

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03819157.1

C07K 14/705

C07K 16/28

C12N 15/12

A61K 39/395

A61K 48/00

A61P 35/00

G01N 33/53

[43] 公开日 2005 年 9 月 28 日

[11] 公开号 CN 1675244A

[22] 申请日 2003.7.15 [21] 申请号 03819157.1

[30] 优先权

[32] 2002.7.15 [33] EP [31] 02015591.7

[32] 2002.9.11 [33] US [31] 60/410,331

[86] 国际申请 PCT/EP2003/007661 2003.7.15

[87] 国际公布 WO2004/007550 英 2004.1.22

[85] 进入国家阶段日期 2005.2.7

[71] 申请人 克斯里恩医药股份公司

地址 德国慕尼黑

[72] 发明人 C·M·翁格尔 C·策厄特迈尔

C·托雷拉 J·尼韦纳

B·阿伦斯 G·贝斯特

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

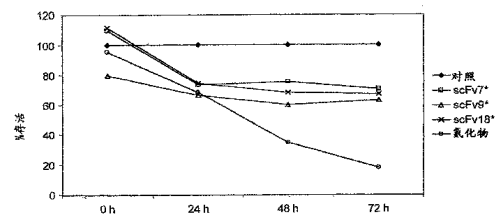
代理人 赵艳华

权利要求书 3 页 说明书 36 页 附图 28 页

[54] 发明名称 MCAM 抑制剂

[57] 摘要

本发明涉及抑制天然存在的肿瘤细胞中 MCAM 功能的多肽以及它们和抑制 MCAM 功能的其它分子在治疗癌症，尤其是降低特异癌症细胞侵袭力、增殖、粘附和/或转移潜能方面的用途。此外，还提供了可以确定天然存在的肿瘤细胞的侵袭力、粘附、增殖和/或其转移的潜能是否取决于功能性 MCAM 的方法。最后，还提供了用以鉴定能抑制肿瘤细胞侵袭、增殖或粘附的抗体或抗体片段的方法。



1. 含抗体互补决定区 CDR 编码序列的多肽, 所述序列选自: SEQ ID NO. 39 至 SEQ ID NO. 57、SEQ ID NO. 1 至 SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 19 至 SEQ ID NO. 23 和 SEQ ID NO. 29 至 SEQ ID NO. 33。

2. 权利要求 1 的多肽, 其中的多肽是抗体和/或抗体片段。

3. 权利要求 1 或 2 的多肽, 其中的抗体和/或抗体片段包含选自下列的序列: SEQ ID NO. 1 至 SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 19 至 SEQ ID NO. 23 和 SEQ ID NO. 29 至 SEQ ID NO. 33。

4. 权利要求 2 或 3 的多肽, 其中所述抗体选自: 人 IgA、人 IgD、人 IgE、人 IgG 和人 IgM; 具体而言是人 IgG 或人 IgM, 更具体而言是人 IgG1、人 IgG2a、人 IgG2b、人 IgG3 和人 IgG4。

5. 权利要求 1 至 4 任一项的多肽, 其中所述多肽用可检测的标记物标记; 具体而言其中所述可检测标记选自放射性同位素、酶、荧光团和生色团。

6. 包含依照权利要求 1 至 5 任一项中的多肽的生物缀合物。

7. 编码依照权利要求 1 至 5 任一项中的肽或多肽的分离核酸分子。

8. 权利要求 7 的分离核酸分子, 其中包含

(a) 选自以下序列的核酸序列: SEQ ID NO. 10 至 SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 24 至 SEQ ID NO. 28 和 SEQ ID NO. 34 至 SEQ ID NO. 38;

(b) 在严谨条件下与 a) 中任一序列杂交的核酸序列。

9. 包含依照权利要求 7 或 8 的核酸的载体。

10. 包含且能够表达依照权利要求 7 或 8 的核酸和/或依照权利要求 9 的载体的宿主细胞。

11. 依照权利要求 1 至 5 任一项的多肽和/或权利要求 6 的生物缀合物, 依照权利要求 7 或 8 的核酸序列, 依照权利要求 9 的载体和/或依照权利要求 10 的宿主细胞, 用作药物治疗增殖性病症或疾病。

12. 诊断试剂盒, 其包含依照权利要求 1 至 5 任一项的多肽、依

照权利要求 6 的生物缀合物、依照权利要求 7 或 8 的核酸序列和/或依照权利要求 9 的载体和容器。

13. 包含依照权利要求 1 至 5 任一项的多肽和/或依照权利要求 6 的生物缀合物、依照权利要求 7 或 8 的核酸序列和/或依照权利要求 9 的载体和药用可接受载体的组合物。

14. 依照权利要求 1 至 5 任一项的多肽和/或依照权利要求 6 的生物缀合物、依照权利要求 7 或 8 的核酸序列和/或依照权利要求 9 的载体和/或依照权利要求 10 的宿主细胞用作 MCAM(黑素瘤细胞粘附分子)抑制剂制备用于预防和/或治疗增殖性病征或疾病的药物中的用途,其中所涉及肿瘤细胞的增殖、粘附、侵袭和/或转移潜能取决于对 MCAM 功能的抑制作用。

15. 依照权利要求 14 的用途,其中另外的和/或可选择的 MCAM 抑制剂选自:化合物、抗体、抗体片段和抗独特型抗体。

16. 依照权利要求 1 至 5 的多肽和/或依照权利要求 6 的生物缀合物在鉴定特异结合人 MCAM 的分子中的用途。

17. 测定天然存在的侵袭性癌细胞的侵袭力对 MCAM 功能的依赖性的离体方法,包括以下步骤:

(a) 使癌细胞接触依照权利要求 1 至 8 中任一项的分子,除了 SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 13 或 SEQ ID NO. 17 之外;

(b) 在适于所述癌细胞生长的条件下使所述癌细胞接触凝胶样基质; 并

(c) 测定所述癌细胞通过凝胶样基质的迁移。

18. 鉴定特异结合 MCAM 细胞外区域的依照权利要求 1 至 5 的多肽、依照权利要求 6 的生物缀合物、抗体或抗体片段和/或依照权利要求 7 或 8 的核酸序列的方法,其中所述多肽、生物缀合物、抗体或抗体片段和/或核酸序列能抑制肉瘤细胞的侵袭力,所述方法包括以下步骤:

(a) 使抗体或抗体片段的噬菌体文库与侵袭性的肉瘤细胞接触;

- (b) 分离所述细胞;
- (c) 去除与所述细胞非特异结合和/或不与所述细胞结合的噬菌体;
- (d) 洗脱与所述细胞结合的噬菌体; 并任选地
- (e) 测定由所述的被洗脱噬菌体展示的抗体或抗体片段的特性。

19. 预防或治疗患者中增殖性病症或疾病、转移和/或癌症的方法, 所述方法包括对所述患者施用治疗有效量的依照权利要求 1 至 5 的多肽、依照权利要求 6 的生物缀合物、依照权利要求 7 或 8 的核酸序列、依照权利要求 9 的载体、依照权利要求 10 的宿主细胞、依照权利要求 13 的组合物和/或依照权利要求 14 或 15 制备的药物, 抑制 MCAM 介导的增殖、粘附、侵袭和/或转移潜能。

MCAM 抑制剂

发明背景

恶性肿瘤脱落细胞，它们迁移至新的组织并产生继发性肿瘤。产生继发性肿瘤的过程被称为转移，它是一个复杂的过程，其中肿瘤细胞移植至远离原发性肿瘤的部位。转移是一个多步骤过程，其中肿瘤细胞脱离原发性肿瘤，侵袭细胞基质，渗透过血管，从而进入循环系统（内渗），在远处停止迁移，退出血流（外渗）并生长。（参阅，如，G. L. Nicolson (1982) *Biochim. Biophys. Acta.* 695, 113 - 176; G. L. Nicolson 和 G. Poste (1983) *In. Rev. Exp. Pathol.* 25, 77 - 181; G. Poste 和 I. J. Fidler (1980) *Nature* 283, 139 - 145; 和 E. Roos (1984) *Biochim. Biophys. Acta.* 738, 263)。已提出肿瘤的转移过程涉及细胞粘附分子 (CAM's)，它们介导了细胞 - 细胞之间或细胞 - 基质之间的相互作用。

在多种肿瘤中上调的细胞粘附分子是 MCAM。MCAM 也已知为 MUC18、Mel - CAM 或 CD 146。MCAM 是一种表观分子量为 113000Da 的内在膜糖蛋白。它包含五个免疫球蛋白样结构域，且其胞质结构域含有数个蛋白激酶识别基元，这表明在细胞信号传导中涉及 MCAM（参阅，C. Sers 等 (1993) *Proc. Nat. Sci. USA* 90, 8514 - 8518）。

文献 (Xie 等 (1997) *Cancer Res.* 57, 2295 - 2303) 显示非侵袭性 SB - 2 细胞在经 MCAM cDNA 转染后变成侵袭性的。他们还证明了抗 MCAM 的单克隆抗体可抑制此人工诱导的侵袭。不过，以蛋白质过表达的研究为基础确定蛋白质的生理学作用是不安全的和推测性的，解释过表达试验的结果需要非常小心是科研中一条公认的准则。举例说来，基于过表达试验，已提出过氧化物酶蛋白质 PEX11 在脂肪酸氧化中起作用。文献 (Li 和 Gould (2002) *J. Cell Biol.* 156 (4): 643 - 651) 中细致的试验表明 PEX11 在过氧化物酶体分配中不具有这样的功能和

取代作用。

蛋白质生理学作用的确定是决定干扰此蛋白质功能是否是疾病治疗的一条可能途径的先决条件。必须记住的是，在生理学条件下，即，在天然存在的患者肿瘤细胞中，MCAM 与能调控和改变 MCAM 功能的其它蛋白质一起过表达。这是 MCAM 与决定 MCAMs 生理学作用的相关蛋白质之间在功能上的相互作用。文献 Shih (1999) J. Pathol 189, 4-11 通过证明 MCAM 的生理学作用涉及它与其尚未鉴定配体之间的相互作用证实了这一点。重要的是，与 MCAM 相互作用的蛋白质的表达在组织与组织间有所不同 (Shih 等 (1997) Cancer Res. 57 (17), 3835-3840)，为此原因在其中必定观察到 MCAM 过表达的结果。利用另一类型肿瘤 (即乳癌) 获得的结果也证实了这一点。Shih 等 (1997) Am. J. Pathol. 151 (3), 745-751 显示在此过程中侵袭被 MCAM 的高水平表达所抑制。在此过程中 MCAM 起到了肿瘤抑制剂的作用。为此，在侵袭和转移中 MCAM 的生理学作用尚未清楚。

转移形成的过程取决于肿瘤细胞的侵袭力。因此，这对于鉴定抑制侵袭并由此阻止原发性肿瘤转移的分子以及随后的药物开发将是有用的。

发明概述

发明者的成绩是以无偏筛选 (unbiased screen) 鉴定可抑制天然存在肿瘤细胞多肽 (特别是抗体和抗体片段) 侵袭力的分子，所述分子作为上述的抑制剂与 MCAM 的细胞外结构域结合。

本发明涉及所述多肽，它可以与 MCAM 的细胞外结构域特异结合并且抑制 MCAM 的功能。在优选的实施方案中，这些多肽是抗体片段或抗体。此外，如果需要，本发明的多肽可用可检测基团标记或可以作为生物缀合物的一部分。

本发明还涉及包含本发明多肽以及任选的药用可接受添加剂和稀释剂的组合物。

在另一实施方案中，本发明涉及编码本发明多肽的核酸分子，以

及含有所述核酸的载体和含有所述载体的宿主细胞。

在又一实施方案中,本发明涉及利用抑制 MCAM 功能的分子制备药物用于治疗或防止天然存在的癌细胞的侵袭和/或转移,其中所述癌细胞的侵袭力和/或转移潜能取决于 MCAM 功能。在另一实施方案中,这样的分子特异结合已表达的 MCAM 并且抑制 MCAM 的侵袭和/或转移功能。所述分子是与 MCAM 的细胞外结构域结合的小化合物或某些多肽,特别是本发明的多肽或生物缀合物。

在另一实施方案中,本发明涉及治疗或防止患者体内发生侵袭和/或转移的方法,其中所述癌细胞的侵袭和/或转移潜能取决于 MCAM 的功能。

在另一实施方案中,本发明涉及确定天然存在癌细胞的侵袭对于 MCAM 功能的依赖性的方法。

在另一实施方案中,本发明涉及抑制肉瘤细胞侵袭的抗体片段的鉴定方法,特别是与 MCAM 的细胞外结构域结合的所述抗体片段的鉴定方法。

发明详述

为了能更充分的了解本文所述的发明,进行了以下的详细说明。用于此处时,除非另外指出,否则应使用以下定义。

用于此处的“多肽”是含有 10 个以上、优选 20 个以上、最优选 30 个以上氨基酸且少于 10000 个、更优选少于 2500 个、最优选少于 1000 个氨基酸的分子。此外,还包括具有较高氨基酸同一性的多肽以及含有低百分率已修饰的或非天然氨基酸的多肽。

术语“抗体”和“免疫球蛋白”用于此处时是指任何免疫结合剂,包括多克隆和单克隆抗体。根据重链恒定区的类型,将抗体划归为五个主要种类中的一种: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。其中的数种被进一步划分为亚类或同种型,诸如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4, 等等。相应于不同种类免疫球蛋白的重链恒定区被分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同种类免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。

抗体还可选自经修饰的免疫球蛋白,例如,对于本发明相应抗体

片段而言,在其 CDR 区域内特别是在其 CDR3 区域内呈现较高氨基酸序列同一性且基本保持与相应抗体片段相同的与 MCAM 亲和性的化学或重组产生的抗体、CDR 移植抗体或人源化抗体、定位诱变抗体。

抗体的 CDR (互补性决定区)是这些分子中决定其特异性并使其与特异配基结合的部分。CDR 是分子中最可变的部分并且造成了这些分子的多样性。它们在结构上局限于人 IgG 内轻链的第 24-41 位(CDR-L1)、50-57 位(CDR-L2)和 90-101 位(CDR-L3)氨基酸和重链第 26-38 位(CDR-H1)、51-70 位(CDR-L2)和 100-125 (CDR-H3)氨基酸(参阅 Kabat 等(1987)第四版,US Department of Health and Human Services, Public Health Service, NIH, Bethesda)。本领域技术人员通过将抗体片段与所述人 IgG 进行比对并且鉴定相应与人 IgG CDR 的抗体片段的氨基酸,可以很容易的确定抗体片段的 CDR 区域,如,利用可以进行“Blast”的 NCBI 软件,从而将两种序列相互比较。

较高氨基酸序列同一性用于此处时是指两种被比对的氨基酸序列中至少 70%的氨基酸、优选至少 85%的氨基酸、更优选除了 5 个氨基酸之外的所有氨基酸、还更优选除了 3 个氨基酸之外的所有氨基酸以及更优选除了 1 个氨基酸以外的所有氨基酸,特别是比对的 CDR 是相同的。

术语“抗体片段”用于指具有抗原结合区的任何抗体样分子片段,此术语包括诸如 scFv、dsFv、Fab'、Fab、F(ab')₂、Fv、单结构域抗体(DAB)、二体等抗体片段。用于制备和使用各种基于抗体的构建体和片段的技术在本领域中是众所周知的(参阅 Kabat 等(1991) J. Immunol. 147, 1709-19),在此特别将它们收编作为参考。

“scFv”抗体片段包括抗体的 VH 和 VL 结构域,其中这些结构域存在于单一多肽链中。一般而言,scFv 多肽还包含 VH 和 VL 结构域之间能使 scFv 形成预期结构用于抗原结合的多肽接头。

“Fv”片段是保持完整抗原结合位点的最小抗体片段。“dsFv”是通过二硫化物稳定的 Fv。“Fab”片段是抗原结合片段,含有与重

链 VH 和 CH1 结构域配对的完整轻链。“Fab”片段是被还原的 $F(ab')_2$ 片段。 $F(ab')_2$ 片段是二价片段，包含在铰链区通过二硫桥连接的两个 Fab 片段。

“单结构域抗体 (DAB)”是只具有来自抗体结构中仅一个结构域的一条 (代替了两条) 蛋白链的抗体。对于一些抗体而言，抗体分子的一半几乎象完整分子一样很好的与其靶抗原结合，Dab 就是利用了这一发现 (Davies 等 (1996) *Protein Eng.* 9: 531 - 537)。

“二体”是二价的或双特异性的抗体，其中 VH 和 VL 结构域表达于一单一多肽链上，但使用的接头太短以至不能使同一条链上的两个结构域之间配对，从而促使结构域与另一条链的互补结构域配对并产生了两个抗原结合位点 (Holliger 等 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444 - 6448)。

术语“标记”或“被标记”分别指可检测标记物或这些标记物的掺入，例如，通过掺入荧光团 -、发色团 - 或放射性标记的氨基酸或者将荧光团、发色团或放射标记附着于多肽上或者附加通过被标记的第二种分子可检测的组分，所述被标记的第二种分子含有可通过光学或比色方法检测的荧光标记或酶活性。这样一种两步检测方法的例子是众所周知的生物素 - 亲和素系统。在本领域中已知并可以使用各种方法标记多肽和糖蛋白 (例如，参阅，Lobl 等 (1988) *Anal. Biochem.*, 170: 502 - 511)。

“表位”包括能特异结合免疫球蛋白或抗体片段的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团组成，诸如暴露的氨基酸、氨基糖或其它碳水化合物侧链等，且通常具有特殊的三维结构特性以及特殊的电荷特性。

本文所述“天然存在的癌细胞”是还未经过转染、转导或实验室中其它遗传工程处理的细胞。这样的细胞不包含如载体等人工 DNA 序列或只在其它物种中发现但在该天然存在癌细胞的来源物种中不经常能找到的 DNA 序列。不过，天然存在的癌细胞中可以包含在其来源物种中不经常发现的序列，只要那些序列是由病毒感染或突变过程以及

天然存在癌细胞来源个体中进行的的选择引起的以及/或在天然存在癌细胞的持续培养中产生的即可。

本发明上下文中优选使用和/或处理的选定的癌细胞类型包括:黑素瘤、乳腺癌、前列腺癌、星形细胞瘤、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、少突神经胶质细胞瘤、室管膜瘤、成神经管细胞瘤、原发性神经外胚层肿瘤(PNET)、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、胰腺导管腺癌、小细胞和大细胞肺腺癌、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、鳞状细胞癌、支气管气泡癌、上皮腺癌、以及它们的肝转移、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、肝癌、胆管癌、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏肿瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、基底细胞癌、汗腺癌、乳头状癌、皮脂腺癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、维耳姆斯氏瘤、睾丸肿瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室鼓膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑脊膜瘤、成神经细胞瘤、视网膜母细胞瘤、白血病、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症,以及重链和轻链疾病,还有子宫颈腺癌、子宫和卵巢上皮癌、转变中的膀胱细胞癌、B细胞和T细胞淋巴(结节状的和扩散状的)浆细胞瘤、急性和慢性白血病、软组织肉瘤和/或平滑肌肉瘤。

“治疗转移性肿瘤”,用于此处指肿瘤的转移被防止、延迟或抑制。

“转移性肿瘤”用于此处时包括在原发位点的能转移的肿瘤和在继发位点的已转移的肿瘤。这样的转移性肿瘤的组织来源可以是肺、肝、肾、胃、小肠、骨、脾、脑、周围神经系统、甲状腺、胰腺、子宫内膜、卵巢、宫颈、皮肤、结肠或淋巴组织。

“侵袭力”用于此处是细胞迁移穿越一层其它细胞的能力或迁移穿越胞外基质的能力。侵袭力可以通过实施例5所述的Matrigel测定进行评估。根据在一定保温期间到达过滤膜底面的细胞数估计侵袭的情况。在如实施例5的侵袭测定中,当6-12小时内40%以上的天然存在的癌细胞到达滤膜另一侧并形成集落时,这种天然存在的癌细胞

被定义为侵袭性的。相反对照细胞在同一时限内只形成 5% 的集落，并且因此被定义为非侵袭性的。

用于此处时“粘附性”是细胞在从其生长的基质上迁移走、以单个细胞溶液悬浮（不与溶液中的其它细胞直接接触）并再次铺于其有可能粘附的基质上后重新附着的能力。如果在实施例 7 中所述的测定中，在 30-120 分钟的时间内有 40% 以上的细胞粘附，则该细胞被定义为具有粘附性。然而，在同一时限内只有 5% 的对照细胞粘附。

