



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109789208 B

(45) 授权公告日 2023.03.03

(21) 申请号 201780059160.5

(22) 申请日 2017.07.26

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109789208 A

(43) 申请公布日 2019.05.21

(30) 优先权数据
10201606178X 2016.07.26 SG

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.03.26

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/SG2017/050382 2017.07.26

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/021972 EN 2018.02.01

(73) 专利权人 新加坡科技研究局
地址 新加坡新加坡

(72) 发明人 S·柯 徐文华 陈行樑 冯慧佳
陈美仪 梁文彦

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713
专利代理师 康健 王思琪

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 1765925 A, 2006.05.03
CN 103097414 A, 2013.05.08
CN 101213454 A, 2008.07.02
N. A. Lokman等. Annexin A2 is regulated by ovarian cancer-peritoneal cell interactions and promotes metastasis. 《Oncotarget》. 2013, 第4卷 (第8期), 第1199-1211页.
尹江丽等. 抗ANXA2单克隆抗体的制备及初步鉴定. 《热带医学杂志》. 2014, 第14卷 (第5期), 第578-581, 618页.
S. Cua等. Targeting of embryonic annexin A2 expressed on ovarian and breast cancer by the novel monoclonal antibody 2448. 《Oncotarget》. 2018, 第9卷 (第17期), 第13206-13221页.

审查员 朱碧薇

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书4页 说明书22页

序列表10页 附图30页

(54) 发明名称

抗膜联蛋白A2单克隆抗体

合,并在结合后内化.他们可以与细胞毒素缀合,并用于癌症的治疗和检测。

(57) 摘要

提供了抗膜联蛋白A2单克隆抗体.具体地,本发明涉及针对膜联蛋白A2 (ANXA2)的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,优选为单克隆抗体,其包含(i)重链可变结构域,其包含序列GYSITSGYSWH的VHCDR1、序列YIHYSGSTKYNPSLKS的VHCDR2和序列GSNYGFDY的VHCDR3; (ii)轻链可变结构域,其包含序列KSSQSLLYSNDQKNYLA的VLCDR1、序列WASIRES的VLCDR2和序列QQYYIYPLT的VLCDR3.本发明还提供了其组合物、其用途及试剂盒.抗体优选地与ANXA2上的N-连接聚糖结

CN 109789208 B

1. 一种抗原结合蛋白或其抗原结合片段,所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段包含 (i) 重链可变结构域,所述重链可变结构域包含VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:9所示的GYSITSGYSWH,VHCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:10所示的YIHYSGSTKYNPSLKS,并且VHCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:11所示的GSNYGFDY;(ii)轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:12所示的KSSQSLLYSNDQKNYLA,VLCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:13所示的WASIRES,并且VLCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:14所示的QQYYIYPLT。

2. 根据权利要求1所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述重链可变结构域的氨基酸序列为SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述轻链可变结构域的氨基酸序列为SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中VHCDR1的氨基酸序列由SEQ ID NO:15所示的核酸序列GCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCAC 编码;VHCDR2的氨基酸序列由SEQ ID NO:16所示的核酸序列ACATACACTACAGTGGTAGCTAAGTACAACCCATCTCTCAAAGTCTC 编码;VHCDR3的氨基酸序列由SEQ ID NO:17所示的核酸序列GGAGTAACTACGGATTTGACTACT编码;VLCDR1的氨基酸序列由SEQ ID NO:18所示的核酸序列GTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAACGATCAAAAGAACTACTTGGCCT编码;VLCDR2的氨基酸序列由SEQ ID NO:19所示的核酸序列GGGCATCTATTAGGGAATCTG编码;并且VLCDR3的氨基酸序列由SEQ ID NO:20所示的核酸序列AGCAATATTATATCTATCCTCTCACGT编码。

5. 根据权利要求4所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述重链可变结构域的氨基酸序列由SEQ ID NO:3所示的核酸序列编码。

6. 根据权利要求4所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述轻链可变结构域的氨基酸序列由SEQ ID NO:4所示的核酸序列编码。

7. 根据权利要求1所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白选自以下组成的组:单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、双特异性抗体和异源偶联抗体;嵌合抗原受体、缺少铰链区的单价抗体和微抗体。

8. 根据权利要求7所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白是单克隆抗体。

9. 根据权利要求8所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体是人源化的。

10. 根据权利要求8所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体是嵌合的。

11. 根据权利要求8所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体是去岩藻糖基化的。

12. 根据权利要求11所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中相对于野生型抗体,岩藻糖基化程度小于10%。

13. 根据权利要求11所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中相对于野生型抗体,岩藻糖基化程度小于5%。

14. 根据权利要求11所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中相对于野生型抗体,

岩藻糖基化程度小于1.5%。

15. 根据权利要求1所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段与ANXA2结合。

16. 根据权利要求15所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段与ANXA2上的聚糖结合。

17. 根据权利要求16所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段与ANXA2上的N-连接聚糖结合。

18. 根据权利要求1所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白为单链Fv。

19. 根据权利要求1所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白为双抗体。

20. 根据权利要求1所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白为Tandabs™。

21. 根据权利要求1所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段与放射性同位素或细胞毒素缀合。

22. 根据权利要求21所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段与选自单甲基澳瑞他汀E、美登素和皂草素组成的组的细胞毒素缀合。

23. 根据权利要求15-17中任一项所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白或抗原结合片段在与ANXA2结合后内化到细胞中。

24. 根据权利要求1所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段具有选自以下组成的组的一种或多种的细胞毒性活性:补体依赖性细胞毒性活性、抗体依赖性细胞毒性活性和溶瘤活性。

25. 一种抗原结合蛋白或其抗原结合片段,所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段包含(i)重链可变结构域,所述重链可变结构域包含VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:21所示的VYSITSGYSWH;VHCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:10所示的YIHYSGSTKYNPSLKS,并且VHCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:22所示的GTDNAVVDY;(ii)轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:23所示的KSSQSLLYSSNQKNYLA,VLCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:24所示的WASSRES,并且VLCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:14所示的QQYYIYPLT。

26. 根据权利要求25所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述重链可变结构域的氨基酸序列为SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。

27. 根据权利要求25所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述轻链可变结构域的氨基酸序列为SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。

28. 根据权利要求25所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中VHCDR1的氨基酸序列由SEQ ID NO:25所示的核酸序列TCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACT编码;VHCDR2的氨基酸序列由SEQ ID NO:26所示的核酸序列ACATACACTACAGTGGTAGTACTAAGTACAACCCATCTCTCAAAAGTCTC编码;VHCDR3的氨基酸序列由SEQ ID NO:27所示的核酸序列GGACCGACAATGCTGTGGACTACT编码;VLCDR1的氨基酸序列由SEQ ID NO:28所示的核酸序列AGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAGCAATCAAAAGAACTACTTGGCCT编码;VLCDR2的氨基酸序列由

SEQ ID NO:29所示的核酸序列GGGCATCCAGTAGGGAATCTG编码;并且VLCDR3的氨基酸序列由SEQ ID NO:20所示的核酸序列AGCAATATTATATCTATCCTCTCACGT编码。

29.根据权利要求28所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述重链可变结构域的氨基酸序列由SEQ ID NO:7所示的核酸序列编码。

30.根据权利要求28所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述轻链可变结构域的氨基酸序列由SEQ ID NO:8所示的核酸序列编码。

31.根据权利要求25所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白选自自由以下组成的组:单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、双特异性抗体和异源偶联抗体;嵌合抗原受体、缺少铰链区的单价抗体和微抗体。

32.根据权利要求31所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白是单克隆抗体。

33.根据权利要求32所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体是人源化的。

34.根据权利要求32所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体是嵌合的。

35.根据权利要求25所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白为单链Fv。

36.根据权利要求25所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白为双抗体。

37.根据权利要求25所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白为Tandabs™。

38.根据权利要求25所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段与ANXA2结合。

39.根据权利要求38所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段与ANXA2上的聚糖结合。

40.根据权利要求39所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段与ANXA2上的N-连接聚糖结合。

41.根据权利要求25所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段与放射性同位素或细胞毒素缀合。

42.根据权利要求41所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段与选自自由单甲基澳瑞他汀E、美登素和皂草素组成的组的细胞毒素缀合。

43.根据权利要求38-40中任一项所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白或抗原结合片段在与ANXA2结合后内化到细胞中。

44.根据权利要求25所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段具有选自自由以下组成的组的一种或多种的细胞毒性活性:补体依赖性细胞毒性活性、抗体依赖性细胞毒性活性和溶瘤活性。

45.一种组合物,所述组合物包含生理上可接受的载体和治疗有效量的根据权利要求1至44中任一项所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段。

46.根据权利要求45所述的组合物,其中所述组合物包含选自自由贝伐单抗、卡铂、紫杉

醇或吉非替尼组成的组的另外的活性药物成分。

47. 根据权利要求1至44中任一项所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段在制备用于治疗或预防癌症的药物中的用途,其中所述癌症表达膜联蛋白A2。

48. 根据权利要求47所述的用途,其中所述癌症选自由乳腺癌、卵巢癌和畸胎瘤组成的组。

49. 根据权利要求47所述的用途,其中所述药物与另外的活性药物成分一起施用。

50. 根据权利要求47所述的用途,其中所述药物与化学疗法一起施用。

51. 根据权利要求49所述的用途,其中所述另外的药剂被分开、同时或依次施用。

52. 根据权利要求50所述的用途,其中所述化学疗法被分开、同时或依次施用。

53. 如权利要求1-44中任一项所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段在制备用于检测受试者中的癌症或鉴定易患癌症的受试者的试剂盒中的用途,当使用所述试剂盒时,包括以下步骤:使得自所述受试者的样品与权利要求1-44中任一项所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段在体外接触;检测所述样品中所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段的结合;将所述结合与对照样品中的结合水平相关联以确定所述样品中的结合水平,其中,相对于所述对照样品,在所述样品中的结合水平上的增加指示癌症或表明所述受试者易患癌症。

54. 根据权利要求53所述的用途,其中所述对照样品来自相同的受试者。

55. 根据权利要求53所述的用途,其中所述对照样品来自不同的受试者。

56. 根据权利要求53所述的用途,其中所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段结合ANXA2。

57. 根据权利要求53所述的用途,其中所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段包含可检测标记物。

58. 根据权利要求57所述的用途,其中所述可检测标记物选自由荧光标记、化学发光标记、酶标记和放射性核素标记组成的组。

59. 根据权利要求58所述的用途,其中所述可检测标记物选自由生物素、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、FITC、PE和Cy染料组成的组。

60. 根据权利要求57所述的用途,其中在选自流式细胞术、组织切片、免疫荧光、免疫细胞化学或免疫组织化学的测定中检测所述可检测标记物。

61. 根据权利要求53所述的用途,其中所述癌症选自由乳腺癌、肝癌、肾癌、结直肠癌、卵巢癌和畸胎瘤组成的组。

62. 一种试剂盒,所述试剂盒包含权利要求1至44中任一项所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,连同使用说明书。

抗膜联蛋白A2单克隆抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年7月26日提交的新加坡申请号10201606178X的优先权的权益，其内容通过引用整体并入本文以用于所有目的。

