKG	RVTIITSDTSSSTAYMELSSLSRSED	TAVYYCAR RTF
	** ** ** *	*****	*****	*****
		CDR3	Fw4	
h5F1M_HC	PYYFDY	WGQGTLVTVSS		
h5F1Mva_HC	PYYFDY	WGQGTLVTVSS		
h5F1Mvs_HC	PYYFDY	WGQGTLVTVSS		
h5F1Ava_HC	PYYFDY	WGQGTLVTVSS		
h5F1AVs_HC	PYYFDY	WGQGTLVTVSS		
	*****	*****		

图 4A

```

(b)
h5F1M _LC SEQ ID NO:92 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RSSQSILHSNGNTYLE W CDR1
h5F1Mva_LC SEQ ID NO:93 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RSSQSILHSNGNTYLE W
h5F1Mvs_LC SEQ ID NO:94 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RSSQSILHSNGNTYLE W
h5F1Ava_LC SEQ ID NO:95 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RSSQSILHSNGNTYLE W
h5F1AVs_LC SEQ ID NO:96 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RSSQSILHSNGNTYLE W
*****
YQQKPGKAPKLLIY KVSNRFS GVPSTRFSGSGGTDFTLTISSLPDDFATYYC FQGSHAP CDR3
h5F1M _LC YQQKPGKAPKLLIY KVSNRFS GVPSTRFSGSGGTDFTLTISSLPDDFATYYC FQGSHAP
h5F1Mva_LC YQQKPGKAPKLLIY KVSNRFS GVPSTRFSGSGGTDFTLTISSLPDDFATYYC FQGSHAP
h5F1Mvs_LC YQQKPGKAPKLLIY KVSNRFS GVPSTRFSGSGGTDFTLTISSLPDDFATYYC FQGSHAP
h5F1Ava_LC YQQKPGKAPKLLIY KVSNRFS GVPSTRFSGSGGTDFTLTISSLPDDFATYYC FQGSHAP
h5F1AVs_LC YQQKPGKAPKLLIY KVSNRFS GVPSTRFSGSGGTDFTLTISSLPDDFATYYC FQGSHAP
*****
LT FGQGTKVELK
h5F1M _LC LT FGQGTKVELK
h5F1Mva_LC LT FGQGTKVELK
h5F1Mvs_LC LT FGQGTKVELK
h5F1Ava_LC LT FGQGTKVEIK
h5F1AVs_LC LT FGQGTKVEIK
** *****:

```

图 4B