用于此处时“增殖”是真核细胞（例如哺乳动物细胞）增生并自身分裂成子代细胞的能力。例如，在细胞培养物中，增殖导致总细胞数目随着时间而增加。

用于此处时，转移潜能是肿瘤细胞在远离其来源的原发性肿瘤部位形成新肿瘤（转移瘤）的能力。通过将例如 1×10^6 个细胞注射入无胸腺裸鼠的侧部尾静脉并在例如注射 2 个月后测定肺中肿瘤结节的数目来估量转移的潜能，参阅，例如：Huang 等（1996）*Oncogene* 13: 2339-2347 第 2346 页的“肿瘤细胞注射章节；或 Radinsky 等（1994）*Oncogene* 9: 1877-1883 第 1882 页的“动物和肿瘤的产生和“钙化基质的组化分析章节。此测定中在肺内产生 3 个以上、优选 8 个以上、更优选 20 个以上肿瘤结节的细胞系被认为是转移性。

治疗有效量是消除或降低患者肿瘤负荷的量或预防或减少转移的量。剂量取决于许多参数，包括肿瘤的特性、患者的病史、患者的状况、可能共同使用的细胞毒剂和给药方法。给药方法包括注射（如，肠胃外的、皮下的、静脉内的、腹膜内的注射，等等），其中抑制 MCAM 功能的分子在药用可接受载体中提供。一般而言，选择合适的载体和稀释剂，诸如水、盐水、Ringer's 溶液、葡萄糖溶液、5% 的人血清白蛋白、不挥发性油、油酸乙酯或脂质体，使其不会显著削弱结合剂的生物活性（如，结合特异性、亲和性或稳定性）。可接受载体可包括生物相容的、惰性的或生物可吸收的盐、缓冲剂、寡糖或多糖、多聚体、诸如透明质酸等粘弹性化合物、粘度改进剂、防腐剂，等等。此外，药用组合物或制剂还可包括其它载体、佐剂、或非毒性、非治

疗性、非免疫原性稳定剂等。典型的剂量范围为约 0.01 至 20mg/kg，或者更具体而言是从约 1mg/kg 至约 10mg/kg。

应用抑制 MCAM 功能的分子进行治疗的方法可与化疗、手术和放疗结合，取决于肿瘤的类型、患者的状况、其它健康组织和多种因素。

“抑制 MCAM 功能的分子”是导致 MCAM 活性被抑制的分子。可以通过测定 MCAM 生物活性的一个或多个指征，诸如 MCAM 依赖性侵袭或 MCAM 依赖性粘附，来评估此 MCAM 生物活性的抑制。MCAM 生物活性的这些指征可以通过数种体外或体内测定法中的一种或多种进行评估（参阅，实施例 5、7 和 6.2）。优选的，通过对 MCAM 诱导的侵袭性人肉瘤细胞（特别是实施例 5、7 和 6.2 中所用的细胞）的侵袭、粘附或增殖的抑制作用来评估分子抑制 MCAM 活性的能力。

本发明的“抑制 MCAM 功能的分子”不是作为蛋白质作用普通抑制剂的分子，如蛋白酶，如变性剂，例如尿素或盐酸胍，如重金属原子或如与生物分子（脂类、蛋白质、糖）共价和非特异反应的小分子（如，醛或异氰酸盐）。抑制 MCAM 功能的分子的特征在于在某一浓度抑制 MCAM 功能的能力，它在此浓度不抑制胰岛素受体（例如，按抗磷酸酪氨酸蛋白质印迹检测法所测定的，参阅，例如，B. Cariou 等（2002）*J Biol Chem.*, 277, 4845-52）和乙酰胆碱受体（如，根据 Ca 流入量的检测测定的，参阅，M. Montiel 等（2001）*Biochem Pharmacol.* 63, 337-42.）以及 B-CAM 细胞表面糖蛋白（例如，按文献 Udani 等（1998）*J. Clin. Invest.* 101(11):2550-2558 中第 2551 页的“流动腔测定法（*Flow chamber assays*）”部分所述，通过测定血红蛋白 A 红血细胞（AA RBCs）与固定化层粘连蛋白的结合）的功能。只有抑制 MCAM 功能但在同一浓度不显著影响所提及的其它三种受体功能的分子才是用于本专利中抑制 MCAM 功能的分子。按上述侵袭测定法中 MCAM 功能所定义的，抑制作用被理解为，与同一实验条件下不含本发明分子的阴性对照相比较，功能下降了至少 30%，优选下降 40%，更优选下降 50%，还更优选下降 60%。如果本发明分子所引起的功能减弱小于 20%、更优选小于 15%、还更优选小于 10%，则此分子被认为不显著影

响其它三种受体的功能。

此外，就抑制 MCAM 基因表达的本发明分子而言，当其实验浓度为 10nM 至 100 μ M (优选 1 μ M 左右) 时，利用经过存在的 β 微管蛋白水平校准的定量 western 印迹法进行测定，发现这样的分子使 MCAM 的表达减少了 50% 以上，更优选 80% 以上，还更优选 90% 以上，最优选 95% 以上，其中 MCAM 的量是在另外两个相同的样品之间进行比较，在其中一个样品中本发明的分子可以抑制 MCAM 的表达。在同一实验中，本发明的分子不会使每个细胞中存在的 β 微管蛋白的量下降超过 20%，且所述分子不会使胰岛素受体和 B-CAM 细胞表面糖蛋白的相对水平下降超过 20%。

另外，就本发明的多肽、特别是本发明的抗体或抗体片段而言，当所述抗体片段浓度为 1nM 至 50 μ M (优选大约 20 μ M) 时，如果在如同实施例 5 的实验中本发明的多肽能使天然侵袭性癌细胞的侵袭力减少了 30% 以上，更优选 60% 以上，那么就认为本发明的多肽抑制了 MCAM 的生物功能。

另外，就本发明的小化合物而言，当浓度为 10nM 至 100 μ M (优选大约 1 μ M) 时，如果在如同实施例 5 或 7 的实验中所述化合物能使天然侵袭性癌细胞的侵袭力减少了 30% 以上，更优选 60% 以上，却不影响细胞形态、细胞周期进程 (通过碘化丙锭染色和 FACS 检验分析细胞群中的 DNA 含量进行测定)，而且不会提高培养物中表现出凋亡迹象的细胞的百分数 (例如，用所谓的隧道测定法，通过检测表现出 DNA 片段化的细胞的百分数进行测定)，那么就认为所述化合物抑制了 MCAM 的生物功能。用于此发明中的小化合物是分子量 50Da 和 10000Da 之间、优选 100Da 和 4000Da 之间、更优选 150Da 和 2000Da 之间的分子或者它们的生理可接受盐。

此处所提及的“特异结合 MCAM”或“特异于 MCAM”的分子是在实施例 1 和 2 给定的条件下结合表达 MCAM 的 HT1080 细胞，但不结合 Hs-27 细胞或 MCAM 阴性的 SBcl-2 细胞的分子 (Shih 等 (1997) Cancer Res. 57 (17), 3835-3840)。也就是说，当所述分子的测试浓度为

0.1nM 至 10 μ M、优选 1nM 至 1 μ M、还更优选 10nM 至 500nM、最优选约 100nM 时，它于 HT 1080 细胞的结合比与 Hs-27 细胞或 SBcl-2 细胞的结合至少高 2 倍、优选高 5 倍、最优选高 20 倍。

另外，这样的分子与 MCAM 的结合常数低于 10 μ M，优选低于 1 μ M，更优选低于 100nM，最优选为 0.1nM 至 20nM。结合常数可以用，例如类似 BIACORE 系统的标准方法按制造商手册的说明书进行测定。

术语“至少一种”用于此处时是指“一种或多种”，具体而言是一种、两种、三种、四种和五种。

本发明首次证实了对于特异的、天然存在的肿瘤细胞而言，它们的粘附、侵袭和/或转移过程中基本上都涉及了 MCAM 的表达和作用。本发明提供了无偏筛选方法用于鉴别抑制 MCAM 功能的分子。

因此，本发明涉及能与 MCAM 细胞外区域特异结合并抑制 MCAM 侵袭、增殖、粘附和/或转移功能的分子或多肽。符合本发明的多肽含有至少一种选自以下种类的序列：

SEQ ID NO. 39 至 SEQ ID NO. 57，它们代表在结合类似如 MCAM 等肿瘤特异细胞表面分子中特别涉及到的 CDR 的序列；或

SEQ ID NO. 1 至 SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 19 至 SEQ ID NO. 23 和 SEQ ID NO. 29 至 SEQ ID NO. 33，它们代表在结合类似如 MCAM 等肿瘤特异细胞表面分子中特别涉及到的 scFv 的序列。

在一个实施方案中，本发明的多肽是抗体片段，特别是 scFv、dsFv、Fab'、Fab、F(ab')₂、Fv、单结构域抗体或二体，更具体而言是 scFv、dsFv、Fv、单结构域抗体或二体，还更具体而言是 scFv、单结构域抗体或二体，更优选 scFv。

在另一实施方案中，本发明的多肽是抗体，在某一优选的实施方案中是抗体来源于 scFv 抗体片段，在另一优选的实施方案中是多克隆抗体或单克隆抗体，特别是人的单克隆抗体。

在另一实施方案中，抗体或抗体片段的 CRD3 区域与表 1 中通过下划线标出的 scFv 序列的相关核苷酸所显示的 CDR3 区域之一相同的。

抗人 MCAM 结合抗体可选自经修饰的免疫球蛋白，例如，对于本发

明相应抗体片段而言,在其 CDR 区域内特别是在其 CDR3 区域内呈现较高氨基酸序列同一性且基本保持与相应抗体片段相同的与 MCAM 的亲亲和性的化学或重组产生的抗体或人源化抗体、定位诱变抗体。

在另一实施方案中,本发明的多肽是选自以下的人类抗体: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,特别是 IgG 和 IgM,更具体而言是 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4。

在本发明的另一优选实施方案中,用可检测标记物标记本发明的多肽,尤其是本发明的抗体片段或抗体。具体而言,可检测标记物的例子有放射性同位素、发色团、荧光团、酶或放射性同位素。可检测标记物可选自,例如,这些种类。

在另一实施方案中,本发明的多肽可分别共价或非共价的缀合和/或偶联至另一蛋白质、固相基质(如,珠子)上,与其自身一起形成多聚体,如,进一步增强其对靶细胞毒性的细胞毒剂、细胞抑制剂、原药或能修饰表达 MCAM 的细胞或使免疫细胞募集的效应分子。所有这些缀合物都是本发明的“生物缀合物”。

细胞毒剂的名单中包括,但不局限于,道诺霉素、紫杉酚、阿霉素、甲氨蝶呤、5FU、长春碱、放线菌素 D、鬼臼亚乙苷、顺铂、阿霉素、染料木黄酮、adnribosome 抑制剂(如,天花粉蛋白(trichosantin))或各种细菌毒素(如,假单胞菌外毒素;金黄色葡萄球菌蛋白 A)。

用各种双功能蛋白质偶联剂制备含本发明多肽(特别是本发明抗体片段或抗体)和所述细胞毒性部分的生物缀合物。所述试剂的一些例子包括: N-琥珀酰亚胺 3-(2-二硫吡啶)-丙酸酯(SPDP)、诸如盐酸二甲基 adipimidate(dimethyl adipimidate HCl)等亚氨酸酯的双功能衍生物、诸如二琥珀酰亚胺辛二酸酯等活性酯、诸如戊二醛等醛、诸如 his(R-叠氮苯甲酰)己二胺等 bisazido 化合物、诸如双-(R-重氮苯甲酰)乙二胺等 bisdiazonium 衍生物、诸如亚苄基 2,6-二异氰酸酯等二异氰酸酯和诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯等双活化的氟化合物。用于产生生物缀合物的方法详见 March's

高级有机化学：反应、机制和结构 (March' s Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure), 第五版, Wiley - Interscience; 或生物缀合技术 (Bioconjugate Techniques), 编辑 Greg Hermanson, 学术出版社。

可利用本发明的生物缀合物或多肽 (特别是本发明的抗体或抗体片段) 检测与转移相关的 MCAM 抗原的表达。从受试者中提取样品, 如, 从疑似具有转移性肿瘤的组织中获取活检标本。一般而言, 在进行测定前处理样品。可利用的测定包括 ELISA、RIA、EIA、western 印迹分析、免疫组化染色等等。根据所使用的测定法, 可以用酶、荧光团或放射性同位素标记抗原或抗体 (参阅, 如, Coligan 等 (1994) 免疫学通用方法 (Current Protocols in Immunology), John Wiley&Sons Inc., 纽约, 纽约州; 和 Frye 等 (1987) Oncogene 4: 1153 - 1157)。

因此, 本发明的一个实施方案涉及利用至少一种本发明的多肽和/或至少一种本发明的标记的多肽和/或至少一种本发明的生物缀合物来用于检测 MCAM。例如, 可利用本发明的一种多肽或本发明的一种已标记多肽或本发明的一种生物缀合物检测 MCAM, 或者可以将一种已标记的多肽与一种生物缀合物或两种或三种多肽或两种已标记的多肽一起利用。对于这样的检测而言, 多肽将与 MCAM 的细胞外区域结合。MCAM 的细胞外区域被定义为细胞膜外侧的 MCAM 蛋白部分, 特别是在第 24 位氨基酸和第 553 位氨基酸之间的胞外氨基酸环。MCAM 应当理解是糖蛋白, 因此不仅是所提及的氨基酸, 其中的糖修饰也被认为是 MCAM 胞外区域的一部分。

在另一实施方案中, 本发明包括了诊断试剂盒。这样的试剂盒含有至少一种生物缀合物和/或至少一种本发明的已标记多肽和/或至少一种本发明的多肽, 尤其是本发明的抗体片段或抗体, 或者它们的标记形式, 另外还有进行标准竞争性或夹心检测所必需的试剂和材料。所述诊断试剂盒可用于测定生物样品的侵袭潜能, 特别是某些种类癌细胞的侵袭潜能。试剂盒通常包含一容器。

通过利用本发明的多肽, 特别是本发明的抗体片段或抗体, 还有

可能产生抗独特型抗体，它可以用于筛选抗体以鉴定该抗体是否具有与本发明的人单克隆抗体相同的结合特异性并且能用于活性免疫接种（Herlyn 等（1986）*Science*, 232: 100）。用众所周知的杂交瘤技术可产生这样的抗独特型抗体（Kohler 等（1975）*Nature*, 256: 495）。抗独特型抗体是识别存在于目的抗体上的独特决定簇的抗体。这些决定簇位于抗体的高变区。此区域与给定的表位结合，因此造成了抗体的特异性。可通过用目的多肽，特别是目的抗体片段或抗体免疫动物制备抗独特型抗体。被免疫的动物会识别并响应进行免疫的抗体的独特型决定簇并产生针对这些独特型决定簇的抗体。通过利用抗独特型抗体，有可能鉴别表达具有同一表位特异性的单克隆抗体的其它杂交瘤。

还可能利用模拟某一表位的抗独特型技术产生单克隆抗体。例如，针对第一种单克隆抗体制备的抗独特型单克隆抗体在其高变区具有结合结构域，它是第一种抗体所结合表位的“影像”。从而，这种抗独特型单克隆抗体抗体可用于免疫接种，因为这种抗独特型单克隆抗体结合结构域可有效的用作抗原。

在另一实施方案中，如果用侵袭测定法进行检测（参阅实施例 5），本发明的多肽，特别是本发明的抗体片段或抗体使侵袭性肿瘤细胞的侵袭力减少了 30-60%，或优选减少了 30-55%、40-50% 或甚至至少减少了 60%。尽管优选通过多肽与 MCAM 的细胞外结构域的特异结合减少侵袭力，但按照另一实施方案，还可以通过多肽与诸如整合蛋白或 ephrins 等其它表面分子结合来降低侵袭力。

在另一实施方案中，如果用粘附测定法检测（见实施例 7），本发明的多肽，特别是抗体或抗体片段使侵袭性肿瘤细胞的粘附减少 30-60%，或优选 30-55%、40-50% 或甚至至少 60%。

在另一实施方案中，如果用增殖测定法检测（见实施例 6.2），本发明的多肽，特别是抗体或抗体片段使侵袭性肿瘤细胞的增殖减少 30-60%，或优选 30-55%、40-50% 或甚至至少 60%。

在另一实施方案中，本发明的抗体片段特异识别 MCAM 的一个或多

个表位、或 MCAM 保守变体的表位、或 MCAM 的肽片段。

在另一实施方案中，本发明涉及本发明分子，特别是选自下列分子：本发明的小化合物、抑制 MCAM 基因表达的分子、本发明的生物缀合物或多肽，更具体而言是本发明抗体片段或抗体作为药物的用途。

在另一实施方案中，本发明涉及含有效量的至少一种（具体而言是一种）本发明分子、特别是本发明多肽或核苷酸序列中的至少任一种、或至少一种抑制 MCAM 基因表达的分子以及药用可接受载体和/或稀释剂的组合物。药用组合物可用于治疗人 MCAM 过表达或异位表达相关的病症，尤其是治疗转移性肿瘤，尤其是来自上述种类癌细胞的转移性肿瘤。

在本发明的另一实施方案中，提供了药物组合物，其中含药用可接受载体和治疗有效量的至少一种抑制 MCAM 功能的分子，特别是通过与 MCAM 的细胞外区域结合抑制 MCAM 功能的分子，更具体而言是其中的分子是本发明的小化合物、核酸序列、多肽或生物缀合物，还更具体而言的分子是本发明的抗体片段，还更优选其中的分子是本发明的 scFv 或来源于本发明所述 scFv 的抗体。

在另一实施方案中，本发明涉及在药用可接受组合物中给药抑制 MCAM 功能的分子，特别是其中的分子通过受体介导的途径抑制 MCAM 的基因表达。

或者，抑制 MCAM 功能的分子可以特别是能结合 MCAM 细胞外区域的分子，更具体而言，其中的分子是小化合物或本发明的抗体或抗体片段或多肽或本发明的生物缀合物，还更具体而言，其中的分子是本发明的抗体片段，更优选其中所述分子是本发明的 scFv 或来源于所述本发明 scFv 的抗体。

本发明还涉及通过重组技术产生本发明多肽的方法。这些技术在本领域中是众所周知的（Skerra 等（1993），Curr. Opin. Immunol. 5, 256 - 62; Chadd 等（2001），Curr. Opin. Biotechnol. 12, 188 - 94）。

例如，可分离编码本发明多肽、特别是抗体片段或抗体的核酸序列（如，编码表 1 或 2 的抗体片段或其抗体的基因）并克隆入一个或

多个多核苷酸表达载体，且所述载体可转化入适当宿主细胞系用于本发明重组多肽表达。编码本发明多肽的基因的表达可以为提高多肽的产量作准备，还可为通过引入氨基酸取代、删除、添加和其它修饰来进行多肽的常规修饰作准备，例如在本发明抗体片段可变区和恒定区这两个区域内的人源化修饰 (Rapley (1995) Mol. Biotechnol. 3: 139 - 154)，所述修饰不会造成结合特性或 MCAM 阻断功能的关键性丧失 (Skerra 等 (1993) Curr. Opin. Immunol. 5: 256 - 262)。

本发明因此涉及上文提及的分离核酸分子，它们编码本发明任一种多肽，特别是本发明的抗体片段，更具体而言是本发明的 scFv、dsFv、Fv、单结构域抗体或本发明的二体，还更具体而言是 scFv、单结构域抗体、本发明的二体或来源于所述本发明 scFv 的抗体，更优选本发明的 scFv 或来源于所述本发明 scFv 的抗体。

在优选的实施方案中，本发明涉及编码含有选自以下序列的多肽的核酸分子：

SEQ ID NO. 39 至 SEQ ID NO. 57，它们代表在结合如 MCAM 等肿瘤特异细胞表面分子中特别涉及到的 CDR 的序列；或

SEQ ID NO. 1 至 SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 19 至 SEQ ID NO. 23 和 SEQ ID NO. 29 至 SEQ ID NO. 33，它们代表在结合如 MCAM 等肿瘤特异细胞表面分子中特别涉及到的 scFv 的序列。

此外，本发明的分离核酸序列包含选自以下的任一种核酸序列：SEQ ID NO. 10 至 SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 24 至 SEQ ID NO. 28 和 SEQ ID NO. 34 至 SEQ ID NO. 38。