发明领域

[0003] 本发明一般涉及抗体。具体地，本发明涉及抗膜联蛋白A2单克隆抗体及其用途。

背景技术

[0004] 膜联蛋白A2 (ANXA2) 参与多种细胞过程和临床关联，尤其是癌症的发展。它是一种钙依赖性磷脂结合蛋白，其功能是帮助组织细胞内蛋白质向细胞外结构域的胞吐作用。ANXA2是一种多效蛋白，意味着其功能取决于体内的位置和时间。

[0005] 在广谱癌细胞中经常观察到ANXA2的表达增加。ANXA2在急性淋巴细胞白血病(ALL)、APL、乳腺癌、结直肠癌(CRC)、胃癌、神经胶质瘤、肝细胞癌(HCC)、肺癌、多发性骨髓瘤(MM)、口腔鳞状细胞癌(OSCC)和胰腺癌中过表达。ANXA2在癌症中的上调可能具有多种临床应用，包括作为早期检测的诊断标志物、预后的预测因子或耐药性的标志物。

[0006] 迄今为止，还没有可用于抗体疗法或用作抗体-药物偶联物的抗ANXA2单克隆抗体用作癌症治疗。此外，靶向ANXA2的独特癌症特异糖型的抗体未见报道。因此需要开发针对ANXA2的新型抗体，其解决目前可用的抗体的缺点。

发明内容

[0007] 在一个方面，提供了抗原结合蛋白或其抗原结合片段，其包含(i)重链可变结构域，其包含具有氨基酸序列GYSITSGYSWH (SEQ ID NO:9)的VHCDR1；具有氨基酸序列YIHYSGSTKYNPSLKS (SEQ ID NO:10)的VHCDR2和具有氨基酸序列GSNYGFDY (SEQ ID NO:11)的VHCDR3；(ii)轻链可变结构域，其包含具有氨基酸序列KSSQSLLYSNDQKNYLA (SEQ ID NO:12)的VLCDR1、具有氨基酸序列WASIRES (SEQ ID NO:13)的VLCDR2和具有该氨基酸序列QQYYIYPLT (SEQ ID NO:14)的VLCDR3。

[0008] 另一方面，提供了抗原结合蛋白或其抗原结合片段，其包含(i)重链可变结构域，其包含具有核酸序列GCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCAC (SEQ ID NO:15)的VHCDR1；具有核酸序列ACATACACTACAGTGGTAGCACTAAGTACAACCCATCTCTCAAAAGTC (SEQ ID NO:16)的VHCDR2和具有核酸序列GGAGTAACTACGGATTTGACTACT (SEQ ID NO:17)的VHCDR3；(ii)轻链可变结构域，其包含具有核酸序列AGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAACGATCAAAAGAACTACTTGGCCT (SEQ ID NO:18)的VLCDR1、具有核酸序列GGGCATCTATTAGGAATCTG (SEQ ID NO:19)的VLCDR2，和具有核酸序列AGCAATATTATATCTATCCTCTCACGT (SEQ ID NO:20)的VLCDR3。

[0009] 在另一个方面，提供了抗原结合蛋白或其抗原结合片段，其包含(i)重链可变结构域，其包含具有氨基酸序列VYSITSGYSWH (SEQ ID NO:21)的VHCDR1；具有氨基酸序列YIHYSGSTKYNPSLKS (SEQ ID NO:10)的VHCDR2和具有氨基酸序列GTDNAV DY (SEQ ID NO:22)

的VHCDR3; (ii) 轻链可变域,其包含具有氨基酸序列KSSQSLLYSSNQKNYLA (SEQ ID NO:23) 的VLCDR1,具有氨基酸序列WASSRES (SEQ ID NO:24) 的VLCDR2和具有氨基酸序列QQYIYIPLT (SEQ ID NO:14) 的VLCDR3。

[0010] 在另一个方面,提供了抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其包含(i) 重链可变结构域,其包含具有核酸序列TCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACT (SEQ ID N:25) 的VHCDR1; 具有核酸序列ACATACACTACAGTGGTAGTACTAAGTACAACCCATCTCTCAAAAGTC (SEQ ID NO:26) 的VHCDR2和具有核酸序列GGACCGACAATGCTGTGGACTACT (SEQ ID NO:27) 的VHCDR3; (ii) 轻链可变结构域,其包含具有核酸序列AGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAGCAATCAAAAGAACTACTTGGCCT (SEQ ID NO:28) 的VLCDR1,具有核酸序列GGGCATCCAGTAGGGAATCTG (SEQ ID NO:29) 的VLCDR2,和具有核酸序列AGCAATATTATATCTATCCTCTCACGT (SEQ ID NO:20) 的VLCDR3。

[0011] 在另一个方面,提供了组合物,其包含生理上可接受的载体和治疗有效量的如本文所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段。

[0012] 在另一个方面,提供了如本文所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段在制备用于治疗或预防癌症的药物中的用途。

[0013] 在另一个方面,提供了用于检测受试者中的癌症的方法,该方法包括:使得自受试者的样品与本文所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段在体外接触;检测所述样品中抗原结合蛋白或其抗原结合片段的结合;将所述结合与对照样品中的结合水平相关联以确定所述样品中的结合水平,其中,相对于所述对照样品,在所述样品中的结合水平上的增加指示癌症。

[0014] 在另一个方面,提供了用于鉴定易患癌症的受试者的方法,该方法包括:使得自受试者的样品与本文所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段在体外接触;检测所述样品中抗原结合蛋白或其抗原结合片段的结合;将所述结合与对照样品中的结合水平相关联以确定所述样品中的结合水平,其中,相对于所述对照样品,在所述样品中的结合水平上的增加表明所述受试者易患癌症。

[0015] 在一方面,提供了试剂盒,当用于如在本文中定义的方法中时,其包含如在本文中定义的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,连同使用说明书。

[0016] 定义

[0017] 以下是可以有助于理解本发明的描述的一些定义。这些旨在作为一般性定义,并且决不应仅将本发明的范围限制于那些术语,而是为了更好地理解以下描述而提出。

[0018] 如本文所用的术语“抗原结合蛋白”是指抗体、抗体片段和其他蛋白质构建体(例如结构域),其能够结合ANXA2。

[0019] 术语“抗体”在本文中以最广泛的意义使用,是指具有免疫球蛋白样结构域分子,且包括单克隆抗体、重组抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、双特异性抗体和异源偶联抗体;嵌合抗原受体(CAR)、单可变结构域、结构域抗体、抗原结合片段、免疫有效片段、单链Fv、双抗体、Tandabs™等(对于可选“抗体”形式的概述,参见Holliger和Hudson,自然生物科技(Nature Biotechnology),2005,第23卷,第9期,1126-1136)。

[0020] “嵌合抗原受体”可包含细胞外结构域,其包含抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。细胞外结构域可以通过接头与跨膜结构域连接。细胞外结构域还可包含信号肽。

[0021] 短语“单可变结构域”是指抗原结合蛋白可变结构域(例如, V_H , V_{HH} , V_L), 其独立于不同的可变区或结构域特异性结合抗原或表位。

[0022] 可以认为“结构域抗体”或“dAb”与能够结合抗原的“单可变结构域”相同。单可变结构域可以是人抗体可变结构域,但也包括来自其他物种的单抗体可变结构域,例如啮齿动物(例如,如WO 00/29004中所公开的)、护士鲨和骆驼科动物的 V_{HH} dAb。骆驼科的 V_{HH} 是免疫球蛋白单可变结构域多肽,其衍生自包括骆驼、美洲驼、羊驼、单峰骆驼和骆马的物种,其产生天然缺乏轻链的重链抗体。这样的 V_{HH} 结构域可以根据本领域可获得的标准技术进行人源化,并且这样的结构域被认为是“结构域抗体”。如本文所用, V_H 包括骆驼科 V_{HH} 结构域。

[0023] 如本文所用,术语“结构域”是指折叠的蛋白质结构,其具有独立于蛋白质其余部分的三级结构。通常,结构域负责蛋白质的离散功能特性,并且在许多情况下可以被添加、去除或转移至其他蛋白质而不丧失蛋白质和/或结构域的其余部分的功能。“单可变结构域”是折叠的多肽结构域,其包含抗体可变结构域的特征序列。因此,它包括完整的抗体可变结构域和经修饰的可变结构域,例如,其中一个或多个环已被不是抗体可变结构域特征的序列替换,或已被截短的或包含N-或C-末端延长物的抗体可变结构域替换,以及已被至少保留全长结构域的结合活性和特异性的可变结构域的折叠片段替换。结构域可独立于不同的可变区或结构域结合抗原或表位。

[0024] 可以通过在非抗体蛋白质支架例如结构域上排列一个或多个CDR来提供抗原结合片段。该结构域可以是结构域抗体,或者可以是为支架衍生物的结构域,所述支架衍生物选自自由以下组成的组:CTLA-4,脂质运载蛋白、SpA、亲和体、avimer、GroE1、转铁蛋白、GroES和纤连蛋白/adnectin,其已经进行蛋白质工程改造以获得与天然配体以外的抗原(例如ANXA2)的结合。

[0025] 抗原结合片段或免疫有效片段可包含部分重链或轻链可变序列。片段长度至少为5、6、8或10个氨基酸。可选择的,片段的长度为至少15,至少20,至少50,至少75或至少100个氨基酸。

[0026] 本说明书中关于抗原结合蛋白使用的术语“特异性结合”是指抗原结合蛋白结合ANXA2而不与或不显著与其他(例如,无关的)蛋白质结合。然而,该术语不排除抗原结合蛋白也可与密切相关的分子交叉反应的事实。本文所述的抗原结合蛋白可以与ANXA2结合,其亲和力比与紧密相关的分子结合的亲和力高至少2、5、10、50、100或1000倍。

[0027] 本说明书中使用的术语“中和”是指在体外或体内,与不存在抗原结合蛋白时相比,在存在本文所述的抗原结合蛋白时,ANXA2的生物活性降低。中和可能是由于阻断ANXA2与其受体结合、阻止ANXA2激活其受体、下调ANXA2或其受体、或影响效应功能的一种或多种。生物活性的降低或抑制可以是部分或全部的。与不存在抗原结合蛋白时ANXA2的活性相比,中和抗原结合蛋白可以将ANXA2的活性中和至少20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。可以使用本领域技术人员已知的或如本文所述的一种或多种实验方法来确定或测量中和。例如,可以通过BIAcore™、FMAT、FORTEbio或类似的体外试验在夹心ELISA中评估与ANXA2结合的抗原结合蛋白。

[0028] “CDR(CDRs)”定义为抗原结合蛋白的互补决定区氨基酸序列。这些是免疫球蛋白重链和轻链的高变区。在免疫球蛋白的可变部分中存在三个重链和三个轻链CDR(或CDR

区)。因此,如本文所用的“CDR”是指所有三个重链CDR、所有三个轻链CDR、所有重链CDR和轻链CDR、或至少两个CDR。

[0029] 如本文所用,术语“启动子”意指启动特定基因转录的DNA区域。

[0030] 如本文所用,术语“癌性的”涉及受癌症特征影响或显示癌症特征异常。

[0031] 如本文所用,术语“生物样品”或“样品”是指来自患者的组织或细胞的样品,其已从患者获得、移除或分离。

[0032] 如本文所用的术语“获得或衍生自”意在包含性地使用。也就是说,旨在包括直接从生物样品中分离的任何核酸序列或源自样品的任何核酸序列。

[0033] 如本文所述的方法适用于新鲜组织、冷冻组织、石蜡保存组织和/或乙醇保存组织的样品。样品可以是生物样品。生物样品的非限制性实例包括全血或其组分(例如血浆、血清)、尿液、唾液淋巴液、胆汁、痰液、泪液、脑脊髓液、支气管肺泡灌洗液、滑液、精液、腹水肿瘤液、母乳和脓液。在一个实施方案中,核酸样品获自血液、羊水或口腔涂片。在优选的实施方案中,样品是全血样品。