本发明还涉及在严谨条件下与 SEQ ID NO. 10 至 SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 24 至 SEQ ID NO. 28 和 SEQ ID NO. 34 至 SEQ ID NO. 38 中任一序列杂交的核酸序列。用于此处的术语“在严谨条件下”指只允许高同源性（优选高于 70%）核酸序列聚集的杂交条件和温度。典型的杂交条件对于本领域技术人员而言是众所周知的。简而言之，对于要求高特异性的应用而言，我们通常期望利用相对较低的盐浓度和/或高温条件，诸如在 50℃ 至 70℃ 温度提供 0.02M-0.15M 的 NaCl。

本发明还涉及含有本发明核酸的载体。具体而言的载体是质粒、噬菌粒或粘粒。

例如，本发明的核酸分子可以以适当的形式克隆入原核或真核表达载体 (Sambrook 等, “分子克隆: 实验室手册 (Molecular cloning: a laboratory manual)” 第二版, 冷泉港实验室出版社 (1989))。这样的表达载体包含至少一个启动子、至少一个翻译起始信号、至少一种本发明的核酸序列 - 在原核表达载体的情况中 - 还有翻译终止信号, 而在真核表达载体的情况中, 优选另外转录终止信号和聚腺苷酸化信号。

原核表达载体的例子, 对于大肠杆菌中的表达而言, 是例如美国专利 4, 952, 496 中所述的基于 T7 RNA 聚合酶所识别的启动子的表达载体, 对于酿酒酵母中表达所用的真核表达载体而言, 是例如载体 p426Met25 或 526GAL1 (Mummborg 等 (1994) Nucl. Acids Res., 22, 5767 - 5768), 对于昆虫细胞中的表达而言, 是例如 EP - B1 - 0 127 839 或 EP - B1 - 0 549 721 中所述的杆状病毒载体, 而对于哺乳动物细胞中的表达而言, 是例如载体 Rc/CMV 和 Rc/RSV 或 SV40 - 载体, 它们是通常已知的且商品化的。

产生这些表达载体的分子生物学方法以及转染宿主细胞并培养该转染宿主细胞的方法和从所述被转化宿主细胞中产生和获取本发明多肽的条件都是技术人员众所周知的。

本发明还涉及含有本发明核酸和/或本发明载体的宿主, 具体而言其中的宿主细胞是微生物, 如酵母或其它真菌, 如大肠杆菌、枯草杆菌或其它细菌。宿主细胞还可以是高级真核生物来源的细胞, 如昆虫细胞, 优选被病毒感染的昆虫细胞, 更优选杆状病毒感染的昆虫细胞, 或如 COS、MDCK 293 - EBNA1、NS0 等哺乳动物细胞或杂交瘤细胞。

本发明还涉及产生本发明多肽、特别是本发明抗体片段的方法, 包括培养以含有本发明多肽 (特别是本发明抗体片段) 编码 DNA 的重组载体转化的微生物, 并从培养基中回收所述本发明多肽、特别是本发明抗体片段或含有它的融合蛋白。

本发明表明,阻断 MCAM 的功能会抑制说明书前面所列举癌细胞类型来源的某些癌细胞的侵袭力,特别是抑制选定癌细胞的侵袭力,如,来源于人肉瘤细胞、上皮肿瘤、间充质肿瘤、网状内皮组织肿瘤、神经系统肿瘤、畸胎瘤的细胞,更优选人肉瘤细胞。

因此,本发明的某一实施方案是至少一种(具体而言是一种)抑制 MCAM 功能的分子用于制备药物中的用途,所述药物用于治疗或预防天然存在癌细胞的侵袭和/或转移,其中所述癌细胞的增殖、粘附、侵袭和/或转移潜能取决于 MCAM 的功能。

在另一优选的实施方案中,抑制 MCAM 的分子抑制了已表达 MCAM 的功能。在本发明的上下文中,已表达的 MCAM 应被理解为在开始任何类型治疗之前就已出现于天然存在癌细胞上的 MCAM 蛋白质。具体而言,这些分子是结合受体的细胞外区域并通过内部途径抑制 MCAM 表达的分子。

更具体而言,这样的分子选自:小化合物、抗 MCAM 抗体、抗 MCAM 抗体片段、本发明的多肽、本发明的抗独特型抗体和/或本发明的生物缀合物,尤其是其中的分子是本发明的多肽和/或生物缀合物。

在另一优选实施方案中,其增殖、粘附、侵袭和/或转移潜能依赖于 MCAM 功能的天然存在癌细胞可以是选自前述组织或癌细胞类型的任何癌细胞,具体而言,它们可以是以下组织来源:肺、肝、肾、胃、小肠、骨、脾、脑、周围神经系统、甲状腺、胰腺、子宫内膜、卵巢、宫颈、皮肤、结肠或淋巴组织,更具体而言,癌细胞是肉瘤细胞。

本发明还涉及可作为药物靶目标的 MCAM 抗原。本发明的另一方面涉及以高中和能力结合人 MCAM 的抗体片段。

在本发明的另一实施方案中,将至少一种本发明的多肽和/或本发明的生物缀合物用于鉴定特异结合人 MCAM 的其它分子,特别是在筛选测定中。这些方法中,在推定竞争性待测结合剂存在的情况下将参照的抗 MCAM 抗体片段与含 MCAM 结构域的靶物质结合。在适于参照抗体片段和靶物质之间于缺乏待测结合剂时形成复合物的条件下完成这一接触步骤。检测参照抗体片段和靶物质之间在存在待测结合剂时的复

合物形成作为待测结合剂与 MCAM 特异结合活性的指征。这一筛选方法可用于如其它抗体文库或抗体片段文库、反义寡核苷酸文库或肽和小分子文库的高通量筛选，从而识别和鉴定另外“与 MCAM 特异结合分子”。通过下述试验测定竞争作用，其中待测抗体片段或其它测试结合剂基本上抑制参照抗体片段与含 MCAM 结构域的靶物质的特异结合。可以通过，例如，检测在存在和缺乏推定竞争剂条件下参照抗体片段与含 MCAM 结构域的靶物质之间的结合，即，在适于复合物形成的条件下检测“特异结合 MCAM 的分子”来测定竞争作用。如文献美国专利 4,376,110 中所述，已知多种类型的竞争结合测定法且它们通常可应用于本发明中。一般而言，这样的测定包括使用含 MCAM 结构域的靶物质（如，纯化的 MCAM 或表达 MCAM 抗原的细胞系）、未标记的“特异结合 MCAM 的分子”和已标记的对照抗体片段或其它结合剂。通过测定在“特异结合 MCAM 的分子”存在的条件下结合于靶物质上的标记物的量来检测竞争性抑制作用。通常“特异结合 MCAM 的分子”是过量存在的。通过这些竞争性测定法（“竞争性结合剂”）鉴定的“特异结合 MCAM 的分子”包括与对照抗体片段所结合表位或结合位点结合的抗体、抗体片段、肽、反义寡核苷酸、小分子和其它结合剂，以及与对照抗体片段所结合表位足够近的表位或结合位点结合的“特异结合 MCAM 的分子”。优选的，当过量存在时，本发明的竞争性结合剂抑制对照抗体片段与选定靶物质的特异结合至少达 10%，优选至少 25%，更优选至少 50%，还更优选至少 75% - 90% 或更多。

除了本发明的多肽外，能特异定性于人 MCAM 的本发明抗体片段或抗体、天然或人造的配体、肽、反义寡核苷酸或其它小分子都可应用。以本发明为基础，可将药物设计成与人 MCAM 结合或有另外的相互作用并且抑制人 MCAM。在这点上，合理的药物设计技术，诸如 X-射线晶体分析法、计算机辅助（或协助）分子模拟（CAMM）、定量或定性结构-活性相关性测定（QSAR）及类似技术都可用于新药开发上。通过合理的设计可以预测能与蛋白质或其特殊部分相互作用的分子。这样的分子结构可以化学合成和/或表达于生物体系中。小分子可以按照本

领域众所周知的方法通过合成有机化合物而产生。可以合成多种肽、半肽化合物或非肽化合物和有机化合物并随后进行筛选以寻找以高中和能力与 MCAM 结合的化合物。具体而言，抑制 MCAM 的化合物与侵袭相关。通常参阅文献：Scott 和 Smith，“用表位文库搜寻肽配体 (*Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library*)”，*Science* (1990)，249，第 386-90 页和 Devlin 等，“随机肽库：特异蛋白质结合分子的来源 (*Random Peptide Libraries: A Source of Specific Protein Binding Molecules*)”，*Science*，(1990)，249，第 40407 页。

本发明还提供了在体外或体内用抗体或抗体片段抑制人 MCAM 活性或检测肉瘤细胞中人 MCAM 的方法。在优选的实施方案中，用一种或多种抗体片段处理表达抗原的细胞引起或导致人肉瘤细胞增殖或粘附的减少并/或抑制了它们的侵袭能力。

肿瘤细胞迁移进入组织是转移中重要的一步。可在跨内皮的模型 (*transendothelial model*) 中研究粘附和侵袭过程 (参阅, Woodward 等, (2002) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 1708-14 和 Vachula 等 (1992) *Invasion Metastasis* 12, 66-81)。跨内皮的模型为研究扩散过程中细胞的相互作用提供了一个有效的体外体系。本发明因此还提供了用于测定天然发生侵袭性癌细胞的侵袭力对 MCAM 功能的依赖性体外方法。此方法包括如下步骤：

- 使细胞与抑制 MCAM 功能的分子接触；
 - 在适于所述癌细胞生长的条件下使癌细胞与凝胶样基质接触；
- 并
- 测定所述癌细胞穿越形成凝胶的基质的迁移。

用于此处的术语“凝胶样基质”被理解为是水含量至少达 90% 的半固体物质，它使得癌细胞可与基质接触培养并使侵袭性癌细胞能迁移穿越 0.1mm-1mm 优选厚度为 0.3mm 的所述“凝胶样基质”层，但非侵袭性细胞则不能迁移。这样的“凝胶样基质”的例子有，类似蛋白质中细胞外基质的物质和碳水化合物的组合物，具体而言，有商品化

的“Matrigel”。具体而言，“凝胶样基质”包含选自IV型胶原蛋白、纤连蛋白和层粘连蛋白中的一种蛋白质。更具体而言，凝胶样基质包含IV型胶原蛋白、纤连蛋白和层粘连蛋白。更优选凝胶样基质包含IV型胶原蛋白、层粘连蛋白、触觉蛋白、巢蛋白和硫酸乙酰肝素蛋白聚糖。

在优选的实施方案中，步骤a)的干扰分子是特异结合MCAM细胞外表位的多肽，具体而言是本发明的多肽，更具体而言是本发明的抗体或抗体片段，还更具体而言是抗体片段，更具体的说是scFv、dsFv、Fv、单结构域抗体或二体，尤其是scFv、单结构域抗体或二体，更优选scFv。

本发明还提供了通过筛选原初抗体片段噬菌体展示文库，鉴定特异结合MCAM细胞外区域的抗体或抗体片段的方法，其中这些抗体片段或抗体（参阅有关抗体噬菌体展示的文献WO 91/17271）能抑制且特别是抑制了肉瘤细胞的侵袭。所述方法包括以下步骤：

- 使抗体片段噬菌体文库与扩散性肉瘤细胞接触；
- 分离所述细胞；
- 在所述细胞不裂解的条件下去除与所述细胞非特异结合的噬菌体，例如，通过用缓冲去污剂溶液洗涤所述细胞；
- 洗脱与所述细胞结合的噬菌体；并
- 测定洗脱下来的所述噬菌体展示的抗体或抗体片的特性。

展示获自步骤d)的抗体或抗体片段的噬菌体的特性可通过，如对编码抗体或抗体片段的DNA进行测序来测定，或者在利用商品化的网格(grid)或编号噬菌体文库时，通过测定噬菌体的网格位置或编号来测定。那么网格位置和编号就能显示噬菌体所展示的抗体或抗体片的特性。

步骤d)之后富集与MCAM结合的噬菌体。那些与MCAM结合的噬菌体最终可以用本领域已知的各种方法进行鉴定。噬菌体可被分离形成单菌落且噬菌体菌落可用标记的MCAM蛋白或MCAM蛋白质的被标记部分（例如，MCAM细胞外结构域的至少7个氨基酸长的肽）进行探测。

与这样的探针结合的菌落被确定为 MCAM 结合菌落。噬菌体还可在纯 MCAM 蛋白或重组 MCAM 上进行亲和纯化。

或者，可将来自整个富集库的编码抗体或抗体片段的开发阅读框架重新克隆入表达载体中，然后抗体或抗体片段可以表达于另一宿主细胞的克隆中，并且通过，例如上述鉴定相关噬菌体克隆的方法、实施例 2 或 9 的方法或通过用重组 MCAM 进行亲和纯化可以鉴定携带含有特异结合 MCAM 的抗体或抗体片段的编码核酸的表达载体的宿主细胞克隆。

这一方法的具体优势在于得到了特异于 MCAM 细胞外区域可接近部分的抗体或抗体片段，因为最初的选择步骤是在完整细胞上进行的，这些细胞展示出 MCAM 细胞外区域中对于噬菌体结合来说可接近的部分。

在本发明优选的实施方案中，以上方法包含代替步骤 e) 的更多步骤：

- 使分离的噬菌体与重组 MCAM 接触；
- 用缓冲去污剂和/或高盐溶液洗涤所述 MCAM；并
- 洗脱与 MCAM 结合的噬菌体；并
- 测定洗脱下来的所述噬菌体展示的抗体或抗体片的特性。

在某些实施方案中，表达于噬菌体上的抗体片段包含选自以下的抗体或抗体片段：scFv、dsFv、Fab'、Fab、F(ab')₂、Fv、单结构域抗体 (DAB) 和二体，更具体而言选自 scFv、dsFv、Fv、单结构域抗体或二体，还更具体而言选自 scFv、单结构域抗体或二体，更优选 scFv。

步骤 c) 和 f) 中所用的“去污剂”是去污剂溶液，优选缓冲溶液，可以是浓度为 0.001-0.5%、特别是 0.01-0.1% 的 Tween。步骤 f) 中的“高盐”是高盐溶液，优选缓冲溶液，且具有 10mM-1M 的离子强度，具体而言是 20-500mM，更具体而言是 50-350mM，还更优选 80-250mM。典型的有效阴离子是，例如，氯化物、柠檬酸盐、磷酸盐、磷酸氢盐或硼酸盐。典型有效的阳离子是，例如，钠、钾、锂、钙或镁。

以上段落中的缓冲溶液通常 pH 值为 7-8。例如, DMEM 或 PBS 可用作缓冲液, 特别是其中含有 1-20% 的 FCS, 更具体而言是含 5-15%, 还更优选约 10% 的 FCS。

通过在 200-300g 温和离心 3-20 分钟, 具体而言是 5-10 分钟, 分离结合了噬菌体的细胞。通过用 2-100mM 甘氨酸洗涤来洗脱与细胞和与固定化 MCAM 结合的噬菌体, 具体而言是 4-50mM、更具体而言是 5-20mM、还更优选约 10mM 的甘氨酸, pH 为 0-2.5, 具体而言是 1-2.5, 更具体而言是 1.5-2.5。

可以如上所述体内或细胞培养实验中检测这些抗体片段(具体而言是这些 scFv)的 MCAM 抑制活性。细胞培养物测定包括在如实施例 5 和 7 所述的侵袭或粘附试验中测定本发明抗体片段抑制作用的检测。例如, 侵袭测定的结果如图 2 所示。

附图描述

图 1 显示了 HT1080 染色细胞穿过 8 μ m 滤膜的扩散。37 $^{\circ}$ C 保温 6 小时后对产生的荧光进行定量。显示的数据是 3 个孔的平均值 \pm SD。

图 2 显示了 - 以表的形式表示 - 利用 HT1080 (人纤维肉瘤) 细胞进行的侵袭试验的结果。通过如图 6 中所示的它们的编号确定待测 scFv。符号 “*” 表示各个 scFv - 按照图 6 中所示的它们的编号确定 - 在进行侵袭试验前被克隆入 IgG4 的形式 (format) 中。检测细胞通过基质的侵袭并以 % 表示对侵袭的抑制作用。

图 3 显示了 - 以表的形式表示 - 在各种细胞类型上进行 FACS 分析的结果, 诸如 HT1080 (人纤维肉瘤)、KHOS-NP (人骨肉瘤)、MCF-7 (人乳腺癌)、BT-474 (人乳癌, 乳腺)、PC-3 (人腺癌, 前列腺)、Jurkat (人 T 细胞白血病)、HL-60 (人急性骨髓性白血病)、HeLa (人子宫颈癌)、SW480 (人结肠癌)、LS174T (人结肠癌)、HT-29 (人结肠癌), 与对照细胞 (Hs27 (人皮肤成纤维细胞)) 相比较。结果用平均荧光强度表示, 其中 0-12 的平均荧光强度用 (+) 表示, 13-40 的平均荧光强度用 (++) 表示, 而 40 以上的平均荧

光强度用(+ + +)表示。表 3a 描述了通过其在图 6 中所示编号确定的 scFv。表 3b 描述了 IgG 的 FACS 结果。符号 “*” 表示各个 scFv - 按照图 6 中所示的它们的编号确定 - 在进行 FACS 试验前被克隆入 IgG4 的形式中。

图 4 显示了免疫沉淀实验的结果。用 SDS - PAGE 分离免疫复合物并进行银染。

图 5 显示了 pXP14 (SEQ ID No. 39) 的载体图谱以及 scFv 表达载体的序列。

图 6 显示了表 1 中已鉴定单链的肽序列: scFv1 至 scFv19。被描述肽序列中的 CDR3 区域以下划线标出。相关的序列编号标在旁边。

图 7 显示了表 2 中编码多肽 scFv1 至 scFv19 的核苷酸序列。相关的序列编号已被标出。

图 8 显示了 - 以表的形式表示 - 在各种基质上进行的粘附试验的结果, 诸如 CI (I 型胶原蛋白 S)、CIV (IV 型胶原蛋白)、FN (纤连蛋白) 和 LN (层粘连蛋白), 用各种类型细胞, 诸如 HT1080 (人纤维肉瘤)、PC-3 (人腺癌, 前列腺)、HeLa (人子宫颈癌) 和 HT-29 (人结肠癌)。通过如图 6 中所示的它们的编号确定待测 scFv。符号 “*” 表示各个 scFv - 按照图 6 中所示的它们的编号确定 - 在进行扩散试验前被克隆入 IgG4 的形式中。检测粘附作用并以 % 表示对粘附作用的抑制。对于抑制值而言: “+” 表示 1-10% 的抑制, “++” 表示抑制值 >10-40%, 而 “+++” 表示抑制值 >40-100%。“n. d.” 表示未测定。

图 9 显示了 scFv 表达载体 pXP10 (SEQ ID No. 40) 的载体图谱和 pXP10 的序列。

图 10 显示了用 MCAM 特异抗体进行免疫组化测定的结果 (scFv7* 和 scFv9*) (scFv7 和 scFv9 克隆入 IgG1 的形式中)。

图 11 显示了此大小约为 110kDa 的带中获取的肽混合物的 MALDI-MS 光谱 (a)。以 T 标示的两个胰酶自消化峰被用于内部校准。以星号标记的总共 15 个峰与代表性的 MCAM 氨基酸序列匹配 (SwissProt,

P43121), 质量偏差小于 13ppm。匹配的肽涵盖了 SEQ ID No. 58 (b) 23 % (151/646 个残基) 的氨基酸序列。

图 12 显示了增殖试验的结果, 即, 通过 IgG 的施用使 SW-480 和 PC-3 的增殖减少。(在进行增殖试验前将 scFv7、scFv9 和 scFv18 克隆入 IgG4 形式)。在第一种抗体加入后指定的时间点用 MTS 细胞生存能力测试检测 SW-480 结肠癌细胞 (图 12b) 和 PC-3 前列腺癌细胞 (图 12a) 的增殖。数据表示为收集自 3 个独立实验的培养基对照百分数的平均值。误差范围: Tukey HSD 95% 可信区间。

图 13 显示了 - 以表的形式表示 - 化合物在无胸腺小鼠中皮下生长的人肿瘤异种移植物内的抗肿瘤作用。将肺腺癌 (LXFA) 用作异种移植物。该表显示了在化合物注射后第 0 天和第 7 天的肿瘤大小。将 scFv7* (克隆入 IgG1 形式的 scFv7) 用于与 Docetaxel 进行比较。图中还显示了 scFv* 与 Docetaxel 的联合疗法的结果。在注射 scFv7* 后第 7 天肿瘤尺寸的大小减小了 12%。

以下实施例, 包括进行的实验和获得的结果, 只供说明用, 而不能解释为对本发明的限制。

实施例

实施例 1: scFv 的选择和筛选 (悬浮细胞的筛选)

单链 Fv 选自含 1011 个独立克隆的人源非免疫大噬菌体展示库, 由 Cambridge Antibody Technology Ltd., Cambridge, 英国提供。

为了进行选择, 用 0.05% EDTA 收获 HT1080 细胞 (人纤维肉瘤细胞系; ATCC CCL-121) 并在 DMEM + 10% FCS 中稀释至 1×10^7 个细胞/ml。将 2×10^{12} cfu 噬菌体/ 10^7 个细胞在 25°C 用 DMEM + 10% FCS 预封闭 1 小时, 随后以倒转旋转方式 (end-over-end rotation) 与用 DMEM + 10% FCS 预封闭的 Eppendorf 管中的细胞一起 25°C 保温 1.5 小时。第一轮选择和第二轮选择分别使用了 3×10^7 个细胞和 1×10^7 个细胞。在 220g 离心 5 分钟洗涤细胞, 然后去除上清并将细胞重悬于洗涤缓冲液中。用 DMEM + 10% FCS + 0.05% Tween-20 作为洗涤缓冲液进行 5 次洗涤,

用 DMEM + 10% FCS 作为洗涤缓冲液进行 5 次洗涤。通过添加 pH2.2 的甘氨酸 10mM 洗脱被结合的噬菌体，用 pH7.4 的 Tris/HCl 1M 中和。通常， $10^3 - 10^6$ cfu 噬菌体在第一轮选择中被洗脱，因此富集组分的密度与最初的所有组分相比下降了。通过感染指数生长的大肠杆菌 TG1 扩增含富集组分的洗脱液。选择含噬菌粒的大肠杆菌并在补充了 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 1% 葡萄糖的 LB 琼脂平板上 30°C 培养过夜进行增殖。这一步之后，富集组分可扩增成多克隆集合并用于以反复方式进行更多轮选择直至得到具预期特性的集合或者在空间上进行分离并在单一克隆的水平上根据预期功能进行筛选。通过用辅助噬菌体 VCS-M13 (Stratagene, La Jolla, CA) 超感染指数生长的前一轮选择的培养物产生用于下一轮选择的噬菌体颗粒并将培养物在补充了 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 50 μ g/ml 卡那霉素的 2xTY 中 20°C 生长过夜。将完成选择的噬菌体用 0.5M NaCl/4% PEG-6000 从细菌澄清上清液中沉淀并重悬于 PBS 中。在此实施例中进行了两轮选择，随后在单一克隆水平上进行筛选。

实施例 2: scFv 的选择和筛选 (在粘附细胞上的筛选)

为了进行筛选，将包含于噬菌体展示载体中且编码选定 scFv 的基因重新克隆入表达载体 pXP14 中。这一载体指导了 scFv 与 Strep 标签和 E-标签的融合表达且不包含丝状噬菌体基因 3。将含表达载体的大肠杆菌 TG1 单菌落培养于微量滴定板的各个孔中，从而使每个孔中只含有一个 scFv 克隆。将细菌在 96 孔微量滴定板 (#9297, TPP) 中用补充了 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 0.1% 葡萄糖的 2xTY 于 30°C 培养至 OD600 为 0.7。用终浓度 0.5mM 的 IPTG 诱导表达并在 25°C 继续培养过夜。通过在 25°C 添加终浓度 50 μ g/ml 的鸡蛋溶菌酶 (#L-6876, Sigma) 1 小时并在 3000g 离心 15 分钟制备含单链 Fv 的澄清裂解物。在进行筛选 ELISA 之前，添加等体积 DMEM + 10% FCS 封闭澄清裂解物 1 小时。为了进行筛选 ELISA，将 HT1080 细胞以 3×10^4 个细胞/孔的密度接种于 96 孔微量滴定平板 (#9296, TTP) 中，在 DMEM + 10% FCS

中 37℃培养过夜。将孔在 37℃用 DMEM + 10% FCS 封闭 1 小时并在 25℃添加含有 scFv 的已封闭澄清裂解物 1.5 小时。平板用 PBS + 0.1% Tween-20 洗涤 2 次，用 PBS 洗涤 1 次，与缀合了 α -E-标签的 HRP (# 27-9413-01, Pharmacia Biotech; 1: 5000 稀释于含 5% 脱脂奶粉 (# 70166, Fluka) 和 0.1% Tween-20 的 PBS 中) 一起保温 1 小时，用 PBS + 0.1% Tween-20 洗涤 3 次，用 PBS 洗涤 3 次，然后用 POD (# 1484281, Roche) 显色并在 370nm 波长处读取信号。用上述 ELISA 筛选方法再次针对 HT1080 细胞和作为对照的人成纤维细胞 Hs-27 (ATCC CRL-1634) 测试阳性克隆。

在典型的筛选中，筛选 1472 个 (16x92) 克隆与 HT1080 细胞的结合，其中 16% 的阳性克隆为扣除背景后信号 > 0.1 的克隆。重新测定 238 个阳性克隆与 HT1080 细胞的特异结合，将其与 Hs-27 对照细胞的结合相比较，28% 的阳性克隆是扣除背景后的信号在 HT1080 上为在 Hs-27 对照细胞上两倍的克隆。

实施例 3a: 测序和大规模表达

用 Sequiserve GmbH, Vaterstetten, 德国进行 scFv 基因的测序，所用引物为 pXP2 Seq2 (5' -CCCCACGCGGTTCCAGC-3' ; SEQ ID No. 41) 和 pXP2 Seq1 (5' TACCTATTGCCTACGGC-3' ; SEQ ID No. 42)。氨基酸序列如表 1 中所示，核苷酸序列如表 2 中所示。

将测序鉴定的独特克隆从其甘油保存菌中划线接种于 LB/Amp (100 μ g/ml) / 1% 葡萄糖琼脂平板并在 30℃培养过夜。将单菌落接种于 LB/Amp/Glu (1%) 培养基 10ml 中并在 30℃ 200rpm 振荡培养过夜。第二天早上将过夜培养物放在冰上直至接种于装在 2L Erlenmeyer 摇瓶内且补充了 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 0.1% 葡萄糖的 2xYT 培养基 1L 中。将培养物在 25℃振荡培养至 OD₆₀₀ 达到 0.5-0.6，然后用终浓度 0.1mM 的 IPTG 诱导。加入新鲜配制的氨苄青霉素 50 μ g/ml 并在 22℃继续振荡培养过夜。早晨将培养物在 4℃ 5000xg 离心 15 分钟，弃上清并用移液器将沉淀小心的重悬于含完全蛋白酶抑制剂 (# 1697498,

Roche) 的预冷 PBS - 0.5M Na 缓冲液 10ml 中。完成重悬浮后, 将细菌悬浮液转移至 20ml 有螺旋盖的耐压塑料离心管中并加入终浓度 50 μ g/ml 的鸡蛋溶菌酶 (#L-6876, Sigma), 冰置 1 小时。将裂解的细菌在 4 $^{\circ}$ C 20000xg 离心 15 分钟并将上清液(裂解物)转移到 15ml 塑料管中。为了进行亲和纯化, 将裂解物以 1ml/分钟的流速加到通过并联蛋白纯化系统(自制的)用 10 个柱床体积(CV) PBS - 0.5M Na 缓冲液平衡的 1ml StrepTactin (#2-1505-010, IBA) 柱中。用 PBS 洗 10CV 后, 用 5CV 的 PBS/5mM 脱硫生物素(Desthiobiotin) (#D-1411, Sigma) 洗脱, 分部收集, 1ml/管。在 UV280 检测收集的组分, 混合含蛋白质的组分并用 Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices 10.000MWC0 (#UFC801024, Millipore) 在 4700xg 浓缩。用考马斯蓝染色的 12% Bis-Tris SDS-PAGE 凝胶检查浓缩后的 scFv 的纯度, 分装成等份试样, 加入 20% 的甘油后冻存于 -80 $^{\circ}$ C。

实施例 3b: 将 scFv 克隆入 IgG 形式并进行表达

scFv 由接头序列连接的可变轻链和可变重链序列组成。用含限制性位点的引物通过 PCR 分别扩增可变轻链和可变重链。那些限制性位点也存在于含重链和轻链的适当恒定区的载体中。用限制性酶切割经过扩增的可变区并克隆入切割过的载体中。测序证实序列的正确性。

使用了四种载体, 一种包含 IgG1 形式的重链恒定区。第二种载体包含 IgG4 形式的重链恒定区, 而另外两个载体则分别包含 λ 和 κ 轻链的恒定区。不同的限制性切点使载体能被切割并将可变区连接入载体中。

为了在哺乳动物细胞系中表达 IgG, 载体包含了 EB 病毒复制起点(oriP 序列), 它提高了 293-EBNA-HEK 细胞中的转录水平, 因为 EBNA 蛋白质引起游离载体的复制。

用重链载体和轻链载体进行共转染, 导致两条链都在细胞中表达并在内质网中进行 IgG 的装配。装配好的 IgG 随后被分泌到培养基中。磷酸钙转染被作为转染方法使用, 其中形成了磷酸钙和 DNA 的沉淀物,

然后进入细胞中。转染后将培养基换成无血清培养基。每3天完成每种IgG的三份样品。将上清液(培养基)无菌过滤并贮存于4℃。

为了纯化IgG,通过自流(gravity flow)或通过取决于体积的HPLC,用蛋白A琼脂糖纯化上清液。对于高达200ml的样品,采用了自流的方法。对于两种纯化而言,都是将上清液加到蛋白A柱上,用pH7的Tris缓冲液50mM洗柱并用pH约为2的0.1M柠檬酸盐洗脱。在洗脱组分中加入pH9的0.25M Tris,使pH达到5.5-6.0。根据IgG的进一步用途,用PBS缓冲液对其进行透析并贮存于-20℃。

实施例4:对肿瘤细胞特异结合进行的FACS分析

为了检测单链Fv或IgG特异结合靶细胞的能力,我们用HT1080细胞、KHOS细胞、PC-3细胞、BT474细胞、MCF细胞、Hela细胞、Jurkat细胞、HL60细胞、LS174T细胞和SW480细胞(10^6 个细胞/ml)进行了荧光激活细胞分选仪(FACS)分析,以Hs-27细胞(10^6 个细胞/ml)作为对照细胞。将细胞与 $10\mu\text{g/ml}$ 纯scFv一起在CellWash(BD(Becton, Dickinson and Company) #349524)中4℃保温20分钟,洗涤,并用FITC标记的二抗-抗E-标签mab(Amersham #27-9412-01)检测被结合的scFv。洗涤样品并在Becton Dickinson FACSscan上进行分析。选定scFv的结果如图3表3a中所示。用IgG分析获得的结果如表3b中所示。

实施例5:侵袭测定

将ChemoTx®系统(Neuro Probe Inc. #106-8, Gaithersburg)以96孔形式用作可置换的趋化性/细胞迁移室,其中包含 $8\mu\text{m}$ 孔径大小的滤膜轨迹蚀刻(Track etched)聚碳酸酯,为5.7mm直径/个位点。

将稀释于Dulbeccos PBS(Gibco #14040-091)中的 $13.3\mu\text{l}$ 的0.3mg/ml Matrigel(Matrigel是一种提取自Engelbreth-Holm-Swarm(EHS)小鼠肉瘤的可溶性基础膜制剂,所述肿瘤富含细胞外基质蛋白质。它的主要组分是层粘连蛋白,然后是IV性胶原蛋白、硫酸

肝素蛋白聚糖、触觉蛋白和巢蛋白。它还包含 TGF- α 成纤维细胞生长因子、组织纤溶酶原激活剂和天然存在于 EHS 肿瘤中的其它生长因子) (Becton Dickenson, BD # 356234) 加到 96 孔板滤膜的 B-H 行中, 在 A 行中加入稀释于 0.05M HCl (Sigma # 945-50) 中的 I 型胶原蛋白 S (Roche # 10982929) 1.2 μ g/个位点, 在干燥器中 20 $^{\circ}$ C 保温过夜使其胶凝化。在补充了 GlutamaxI (862mg/l (Gibco # 31966-021) 和 10% FCS (Gibco # 10270106) 的 DMEM 中将 HT1080 细胞培养至 70-80% 汇合。然后在 37 $^{\circ}$ C、7.5%CO₂ 的条件下, 用 1:100 稀释于 DMEM/GlutamaxI/0.1%BSA (Sigma # A-7030) 中的 Bisbenzimidazole H 33342 (Sigma # B-2261) 原位标记细胞 15 分钟。细胞用 DMEM/GlutamaxI/0.1%BSA 洗涤 2 次并在 37 $^{\circ}$ C、7.5%CO₂ 的条件下加入 DMEM/GlutamaxI/0.1%BSA 15 分钟进行回收。用不含 Ca⁺⁺、Mg⁺⁺ 的 PBS (Gibco, 10010-015) 洗涤 2 次后, 用 0.5mM EDTA (Sigma # E8008) 分离细胞, 用 Dulbeccos PBS/0.1%BSA/10mM Hepes (Gibco # 15630-056) 收集细胞, 用 Dulbeccos PBS/0.1%BSA/10mM Hepes 洗涤细胞 2 次, 将细胞重悬于 Dulbeccos PBS/0.1%BSA/10mM Hepes 中, 并将细胞用 Dulbeccos PBS/0.1%BSA/10mM Hepes 稀释至 6.7 $\times 10^6$ 个细胞/ml。将 6.7 $\times 10^6$ 个细胞/ml 以 1:1 的比率与作为侵袭抑制阴性对照的 40 μ g/ml HT1080 特异 scFv1 以及与 HT1080 特异 scFv (scFv2-scFv10) 一起冰置 1 小时。在用 DMEM/GlutamaxI/0.1%BSA 稀释至 6.7 $\times 10^5$ 个细胞/ml 后, 将 HT1080 细胞和 HT1080 细胞/scFv 稀释液一式三份以 3.4 $\times 10^4$ 个细胞/孔的密度吸取到趋化性室中 (B-H 行) 并在 37 $^{\circ}$ C、7.5%CO₂ 的条件下保温 6 小时。含 5% FCS 的 DMEM/GlutamaxI 的用作较低部室中的化学吸引剂。用 I 型胶原蛋白 S 包被的 A 行趋化性室中的 1 $\times 10^4$ 至 4 $\times 10^4$ 个细胞/个位点制备标准曲线。在底部室中使用了 DMEM/GlutamaxI/0.1%BSA (细胞不移动)。从膜的上部去除未迁移的细胞后 (除了 A 行的标准曲线外), 在 Fluostar Galaxy (BMG) 微量滴定板读数器上用 370/460nm 的激发/发射波长检测已迁移穿越膜的细胞 (在测定标准曲线的情况下不迁移) 的荧光。在我们的实验

中，45000 的值相当于 100% 的迁移细胞。三份平行试样的平均抑制结果如图 2 中所示。将每个实验都重复三次，得到了基本相似的结果。通过用上述 Transwell 培养体系比较它们侵袭肿瘤细胞外基质 (Matrigel) 的相对能力来评估肿瘤细胞的侵袭表型。

实施例 6.1: MTS 生存能力测定

通过测定四唑染料 MTS (MTS, Celltiter Aqueous one, Promega # G4000) 向甲腈的转变检测能生存的细胞。将 HT1080 细胞和 HT1080 细胞/scFv 稀释液 (获自侵袭试验中制备的稀释液) 以 3.4×10^4 个细胞/孔的密度一式三份加入 96 孔板 (黑色, 超薄澄清平底, 特殊的光学材料, Costar # 3615) 中, 在每个孔中加入 $10 \mu\text{l}$ MTS 并在 37°C 、 $7.5\% \text{CO}_2$ 的条件下保温 1 小时。用 Fluostar Galaxy (BMG) 微量滴定板读数器检测 492nm 处的吸光度。对于所有被检测的 scFv 而言, 未观察到对细胞生存能力的影响。

实施例 6.2: 增殖测定

将 SW-480 和 PC-3 细胞培养于含 L-谷氨酰胺和 10% FCS 的 RPMI (Invitrogen # 21875-034, Carlsbad, California) 中。

将 SW-480 和 PC-3 细胞以 $100 \mu\text{l}$ /孔的体积接种于 96 孔板 (Corning Costar # 3904, Acton, Massachusetts) 的培养基中。将细胞在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的条件下保温 24 小时。吸出培养基并加入稀释于培养基中的抗体 $15 \mu\text{g/ml}$ 或 50mM NaN_3 。对照细胞单独保温于培养基中。在第一次添加抗体 48 小时后, 第二次添加相同浓度的抗体。在第一次处理前、处理后的 24 小时、48 小时和 72 小时测定 MTS 吸光度。为此, 将 $10 \mu\text{l}$ CellTiter96 Aqueous One 溶液 (Promega # G3581, Madison, Wisconsin) 加入 $100 \mu\text{l}$ 细胞悬浮液中并将混合物在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的条件下保温 3 小时。在 Fluostar 平板阅读器 (BMG LabTechnologies, Offenburg, 德国) 中检测 492nm 处的吸光度。结果如图 12 中所示。

实施例 7: 细胞 - 基质粘附试验

用溶于 Dulbeccos PBS (Gibco # 14040 - 091) 的 I 型胶原蛋白 S (Roche # 10982929) $1 \mu\text{g}/\text{孔}$ 4°C 包被 96 孔板(细胞培养处理的)(TPP # 9296) 过夜。经 Dulbeccos PBS 洗涤后, 在 37°C 用 2% BSA (Sigma # A - 7030) /Dulbeccos PBS 封闭 1 小时并用 Dulbeccos PBS 洗涤。一式三份吸取 HT1080 细胞和 HT1080 细胞/scFv 稀释液(获自侵袭试验中制备的稀释液)以 3.4×10^4 个细胞/孔的密度加到板上并在 37°C 、7.5% CO_2 的条件下保温 1 小时。用 Dulbeccos PBS 再洗两次后, 非粘附细胞被洗去, 稀释于 Dulbeccos PBS/0.1% BSA/10mM HEPES 中的 $1 \times 10^4 - 4 \times 10^4$ 个染色细胞/孔(获自侵袭试验中制备的稀释液)的标准曲线在 A 行中进行。在洗涤后的细胞中加入 $50 \mu\text{l}$ Dulbeccos PBS 并在 Fluostar Galaxy (BMG) 微量滴定板读数器上用 370/460nm 的激发/发射波长检测附着细胞的吸光度和标准曲线的吸光度。在我们的实验中, 数值 25000 相当于 100% 的粘附细胞。粘附试验还利用了数种基质蛋白进行, 诸如 CIV (IV 型胶原蛋白)、FN (纤连蛋白) 和 LN (层粘连蛋白), 以及各种类型的细胞, 诸如 HT1080 (人纤维肉瘤)、PC - 3 (人腺癌, 前列腺)、HeLa (人子宫颈癌) 和 HT - 29 (人结肠癌) 细胞。除了 scFv 之外, 还检测了按照实施例 3.2 克隆自单链的 IgG 抑制肿瘤细胞粘附的能力。结果如图 8 所示。

实施例 8: 用 FACS 进行竞争性分析

为了检测某些抑制性 scFv 阻断靶细胞上常见抗原表位的能力, 用 0.5mM EDTA/PBS 收集 HT1080 单细胞悬浮液。在 CellWash (BD, # 349524) 中将约 1×10^6 个细胞与 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ scFv 一起在 4°C 保温 1 小时。用 Cell Wash 洗涤后, 加入 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ FITC 标记的 scFv 并在 4°C 保温 20 分钟。在 Becton Dickinson FACSscan 上分析经过或未经过与其它结合剂预保温的被结合的 FITC 标记 scFv 的信号。