[0034] 如本文所考虑的生物样品包括培养的生物材料,其包括衍生自培养细胞的样品,例如从培养细胞或细胞团块中收集的培养介质。因此,生物样品可以指从整个生物体或其组织、细胞或组成部分或其一部分或局部制备的裂解物、匀浆或提取物。生物样品也可在使用前进行修饰,例如,通过纯化一种或多种组分、稀释和/或离心。

[0035] 如本文所用,术语“可检测标记物”或“报道子”是指可附着于核酸的可检测标记物或报道分子。典型的标记物包括荧光团,放射性同位素,配体、化学发光剂、金属溶胶和胶体、以及酶。用于标记和指引可用于各种目的的标记物的选择的方法在例如Sambrook等,分子克隆(Molecular Cloning):实验室手册(A Laboratory Manual),冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)(1989)和在Ausubel等,分子生物学的实验室指南(Current Protocols in Molecular Biology),格林出版协会(Greene Publishing Associates)和威利跨学科(Wiley-Intersciences)(1987)中进行了讨论。

[0036] 如本文所用,在制剂组分浓度的行文中,术语“约”典型地表示所述值的 $\pm 5\%$ 、更典型地为所述值的 $\pm 4\%$ 、更典型地为所述值的 $\pm 3\%$ 、更典型地为所述值的 $\pm 2\%$ 、甚至更典型地为所述值的 $\pm 1\%$ 、甚至更典型地为所述值的 $\pm 0.5\%$ 。

[0037] 在整个本公开文本中,某些实施例可以以范围形式公开。应当理解,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应该被解释为对所公开范围的僵化限制。因此,应该认为范围的描述具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如,应当认为对诸如1至6的范围的描述具有特别公开的子范围,例如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及该范围内的单个数字,例如,1、2、3、4、5和6。无论范围的广度如何,这都适用。

[0038] 本文还可以广泛地和一般地描述某些实施方案。落入通用公开内容中的每个较窄物种和亚属群组也构成本公开的一部分。这包括具有从该类中去除任何主题的附带条件或否定限制的实施方案的一般描述,无论本文是否具体列举了切除的材料。

[0039] 除非上下文另外要求或特别地相反陈述,否则本文所述的本发明的整体、步骤或元素作为单数的整体、步骤或元素清楚地包含所述整体、步骤或元素的单数和复数形式。

[0040] “基本上”一词不排除“完全”,例如“基本上不含”Y的组合物可以完全不含Y。必要时,可以从本发明的定义中省略“基本上”一词。

[0041] 本文说明性描述的本发明可以在缺少本文未具体公开的任何一个或多个要素、一种或多种限制的情况下适当地实施。因此,例如,术语“包括”、“包含”、“具有”等应当被广泛地理解而不受限制。另外,这里使用的术语和表达已被用作描述而非限制的术语,并且无意使用这些术语和表达来排除所示和所描述的特征的任何等同物或其部分,但应认识到在所要求保护的本发明的范围内可以进行各种修改。因此,应该理解,尽管已经通过优选实施例和可选特征具体公开了本发明,但是本领域技术人员可以采用本文公开的体现在本发明中的修改和变化,并且这些修改和变化是被认为是在本发明的范围内。

[0042] 本文已广泛和一般地描述了本发明。落入通用公开内容中的每个较窄物种和亚属群组中的每个也构成本公开的一部分。这包括具有从该类中去除任何主题的附带条件或否定限制的实施方案的一般描述,无论本文是否具体列举了切除的材料。

[0043] 其他实施方案在所附权利要求和非限制性实施例内。另外,在根据马库什群组描述本发明的特征或方面的情况下,本领域技术人员将认识到,本发明也因此以马库什群组的任何单个成员或成员子群的形式描述。

附图说明

[0044] 当结合非限制性实施例和附图考虑时,参考详细描述将更好地理解本发明,其中,

[0045] 图1:抗体重链和轻链序列和mAb(单克隆抗体)C51的同种型。(A)核酸序列mAb C51。(B)mAb C51的氨基酸序列。(C)使用IsoStrip小鼠单克隆抗体同种型试剂盒(Roche)从表达mAb C51的小鼠杂交瘤培养物的上清液中鉴定的mAb C51的同种型。抗体互补决定区域加下划线。

[0046] 图2:mAb C51对各种类型的癌症和正常细胞系的反应性。(A)C51与各种癌细胞系结合的热图。通过流式细胞术基于mAb C51与各种细胞群结合的百分比,将反应性评定为0-4。(B)根据基于上皮-间质转化(EMT)的分类,C51与卵巢癌和乳腺癌细胞系结合的表。

[0047] 图3:ANXA2作为mAb C51的抗原靶标的验证。(A)使用蛋白质印迹分析交叉探测mAb C51和市售的 α -ANXA2 mAb的免疫沉淀(IP)。类似的抗原带出现在39kDa附近。(B)ANXA2 siRNA用于敲低IGROV1细胞中的ANXA2。进行蛋白质印迹分析以评估mAb C51与ANXA2敲低的细胞裂解物结合的丧失。

[0048] 图4:mAb C51与N-聚糖表位的结合。(A)用PNGase-F处理MCF7细胞的膜部分显示C51与39-kDa条带抗原条带结合的丧失。(B)当用衣霉素处理细胞并裂解时,蛋白质印迹分析显示C51的靶抗原丢失。

[0049] 图5:通过肿瘤病(oncosis)引起的mAb C51的直接细胞毒性。当在mAb C51(10ug/ml)存在下悬浮时,一系列肿瘤细胞系增加碘化丙啶的摄取。

[0050] 图6:通过mAb C51靶向递送的毒性有效负载。评估了mAb C51将核糖体失活蛋白质——皂草素递送到各种癌细胞系中的能力。在与皂草素连接的抗小鼠IgG预孵育的mAb C51存在下培养各种细胞系72小时,并通过CellTiter-Glo[®] 试验(Promega)评估。与阴性细胞系IOSE523和BT549相比,在对C51抗原靶标呈阳性的IGROV1、OVCAR3、SKOV3(D10)和MCF7中观察到显著的抗增殖作用。

[0051] 图7:mAb C51的补体依赖性细胞毒性(CDC)。观察到mAb C51以剂量依赖性方式诱导CDC的能力,具有高达30%的裂解。在正常人血清存在下,将IGROV1细胞与递增浓度的mAb

C51一起孵育2小时。使用CytoTox96®测定(Promega)通过LDH释放评估细胞毒性。

[0052] 图8:通过mAb chC51靶向递送的毒性有效负载。评估了mAb chC51将核糖体失活蛋白质——皂草素递送到各种癌细胞系中的能力。在与皂草素连接的抗小鼠IgG预孵育的mAb chC51存在下培养各种细胞系72小时,并通过CellTiter-Glo®试验(Promega)评估。在IGROV1、SKOV3-LUC-D3、MCF7和HCC1937细胞系中观察到显著的抗增殖作用。

[0053] 图9:C51和chC51的ADCC活性。当与MCF7乳腺癌细胞一起培养时,chC51而不是C51表现出ADCC活性。使用ADCC报道基因生物活性检测(Promega)在NFAT ADCC通路的倍数诱导下在6小时内测量ADCC活性。

[0054] 图10:抗体重链和轻链序列和mAb 2448的同种型。(A)核酸序列mAb 2448。(B)mAb 2448的氨基酸序列。抗体互补性-确定区域加下划线。(C)使用IsoStrip小鼠单克隆抗体同种型试剂盒(Roche)从表达mAb 2448的小鼠杂交瘤培养物的上清液中鉴定的mAb 2448的同种型。

[0055] 图11:mAb 2448对各种类型的癌症和正常细胞系的反应性。(A)mAb2448与各种癌细胞系结合的热图。通过流式细胞术基于mAb 2448与各种细胞群结合的百分比,将反应性分级为0-4。(B)根据基于上皮-间质转化(EMT)的分类,mAb 2448与卵巢癌和乳腺癌细胞系结合的表。(C)同基因乳腺癌细胞系MCF7-D10和MCF7-2101分别显示EMT的上皮表型和间充质表型。显著更高水平的上皮标志物E-钙粘着蛋白和更低水平的间充质标志物波形蛋白分别在MCF7细胞和MCF72101细胞中表达。相差显微镜图像显示EMT样形态变化。与MCF7-2101细胞相比,MCF7-D10细胞更具上皮性,具有立方形或“鹅卵石样”细胞,MCF7-2101细胞是更加分离且延长的。通过免疫细胞化学在MCF7-D10细胞上观察到2448的膜结合,但在同基因MCF7-2101细胞上未观察到该膜结合。通过流式细胞术显示mAb 2448在活MCF7-D10细胞上的结合(阴影直方图),但不在MCF7-2101细胞上。

[0056] 图12:ANXA2作为mAb 2448的抗原靶标的验证。(A)使用蛋白质印迹分析鉴定使用mAb 2448偶联的蛋白G珠粒从细胞裂解物(MF)的膜级分免疫沉淀。(B)切下银染凝胶上的相应条带(↑)并使用液相色谱串联质谱(LC/MS-MS)鉴定。在使用MS数据进行蛋白质数据库搜索后,确定了ANXA2的潜在靶标。(C)跨越ANXA2的肽序列(SEQ ID NO:30)的多轮质谱法的肽匹配(加框)。

[0057] 图13:2448的抗原靶标鉴定。(A)使用mAb 2448偶联的蛋白G珠粒从人胚胎干细胞和T47D乳腺癌细胞系的膜级分免疫沉淀的抗原的蛋白质印迹分析。(B)切下银染凝胶上的相应条带,并使用质谱分析鉴定为ANXA2。

[0058] 图14:ANXA2作为2448的抗原靶标的验证。(A)使用蛋白质印迹分析交叉探测市售的 α -膜联蛋白2(ANXA2)mAb和mAb 2448的免疫沉淀(IP)。类似的抗原带出现在39kDa附近。(B)ANXA2 siRNA用于敲低IGROV1细胞中的ANXA2。进行蛋白质印迹分析以评估mAb 2448与ANXA2敲低的细胞裂解物结合的丧失。

[0059] 图15:2448与细胞表面的结合。通过流式细胞术,mAb 2448结合在活IGROV1细胞的细胞表面上。市售的 α -ANXA2抗体,例如文献中报道的那些,不能与活细胞结合。实线是阴性对照;虚线是mAb 2448。

[0060] 图16:mAb 2448与N-聚糖表位的结合。(A)mAb 2448的结合对以IGROV1裂解物跑胶(run)的蛋白质印迹膜的高碘酸盐处理敏感。(B)用PNGase-F处理细胞的膜部分显示2448-

与39-kDa条带抗原条带结合的丧失。

[0061] 图17:mAb 2448的快速细胞内化。用两种pH敏感染料(A) CypHER5E和(B) pH-RODO标记mAb 2448,其在低pH环境中荧光强度增加。如使用流式细胞术分析测量的,通过总平均荧光的增加,染料缀合的mAb 2448内化到核内体和溶酶体区室中。