实施例 9: 免疫沉淀

在含蛋白酶抑制剂混合物(1粒溶于50ml缓冲液中)(Boehringer Mannheim, 目录号1697498)和100 μ M Pefablock (Roth, 目录号A154.1)的3ml的50mM Tris-HCl, pH8.0, 150mM NaCl, 1% Triton X-100(v/v)裂解HT1080和Hs-27细胞(10^8)。将裂解物与Streptactin Sepharose (IBA, #2-1201-010)在4 $^{\circ}$ C预保温2小时并将上清液用于免疫沉淀反应中。将HT1080特异的单链Fv(50 μ g/mg细胞提取物)加入澄清裂解物中,样品在4 $^{\circ}$ C旋转2小时,700x g温和离心沉淀Streptactin Sepharose,沉淀用PBS+0.1%Tween缓冲液洗涤4次,1ml/次,用溶于PBS 0.1%Tween 20的10mM D-脱硫生物素50 μ l将复合物从Streptactin Sepharose沉淀上洗脱下来进行分离。免疫复合物用SDS-PAGE分离并进行银染以供MS分析。

scFv 2为一种蛋白质,SDS-PAGE银染检测是分子量约为120kDa的条带。这条带在对照样品Hs-27细胞中则没有。

单链Fv1、3、5、6、7、9、15和19是一种蛋白质,经SDS-PAGE银染检测是分子量约为110kDa的条带。用来自HT1080细胞的细胞提取物进行免疫沉淀,以Hs-27作为对照细胞。可观察到这一特殊条带也存在于对照样品中,但在所有的情况下都要弱得多,表明这种蛋白质可能在HT1080细胞系中过表达。对于scFv3而言,这条带只有在使用HT1080细胞提取物时才被检测到,而用Hs-27细胞则检测不到。

scFv8和10是一种蛋白质,经SDS-PAGE银染检测是分子量约为130kDa的条带。这条带在对照样品Hs-27细胞中则没有。

单链Fv4、11和14是两种蛋白质,经SDS-PAGE银染检测是分子量分别为大约150kDa和大约130kDa的两条带。上一条带也出现于对照样品中,但强度要弱得多,而下一条带则在对照样品中没有或非常微弱,表明这两种蛋白质可能在HT1080细胞系中过表达。

实施例 10: 通过质谱分析法进行蛋白质鉴定

获自免疫沉淀并经SDS-PAGE获得的凝胶条带在37 $^{\circ}$ C用胰蛋白酶

进行胶内消化过夜。用 5% 的甲酸提取肽，然后用 ZipTip μ C18 (Millipore) 使产生的肽混合物脱盐，第一次用 $2\ \mu\text{l}$ 30% ACN/0.1% TFA 洗脱，然后用 $2\ \mu\text{l}$ 70% ACN/0.1% TFA 洗脱。收集两次洗脱的组分并将获得的肽混合物 $1\ \mu\text{l}$ 以 1:1 的比率与 α -氰-4-羟基肉桂酸 (3mg/ml) 混合，在 Teflon 包裹的不锈钢圆盘上共结晶，然后在 MALDI-TOF 仪器上进行分析产生的肽质量指纹 (PMF) 在 m/z 800-3000 质谱范围内。用获得的 PMF 搜索 NCBI 和 SwissProt 数据库中人类 (Homo Sapiens) 物种的所有条目。在所有的情况下，都只有以小于 13ppm 的质量偏差与给定蛋白质匹配的肽才被认为是与给定蛋白质相同的。

用 scFv2 获得的、大小约 120kDa 的条带产生了 9-10 个肽峰，它们与 Ephrin A 型受体 2 匹配，最大蛋白质覆盖率 (coverage) 为 14% (134/976 个残基)。

大小约为 110kDa 的条带在不同的 MALDI-TOF-MS 实验中产生 6-15 种肽，它们与细胞表面糖蛋白 MUC18 前体匹配，最大蛋白质覆盖率为 23% (151/646 个残基)。在数据库中可以得到同一蛋白质的多个条目，它们在氨基酸序列上略有差异。导致 MCAM 被确定的 MALDI 谱如图 11a 中所示。肽的覆盖率如图 11b 中所示。

任何黑素瘤粘附蛋白的分子量都约在 72kDa 左右，但因为预期蛋白质会被糖基化，所以不奇怪会在凝胶上发现约 110kDa 的条带。

用 scFv10 获得的、大小约 130kDa 的条带产生了 7 条肽，它们与整合蛋白 α 3 匹配，蛋白质覆盖率为 6% (71/1019 个残基)。

这种蛋白质的分子量在 119kD 左右，但预期它会被糖基化，因此解释了为何在 SDS-PAGE 上观察到较大的分子量。

大小约 150kDa 的带是用 scFv11-scFv14 获得的两条带中较大的一条，产生了 17-21 条肽，它们与整合蛋白 α 2 匹配，最大的蛋白质覆盖率为 19% (225/1181 个残基)。

两条带中较小的那一条大小约为 130kDa，产生了 9-13 条肽，它们与整合蛋白 β -1 匹配，最大的蛋白质覆盖率为 13% (106/798 个残基)。

整合蛋白 $\alpha - 2$ 的分子量约为 129kDa，而整合蛋白 $\beta - 1$ 的分子量约为 88kDa。不过，预计两种蛋白质都被高度糖基化，这可以解释为何在 SDS - PAGE 上观察到较高的表观分子量。

实施例 11: 表位作图的方法

实施例 11.1: “传统的”表位作图

将针对目的抗原的 cDNA 限定片段表达为重组(融合)蛋白质并用诸如 western 印迹或 ELISA 等多种测定法进行探测。

实施例 11.2: 噬菌体展示技术

利用随机肽噬菌体展示文库进行表位作图的技术被发展为，将针对目的抗原的 cDNA 随机小片段克隆入丝状噬菌体的噬菌体蛋白 pIII 中并将它们展示于噬菌体的表面(Fack 等,(1997)J. Immunol. Methods 7, 43 - 52)。可以经过所谓的“生物淘选”的步骤用抗体捕捉展示表位的噬菌体。相应噬菌体的插入序列给出了表位上的一些信息。此方法原则上能够识别构象表位。

实施例 11.3: 肽扫描技术

这一技术是以用 Fmoc 化学方法在活化膜上合成固定化肽为基础的。将氨基酸溶液加到活化膜上导致在膜(该膜用 PEG 活化)上的氨基和所施加氨基酸的活化羧基之间形成肽键。在每一轮循环之后进行特殊的洗涤步骤、乙酰化、去保护并监测自由氨基。与体内合成蛋白质的膜相反，被结合的寡肽链是从 C - 末端向 N - 末端逐步合成。可以合成长达 20 个氨基酸的寡肽，其中含有天然的和修饰过的氨基酸。寡肽合成后，使膜保持平衡并封闭非特异性的结合位点。在与目的抗体一起保温和数次洗涤后，用与 ECL - 系统联合的 HRP - 缀合二抗进行检测。根据所用的抗体，膜可以被清除、再生并重复使用达 10 次。在固相支持物上合成理论上覆盖目的抗原全部氨基酸序列的小的重叠寡肽。这种方法使得线性表位可以在氨基酸水平上得到鉴定。还可以进行快速的突变研究。

实施例 12: 用免疫组化方法进行组织剖析

在含 112 个肿瘤样本和 2 个对照的组织微阵列中检测两种抗 MCAM 抗体 (scFv7* 和 scFv9* - scFv7 和 scFv9 克隆成 IgG1 形式) 与各自靶目标的结合。所述样本是来自生长于裸鼠中的人异种移植物的石蜡切片, 且用生物素 - 链霉亲和素/过氧化物酶/二氨基联苯胺对其进行了染色。与各种肿瘤组织的结合结果如图 10 中所示。

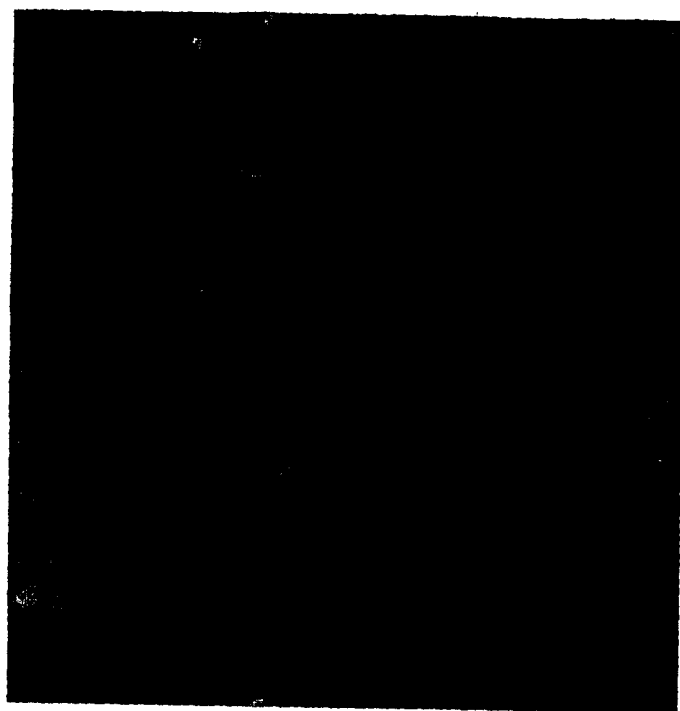
实施例 13: 在皮下生长的人肿瘤异种移植植物中化合物的抗肿瘤作用

将肺腺癌(支气管腺癌)用作异种移植植物。使用大约 7 周大的 NMRI 背景裸鼠, 在处理开始时平均体重为 35g。在研究开始前检查动物的健康状况以保证只有健康状况良好的动物才被选来进行测试。通过各自耳朵标签号识别小鼠, 每一笼都用记录卡标志, 卡上标明实验的编号、随机选择的日期、小鼠菌株、性别、各个小鼠的编号、试验化合物、剂量、时间表和给药途径。动物被关在带过滤器罩的 III 型 Macrolon^M 笼中, 空调房室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度 $60 \pm 10\%$, 喂食 Altromin Extrudat 1439 大鼠/小鼠饲料、含有 0.9g/1 山梨酸钾且用 1N HCl 将其 pH 调节到 2 的脱矿质无菌水。每天观察监测水的消耗, 随意添加食物和水。动物笼内所铺的 Altromin GmbH 生产的垫料 SAWI 经过 Jelu Werk 分析和检验以及 Charles River 灭菌和分装, 并且每周换两次。以单一高剂量水平 (50mg/kg, 每周两次, 共 4 周) 施用抗体。一组只接受载体, 第二组接受 scFv7* (scFv 序列克隆成 IgG1 形式), 第三组作为阳性对照接受 Docetaxel (20mg/kg), 而第四组接受 scFv7* 和 Docetaxel (50/20mg/kg) 的组合。

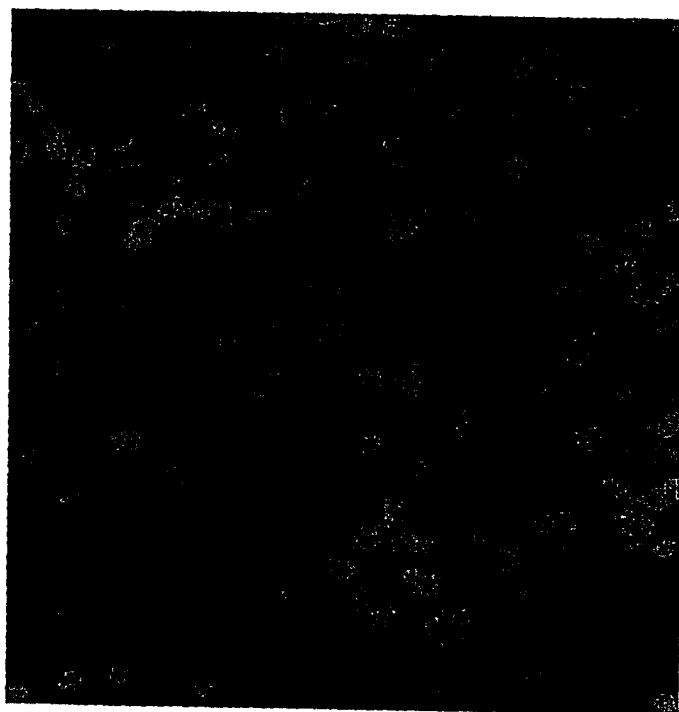
每组 6 只小鼠, 为了获得含类似肿瘤大小的 24 只小鼠, 将总共 64 个肿瘤碎片移植入 32 只小鼠中 (两侧移植)。用于移植的肿瘤碎片获自连续传代的裸鼠中的异种移植植物。从供体小鼠中切下肿瘤, 将肿瘤切成碎片 (直径 2 - 3mm) 并放到 RPMI 1640 培养基中 (最多 30 - 45 分钟) 直至皮下移植入小鼠体内。使小鼠吸入挥发性异氟烷将其麻醉, 在背部皮肤上 (左侧和右侧) 切开两个小切口, 每只小鼠中植

入两块肿瘤碎片。待肿瘤长到平均直径 6 - 8mm 之间时开始进行处理。为了随机选择，按肿瘤直径将动物划分成三类：大的组：>8mm；中等组：6 - 8mm 之间；小的组：5mm。在随机选择的情况下，肿瘤种类在不同组之间是平均分布的。

每周两次检查肿瘤大小和小鼠体重，每天记录死亡率和临床症状。将各个肿瘤的相对体积计算成第 x 天的肿瘤体积和第 0 天的肿瘤体积的比率 (T_x/T_0 ，第 0 天是进行随机选择的那天和处理的第一天)。相应的计算各个小鼠的相对体重。绘制出相对肿瘤体积和相对体重对时间的曲线。为了估计抗肿瘤活性，计算具体某一天在抗体处理组和载体处理组中中值相对肿瘤体积的比率 ($T/C\%$ 值)。将抗体鉴定为具有活性的最低要求是最小 $T/C\%$ 值 < 50%。每周两次处理携带肿瘤的小鼠，共 4 周。在试验结束时收集肿瘤以供进行进一步的分析。经不同处理后第 7 天肿瘤大小的比较如图 13 所示。为了评估 NMRI nu/nu 小鼠中抗体的血浆水平，在体内治疗试验期间的 6 个不同时间点对抗体处理组的小鼠进行舌下取血得到血液样品 300 μ l。在第二次施药前 4 天和第 7 次施药前 22 天测定曲线波谷水平。在第 26、27、28、29 天收获血液样品（每个时间点收集 3 个血样）。第 4、26、28 天的样品取自小鼠 1 - 3 号，第 22、27 和 29 天的样品取自小鼠 4 - 6 号。血样的量足以制备至少 100 μ l 血浆。用 EDTA 制备血浆样品，在 -80 $^{\circ}$ C 保存待分析。



Hs-27对照细胞侵入



HT1080细胞的侵入

图1

scFv	%抑制
scFv1	28.7
scFv3	16.2
scFv6	22.6
scFv7	26.6
scFv9	32.5
scFv15	14.3
scFv16	36.9
scFv17	26.8
scFv18	24.7
scFv19	30.2
scFv6*	21.9
scFv7*	42.1
scFv9*	27.8
scFv15*	26.7
scFv16*	23.8

图 2

表 3a: FACS scFv

	HT1080	KHOS	PC-3	BT-474	MCF-7	HeLa	HS-27	Jurkat	HL-60
scFv1	++	+	+	+	+	++	+	+	+
scFv3	+++	++	++	++	++	+++	+	+	+
scFv5	++	+	+	+	+	+	+	+	+
scFv6	+++	++	++	+	+	++	++	+	+
scFv7	+++	+	+	+	+	++	+	+	+
scFv9	+++	++	++	+	+	+++	+	+	+
scFv15	+++	++	++	+	+	++	+	+	+
scFv16	+++	++	++	++	+	++	+	+	+
scFv17	+++	+	+	+	+	++	+	+	+
scFv18	+++	++	++	++	++	+++	+	+	+

表 3b: FACS IgG

	HT1080	PC-3	KHOS	HT29	LS174T	SW480	HS-27
scFv1*	+++	n.d.	n.d.	+	+	+++	n.d.
scFv3*	+++	n.d.	n.d.	+++	+	+++	n.d.
scFv5*	+++	++	+	+	+	+++	+
scFv6*	+++	++	++	+	+	+++	++
scFv7*	+++	++	+	+	+	+++	+
scFv9*	+++	++	+	+	+	+++	+
scFv15*	+++	++	+	+	+	+++	+
scFv16*	+++	+++	++	+	+	+++	++
scFv17*	+++	n.d.	n.d.	+	+	+++	n.d.
scFv18*	+++	n.d.	n.d.	++	+	+++	n.d.
scFv19*	+++	n.d.	n.d.	+	+	++	n.d.

图 3

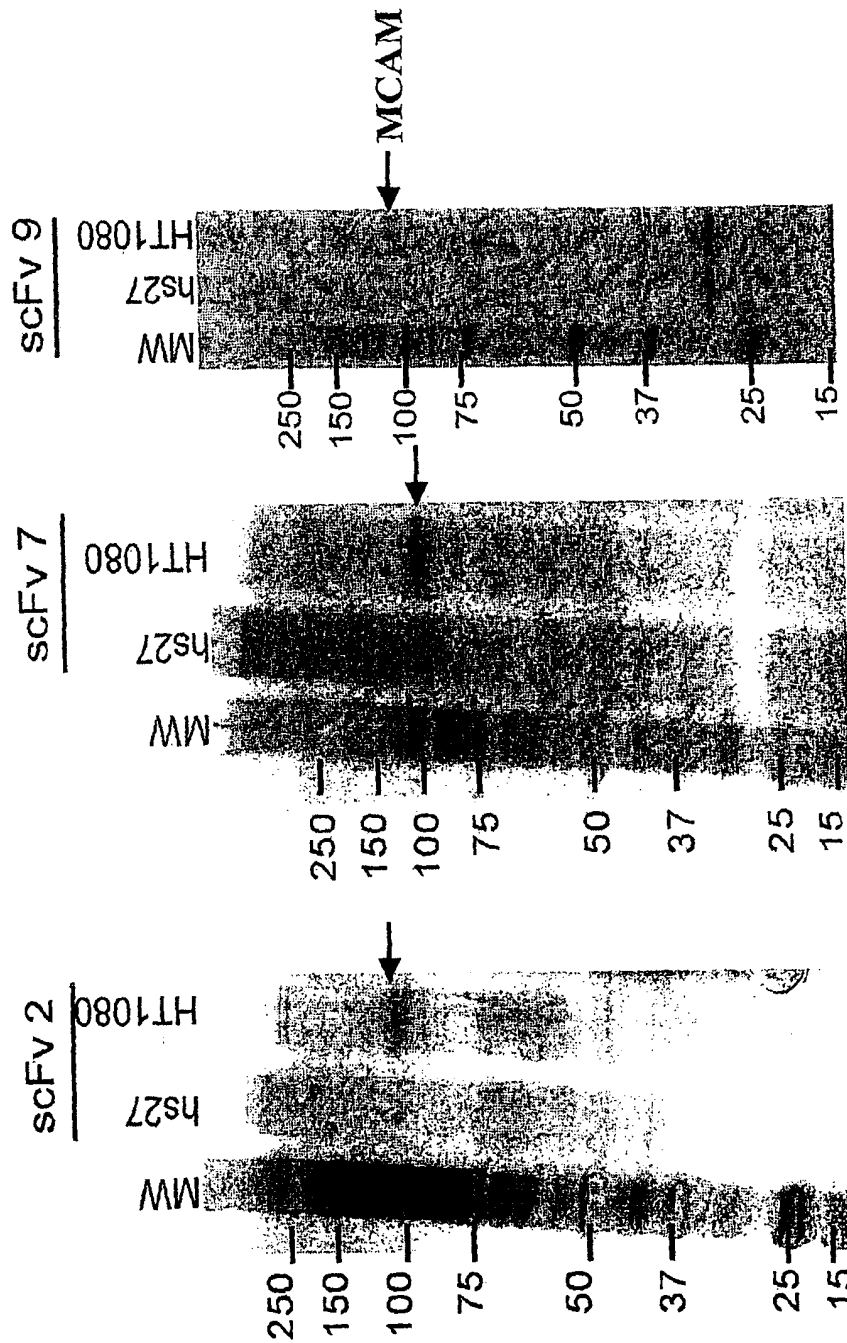


图 4

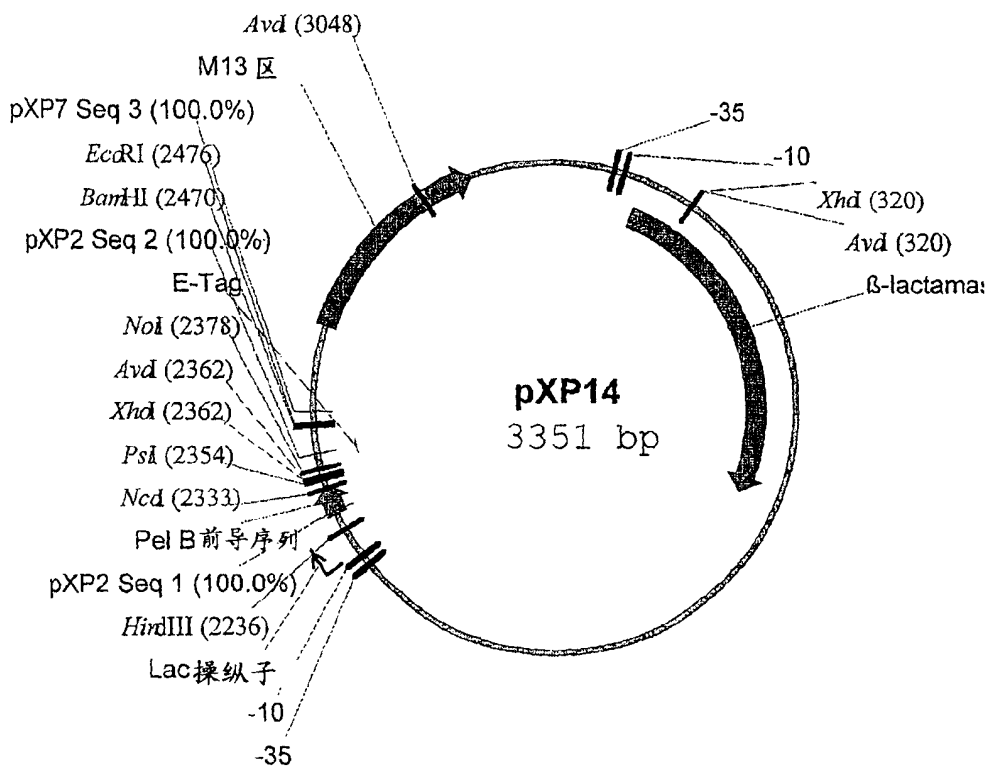


图 5a

pXP14的核苷酸序列 (SEQ ID No. 39)

```

1   GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTAA TGTCATGATA
51  ATAATGGTTT CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG
101 AACCCCTATT TGTTATTTT TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA
151 TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT AATATTGAAA AAGGAAGAGT
201 ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTCGCCCTT ATTCCCTTTT TTGCGGCATT
251 TTGCCTTCCT GTTTTTGCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCT CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC
351 AGCGGTAAGA TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT
401 GAGCACTTTT AAAGTTCTGC TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG
451 CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC ACTATTCTCA GAATGACTTG
501 GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG GCATGACAGT
551 AAGAAATTA TGCAGTGTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTTTG
651 CACAACATGG GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT
701 GAATGAAGCC ATACCAAACG ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA
751 TGGCAACAAC GTTGCGCAA CTATTAAGT GCGAACTACT TACTCTAGCT
801 TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG TTGCAGGACC
851 ACTTCTGCGC TCGGCCCTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG
901 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT
951 GGTAAGCCCT CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAGGCAAC
1001 TATGGATGAA CGAAATAGAC AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA
1051 AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT CATATATACT TTAGATTTGAT
1101 TTAAAACCTC ATTTTTAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA TCCTTTTTGA
1151 TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTT CACTGAGCGT
1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTTCTG
1251 CGCGTAATCT GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT
1301 TTGTTTGCCG GATCAAGAGC TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAAGTGGCT
1351 TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA
1401 GGCCACCCTC TCAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC TCCTCTGCT
1451 AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGCTTACCG
1501 GGTGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA
1551 ACGGGGGGTT CGTGATACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA
1601 ACTGAGATAC CTACAGCGTG AGCTATGAGA AAGCGCCACG CTCCCCGAAG
1651 GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG GCAGGGTCGG AACAGGAGAG
1701 CGCACGAGGG AGCTTCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT ATAGTCTGT
1751 CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTGTGA TGCTCGTCAG
1801 GGGGCGGAG CCTATGAAA AACGCCAGCA ACGCGGCCTT TTTACGGTTC
1851 CTGGCCTTTT GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTCTTCTCTG CGTTATCCCC
1901 TGATTCTGTG GATAACCGTA TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATAACCGTC
1951 GCCGAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA
2001 GAGCGCCCAA TACGCAAACC GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC CGATTCATTA
2051 ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA
2101 ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACTCATT AGGCACCCCA GGCTTTACAC
2151 TTTATGCTTC CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT
2201 TCACACAGGA AACAGCTATG ACCATGATTA CGCCAAGCTT GCATGCAAAT
2251 TCTATTTCAA GGAGACAGTC ATAATGAAAT ACCTATTGCC TACGGCAGCC
2301 GCTGGATTGT TATTACTCGC GGCCAGCCG GCCATGCCCC AAGTGCAGCT
2351 GCAGTCCGGC CTCGAGATCA AACGGGCGGC CGCAGGTGCG CCGTGCCTG
2401 ATCCAGATCC GCTGGAACCG CGTGGGGCCG CAAGCGCTTG GAGCCACCCG

```

图5b (续)

```
2451 CAGTTCGAAA AATAATAAGG ATCCGAATTC ACTGGCCGTC GTTTACAAAC
2501 GTCGTGACTG GGAAAACCCCT GCGGTACCC AACTTAATCG CCTTGCAGCA
2551 CATCCCCCTT TCGCCAGCTG GCGTAATAGC GAAGAGGCC GCACCGATCG
2601 CCCTFCCCAA CAGTTGCGCA GCCTGAATGG CGAATGGCGC CTGATGCGGT
2651 ATTTTCTCCT TACGCATCTG TGCGGTATTT CACACCGCAT ACGTCAAAGC
2701 AACCATAGTA CGCGCCCTGT AGCGGCGCAT TAAGCCCGGC GGGTGTGGTG
2751 GTTACGCGCA GCGTGACCGC TACACTTGCC AGCGCCCTAG CCCCCTCC
2801 FTTGCTTTC TTCCCTTCTT TTCTCGCCAC GTTCGCCGGC TTTCCCGTC
2851 AAGCTCTAAA TCGGGGGCTC CCTTTAGGGT TCCGATTTAG TGCTTTACGG
2901 CACCTCGACC CCAAAAACCT TGATTTGGGT GATGGTTCAC GTAGTGGGCC
2951 ATCGCCCTGA TAGACGGTTT TTCGTCCTTT GACGTTGAG TCCACGTCT
3001 TTAATAGTGG ACTCTTGTTC CAAACTGGAA CAATACTCAA CCCTATCTCG
3051 GGCTATTCTT TTGATTTATA AGGGATTTG CCGATTTGCG CCTATTGGTT
3101 AAAAAATGAG CTGATTTAAC AAAAAATTAA CGCGAATTTT AACAAAATAT
3151 TAACGTTTAC AATTTTATGG TGCAGTCTCA GTACAATCTG CTCTGATGCC
3201 GCATAGTTAA GCCAGCCCCG ACACCCGCCA ACACCCGCTG ACGCGCCCTG
3251 ACGGGCTTGT CTGCTCCCGG CATCCGCTTA CAGACAAGCT GTGACCGTCT
3301 CCGGGAGCTG CATGTGTCAG AGGTTTTTAC CGTCATCACC GAAACGCGCG
3351 A
```

图 5b

表1

多肽 (结合子)	SEQ ID NO.	蛋白质序列 (CDR下划线)	CDR的SEQ ID No.
scFv1	1	1 EVQLLESGGG LVQFGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWYSA 51 ISGSGSTYY ADSVKGRFTI SRDMSKNTLY LQMSLRAED TAVYICARDV 101 YGATSSVDFE WGQGTMTVVS SGGGGGGGG SGGGSAALS ELTQDPFVSV 151 ALGQTVRITC QGDSLRLYA SWYQQKPGQA PLLVMYGKSN RPSGIPDRFS 201 GSSGSGTSSL TITGAQAEDE ADYICSSRDT SGNHLVFCGG TKYTVLGA 251 GAPVPYDPDL EPRGAASAW HQQFEK	39
scFv2	2	1 EVQLLESGGG LVQFGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWYSA 51 ISGSGSTYY ADSVKGRFTI SRDMSKNTLY LQMSLRAED TAVYICARDV 101 GEGYIEFDY WGQGTMTVVS SGGGGGGGG SGGGSAQSV LTQPPFSVGA 151 PGQRVTISCT GSSSNIGAGF DVHWYQHLPG TRKVLIIYAN DMRESGVPR 201 FSGSKSQTSA SLAITGLQAE DEADYFCQSH DNNMREVEGG GFKVTVLGMA 251 AGAPVPYDPD LEPRGAASAW SHQFEK	40
scFv3	3	1 EVQLLESGGG LVQFGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWYSA 51 ISGSGSTYY ADSVKGRFTI SRDMSKNTLY LQMSLRAED TAVYICARDV 101 ERYTMVGDFD FWGRGTLTVV SGGGGGGGG SGGGSAQSV LTQPPFSVSA 151 APGRVTISCT SSSSNIGYN FVSWYQQPTG KAFKLLIYGN YKRPSGIPDR 201 FSGGYATSA TIDITGLQAG DEADYICGTV DSTIRTWVFG GFKVTVLGA 251 AAGAPVPYDP FLEPRGAASA WSHQFEK	41
scFv4	4	1 QLQLQESGPG LVKPSGTLRL TCAYVSGGSS SNNWWTWVRQ SPGKGLEWIG 51 EIFHSSTYY KSSLQSRVTI SLDKSQNQFS LKLASVTDAD TAVYICAREE 101 FGELEFDSWG RGTLVTVSSG GGGGGGGGG GGSQAQAVLT OPSSVSGAPG 151 QRVTISCTGS SSNIGAGYDV HWYQHLPGTA FKVLIYANN RPSGVPDRFS 201 ASKSGTSASL AITGLQAEDE ADYICQSYDT SLGSGYVFGT GTKLTVLGA 251 AGAPVPYDPD LEPRGAASAW SHQFEK	42
scFv5	5	1 EVQLLESGGG LVQFGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWYSA 51 ISGSGSTYY ADSVKGRFTI SRDMSKNTLY LQMSLRAED TAVYICAKSV 101 LAKYFDYWG QGTMTVTVSSG GGGGGGGGG GGSALSSEL TDPAVSVLAL 151 GQTVRITCQG DSLRNYYASW YQKPKQAQAV VVIYCKNNRP SGIPDRFSGS 201 SSGNTASLTI TGAQAEDEAD YCNRSRDSG NHVYVGGGTYK LTVLGAAGA 251 PVPYRDPLEP RGAASAWSHP QFEK	43

表6 (续)



scFv6	6	<p>1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVROA PKGGLWVSA 51 ISGSGGSTYY VDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNLSRAED TAVYICARDL 101 WGVYTAFDYW GQGTIVTVSS GGGSGGGGGS LQDPPAVSVA 151 LGQTVRITCO GDSLRVYAS WYQKPGQAP VLVYGNKRR PSGIPDRFSG 201 STSGDTASLS ITGALADDEA DYICHSRDSS GDQILFGGGT KLTVLGAAAG 251 APVEYPPDLE PRGAASAWSH PQFEK</p>	44
scFv7	7	<p>1 EVQLLESGGG LVOPGGSLRL SCRAAGFTFS SYAMSWVROA PKGGLWVSA 51 ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNLSRAED TAVYICARDL 101 YGGFVFDYWG RGTIVTVSS GGGSGGGGSG GGGALSSEL TQDPAVSVAL 151 GQTVSITCRG DSLKNYYPTW YQKPGQAPI VLVYGNKRA SGIPDRFSGS 201 DSGNTGSLTI TGAQAEDEAA YICSSROSSD NLRRLFGGGT KVTVLGAAAG 251 APVYPPDLE PRGAASAWSH PQFEK</p>	45
scFv8	8	<p>1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVROA PKGGLWVSA 51 ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNLSRAED TAVYICARWG 101 AKSGYEVHAF DMWGRGLVT VSSGGGGSG GSGGGGSAQ AVLTQFSSAS 151 GTFQRVTLIS CSGSSNIGS NTVNWIQHLF GSAPKLLIYS DNQRFSGVPO 201 RFSGSRAGTS ASLAISRLOQ EDEARYYCAA WDDTLGSDW VFGGGTKVTV 251 LGAAGAPVP YPDPLEPRGA ASAWSHPQFE K</p>	46
scFv9	9	<p>1 QLQLQESGPR LVQPSFTLSL TCVWSEASIT TPNWWSWVRO PPGGLEWIG 51 EYVHSGSTTY KPSLKRVM TQDTSKNQFS LNLTSVTAAD TAVYICAREA 101 VQAADFDYWG QGTLIVTVSS GGGSGGGGSG GGSALSSEL TQPPSVSVSP 151 GQTASITCSG DKLGDKIYASW YQKPGQSPV LVIYQDSKRP SGIPDRFSGS 201 NSGNTATLTI SGTQAMDEAD YICQAWDSST LYVFGTGTKL TVLGAAGAP 251 VPYPPDLEPR GAASAWSHPQ FEK</p>	47
scFv10	19	<p>1 LESGGIVQP GGSRLSCAA SGFTFSSYAM SWIRQAPKKG LEWYSAISGS 51 GGSTYYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVY YCARGGRTFG 101 SATYGYEDYW GRGTMVTVSS GGGSGGGGGS GGGSAQSVL TQPPSVSVAP 151 GQTRITCGR SNIGNKIVHW YQKPGQAPV LVVYDSDSRP SGIPDRFSGT 201 NLGSTATLTI SRVEAGDEAD YICQLWMDNRS DQVILGGGTPK VTVLGAAGAA 251 PVPYPPDLEPR RGAASAWSHPQ QFEK</p>	48

图6 (续)

scFv11	20	1	QQSGAELVRP GASVKLSCKA LGYTFSDYEM HWVKQTPVHG LEWIGIHPG	49
		51	SGGTAYNQKF KGKALTADK SSSTAYMDLS SLTSEDSAVY YCTRDYGNWY	
		101	EDVWGAGTV TVSTGGGGSG GGGGGGGSA LDIQMTQTPS SLASLGERV	
		151	SLTCRASQDI GSSLNWLQOE PDGTIKRLIY ATSSLDSDGVP KRFGSRSSGS	
		201	DYSLTISSLE SEDFADYCV QYAQFPWTFG GGTKLEIKAA AGAPVPYDFP	
251	LEPRGAASAW SHPQFEK			
scFv12	21	1	ELVRPGASVT LSCKASGYTF TDFEIHVKQ TPVHGLEWIG FIDPFTGGTA	50
		51	YNQKFRDKAT LTADRSSTA YMELRSLTSE DSAVYCYTRS DYGGSYWYE	
		101	DVWGAQTSVT VSTGGGGSG GSGGGGGSA LDIQMTQTPS SLTSEDSAVY	
		151	VTCKASQNVG TNVAWYQOKP GQSPKALIIYS ASYRISGVDP RETGSSGTD	
		201	FTLTISNVQS EDLAEYFCQQ YNSYPLTFGA GTKLEIKAAA GAFVPPYDPL	
251	EPRGAASAWS HPQFEK			
scFv13	22	1	QLKESGPELV KPGASVKIASC KASGYTFTDY NMHWLKRSHG KSEWIGYVY	51
		51	PYNGDTGYNQ KFKTKATLTV DNSSSTAYME LRSLTSEDSA VYCVKRWGYD	
		101	VAWYFDWGA GTTVVSTGG GSGGGGGSG GGSALQIVLT QSPAITAASL	
		151	GQKVTITCSA SSSVYMHY QOKSGTSPKR WIYDTSKLAS GVPARFSSGS	
		201	SGTSYSLTIS SMEARDAATY YCQQWSSNPL TFGACTKLEL KAAAGAPVPY	
251	PDPLEPRGAA SAWSHPQFEK			
scFv14	23	1	LQOGRRELVR PGASVKLSCK ALGYTFSDYE MHWKQTPVH GLEWIGYIHP	52
		51	GSGGTAYNQK FKGKALTLAD KSSSTAYMDL SLSLSEDSAV YCTRDYGNW	
		101	YFDVWGAGTT VTSTGGGGSG GSGGGGGSG ALDIQMTQTP SLSASLGER	
		151	VSLTCRASQD IGSSLNWLQOE EPDGTIKRLI YATSSLDSDGVP KRFGSRSSGS	
		201	SDYSLTISSL ESEDFVDYIC LQYASSPYTF GGTKLEIKAA AAGAPVPYDP	
251	PLEPRGAASA WSHPQFEK			
scFv15	29	1	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGTFES SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA	53
		51	ISGGGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNLSRAED TAVYVCARDL	
		101	YGGGTFVGVY WKGKMTVTVS SGGGGGGGG SGGGGGSAISS ELTQDPAVSV	
		151	ALGQFVNIIC QGDSLRSYYA SWYQQRPGQA PVIVYGNK RPSGIPDRFS	
		201	GSSSGNTASL SIGCAQAEDE ADYICNSRDS NANQYFFGG TKVTIVLGAAA	
251	GAPVYPDPL EPRGAASAWS HPQFEK*			
scFv16	30	1	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGTFES SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA	54
		51	ISGGGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNLSRAED TAVYVCARRG	
		101	FFDLWGRGTM VTVSSGGGGG GGGGGGGGG AQAALTPSS LSASVGCASAS	
		151	LTCTFRSGIN VGSYKIYWO QKPGSPPOFL LRYKSDSDKQ QGSGVPSRFS	
		201	GSKDASANAG ILLISGLQSD DEADYICMVV HSSAWVFGG TKVTIVLGAAA	
251	GAPVYPDPL EPRGAASAWS HPQFEK*			

图6 (续)

scFv17	31	1	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKLEWVSA	55
		51	ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDMSKNTLY LQMSLRAED TAVYICARDL	
		101	SGYAWDFWG QGTMVTVSSG GGGSGGGSG GGSALSSSEL TQDEAVSVL	
		151	GTVITTCOG DSLRSYYASW YQKPGQAPV LVIYKDNRP SGIPDRFSGS	
		201	SSGYTASLTI TGAQAEDAD YCSSRDSSG SHLYVFGGTT KVTIVLGAAG	
251	APVYPDPLE PRGAASAWH PQFEK*			
scFv18	32	1	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKLEWVSA	56
		51	ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDMSKNTLY LQMSLRAED TAVYICARKG	
		101	GMDVWGRGTM VTVSSGGGG GGGSGGGGS AQAVLTQPSL LSAPFGASAS	
		151	LTCTLRSDIN VGTIRIYWQ QKPGSPPOYL LRYKSDSDKQ QGSGVPSRFS	
		201	GSKDASANAG ILLISGLQSE DEADYICMIW HSSAWVFGG TKVTIVLGAAG	
251	GAPVYPDPL EPRGAASAWS HQFEK*			
scFv19	33	1	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKLEWVSA	57
		51	ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDMSKNTLY LQMSLRAED TAVYICARDG	
		101	FYAMDVWQG GTMVTVSSG GGGSGGGSG GGSALSSSEL QDPAVSVL	
		151	QTVITTCQGD FLRSYYASWY QKPGQAPLL VIYKKNRFS GIPDRFSGSS	
		201	SGNSASLTI TGAQAEDAD YCNSRDITSGN HIGVFGGTTK LITVLGAAGA	
251	PVYPDPLE PRGAASAWSH PQFEK*			