[0062] 图18:mAb 2448、ch2448和ch2448ATS的ADC活性。在卵巢癌和乳腺癌细胞上评估抗体(2448和ch2448)与次级皂草素缀合物(ZAP)的复合物的细胞毒性。分别将抗体2448和ch2448与抗小鼠IgG(mAbZAP)或抗人IgG(HZAP)皂草素缀合物预混合。将癌细胞与混合物、单独的初级mAb(2448或ch2448)、单独的皂草素缀合物(mAbZAP或HZAP)或作为对照的缓冲液一起孵育。孵育72小时后,以单独用缓冲液处理的对照细胞为基准,测量活细胞的百分比。与仅用初级mAb或次级缀合物处理的那些相比,用与次级缀合物复合的mAb处理的活细胞观察到显著差异的细胞毒性。结果表示为一式三份孔中的三次独立实验的平均值±标准偏差(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; 和***, $P < 0.001$, 非配对t-检验)。在一式四份孔中测试T47D细胞一次。

[0063] 图19:ch2448-皂草素(ch2448ATS)的剂量依赖性细胞毒性。将细胞与ch2448ATS或对照(人Ig皂草素-缀合物或chTNA2ATS)一起孵育。(A)用xCELLigence系统(Roche)实时监测IGROV1和IOSE523培养物的细胞增殖。在靶IGROV1细胞上观察到细胞生长的持续抑制,但在对照IOSE2523细胞上未观察到。(B)以剂量依赖性方式观察ch2448ATS的细胞毒性。72小时后,在IGROV1和SKOV3培养物中测量半数最大抑制浓度。

[0064] 图20:ch2448的ADCC活性。ch2448表现出针对(A)卵巢癌细胞和(B)乳腺癌细胞的ADCC活性。使用ADCC报道基因生物活性检测(Promega)在NFAT ADCC通路的倍数诱导下测量ADCC活性。

[0065] 图21:ch2448在裸鼠异种移植模型中的体内活性。(A)ch2448抑制IGROV1肿瘤细胞生长。通过腹膜内注射施用ch2448(1mg)或缓冲载体对照(↓)的处理。(B)在整个治疗方案中没有观察到显著的体重减轻。所有值和条形均表示为平均值的标准误差(S.E.M.) 双侧未配对学生t检验。*、**和***表示 $p < 0.05$ 、 0.01 和 0.005 。

[0066] 图22:ch2448-F(ab')₂的体外和体内作用。(A) IdeS消化用于产生ch2448的F(ab')₂片段。通过SDS-PAGE分离消化产物并用考马斯蓝染色显现观察。(B)消化后,在体外,与ch2448相比,观察到ADCC活性的丧失。(C)在体内,F(ab')₂未显示出对肿瘤生长的任何抑制。

[0067] 图23:非岩藻糖基化的ch2448的增强的ADCC活性。(A)通过流式细胞术分析证明了非岩藻糖基化的ch2448以及ch2448的类似结合情况。(B)与野生型相比,非岩藻糖基化的ch2448表现出增强的(>10倍)ADCC活性。使用ADCC报道基因生物活性检测(Promega)在NFAT ADCC通路的倍数诱导下在6小时内测量ADCC活性。与原始ch2448相比,为了引起相同的ADCC效应,所需的非岩藻糖基化ch2448的浓度低于原始ch2448浓度的1/100。

[0068] 图24:hESC疗法中的mAb 2448。(A)mAb 2448被针对hESC产生并特异性结合hESC但不结合分化的胚状体(EB)。(B)作为裸抗体,mAb 2448能够在体内防止畸胎瘤的形成。

[0069] 图25在hESC中ch2448的内化。如在pH-Rodo测定中观察到的,ch2448内化到hESC中。(A)如在pH-Rodo测定中观察到的,ch2448内化到未分化的hESC中,但没有内化到分化的细胞,ch2448可潜在地用作ADC以特异性地消除未分化的hESC。

[0070] (B) 作为ADC, ch2448在体外杀死未分化的hESC但不杀死分化的EB。ch2448可以潜在地用作ADC, 以在再生疗法中特异性地消除未分化的hESC。(C) F(ab')₂ ch2448也可用作ADC以在体外特异性消除未分化的hESC。

[0071] 图26. ch2448预防或延迟畸胎瘤形成的能力。(A) 将人胚胎干细胞(每只动物 5×10^6 个细胞)的单细胞悬液与缓冲液(上图)或ADC(下图)在4°C下预孵育20分钟, 然后注入SCID小鼠的右后腿肌肉(n=3)。然后用先前开发的分级方法评估畸胎瘤的形成。(B) 将人胚胎干细胞(每只动物 5×10^6 个细胞)的单细胞悬浮液注射到SCID小鼠的右后腿肌肉中(n=3)。腹膜内施用缓冲液(上图)和ADC(下图)。然后用先前开发的分级方法评估畸胎瘤的形成。

[0072] 图27. CAR(2448)的结构。使用CD28共刺激结构域和IgG4 Fc区接头结构域构建CAR(2448)作为第二代CAR。将T2A元件和eGFP插入与CAR构建体相同的开放阅读框的下游。

[0073] 图28. CAR-T细胞分泌细胞因子的概述。在指出的情况下, 将T细胞与靶IGROV-1细胞以10:1的比例共孵育。将细胞于37°C、5%CO₂孵育6小时, 然后用抗细胞因子珠粒捕获。结果表明CAR(2448) T细胞暴露于表达靶膜联蛋白A2的IGROV-1细胞后, T细胞细胞因子显著增加。特别地, 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、干扰素- γ 、白细胞介素-2和肿瘤坏死因子- α 是在用靶标激活时具有最高分泌水平的细胞因子。

[0074] 图29. 通过CAR-T细胞的详细细胞因子分泌谱。在指出的情况下, 将T细胞与靶IGROV-1细胞以10:1的比例共孵育。将细胞在37°C、5%CO₂孵育6小时, 然后用抗细胞因子珠粒捕获。结果表明, 与非靶特异性CAR对照相比, 多种细胞因子(GM-CSF, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17A和TNF- α)示出细胞因子产生的显著增加。条件1: CAR(抗CD19): IGROV-1; 条件2: CAR(2448): IGROV-1; 条件3: CAR(抗CD19); 条件4: CAR(2448); 条件5: IGROV-1(所有样品n=2; n.s. -P>0.05; * -P<0.05; ** -P<0.01; *** -P<0.001)

[0075] 图30. CAR(2448)的细胞毒性。与非特异性CAR对照相比, CAR(2448)介导针对靶细胞的T细胞细胞毒性。在通过裂解细胞检测LDH之前, 在4小时测定中, 将效应IGROV-1细胞与CAR-T细胞以不同的E:T比例共孵育。结果表明, 与非靶特异性CAR构建体相比, 核转染以表达CAR(2448)构建体的T细胞能够以剂量依赖性方式介导针对靶IGROV-1细胞的细胞毒性。(所有样品n=3; * -P<0.05; ** -P<0.01)。

[0076] 图31. CAR(2448)的生长抑制。CAR(2448) T细胞介导靶细胞的生长抑制。将靶IGROV-1细胞与CAR-T细胞以不同的E:T比例共孵育, 并通过xCELLigence系统上的电阻抗监测粘附的IGROV-1细胞的细胞生长。结果表明, CAR(2448) T细胞能够以剂量依赖性、时间依赖性方式抑制靶IGROV-1细胞的生长, 最高剂量的CAR(2448) T细胞介导的生长抑制率最高。与非靶特异性CAR对照相比, CAR(2448) T细胞的所有剂量水平显示靶细胞生长的抑制。

具体实施方式

[0077] 在第一方面, 提供了抗原结合蛋白或其抗原结合片段。抗原结合蛋白或其抗原结合片段包含(i)重链可变结构域, 其包含具有氨基酸序列GYSITSGYSWH(SEQ ID NO:9)的VHCDR1; 具有氨基酸序列YIHYSGSTKYNPSLKS(SEQ ID NO:10)的VHCDR2和具有氨基酸序列GSNYGFDY(SEQ ID NO:11)的VHCDR3; 和(ii)轻链可变结构域, 其包含具有氨基酸序列KSSQSLLYSNDQKNYLA(SEQ ID NO:12)的VLCDR1、具有氨基酸序列WASIRES(SEQ ID NO:13)的

VLCDR2和具有氨基酸序列QQYYIYPLT (SEQ ID NO:14)的VLCDR3。

[0078] 抗原结合蛋白或其抗原结合片段可包含与(i)和(ii)的重链CDR区和轻链CDR区具有约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的同一性的重链CDR区和轻链CDR区。

[0079] 在一个实施方案中,重链可变区包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。可选择的,重链可变区可包含与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列具有约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的同一性的氨基酸序列。

[0080] 在一个实施方案中,轻链可变区可包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。可选择的,轻链可变区可包含与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列具有约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的同一性的氨基酸序列。

[0081] 在另一个方面,提供了抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其包含(i)重链可变结构域,其包含具有核酸序列GCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCAC (SEQ ID NO:15)的VHCDR1;具有核酸序列ACATACACTACAGTGGTAGCTAAGTACAACCCATCTCTCAAAAGTC (SEQ ID NO:16)的VHCDR2和具有核酸序列GGAGTAACTACGGATTTGACTACT (SEQ ID NO:17)的VHCDR3;和(ii)轻链可变结构域,其包含具有核酸序列AGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAACGATCAAAAGAACTACTTGGCCT (SEQ ID NO:18)的VLCDR1、具有核酸序列GGGCATCTATTAGGGAATCTG (SEQ ID NO:19)的VLCDR2、和具有核酸序列AGCAATATTATATCTATCCTCTCACGT (SEQ ID NO:20)的VLCDR3。

[0082] 在一个实施方案中,抗原结合蛋白或其抗原结合片段可包含与(i)和(ii)的重链CDR区和轻链CDR区具有约60%、65%、70%、75%、80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的同一性的重链CDR区和轻链CDR区。

[0083] 在一个实施方案中,重链可变区可包含SEQ ID NO:3所示的核酸序列。可选择的,抗原结合蛋白或其抗原结合片段可包含重链可变区,其包含与SEQ ID NO:3所示的核酸序列具有约60%、65%、70%、75%、80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的同一性的核酸序列。

[0084] 在一个实施方案中,轻链可变区可包含SEQ ID NO:4所示的核酸序列。可选择的,抗原结合蛋白或其抗原结合片段可包含轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列具有约60%、65%、70%、75%、80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的同一性的核酸序列。

[0085] 在一个实施方案中,抗原结合蛋白或其抗原结合片段可以选自由以下组成的组:单克隆抗体、重组抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、双特异性抗体和异源偶联抗体;嵌合抗原受体(CAR)、单可变结构域、结构域抗体、抗原结合片段、免疫有效片段、单链Fv、单链抗体、缺少铰链区的单价抗体、微抗体、双抗体和Tandabs™。

[0086] 在一个实施方案中,结合蛋白可以是单克隆抗体。单克隆抗体可以是2448。在一个实施方案中,单克隆抗体可以是人源化的。可选择的,单克隆抗体可以是嵌合的。