图6

表 2

编码的多肽	SEQ ID NO.	DNA 序列
scFv1	10	1 GAGGTGACGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCTGGGGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAG 71 CCTCTGGATTACCTTTACAGCTATGCCATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGTG 141 GGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTAGCACATACTACGACACTCCGTGAAGGCCCGGTTCCACCATC 211 TCCAGAGACAATTCCAGAACACCGCTGTATCTGCAATGACAGCCTGAGAGCCGACACCGGCCGCTGT 281 AATTACTGCGAGAGATGTACGGTGCACCTTCTCCGATTTGACTTCTGGGGCCAAAGGACATGGT 351 CACCGTCTCGAGTGGAGGGCGGTTCAAGGGAGGTGGCTTGGGGTGGCGAAGTGCACCTTCTTCT 421 GAGCTGACTCAGGACCTGCTGTGCTGTGGCCCTGGGACAGACACTCAGAACTCACATGCCAAGGAGACA 491 GCCTCAGACTCTATTATGAAGCTGTTACCCAGCAGAACCCAGACAGCCCTTACTTGTCAATGTAISG 561 TAAAGCAACCCGGCCCTCAGGGATCCAGACCGAATCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAGTACTTCTTCCATTG 631 ACCATCACTGGGGCTCAGCGGAGATGAGCTGACTATTACTGTAGCTCCCGGACACCAAGTGTAAACC 701 ATCTGGTTTTCGCGGAGGACCAAGTCAACCTCCTAGGTGGGGCCGGCTCGCGGCTGCGGCTATCC 771 AGATCCGCTGGAACCGCTGGGGCCGCAAGCGCTTGGAGCCACCCCGCAGTTCGAAAAA
scFv2	11	1 GAGGTGACGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCTGGGGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAG 71 CCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGTG 141 GGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTAGCACATACTACGACACTCCGTGAAGGCCCGGTTCCACCATC 211 TCCAGAGACAATTCCAGAACACCGCTGTATCTGCAATGACAGCCTGAGAGCCGACACCGGCCGCTGT 281 AATTACTGCGAGAGACGGGGATTTGGTGGCTACTAATTTCCCTGACTACTGGGGCCAAAGGACATGGT 351 CACCGTCTCGAGTGGAGGGCGGTTCAAGGGAGGTGGCTTGGGGTGGCGAAGTGCACACTCTGTG 421 TTGACGACCCCTCAGTGTCTGGGGCCCGCAGGAGGCTACCATCTCCTGTACTGGAGCAGCT 491 CCAACATCGGGCAGGTTTGTATGTACACTGGTACCCAGCCTTCCAGGAACGCCCCAAAECTCCTCAT 561 CTATGCTACACATGCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCCGATCTCTGGCTCCAAAGTCTGGCCACCTCAGCC 631 TCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGCTGAGGATGAGGCTGATATTTTTTGTCACTCAGTACACAATAACA 701 TGAGGAGGTGTTCCGGCGGAGGACCAAGTCAACCTCCTAGTGGGGCCGGCTGCGGCTGCGGCTGCGGCTA 771 TCCAGATCCGCTGGAACCGCTGGGGCCGCAAGCGCTTGGAGCCACCCCGCAGTTCGAAAAA

图 7 (续)

图 7

scFv6	15	<p>1 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCGTTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCGAG 71 CCTCTGGATTCACTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAATG 141 GGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGTAGCACAFATACGTAGACTCCGTGAAGGCCCGGTTCCACCATC 211 TCCAGAGACAAATCCAGAACACCTGTATCGAAATGAACACCTGAGAGCCGAGGACACGGCCCGTGT 281 ATTACTGCGAGAGATAATTGGGGGTGACAAACCCCTTGTACTTGGGGCCAGGGACACCGGTGCAC 351 CCTCTCAGTGGAGCGCGGTTCCAGCCGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGAAGTGCATTTCTTCTGAG 421 CTGACTCAGGACCCCTGCTGTCTGTGGCTTGGGACAGACAGTCAAGATCACATCCCAAGGAGACAGCC 491 TCAGAACTTACTATGAGCTGGTATCAGCAGAACCCAGCACGCCCCGGTACTTCTCATCTATGGTAA 561 AAACAAGCGCCCTCGGGATCCAGACGATTTCTGGGCTCCACTCAGGAGACACAGCTTCTTTCTCC 631 ATCACCGGGCTCTGGCGATGATGAGGTGACTATTACTGTACTCCCGGACACAGTGGTGAACCAA 701 TTCTATTCCGGGAGGACCAAGCTGACCTCCTAGGTCCGGCCGGGTCCCGGTTGCCGATVCCAGA 771 TCCGCTGGACCCGCTGGGCCCCAGCGCTTGGACCAACCCCGAGTTCGAAAAA</p>
scFv7	16	<p>1 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCGTTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCGAG 71 CCTCTGGATTCACTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAATG 141 GGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGCCCGGTTCCACCATC 211 TCCAGAGACAAATCCAGAACACCTGTATCTGCAATGAACACCTGAGAGCCGAGGACACGGCCCGTGT 281 ATTACTGCGAGAGATAATTGGGGGTGACAAACCCCTTGTACTTGGGGCCAGGGACACCGGTGCAC 351 CTGAGTGGAGCGCGGTTCCAGCCGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGAAGTGCATTTCTTCTGAGCTG 421 ACTCAGAACCCCTGCTGTCTGTGGCTTGGACAGACAGTCAAGTCACTGCGAGGAGACAGCTCA 491 AAAATTATTATCCAACTGTTATCAGAGAGCCTGGACAGCCCTTACTTGTCAATATGGTAA 561 CAAAGCGCCCTCAGGGATCCAGACGATTTCTGGCTCCGACTCAGGAAACACAGGTTCTTGTGACCATC 631 ACTGGGGCACAGCGGAAAGTAGGCTGCCATTACTGTAGTTCCCGGACAGCATGATATCATCTTA 701 GACTATTCCGGGAGGACCAAGTCACTGCTCCTAGTGGCCGCGCGGCTCCCGGTTGCCGATVCCAGA 771 TCCGCTGGACCCGCTGGGCCCCAGCGCTTGGACCAACCCCGAGTTCGAAAAA</p>
scFv8	17	<p>1 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCGTTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCGAG 71 CCTCTGGATTCACTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAATG 141 GGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGCCCGGTTCCACCATC 211 TCCAGAGACAAATCCAGAACACCTGTATCGAAATGAACACCTGAGAGCCGAGGACACGGCCCGTGT 281 ATTACTGCGAGAGATAATTGGGGGTGACAAACCCCTTGTACTTGGGGCCAGGGACACCGGTGCAC 351 CCTGTCACCGTCTCGAGTGGAGCGCGGTTCCAGCCGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGAAGTGCACAG 421 GCTGTCTGACTCAGCCGTTCTCAGCCTCTGGACCCCGGACAGGTTCACTTCTTGTGTTGAA 491 GCAGTCCAACTCGGAAGCAACACTGTAACTGGTGTACAGCATCTCCAGGATCGGCCCAAACTCCT 561 CATCTATAGTACAAATCAGCGCCCTCAGGGTCCCTGAGCCGATTCCTGGCTCCAGGCTGGCACCTCA 631 CCCTCCCTGCGCATCAGTAGCTCCACTGAGGATGAGGCTCATTTATTTGTCAGCGTGGATGATA 701 CCCTGAGTGGCTCCGACTGGGTGTTCCGGGAGGGACCAAGTCACTGCTCCTAGTGGCCGCGAGGTGC 771 GCCGCTGCCATCCAGATCCGCTGGAAACCCCGTGGGGCCCCAGCGCTTGGAGCCACCCCGGAGTTCGAA 841 AAA</p>

图7 (续)

scFv9	18	<p>1 CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCCAAGACTGGTGGCAGCCCTCGGGACCCCTGTCCTCCCTCACCTCCGCTTG 71 TCTCTGGTGGCTCCATCACCACTCCCTAACTGGTGGATTGGTCCGCGCAGCCCGCCAGGGAGGACTGGA 141 GTGATTGGGGAAGTCTATCATGTGGGAGCACCACTGATCCCTGAAGTCCCGTCCCTGAAAGAGTCCGAGTTCAATG 211 ACAGTTGACACGTCCAAGAACCAGTCTCCCTCAATGACCTCTGTGACCCCGCCGACACCGCCCGTCT 281 ATTACTGTCCGAGAGAGGCTGTGGAGTCCGACTTGTACTTGGGCGCCAGGACCCCTGGTCCACCGT 351 CTCGAGTGGAGGGCGGGTTCAGGGGGAGTGGCTTCGCGGTGGGAAAGTCACTTCCTATGAGCTG 421 ACTCAGCCACCTCAGTGTCCGCTGCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTCTCGAGATAAATGG 491 GGGATAATATGCTTCTCTGATACAGCAGAGCCAGCCGTCCTCTGTACTGGTCACTCTCAAGATAG 561 CAAGCGCCCTCAGGATCCCTGAGGATCTCTGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCCATC 631 AGCGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTAATGCTAGCCGTGGGADAGCAGCACTCTTTATGTCT 701 TCGGAACCTGGGACCAAGCTGACCGTCTTAGTGGCGCCGCGGTGCGCCGATCCAGATCCCGCT 771 GGAAACCGCTGGGCGCCGCAAGCGCTTGGAGCCACCCGCGAGTTCGAAAA</p>
scFv10	24	<p>1 TGTGGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCGAGCCCTCTGGATT 71 CACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGATCCGCGAGGCTCCAGGAAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGT 141 ATTAGTGGTAGTGGTGTAGCACATACTACGCRGACTCCGTTGAGGGCCGGTCCCATCTCCAGAGACA 211 ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCCTGTACTGTGC 281 GCGGGGGAAGATCACTGGTTCGGCAACTTATGGATACTTGTACTTGGGGCCGAGGGACAATGGTC 351 ACCGCTCCAGTGGAGCGCGGTTCAAGCGGAGTGGCTGGCCGTGGCGAAGTGCACAGTCTGTGC 421 TGACGACCGCCCTCGGTGTCACTGGCCCAAGGACAGAGCCGCGCAATACCTGTGGGAGAGTAACT 491 TGGAAATAATATGACTGTACACTGTTACAGCAGAGAGCTGGCCAGCCCTGTGCTGGTCTGTATGATGAT 561 AGCGACCGCCCTCCGGATCCCTGAGCGATCTCTGGACCAACTTGGAGCAGCGCCACCCCTGACCA 631 TCAGCAGGTCRAGCCGGGATGAACCCGACTTACTCTCAGTGTGGATAFAGAAGTGAATCAACC 701 GGTATTGGCGGAGGGACCAAGTCAACCCTCCTAGTGGCGCCGAGGTCGCGGTCCTCCAGAT 771 CCGCTGGAAACCGCTGGGCGCCGCAAGCGCTTGGAGCCACCCGCGAGTTCGAAAA</p>
scFv11	25	<p>1 CAACAGTCTGGGCTGAGCTGTGAGGCTGGGCTTCAAGTGTCTGCTGCAAGGCTTGGGCTACA 71 CAATTTCTGACTATGAATGCACTGGTGAAGCAGACACTGTGCATGGCTGGATGGATGGATATAT 141 TCATCCAGGAAGTGGTACTGCTTACAAATCAGAAATCAAGGCAAGCCACACTGACTGCAGACAAA 211 TCCTCCAGCACCCCTACATGGACTCAGCAGCTGACACTGTAGGACTCTGTCTTATTAATGTACAA 281 GAGACTACGGTAACTGCTGATGCTGGGCGCTGGACCCAGTCCGATATCCAGATGACACAGACTCCATCC 351 CGGTTCAAGGCGGAGGCTGCTGGCGGTGGGAGTGCCTCCGATATCCAGATGACACAGACTCCATCC 421 TCCTTATCTGCTCTCTGGGAGAAAGTCACTCACTGTGGGCAAGTCAAGCAATGGTAGTACT 491 TAACTGGCTTCAGCAGAACAGATGAACTATTAACGCTTACATCCGCACTCCAGTTAGATTCC 561 TGGTGTCCCCAAAAGTTCAGTGGCAGTAGGCTGGGTGAGATTAATCTCTCACCATCAGAGCCCTGGAA 631 TCTGAGATTTGCAGACTTACTGTACAGTATGCTCAGTTCCTGCTCCGCTGAGGAGGAGCCCA 701 AGCTGGAAATCAAGCCGCGGAGGTCGCGGCTGCTCCGATFCCAGATCCGCTGGAACCCGCTGGGCGCCG 771 AAGCGCTTGGAGCCACCCGCGACTTCGAAAA</p>

图7 (续)

<p>scFv12</p>	<p>26</p>	<p>1 CTGAGCTGGTGGGCTGGGCTTCAGTGCAGCTGCTCCGCAAGGCTTGGGCTACACATTTACTGACTT 71 TGAATCCACTGGGTGAGCAGACACACCTGTGCATGGCCGGAATGGATTGGATTTATGATCCCTGAACT 141 GGAGGTACTGCTTAAATCAGAAAGTTCAGAGCAGAGCCACACCTGACTGACAGACAGATCCCTCCAGTACAG 211 CCTACATGGAGCTCCGAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGCTATTTACTGTGAAGATCAGATTACTYA 281 CGGTAGTGGTACTTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAGGAACCTCAGTCCAGCTCGACAGTTGGAGGC 351 GGTTCAGCGGAGGTGGCTTGGCGGTGGCGGAAGTGCATCGACTGATGTGATGACACAGTCCRAAAT 421 TCATGTCACATCAGTAGGAGACAGGTTCAGCTCACCCTCAAGCCAGTCAAGATGTGGTACTAATGT 491 AGCCTGGTTCACAGAAACAGGGCAATCTCCTAAGACTGATTTACTCGGGATCCACCGGTACAGT 561 GGAGTCCCTGATCCGTTTCCAGGAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCCACCATCAGCAATGTGAGT 631 CTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCCAGAAATACAGCTATCTCTCACCTGCGGTGGGACCAA 701 GCTGGAGCTGAAGCGCGCAGGTGGCGGTCTCCGTTCCAGATCCGCTGGAACCGCTGGGCGCGCA 771 AGCGCTGGAGCCACCGGAGTTCGAAAA</p>
<p>scFv13</p>	<p>27</p>	<p>1 GCAGCTGAAGGAGTCAGGACTGAGCTGGTGAACCTGGGGCTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCT 71 GGATACAACTACTGACTACACATGCATGCTGGCTGAAGGGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATGG 141 GATATGTTTATCCTTACAAATGENTACTGGCTACACACAGAACTTCAAGACCAGGCCACATGACTGT 211 AGCAATTCCTCCAGCACGCCATACATGGAGCTCCGAGCTCGGAGCTCTGAGGACTCTGCGACTATTTAC 281 TETGTAATGGGGTACGACGTGGCTGCTTCTGATGCTGGGGCCAGGGACCCACCGTCAACGTTST 351 CGACAGTGGAGCGGTTCCAGCGGAGTGGCTTGGCGGTGGCGGAAGTGCATCCAAATTTGTTCCAC 421 CCACTCCAGCCATCACAGTGCATCTCTGGSCAAAGGTCACCATCCTGCAGTGCAGCTCAAGT 491 GTAAGTACATGCTGTPACCCAGAAATCAGGCACTCCGCCAAAGATGGATTTATGACACATCCA 561 AACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTGCTTCCAGTGGCAGTGGTCTGGGACTCTTACTCTCTCACAAATCAG 631 CAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGAGTGGAGTAGTAAACCCACTCACCGTTCGGT 701 GCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAGCGCGCAGGTGGCGGCTGCGCCGCTCCAGATCCGCTGGAACCCG 771 GTGGGCGCAGCGGCTTGGAGCCACCGGAGTTCGAAAA</p>
<p>scFv14</p>	<p>28</p>	<p>1 CTGCAACAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGGGCTTCCGTTCACTGAAGCTGTCTCTGCAAGGCTTGGGCT 71 ACACATTTTCTGACTATGAAATGCATGGGTGAAGCGACACCTGTGCANGCCCTGGAATGGATGGATA 141 TATTCATCCAGGAAGTGGTGGTACTGCCCTCAATCAGAAATTCAGGGCAAGCCACACTGACTGCAGAC 211 AAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTGTGCTGTCTATTTACTGTA 281 CAAGAGACTACGGTAACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCTGGACCCAGGTTACCCCTCGACAGGTTG 351 AGCGGTTCCAGCGGAGTGGCTTGGCGGTGGCGGAAGTGCATCGATCCAGATGACACAGACTCCA 421 TCCTCCTATCTGCCCTCTCTGGGAAAGAGTCACTCACATTTCTGGGCAAGTCAAGGACTTGGTAGTA 491 GCTTAACTGGCTTCCAGCAGGAACCAAGATGAACTATTAACCGCTGATACGCCCATCCAGTTTGA 561 TTCTGGTTCCTCCAAAGGTTAGTGGCAGTAGGCTGGGTCAAGATTTCTCTCACCATCAGAGCCTT 631 GAGTCTGAAGATTTTGTACACTATTAATCTGTCTAATAATGTAGTCTCCGCTACACCTTCCGAGGGGGA 701 CCAAGCTGGAAATAAAGCGCGCCAGGTGGCGGCTGCGCCGCTCCGCTGGAACCCGCTGGGCG 771 CCAAGCGCTTGGAGCCACCGGAGTTCGAAAA</p>

图7 (续)

scFv18	37	1	GAGTGCAGCTGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAG
		71	CCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGCTGGAGTG
		141	GGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGTAGCACATATACGACACTCCGTGAAGGCCGGTTACCATC
		211	TCCAGAGACAATCCAGAACACGCTGTATCTGCARAATGAACACACCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGT
		281	ATTACTGTGCGAGAAAGGGGGATGGACGCTGTGGGGCCGAGGGACAATGGTCAACCGTCTCGAGTGGAGG
		351	CGCCGGTTCAGCGGAGGTGGCTCTGGGCGATCAGCCACTCACCTGGACCTTACGAGTGACATCAATGTTGGTACCT
		421	CTCTCTGCATCTCCTGGAGCATCAGCCACTCACCTGGACCTTCCGCCAGTATCTCTGAGGTACAAATCAGACTC
		491	ACAGGATATCTGGTACCAGACAGCCAGGGAGTCCGCCAGTATCTCTGGATCCAAAGATGCTTCGGCCAAATGCAGGG
		561	AGATAAGCAGCAGGGCTCTGGAGTCCCGAGCCGCTTCTCTGGATCCAAAGATGCTTCGGCCAAATGCAGGG
		631	ATTTTACTCATCTCTGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGACTTATTAATGATGATTTGGCAGCAGCAGCGG
701	CTTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCTTAGGTGGCCCGCAGGTGGCCCGTCCCGTATCC		
771	AGATCCGCTGGAACCGCTGGGCCCGCAAGCGCTTGGAGCCACCCGCACTCGAAAATTA		
scFv19	38	1	GAGTGCAGCTGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAG
		71	CCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGCTGGAGTG
		141	GGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGTAGCACATATACGACACTCCGTGAAGGCCGGTTACCATC
		211	TCCAGAGACAATCCAGAACACGCTGTATCTGCARAATGAACACACCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGT
		281	ATTACTGTGCGAGAAAGGGGGATGGACGCTGTGGGGCCGAGGGACAATGGTCAACCGTCTCGAGTGGAGG
		351	GAGTGGAGGGCGGCTTATTAATGCTATGGACTCTGGGGCCAGGGGCAATGFTCAACCGTCTC
		421	CAGGACCCCTGCTGTCTGTGGCTTGGGACAGACAGTCAAGTCACTTGGCCAGGAGACTTCTCTCAGAA
		491	GCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAGCCAGGACAGGCCCTCTACTTGTCACTATGGTAAACAA
		561	GCGGCCCTCAGGATCCAGACCGGATTTCTTGGCTCCAGCTCAGGAAACTCAGCTTCTTGGACCACTCACT

图7

a.) HT1080

	CI	CIV	FN	LN
scFv1	n.d.	n.d.	n.d.	++
scFv3	n.d.	+	+	++
scFv5	n.d.	++	+	++
scFv6	n.d.	n.d.	n.d.	+++
scFv7	+	n.d.	+	+++
scFv9	n.d.	n.d.	+	+++
scFv15	+	+	++	++
scFv17	n.d.	++	n.d.	+++
scFv18	n.d.	n.d.	n.d.	++
scFv5*	+	++	++	++
scFv7*	n.d.	n.d.	n.d.	++
scFv9*	n.d.	n.d.	n.d.	++
scFv15*	n.d.	n.d.	n.d.	++
scFv16*	n.d.	n.d.	n.d.	+

b.) PC-3

	CI	CIV	FN	LN
scFv1	n.d.	++	++	++
scFv3	++	++	++	++
scFv6	n.d.	n.d.	n.d.	++
scFv7	n.d.	n.d.	++	++
scFv9	n.d.	++	++	+++
scFv15	n.d.	+	++	++
scFv16	n.d.	++	n.d.	++
scFv17	++	++	++	++
scFv18	+	++	++	++

c.) HELA

	CI	CIV	FN	LN
scFv1	n.d.	+	++	++
scFv3	n.d.	n.d.	++	++
scFv5	n.d.	n.d.	++	++
scFv6	n.d.	+	++	++
scFv7	n.d.	n.d.	++	++
scFv9	+	n.d.	+	+
scFv15	+	n.d.	+	++
scFv17	n.d.	n.d.	+	++
scFv18	n.d.	n.d.	+	++
scFv5*	n.d.	n.d.	n.d.	++
scFv6*	n.d.	n.d.	++	+++
scFv7*	n.d.	n.d.	+++	+++
scFv9*	n.d.	n.d.	++	+++

d.) HT-29

	CI	CIV	FN	LN
scFv5	n.d.	n.d.	n.d.	+++
scFv6	n.d.	n.d.	n.d.	+++
scFv7	n.d.	n.d.	n.d.	+++
scFv17	n.d.	n.d.	n.d.	+++
scFv9*	n.d.	n.d.	n.d.	++