[0087] 单克隆抗体可以是去岩藻糖基化的。相对于野生型抗体,岩藻糖基化程度可以小于10%、小于5%或小于1.5%。

[0088] 另一方面,提供了抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其包含(i)重链可变结构域,其包含具有氨基酸序列VYSITSGYSWH (SEQ ID NO:21)的VHCDR1;具有氨基酸序列YIHYSGSTKYNPSLKS (SEQ ID NO:10)的VHCDR2和具有氨基酸序列GTDNAVY (SEQ ID NO:22)

的VHCDR3;和(ii)轻链可变结构域,其包含具有氨基酸序列KSSQSLLYSSNQKNYLA (SEQ ID NO:23)的VLCDR1、具有氨基酸序列WASSRES (SEQ ID NO:24)的VLCDR2和具有氨基酸序列QQYYIYPLT (SEQ ID NO:14)的VLCDR3。

[0089] 在一个实施方案中,抗原结合蛋白或其抗原结合片段可包含与(i)和(ii)的重链CDR区和轻链CDR区具有约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的同一性的重链CDR区和轻链CDR区。

[0090] 在一个实施方案中,重链可变区可包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。可选择的,重链可变区可包含与SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列具有约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的同一性的氨基酸序列。

[0091] 在一个实施方案中,轻链可变区可包含SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。可选择的,抗原结合蛋白或其抗原结合片段可包含轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:6所述的氨基酸序列具有约80%、约85%、约90%、约95%、96%、约80%、约97%、约98%或约99%的同一性的氨基酸序列。

[0092] 在另一个方面,提供了抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其包含(i)重链可变结构域,其包含具有核酸序列TCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACT (SEQ ID NO:25)的VHCDR1;具有核酸序列ACATACACTACAGTGGTAGTACTAAGTACAACCCATCTCTCAAAAGTC (SEQ ID NO:26)的VHCDR2和具有核酸序列GGACCGACAATGCTGTGGACTACT (SEQ ID NO:27)的VHCDR3;和(ii)轻链可变结构域,其包含具有核酸序列AGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAGCAATCAAAAGAACTACTTGGCCT (SEQ ID NO:28)的VLCDR1、具有核酸序列GGGCATCCAGTAGGGAATCTG (SEQ ID NO:29)的VLCDR2,和具有核酸序列AGCAATATTATATCTATCCTCTCACGT (SEQ ID NO:20)的VLCDR3。

[0093] 抗原结合蛋白或其抗原结合片段可包含与(i)和(ii)的重链CDR区和轻链CDR区具有约60%、65%、70%、75%、80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的同一性的重链CDR区和轻链CDR区。

[0094] 重链可变区可包含SEQ ID NO:7中所述的核酸序列。重链可变区可包含与SEQ ID NO:7所述的核酸序列具有约60%、65%、70%、75%、80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的同一性的核酸序列。

[0095] 轻链可变区可包含SEQ ID NO:8所示的核酸序列。抗原结合蛋白或其抗原结合片段可包含轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列具有约60%、65%、70%、75%、80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的同一性的核酸序列。

[0096] 在一个实施方案中,抗原结合蛋白可选自由以下组成的组:单克隆抗体、重组抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、双特异性抗体和异源偶联抗体;嵌合抗原受体(CAR)、单可变结构域、结构域抗体、抗原结合片段、免疫有效片段、单链Fv、单链抗体、缺少铰链区的单价抗体、微抗体、双抗体和Tandabs™。

[0097] 在一个实施方案中,结合蛋白可以是单克隆抗体。单克隆抗体可以是C51。单克隆抗体可以是人源化的。可选择的,单克隆抗体可以是嵌合的。

[0098] 在一个实施方案中,如本文所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段可以结合ANXA2。在一个实施方案中,如本文所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段可以结合ANXA2上的聚糖。如本文所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段可以结合ANXA2上的N-连接聚糖。

N-连接聚糖可位于ANXA2的氨基酸残基62。

[0099] 在另一个实施方案中,如本文所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段可包含与其缀合的放射性同位素或细胞毒素。抗体可以与选自由单甲基澳瑞他汀E (MMAE-1)、美登素(DM-1)和皂草素组成的组的细胞毒素缀合。

[0100] 在一个实施方案中,如本文所述的抗原结合蛋白或抗原结合片段可在与ANXA2结合后内化到细胞中。

[0101] 在一个实施方案中,如本文所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段可具有选自由补体依赖性细胞毒性(CDC)活性、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性和溶瘤活性组成的一种或多种的细胞毒性活性。

[0102] 在另一个方面,提供了组合物,其包含生理上可接受的载体和治疗有效量的如本文所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段。

[0103] 在一个实施方案中,组合物可包含选自由贝伐单抗、卡铂、紫杉醇或吉非替尼组成的组的另外的活性药物成分。

[0104] 当然,如本文所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段在药物组合物和制剂中的百分比可以变化,并且例如可以方便地在剂量单位重量的约2%至约90%、约5%至约80%、约10%至约75%、约15%至约65%;约20%至约60%、约25%至约50%、约30%至约45%、或约35%至约45%的范围变化。治疗上有用的组合物中化合物的量使得可以获得合适的剂量。

[0105] 术语“生理上可接受的载体”旨在包括溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等等。这些介质和试剂用于药物活性物质的用途是本领域熟知的。除非任何常规介质或试剂与化合物不相容,否则考虑将其用于治疗组合物和治疗和预防方法中。补充的活性化合物也可以掺入本发明的组合物中。以剂量单位形式配制肠胃外组合物以便于给药和剂量均匀是特别有利的。如本文所用的“剂量单位形式”是指适合作为针对待治疗个体的单位剂量的物理上离散的单位;计算含有预定量的一种或多种化合物的每个单位以产生与所需药物载体相关的所需治疗效果。可以配制有效量的化合物和合适的药学上可接受的载体,以可接受的剂量单位,方便有效地给药。在含有补充活性成分的组合物的情况下,剂量通过参考所述成分的常用剂量和给药方式来确定。

[0106] 组合物可以通过注射(例如皮下、静脉内等)方便地给药。该组合物还可以肠胃外或腹膜内给药。在一个实施方案中,化合物可以通过注射给药。在可注射溶液的情况下,载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物和植物油。适当的流动性可以通过例如使用诸如卵磷脂的涂层(通过在分散的情况下保持所需的粒度)和使用表面活性剂来保持。通过包括各种抗细菌剂和/或抗真菌剂可以实现防止微生物的作用。合适的试剂是本领域技术人员公知的,包括例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、苯甲醇、抗坏血酸、硫柳汞等等。在许多情况下,可优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(如甘露醇、山梨糖醇)和氯化钠。通过在组合物中包括延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)可以实现可注射组合物的延长吸收。

[0107] 无菌可注射溶液可以通过将所需量的类似物与上面列举的成分中的一种或组合(根据需要)掺入适当的溶剂中,然后过滤灭菌来制备。通常,通过将类似物掺入无菌载体中来制备分散体,所述无菌载体含有基础分散介质和所需的上面列举的那些其他成分。

[0108] 在通常的储存和使用条件下,药物制剂可含有防腐剂以防止微生物的生长。优选

地,药物组合物可以进一步包括合适的缓冲液以使酸水解最小化。合适的缓冲液试剂是本领域技术人员公知的,包括但不限于磷酸盐、柠檬酸盐、碳酸盐及其混合物。

[0109] 可以单次或多次施用根据本发明的药物组合物。通过常规实验,本领域技术人员能够确定本发明化合物和/或组合物的有效、无毒剂量水平和适合于治疗所述疾病和/或感染的可应用该化合物和组合物的给药模式。

[0110] 此外,对于本领域普通技术人员显而易见的是,最佳疗程可以通过使用常规疗程的治疗确定测试来确定,该最佳疗程例如,针对确定的给药天数,每天给定的本发明化合物或组合物的剂量数目。

[0111] 通常,每24小时的有效剂量可以在每kg体重约0.0001mg至约1000mg的范围内;合适地,每kg体重约0.001mg至约750mg的范围内;每kg体重约0.01mg至约500mg的范围内;每kg体重约0.1mg至约500mg的范围内;每kg体重约0.1mg至约250mg的范围内;或每kg体重约1.0mg至约250mg的范围内。更合适地,每24小时的有效剂量可以在每kg体重约1.0mg至约200mg体重的范围内;每kg体重约1.0mg至约100mg的范围内;每kg体重约1.0mg至约50mg的范围内;每kg体重约1.0mg至约25mg的范围内;每kg体重约5.0mg至约50mg的范围内;每kg体重约5.0mg至约20mg的范围内;或每kg体重约5.0mg至约15mg的范围内。

[0112] 可选择的,有效剂量可高达约500mg/m²。例如,通常,预期有效剂量为在约25至约500mg/m²的范围中、约25至约350mg/m²的范围中、约25至约300mg/m²的范围中、约25至约250mg/m²的范围中、约50至约250mg/m²的范围中、约75至约150mg/m²的范围内。

[0113] 在另一个方面,提供了如本文所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段在制备用于治疗或预防癌症的药物中的用途。

[0114] 在一个实施方案中,癌症可选自由乳腺癌、肝癌、肾癌、结直肠癌、卵巢癌和畸胎瘤组成的组。

[0115] 在一些实施方案中,药物可以与进一步的活性药物成分一起施用。或者,药物可以与化学疗法一起施用。进一步的药剂或化学疗法可以被分开、同时或依次施用。

[0116] 在另一个方面,提供了用于检测受试者中的癌症的方法,该方法包括:使得自受试者的样品与本文所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段在体外接触;检测所述样品中抗原结合蛋白或其抗原结合片段的结合;将所述结合与对照样品中的结合水平相关联以确定所述样品中的结合水平,其中,相对于所述对照样品,在所述样品中的结合水平上的增加指示癌症。

[0117] 在另一个方面,提供了用于鉴定易患癌症的受试者的方法,该方法包括:使得自受试者的样品与本文所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段在体外接触;检测所述样品中抗原结合蛋白或其抗原结合片段的结合;将所述结合与对照样品中的结合水平相关联以确定所述样品中的结合水平,其中,相对于所述对照样品,在所述样品中的结合水平上的增加表明所述受试者易患癌症。

[0118] 在一个实施方案中,对照样品可以来自相同的受试者。可选择的,对照样品可以来自不同的受试者。

[0119] 在一个实施方案中,如本文所述的抗原结合蛋白或其抗原结合片段可包含可检测标记物。可检测标记物可选自由荧光标记、化学发光标记、酶标记和放射性核素标记组成的组。在一个实施方案中,可检测标记物选自由生物素、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、FITC、

PE和Cy染料组成的组。可以在选自流式细胞术、组织切片、免疫荧光、免疫细胞化学或免疫组织化学的测定中检测可检测标记物。

[0120] 在一方面,提供了试剂盒,当用于如在本文中定义的方法中时,其包含如在本文中定义的抗原结合蛋白或其抗原结合片段,连同使用说明书。

[0121] 实施例

[0122] 通过参考具体实施例将更详细地进一步描述本发明的非限制性实施例,包括最佳模式和比较实施例,这些实施例不应被解释为以任何方式限制本发明的范围。

[0123] 材料和方法

[0124] 抗体产生和纯化

[0125] 使用Choo等人(Choo AB, Tan HL, Ang SN, Fong WJ, Chin A, Lo J, et al. Selection against undifferentiated human embryonic stem cells by a cytotoxic antibody recognizing podocalyxin-like protein-1. Stem Cells Dayt Ohio. 2008; 26:1454-63)报道的小鼠杂交瘤技术,通过人胚胎干细胞(HES-3)的全细胞免疫产生单克隆抗体2448和C51。将杂交瘤保持在37°C的、具有5%CO₂的潮湿培养箱中的ClonaCell™-HY培养基E(Stem Cells Technologies)中。嵌合(包括非岩藻糖基化)抗体在DG44-CHO细胞中表达并保持在BTI专有的无血清培养基中。嵌合化由生物加工技术研究所的动物细胞技术小组完成(Ho SCL, Bardor M, Feng H, Mariati null, Tong YW, Song Z等, 用于增强表达高单克隆抗体的CHO细胞系的产生的IRES介导的三顺反子(Tricistronic)载体, J Biotechnol. 2012; 157:130-9)。

[0126] 使用ÄKTA Explorer 100 (GE Healthcare) 系统进行纯化。将培养的上清液进行蛋白A层析(Tosoh; Toyopearl AF-rProtein A-650F)和离子交换层析(Biorad; UNOsphere™ Q)。使用高效液相色谱系统(Shimadzu)在Superdex 200 PC 3.2/30柱(GE Healthcare)上评估纯化的产物。另外通过SDS-PAGE分析抗体,并且使用Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific)通过A280处的吸光度测定蛋白质浓度。对于体内研究,使用Endosafe®内毒素检测系统(Charles River)测量内毒素以确保水平低于0.1EU/mL。

[0127] 流式细胞术和分析

[0128] 使用胰蛋白酶(Thermo Fisher Scientific)以单细胞悬浮液收获细胞。将1-2×10⁵个细胞的每个样品在1%牛血清白蛋白(BSA; Sigma Aldrich)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)缓冲液(Thermo Fisher Scientific)中彻底洗涤。将样品与一抗在4°C孵育45分钟,洗涤,然后与适当的荧光团缀合的二抗(异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗人kappa轻链mAb (Sigma Aldrich)或FITC标记的山羊抗小鼠Ig多克隆(Dako))在4°C孵育15分钟。孵育后,洗涤细胞并通过BD FACSCalibur™(BD Biosciences)或Guava®easyCyte (Millipore)进行样品数据采集。使用FlowJo™软件7.6.3版(Tree Star)进行数据分析。使用基于阴性对照的第97-98百分位数的M-门控组确定结合的百分比。

[0129] 免疫细胞化学

[0130] 用4%多聚甲醛固定细胞培养物20分钟。对于透化细胞,加入0.1% Triton X-100/PBS (Bio-Rad) 3×5分钟,最后在室温用10%山羊血清/PBS (DAKO) 封闭1小时。将细胞在4°C与缀合有DyLight™ 488NHS酯(Thermo Fisher Scientific)的2448一起孵育。用DAPI (1:1000, Thermo Fisher Scientific)对DNA进行复染色。使用Zeiss Axiovert 200倒置显微

镜拍摄图像。

[0131] 凝胶电泳和蛋白质印迹分析

[0132] 通过手动刮擦收获细胞,并根据需要,依照制造商的说明,通过膜蛋白提取试剂盒 (BioVision) 富集膜蛋白。简言之,将细胞重新悬浮在匀浆缓冲液中,并在4℃以700g离心10分钟。然后吸出上清液并在4℃以10,000g离心30分钟。收集总膜蛋白的细胞沉淀并裂解。用于裂解的缓冲液含有PBS中的2% Triton X-100 (BioVision),其根据需要补充有蛋白酶抑制剂 (Calbiochem)。使用DC™蛋白质测定法 (BioVision) 测定总蛋白质浓度。

[0133] 对于凝胶电泳,用最终浓度为50mM氨丁三醇 (Tris-HCl)、2% SDS、10% 甘油、0.02% 溴酚蓝的上样染料制备样品,并且对于还原条件,使用2-5%的β-巯基乙醇。将样品与SeeBlue Plus2®或Page2™蛋白质标准品 (Thermo Fisher Scientific) 一起进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),使用4-12%的Bis-Tris梯度凝胶 (Thermo Fisher Scientific) 和1X MOPS缓冲液 (Thermo Fisher Scientific)。如果需要,使用考马斯亮蓝 (Coomassie Brilliant Blue) 或SilverQuest™银染试剂盒 (Silver Staining Kit) 对凝胶进行染色。

[0134] 对于蛋白质印迹,将来自跑胶的产物转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (Bio-Rad) 并用5%脱脂乳或Odyssey®阻断缓冲液 (LI-COR) 封闭1小时。与初级mAb (小鼠抗膜联蛋白A2 mAb (BD Biosciences); 小鼠抗膜联蛋白A2 mAb (Invitrogen); 兔抗膜联蛋白A2 pAb (Santa Cruz); 小鼠抗E-钙粘蛋白mAb (BD Biosciences); 小鼠单克隆抗波形蛋白 (Dako); 小鼠抗人Fc特异性抗体 (Sigma)) 或生物素化凝集素 (Aleuria Aurantia Lectin (Vector Labs)) 在4℃一起孵育过夜。将印迹与适当的检测抗体 (辣根过氧化物酶 (HRP) -缀合的山羊抗小鼠IgG pAb, Dako) 或与辣根过氧化物酶 (Dako) 缀合的链霉抗生物素蛋白一起孵育1-2小时,并在加入化学发光底物 (GE healthcare) 后即时观察。在Medical X-ray Processor 2000 (Kodak) 或ChemiDoc™成像系统 (Bio-Rad) 上捕获图像。使用Image Lab™5.2软件 (BioRad) 进行光密度测定,并归一化至β-肌动蛋白表达水平 (Cell Signaling Technology)。

[0135] 膜联蛋白A2 (ANXA2) 的瞬时敲低

[0136] 将IGROV1细胞以 3×10^5 个细胞接种在6孔板上或以 1×10^6 个细胞接种在T175烧瓶中,并生长至30-50%汇合。使用Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) 在无血清培养基中以30pM的浓度分别转染经验证的一组人膜联蛋白A2特异性siRNA (Thermo Fisher Scientific) 和对照的scramble siRNA (Thermo Fisher Scientific)。在37℃孵育5小时后,除去转染培养基并用含有10%血清的新鲜培养基替换。在72小时内收获细胞用于蛋白质印迹分析。使用ImageJ软件 (National Institutes of Health) 进行密度测定,并使用β-肌动蛋白 (Cell Signaling Technology) 表达水平进行标准化。

[0137] 高碘酸盐处理

[0138] 通过SDS-PAGE分离来自IGROV1细胞的裂解物并转移至PVDF膜 (Bio-Rad)。随后,用乙酸钠缓冲液 (100mM, pH4.5; Merck Millipore) 洗涤印迹两次,并用偏高碘酸钠 (100mM, Sigma-Aldrich) 在黑暗中孵育30分钟。随后用乙酸钠缓冲液洗涤印迹四次,再使用PBS洗涤,并用0.5M硼氢化钠 (Sigma) 淬灭30分钟。在与一抗孵育之前,用Odyssey®封闭缓冲液 (LI-COR) 封闭印迹30分钟。类似地,对照印迹与缓冲液一起孵育,但不添加偏高碘酸钠。使

用一抗2448、C51和抗 β -肌动蛋白作为阴性对照分析样品。

[0139] 通过PNGase-F和 β -消除释放聚糖

[0140] 对于PNGase-F处理,首先使用1 μ l 10X糖蛋白变性缓冲液(5%SDS,不含DTT)和水使富含膜蛋白的裂解物(10 μ g)变性,以构成10 μ l的反应体积。将糖蛋白加热至100 $^{\circ}$ C持续5分钟。通过加入2 μ l 10 \times G7反应缓冲液、2 μ l 10%的NP40和1 μ l PNGase F以及5 μ l水,用变性糖蛋白制备总反应体积20 μ l。将样品在反应缓冲液中于37 $^{\circ}$ C孵育1小时。孵育后,对样品进行SDS-PAGE和蛋白质印迹分析。对于碱性 β -消除处理,将蛋白质印迹在0.1M氢氧化钠溶液中于60 $^{\circ}$ C孵育过夜。第二天将印迹进行蛋白质印迹分析。

[0141] 通过衣霉素抑制糖基化

[0142] 使用衣霉素,一种靶向G1cNAc转移酶的核苷抗生素,在细胞培养物中进行糖基化的抑制。在高浓度,衣霉素可诱导癌细胞凋亡,但在较低浓度,它可用于抑制(真核)细胞中N-聚糖的合成(127-129)。用衣霉素(Sigma-Aldrich)以0.25 μ g/mL的最终浓度处理60-70%汇合的IGROV1细胞。孵育24小时后,收获细胞并通过流式细胞术和蛋白质印迹分析进行分析。

[0143] 竞争性抑制测定

[0144] 将IGROV1细胞在饱和浓度的单独添加单一抗体(2448或ch2448)、同时添加两种抗体以及添加一种mAb后再添加另一种mAb下孵育。孵育在4 $^{\circ}$ C各进行至少15分钟,并在1%BSA/PBS中洗涤。使用荧光团缀合的二抗(Alexa fluor 647-缀合的抗人pAb(Thermo Fisher Scientific)和Alexa Fluor 488-缀合的抗小鼠pAb(Thermo Fisher Scientific))进行二次孵育。在BD FACSCaliburTM流式细胞仪(BD Biosciences)或Guava[®]easyCyte(Millipore)上分析结合。

[0145] 2448-皂草素对细胞生长的细胞毒性的实时监测

[0146] 当使用xCelligence实时细胞分析仪(Roche)通过细胞阻抗测量以最低浓度处理的细胞随时间达到监测时,确定细胞生长是连续的细胞(130)。简而言之,首先将细胞培养基加载到96孔E板上以测量背景阻抗。IGROV1, IOSE523和S膜。

[0147] 将V3细胞以每孔1,000个细胞铺板,并使其在正常细胞培养条件下生长过夜。在细胞生长的对数期开始时用抗体(ch2448)或抗体缀合物(ch2448-皂草素或人IgG-皂草素)处理细胞。对照孔仅用缓冲液处理。所有实验均在每个处理条件下至少5个孔中进行。不使用板的最外面的孔。对于剂量反应曲线,用ch2448-皂草素的稀释液处理IGROV1。监测细胞的生长直至细胞达到死亡阶段。在抗体处理后将孔的细胞指数标准化。细胞生长的IGROV1静止期的IC₅₀值。使用随附的实时细胞分析软件(Roche)计算IC₅₀值。

[0148] 具有次级皂草素缀合物的抗体药物缀合物(ADC)测定

[0149] 如通过生长曲线所确定的,将细胞以每孔1000或2000个细胞接种在96孔培养板(Corning)中。将10 μ g/ml的一抗(2448、C51、ch2448或chC51)与适当的次级皂草素缀合物(mAb-ZAP、抗-M-ZAP、HUM-ZAP(高级靶向系统))复合,摩尔比为1:3在室温保持15分钟。在接种后24小时将预混合的复合物、初级mAb、次级缀合物和缓冲液对照加入孔中。在处理72小时,使用CellTiter-Glo[®]发光细胞活力测定试剂盒(Promega),基于ATP的存在测量有活力的(代谢活性的)细胞。数据表示为有活力的处理的细胞为仅用缓冲液处理的对照细胞的