图 8

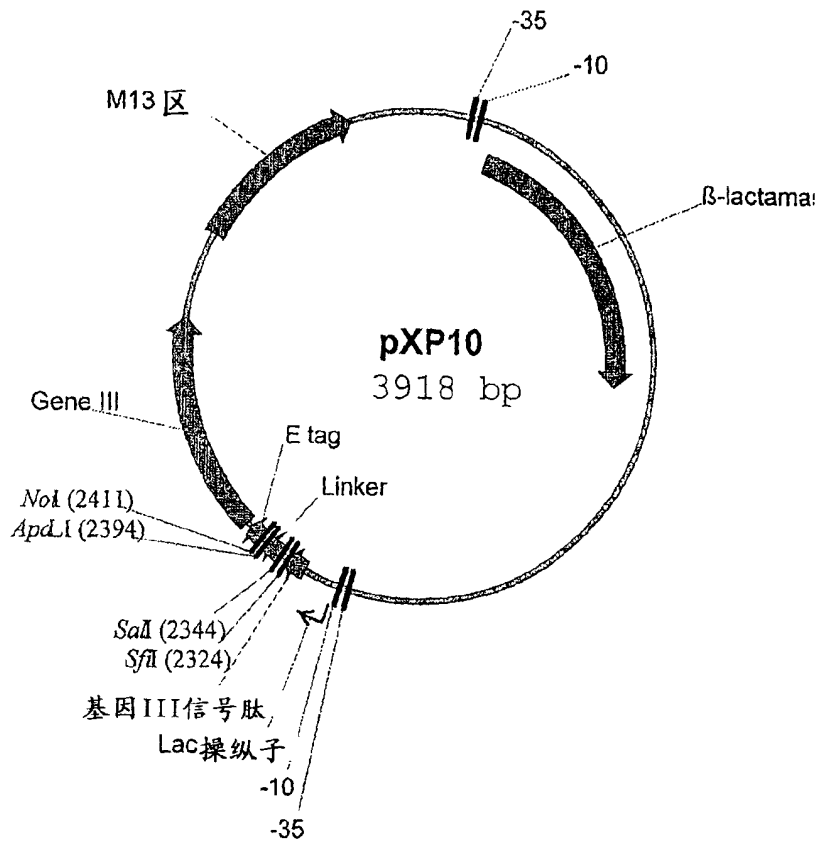


图9a

pXP10的核苷酸序列 (SEQ ID No. 40)

```

1   GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTAA TGTCATGATA
51  ATAATGGTTT CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG
101 AACCCCTATT TGTTTATTTT TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA
151 TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT AATATTGAAA AAGGAAGAGT
201 ATGAGTATTC AACATTCCG TGTCGCCCTT ATCCCTTTT TTGCGGCATT
251 TTGCCTTCCT GTTTTGCTC ACCCAGAAAC GCTGGTAAA GTAAAAGATG
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCT CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC
351 AGCGGTAAGA TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAAGGTT TTCCAATGAT
401 GAGCACTTTT AAAGTTCTGC TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG
451 CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC ACTATTCTCA GAATGACTTG
501 GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG GCATGACAGT
551 AAGAGAATTA TGCAGTCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTTCG
651 CACAACATGG GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGAGCT
701 GAATGAAGCC ATACCAAACG ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA
751 TGGCAACAAC GTTGGCGAAA CTATTAAC TGCGAACTACT TACTCTAGCT
801 TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG TTGCAGGACC
851 ACTTCTGCGC TGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTATTGCT GATAAATCTG
901 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT
951 GGTAAAGCCCT CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAGSCAAC
1001 TATGGATGAA CGAAATAGAC AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA
1051 AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTACT CATATATACT TTAGATTGAT
1101 TTAAAACATC ATTTTTAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA TCCTTTTTCG
1151 TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTT CACTGAGCGT
1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTTCTG
1251 CGCGTAATCT GCTGCTGCA AAAAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT
1301 TTGTTTCCG GATCAAGAGC TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAACCTGGT
1351 TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC TTCTAGTGA GCCGTAGTTA
1401 GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC TCGCTCTGCT
1451 AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGCTTACCG
1501 GGTGGACTC AAGACGATG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA
1551 ACCGGGGGTT CGTGCAACA GCCCAGCTTG GAGCGAACA CCTACACCGA
1601 ACTGAGATAC CTACAGCGTG AGCTATGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG
1651 GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG GCAGGGTCGG AACAGGAGAG
1701 CGCACGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT ATAGTCTCTG
1751 CCGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTGTGA TGCTCGTCAG
1801 GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCGGCCTT TTACGGTTC
1851 CTGGCCTTTT GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTCTTTCCTG CGTTATCCCC
1901 TGATTCTGTG GATAACCGTA TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC
1951 GCCGCAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA
2001 GAGCGCCCAA TACGCAAACC GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC CGATTCATTA
2051 ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA
2101 ACGCAATTA TGTGAGTTAG CTCACTCATT AGGCACCCCA GGCTTTACAC
2151 TTTATGCTTC CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT
2201 TCACACAGGA AACAGCTATG ACCATGATTA CGCCAAGCTT TGGAGCCTTT
2251 TTTTGGAGA TTTTCAACGT GAAAAAATA FTATTGCAA TTCCTTTAGT
2301 TGTTCTTTT TATGCGGCC AGCCGGCCAT GGCCAGGTC CAGTCGACAG
2351 GTGGAGGCGG TTCAGGCGGA GGTGGCTCTG GCGGTGGCGG AAGTGCACCT
2401 ATCAAACGGC GGCCGACAGT GCGCCGTCG CGTATCCGGA TCCGCTGGAA
2451 CCGCGTGCCG CATAGGCTGG CCGCGGCTCT GGTGGTGGTT CTGGTGGCGG
2501 CTCTGAGGTT GCGGCTCTG AGGTTGGCGG TTCTGAGGTT GCGGCTCTG
2551 AGGGTGGCGG TTCCGGTGGC GGCTCCGGTT CCGGTGATTT TGATTATGAA
2601 AAAATGGCAA ACGCTAATAA GGGGCTATG ACCGAAATG CCGATGAAA
2651 CGCGCTACAG TCTGACGCTA AAGCAAACCT TGATTCTGTC GCTACTGATT

```

```

2701 ACGGTGCTGC TATCGATGGT TTCATTGGTG ACGTTTCCGG CCTTGCTAAT
2751 GGTAATGGTG CTA CTACTGGTGA TTTTGCTGGC TCTAATFCCC AAATGGCTCA
2801 AGTCGGTGAC GGTGATAATT CACCTTTAAT GAATAATTC CGTCAATATT
2851 TACCTTCTTT GCCTCAGTCG GTTGAATGTC GCCCTTATGT CTTTGGCGCT
2901 GGTA AACCAT ATGAATTTTC TATTGATTGT GACAAAATAA ACTTATTCCG
2951 TGGTGTCTTT GCGTTTCTTT TATATGTTGC CACCTTATG TATGTATTTT
3001 CGACGTTTGC TAACATACTG CGTAATAAGG AGTCTTAATA AGAATTCAC
3051 GGCCGTCGTT TTACAACGTC GTGACTGGGA AAACCCTGGC GTTACCCAAC
3101 TTAATCGCCT TGCAGCACAT CCCCCTTTCG CCAGCTGGCG TAATAGCGAA
3151 GAGGCCCGCA CCGATCGCCC TTCCAACAG TTGCCGAGCC TGAATGGCGA
3201 ATGGCGCCTG ATGCGGTATT TTCTCCTTAC GCATCTGTGC GGTATTTAC
3251 ACCGCATACG TCAAAGCAAC CATAGTACCG GCCCTGTAGC GGGCGATTAA
3301 GCCCGGCGGG TGTGGTGGTT ACGGCGAGCG TGACCCGTAC ACTTGCCAGC
3351 GCCCTAGCCC CCGCTCCTTT CGCTTTCTTC CCTTCTTTC TCGCCACGTT
3401 CGCCGGCTTT CCCCCTCAAG CTCTAAATCG GGGGCTCCCT TTAGGGTCC
3451 GATTTAGTGC TTTACGGCAC CTCGACCCCA AAAA ACTTGA TTTGGGTGAT
3501 GGTTCACGTA GTGGGCCATC GCCCTGATAG ACGGTTTTTC GTCCTTTGAC
3551 GTTCGAGTCC ACGTTCCTTA ATAGTGGACT CTGTTCCTCA ACTGGAACA
3601 TACTCAACCC TATCTCGGGC TATTCTTTG ATTTATAAGG GATTTTGCCG
3651 ATTTTCGCCT ATTGGTAAA AAATGAGCTG ATTTAACAAA AATTTAACGC
3701 GAATTTTAAAC AAAATATTAA CGTTTACAAT TTTATGGTGC AGTCTCAGTA
3751 CAATCTGCTC TGATGCCGCA TAGTTAAGCC AGCCCCGACA CCGCCAACA
3801 CCCGCTGACG CGCCCTGACG GGCTTGTCTG CTCCCAGCAT CCGCTTACAG
3851 ACAAGCTGTG ACCGCTCCG GGAGCTGCAT GTGTCAGAGG TTTTCACCGT
3901 CATCACCGAA ACGCGCGA

```

图 9b

恶性肿瘤类型	任意强度测试肿瘤不同阳性读数的数目	
		scFv7* scFv9*
膀胱	6	5 3
宫颈	3	2 0
CNS	3	2 1
结肠	11	4 4
胃	4	3 1
头颈	1	1 0
肺腺癌	12	10 5
鳞状细胞肺癌	4	4 1
大细胞肺癌	6	6 1
小细胞肺癌	2	2 2
淋巴瘤	1	1 0
胸	13	9 3
黑色素瘤	10	7 3
卵巢	4	3 3
胰腺	2	3 2
前列腺	7	4 0
胸膜间皮瘤	7	5 5
肾	8	7 3
肉瘤	2	2 1
睾丸	2	2 0
子宫	1	1 1
肝癌	3	2 1
	112	85 40

图10

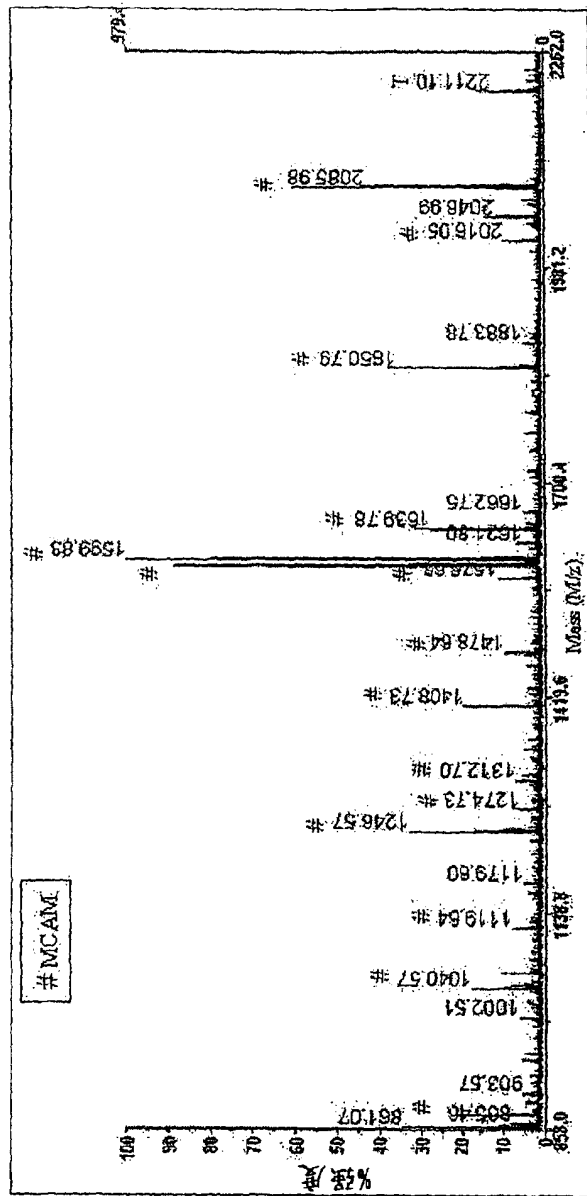


图 11a

MCAM 蛋白质 (SEQ ID No 58)

1 MGLPRLVCAF LLAACCCCFR VAGVPGEAEQ PAPELVEVEV GSTALLKCGL
 51 SQSQGNLSHV DWFSVHKEKR TLIFRVROGO GQSEPGEYEQ RLSLQDRGAT
 101 LALTQVTPQD ERIFLCQGKR PRSQEYRIQL RVYKAPEEPN IQVNPLGIPV
 151 NSKEPEEVAT CVGRNGYPIP QVIWYKNGRP LKEEKNRVHI QSSQTVESSG
 201 LYTLQOSILKA QLVKEDKDAQ FYCELNYRLP SGNHMKESRE VTVPVFYPTD
 251 KVWLEVEFVG MLKEGDRVEI RCLADGNPPP HFSISKQNP TREAREETT
 301 DNGVLEPA RKEHSGRYEC QAWNLDTMIS LLSEPQELLV NYVSDVRVSP
 351 AAPERQEGSS LTLTCEAESS QDLEFQWLRE ETDQVLERGP VLQLHDLKRE
 401 AGGGYRCVAS VPSIPGLNRT QLVKLAIFGP PWMAFKERKV WVKENMVLNL
 451 SCEASGHPRP TISWNVNGTA SEQDQDPQRV LSTLNVLVTP ELLETGVECT
 501 ASNDLGKNTS ILFLELVNLT TLTPDSNTTT GLSTSTASPH TRANSTSTER
 551 KLPEPESRGV VIVAVIVCIL VLAVLGAVLY FLYKKGKLP RRSGKQEITL
 601 PPSRKTELVV EVKSKLPEE MGLLQSSGD KRAPGDQGEK YIDLRH

23%覆盖率 (下划线的)

图 11b

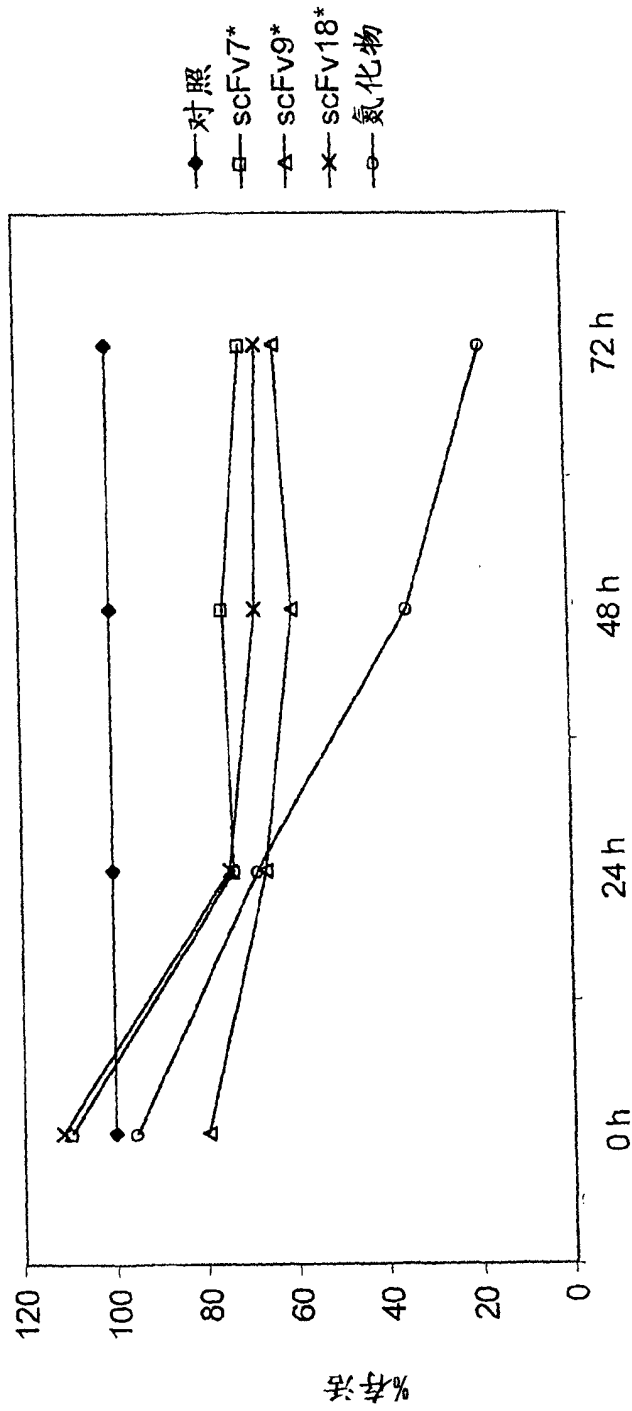


图12a

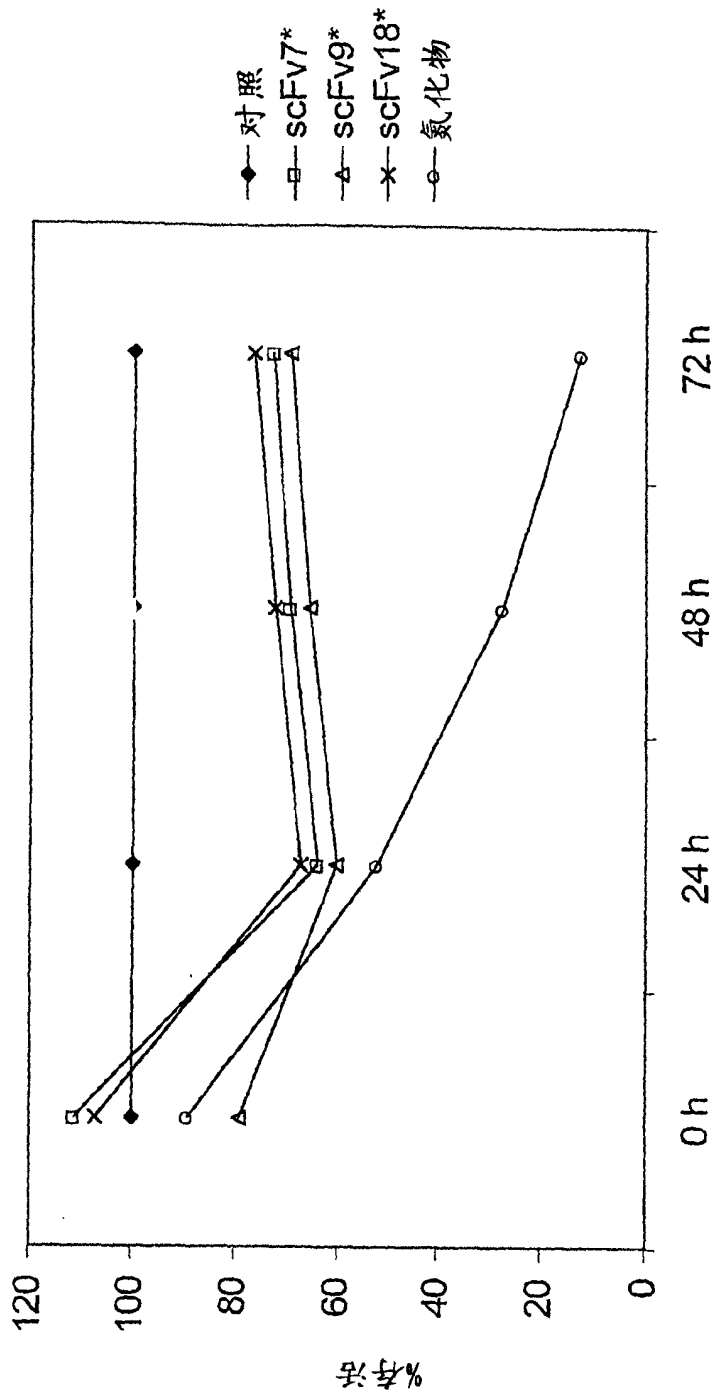


图12b

实验号	治疗	剂量 ml/kg	第0天的 肿瘤体积 [mm ³]	第7天 -肿瘤体积 [%] -体重 [%]	由于治疗 肿瘤体积 的减少%
1	对照	10	70.0	245.6 104.9	0
2	scFv7*	50	124.9	217.9 98.1	11.9
3	Docetaxel	20	90.8	94.6 89.6	61.5
4	scFv7*/Docetaxel	50/20	102.2	81.8 95.2	66.7

图 13