百分比。

[0150] 用ch2448-皂草素缀合物进行抗体药物缀合物(ADC)测定

[0151] 将皂草素与抗体的直接缀合外包给Advanced Targeting Systems (ATS)。ch2448-皂草素、chTNA2-皂草素和人Ig-皂草素的药物与抗体摩尔比分别为2.5、2.9和3.1。如前所述,通过流式细胞术分析进行结合特异性的评估。

[0152] 在IGROV1、SKOV3和IOSE523细胞系上评估ch2448-皂草素的细胞毒性。在90 μ l培养基中,将细胞以每孔1000个细胞接种于96孔板(Corning)中。第二天,将ch2448-皂草素和chTNA2-皂草素连续稀释,并向孔中加入10 μ l的每种稀释液。作为对照,将游离的皂草素和ch2448加入另一单独组的板中。孵育72小时后,使用CellTiter-Glo®发光细胞活力测定试剂盒(Promega)根据制造商的说明书测量细胞活力。数据表示为%对照,测量经处理细胞的活力相对于未处理细胞的活力。使用GraphPad Prism 6(GraphPad)计算剂量响应曲线和IC₅₀值。

[0153] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)测定

[0154] 根据制造商的文件,使用ADCC Reporter Bioassay报告基因生物测定法(Promega)测量ADCC活性。简言之,在低4% IgG-血清(Promega)培养基中,将细胞以每孔5,000个细胞接种在96孔透明底黑色组织培养板(Corning)上。将一抗的连续稀释液在一式三份孔中在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂孵育约15分钟。孵育后,将工程化的效应细胞以每孔约150,000个细胞加入孔中。5至16小时后(如结果中所示),将Bio-Glo™荧光素酶测定底物(Promega)加入孔中,并使用Infinite®200酶标仪(Tecan)测量发光。使用GraphPad Prism 6(GraphPad)通过对数转换数据的线性回归计算估计的EC₅₀值。

[0155] 肿瘤异种移植小鼠模型

[0156] 在本研究中使用4-6周龄雌性BALB/c裸鼠(Invivos)。在第0天,在100 μ l细胞培养基和高浓度基质胶(BD biosciences)中以1:1稀释体积用总共 5×10^6 个IGROV1细胞接种小鼠。在接种后24小时,将抗体以100 μ l体积的在50mM HEPES、150mM NaCl缓冲液中的1mg/剂腹腔内注射。如结果中所示,每周进行后续施用,持续5周。通过数字卡尺每周测量原发肿瘤的大小。基于下式计算肿瘤体积(TV): $TV = (L \times L \times W) / 2$,其中W(宽度)和L(长度)分别是短径和长径。学生的t检验用于评估处理和未处理动物的统计显著性。为了收集肿瘤,将动物安乐死并立即收集肿瘤。用PBS洗涤样品,在液氮中快速冷冻或置于多聚甲醛(Merk)中24小时,随后用100%乙醇(Merk)代替。当肿瘤大小 $>2000\text{mm}^3$ 时或当在超过两周的时间内观察到持续的副作用(例如肿胀的淋巴结或剧烈的体重减轻)时,对小鼠实施安乐死。通过吸入CO₂然后颈椎脱臼进行安乐死。根据Biopolis IACUC规程No.:151001,依照国家实验动物研究咨询委员会(NACLAR)指南处理动物。

[0157] 生物分布研究

[0158] 用100 μ l细胞培养基和高浓度基质胶(BD biosciences)中以1:1稀释体积的总共 5×10^6 个IGROV1细胞接种雌性BALB/c裸鼠。当肿瘤达到300-400 mm^3 (第10周)时,通过每只小鼠i.p.注射100 μ g/100 μ l缓冲液(50mM HEPES、150mM NaCl),用染料缀合的ch2448和对照缀合物chTNB1。在注射后72小时和94小时,用2-3%异氟烷麻醉小鼠并使用IVIS®光谱成像系统(Caliper Life Sciences)成像。使用Living Image软件3.2(Caliper Life

Sciences) 分析数据。

[0159] 使用XenoLight CF750快速抗体标记试剂盒(Caliper Life Sciences)按照制造商的说明书,用近红外荧光(NIR)染料CF750标记抗体ch2448和IgG对照(Southern Biotech)。根据Biopolis IACUC规程No.:151001,依照国家实验动物研究咨询委员会(NACLAR)指南处理小鼠。

[0160] CAR设计和载体

[0161] CAR (2448) 由计算机设计,并由GenScript制造。CAR构建体含有GMCSFRa信号序列,2448抗体的抗膜联蛋白A2V_L和V_H结构域通过Whitlow接头、IgG4Fc接头结构域、CD28跨膜和细胞内共刺激结构域以及CD3 ζ 信号传导结构域连接。使用HindIII和EcoRI限制性位点将CAR片段合成到pcDNA3.1(+)质粒中。

[0162] mRNA产生

[0163] 根据制造商的说明书,使用HiScribe™ T7 ARCA mRNA试剂盒(带有加尾)(New England BioLabs)体外转录CAR构建体的mRNA。简而言之,利用XbaI限制性位点对CAR序列质粒进行线性化、纯化、并用ARCA加帽体外转录。在用氯化锂纯化之前,进行随后的聚(A)加尾反应。最终的mRNA构建体在无核酸酶的水中重建,并在-80℃以一次性等分试样储存。

[0164] T细胞的核转染

[0165] 使用EasySep人T细胞分离试剂盒(StemCell Technologies)从人PBMC分离T细胞。用人T-活化剂CD3/CD28免疫磁珠(Dynabeads)(Life Technologies)以1:1珠粒:细胞的比例活化T细胞。使用补充有10%胎牛血清(R10)和IL-7(20U/mL)、IL-15(10U/mL)和IL-21(0.04U/mL)的RPMI 1640作为T细胞培养基。

[0166] 在核转染之前,除去活化的免疫磁珠(Dynabeads),并将T细胞以 5×10^4 细胞/ μ L重悬于P3 Primary Cell Nucleofector™溶液(Lonza)中。在使用4D Nucleofector™装置的程序E0-115进行核转染之前,将CAR mRNA(61pg/ μ L)添加至T细胞。允许细胞在37℃、5%CO₂在R10培养基中回收,取决于下游应用添加或不添加额外的细胞因子。

[0167] 细胞毒性测定

[0168] 根据制造商的说明书,使用CytoTox96®Non-Radioactive Cytotoxicity Assay(Promega)测定CAR-T细胞的细胞毒性。简言之,将靶IGROV-1细胞(1×10^4 个细胞/孔)与效应物CAR-T细胞以不同的效应物:靶比例在37℃、5%CO₂共孵育4小时。使用试剂盒溶液检测自裂解细胞的LDH释放,并使用Infinite M200®(TECAN)读出。

[0169] 对于细胞生长测定,将靶IGROV-1细胞以每孔 1×10^4 个细胞/孔接种到E-板96(ACEA Biosciences)上。使用xCELLigence RCPA MP仪器(ACEA Biosciences)测量细胞生长。24小时后,将新鲜核转染的CAR-T细胞以1:1、2:1、4:1和8:1的效应物:靶比例加入每个孔中。继续监测细胞生长72小时。没有效应物和没有靶细胞的孔用作对照。

[0170] 细胞因子释放测定

[0171] 根据制造商的说明,在使用MACSplex Cytokine 12试剂盒(Miltenyi Biotec)检测细胞因子之前,将CAR-T细胞与靶IGROV-1细胞以10:1的比例在37℃、5%CO₂,不添加额外的细胞因子下,孵育6小时。简言之,在加入MPx细胞因子12捕获珠粒之前,将细胞上清液离心并收集。在室温孵育2小时后,将捕获珠粒洗涤两次,并加入MPx细胞因子12检测试剂以检

测结合的细胞因子。在MACSQuant Analyzer 10流式细胞仪 (Miltenyi Biotec) 上检测细胞因子之前,将珠粒在室温再孵育1小时。

[0172] 结果

[0173] 单克隆抗体 (mAb) C51的抗体 (Ab) 重链和轻链序列和同种型是IgM-kappa。

[0174] 通过逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 从杂交瘤细胞克隆mAb C51的重链和轻链基因序列,并以如下划线所示的互补决定区 (CDR) 测序 (图1A和1B)。来自杂交瘤克隆上清液的上清液的分型显示mAb C51是IgM-kappa免疫球蛋白。

[0175] mAb C51表现出对各种癌症的反应性。根据基于上皮-间质转化 (EMT) 的分类,mAb C51结合上皮表型。

[0176] 通过流式细胞术对活细胞进行mAb C51的高通量筛选 (图2A)。在乳腺癌细胞 (BT474、BT20、CAMA1、HCC1937、HCC1954、HCC2218、MS578T、MCF7、MDAMB453、SKBR3、T47D)、结直肠癌细胞 (COLO205、HT29、KM12、LS174T、SW620)、肾脏癌细胞 (7860、A498、ACHN、CAKI1、UO31、RXF393、TK10)、肝脏癌细胞 (HEP3B、HEPG2、HUH7、PLC) 和卵巢癌细胞 (CAOV3、IGROV1、OV90、OVCA432、OVCAR3、OVCAR8、OVCA433、PEA1、SKOV3) 观察到细胞表面结合。在正常细胞系 (IMR90、IOSE523、HEK293、HFF、hTERT-HME1) 上未观察到结合。结果显示mAb C51可特异性结合多种癌症。根据上皮-间质转化 (EMT) 分类,组织mAb C51与卵巢癌和乳腺癌细胞的结合 (图2B)。显示mAb C51优先结合分类为上皮 (E) 和中间型上皮 (IE) 表型的细胞。结果显示mAb C51可潜在地用于监测EMT。

[0177] 膜联蛋白A2是mAb C51的抗原靶标。

[0178] 为了验证ANXA2作为mAb C51的抗原靶标,使用市售抗ANXA2 mAb进行正向和反向免疫沉淀 (IP)。针对mAb C51和市售抗体对IP产物进行免疫印迹 (图3A)。mAb C51识别两种IP产物的相似抗原带。还进行了ANXA2的瞬时siRNA敲低研究 (图3B)。ANXA2的部分敲低对应于mAb C51对抗原识别的丧失。总之,结果证明膜联蛋白A2是mAb C51的抗原靶标。

[0179] mAb C51靶向N-聚糖表位。

[0180] 当除去N-连接的聚糖时,消除了C51的结合。这通过用PNGase F处理酶促消化蛋白质 (图4A) 和用衣霉素抑制细胞中的N-连接糖基化 (图4B) 来证明。这些结果证明C51与ANXA2上的N-聚糖表位结合。

[0181] mAb C51通过肿瘤病诱导细胞死亡。

[0182] 与C51一起孵育的卵巢癌和乳腺癌细胞具有显著且快速的PI摄取增加,表明膜完整性丧失 (图5)。在IGROV1、MCF7、SKOV3和T47D细胞上观察到相对活力的丧失。在只有培养基的对照中观察到最小的细胞毒性。结果表明经由肿瘤病的细胞死亡。

[0183] 作为抗体-药物缀合物 (ADC) 的mAb C51杀死癌细胞。

[0184] 将卵巢癌和乳腺癌细胞在培养中与mAb C51和缀合至皂草素 (MZAP) 的二抗一起孵育。孵育72小时后,通过处理组中活细胞相对于缓冲液处理的对照的百分比来测量相对细胞活力 (图6)。与缓冲液对照、单独的mAb C51或单独的皂草素二抗Ab相比,在IGROV1和MCF7细胞系上均显示出mAb C51和次级mAb的高达50%的细胞毒性。未观察到非结合对照细胞系IOSE523和BT549的细胞毒性。总体而言,mAb C51递送皂草素并诱导有效的细胞毒性。结果证明了mAb C51作为抗体-药物缀合物 (ADC) 的用途。

[0185] mAb C51诱导补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0186] mAb C51在人补体存在下显示出可检测水平的细胞裂解(图7)。在C51的高结合饱和浓度下观察到高达30%的裂解。为了对照,将细胞与mAb和热灭活的补体一起孵育。结果显示mAb C51可用于诱导靶癌细胞上的CDC活性。

[0187] 作为抗体-药物缀合物(ADC)的嵌合mAb chC51杀死癌细胞。

[0188] 将卵巢癌和乳腺癌细胞在培养中与嵌合C51mAb(chC51)和与皂草素(HZAP)缀合的次级抗人抗体一起孵育。孵育72小时后,通过处理组中活细胞相对于缓冲液处理的对照的百分比来测量相对细胞存活率(图8)。总体而言,嵌合mAb chC51递送皂草素并诱导有效的细胞毒性。结果证明,与小鼠C51IgM抗体相当,嵌合mAb chC51作为抗体-药物缀合物(ADC)的用途。

[0189] mAb chC51诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

[0190] 嵌合mAb chC51诱导针对MCF7乳腺癌细胞的ADCC(图9)。阳性ADCC活性对应于chC51在细胞上的结合,这在非结合癌细胞系上未观察到。

[0191] mAb 2448的Ab重链和轻链序列以及同种型是IgG1-kappa。

[0192] 通过逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)从杂交瘤细胞克隆mAb 2448的重链和轻链基因序列,并以如下划线所示的互补决定区(CDR)测序(图10A和B)。来自杂交瘤克隆上清液的上清液的分型显示mAb 2448是IgG1-kappa免疫球蛋白(图10C)。

[0193] mAb 2448表现出对各种癌症的反应性。根据基于上皮-间质转化(EMT)的分类,mAb 2448结合上皮表型。

[0194] 通过流式细胞术对活细胞进行mAb 2448的高通量筛选(图11A)。在乳腺癌细胞(BT474、BT20、CAMA1、HCC1937、HCC1954、HCC2218、MS578T、MCF7、MDAMB453、SKBR3、T47D)、结肠癌细胞(COLO205、HT29、KM12、LS174T、SW620)、肾脏癌细胞(7860、A498、ACHN、CAKI1、UO31、RXF393、TK10)、肝脏癌细胞(HEP3B、HEPG2、HUH7、PLC)和卵巢癌细胞(CAOV3、CH1、IGROV1、OV17R、OV90、OVCA432、OVCA433、PEA1、SKOV3)观察到细胞表面结合。在正常细胞系(IOSE523、HEK293、HFF)上观察到最小结合。结果显示mAb 2448可特异性结合多种癌症。根据上皮-间质转化(EMT)分类重新组织mAb 2448与卵巢癌和乳腺癌细胞的结合(图11B)。显示mAb 2448优先结合分类为上皮(E)和中间型上皮(IE)表型的细胞。结果显示mAb2448可潜在地用于监测EMT。同基因乳腺癌细胞系MCF7-D10和MCF7-2101分别显示EMT的上皮表型和间充质表型。显著更高水平的上皮标志物E-钙粘着蛋白和更低水平的间充质标志物波形蛋白分别在MCF7细胞和MCF72101细胞中表达。在MCF-D10和MCF7-2101同基因细胞系上的2448的显微镜图像(图11C)。相差图像显示EMT样形态变化。与MCF7-2101细胞相比,MCF7-D10细胞更具上皮性,具有立方形或“鹅卵石样”细胞,MCF7-2101细胞是更加分离且延长的。通过免疫细胞化学在MCF7-D10细胞上观察到2448的膜结合,但在同基因MCF7-2101细胞上未观察到膜结合。mAb 2448结合活MCF7-D10细胞,但不结合MCF7-2101细胞。

[0195] 膜联蛋白A2被鉴定为卵巢癌细胞系中mAb 2448的抗原靶标。

[0196] 对IGROV1卵巢癌细胞进行免疫沉淀(IP)以富集mAb 2448的抗原。用2448对IP产物进行免疫印迹(图12A)。切下银染凝胶上的相应条带并通过液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)分析。结果证明膜联蛋白A2作为mAb 2448的抗原靶标(图12B)。在多轮IP和LC-MS/MS后,肽覆盖跨越ANXA2的整个氨基酸序列。

[0197] 膜联蛋白A2被鉴定为hESC和乳腺癌细胞系中mAb 2448的抗原靶标。

[0198] 对hESC和T47D乳腺癌细胞进行免疫沉淀(IP)以富集mAb 2448的抗原。用mAb 2448对IP产物进行免疫印迹(图13A)。切下银染凝胶上的相应条带,并通过液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)分析。膜联蛋白A2被鉴定为顶级蛋白质命中(图13B)。结果证明膜联蛋白A2作为mAb 2448的抗原靶标。

[0199] 膜联蛋白A2被验证为人胚胎干细胞(hESC)和乳腺癌细胞系中mAb 2448的抗原靶标。

[0200] 为了验证ANXA2作为mAb 2448的抗原靶标,使用市售抗ANXA2 mAb进行正向和反向免疫沉淀(IP)。针对mAb 2448和市售抗体对IP产物进行免疫印迹(图14A)。mAb 2448识别两种IP产物的相似抗原带。还进行了ANXA2的瞬时siRNA敲低研究(图14B)。ANXA2的部分敲低对应于mAb 2448对抗原识别的丧失。总之,结果证明膜联蛋白A2作为mAb 2448的抗原靶标。

[0201] 仅mAb 2448结合细胞表面膜联蛋白A2。

[0202] 评估mAb 2448对癌细胞的结合。与市售抗ANXA2抗体不同,证实了针对mAb 2448的强细胞表面结合(图15)。市售抗体仅在细胞固定和透化后才显示出结合。结果表明,与其他抗ANXA2 mAb不同,mAb 2448与癌细胞上的独特表面表位结合。

[0203] mAb 2448靶向N-聚糖表位。

[0204] 在高碘酸盐处理(图16A)和PNGase F酶促释放(图16B)后,mAb 2448结合丧失。结合丧失证明mAb 2448与ANXA2上的N-聚糖依赖性表位结合。

[0205] mAb 2448内化到癌细胞中。

[0206] 将mAb 2448与CypHER5E(图17A)和pHRodo染料(图17B)缀合。结果证明了mAb 2448有效内化到靶癌细胞中的能力。

[0207] 作为抗体药物缀合物(ADC)的mAb 2448和嵌合mAb ch2448杀死靶癌细胞。

[0208] 为了证明2448或ch2448为潜在的ADC,用衍生自植物的毒素皂草素的次级缀合物评估mAb。将卵巢癌细胞和乳腺癌细胞与初级mAb(2448或ch2448)、次级皂草素缀合物(mAb-ZAP或HUM-ZAP)或初级mAb和次级缀合物的复合物一起孵育(图18)。

[0209] 初级mAb和次级缀合物的复合物将皂草素递送到细胞中并诱导细胞毒性。总体而言,结果表明2448和ch2448都是针对用作ADC的开发的可行的靶向剂。

[0210] 嵌合mAb ch2448作为抗体-药物缀合物(ADC),以剂量依赖性方式杀死靶癌细胞。

[0211] 将嵌合mAb 2448与衍生自植物的毒素(皂草素)缀合以产生抗体药物缀合物(ADC)。作为ADC,ch2448杀死IGROV1靶卵巢癌细胞,但不杀死IOSE523正常卵巢细胞(图19A)。在IGROV1和SKOV3卵巢癌细胞系上观察到剂量依赖性细胞毒性(图19B)。结果表明嵌合mAb ch2448可用作具有强效细胞毒性的ADC。

[0212] 嵌合mAb ch2448诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

[0213] 将嵌合mAb ch2448与靶癌细胞系和效应细胞共孵育。通过荧光素酶读数测量ADCC NFAT通路的剂量依赖性激活。嵌合mAb ch2448可用于激活针对卵巢癌细胞(图20A)和乳腺癌细胞(图20B)的ADCC活性。

[0214] 嵌合mAb 2448延迟体内肿瘤生长。

[0215] 嵌合mAb ch2448延迟了IGROV1卵巢癌异种移植小鼠模型中的肿瘤生长(图21A)。没有观察到体重的显著变化(图21B),表明抗体治疗没有副作用。结果表明ch2448可用作卵巢癌的裸抗体治疗。

[0216] 嵌合mAb ch2448通过ADCC延迟体内肿瘤生长。

[0217] 产生了ch2448的F(ab')₂ (图22A), 其不具有诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的能力(图22B)。嵌合mAb ch2448作为IgG但不作为F(ab')₂在小鼠异种移植模型中延迟人卵巢肿瘤生长(图22C)。结果证明了ch2448通过ADCC延迟肿瘤生长的能力。

[0218] 非岩藻糖基化增强ch2448诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的能力。

[0219] 非岩藻糖基化的ch2448保留与野生型嵌合mAb ch2448类似的结合(图23A)。将mAb ch2448和aF-ch2448与靶癌细胞和效应细胞一起孵育。与ch2448相比, aF-ch2448诱导如呈倍数变化的增加所示的更强的ADCC活性(图23B)。结果显示ch2448的非岩藻糖基化保留了抗体-抗原特异性并显著增强了ch2448的ADCC活性。

[0220] mAb ch2448与未分化的hESC强结合并防止体内畸胎瘤形成。

[0221] mAb 2448特异性结合未分化的hESC但不结合分化的胚状体(EB) (图24A)。在肌内注射到SCID小鼠之前, 将hESC与PBS缓冲液或mAb 2448预孵育(图24B)。在第5周内缓冲液对照中的所有3只小鼠中形成畸胎瘤。观察到用2448处理的细胞预防了畸胎瘤(n=2)或延迟了畸胎瘤(n=1, 第7周)。因此, 作为裸mAb, 2448可以预防或延迟SCID小鼠中畸胎瘤的形成。

[0222] ch2448内化到hESC中并作为ADC杀死未分化的hESC。

[0223] 将ch2448与pHRodo染料缀合, 并在24小时内观察到ch2448的内化(图25A)。hESC自发地部分分化并且用鬼笔环肽染色肌动蛋白。未分化的hESC显示出浓厚的肌动蛋白染色, 而分化的细胞具有稀疏的肌动蛋白染色。ch2448(与pHRodo缀合)结合并内化到未分化区域(图25B)。作为F(ab')₂的ch2448可以与毒素缀合并且可以潜在的用作ADC以杀死未分化的hESC。将Hum-Zap与ch2448一起孵育作为ADC复合物并掺入未分化的hESC培养物中。ch2448-ADC在3天内杀死未分化的hESC(图25C)。对于缓冲液对照、单独的ch2448和同种型对照ADC没有观察到杀伤。ch2448ADC不会杀死分化的胚状体。ch2448的Fc区被酶切除, 并与抗Fab皂草素复合作为ADC(图25D)。F(ab')₂-ADC在3天内杀死未分化的hESC。对于缓冲液对照、单独的F(ab)₂和游离皂草素对照没有观察到杀伤。

[0224] mAb 2448作为F(ab')₂-ADC, 预防或延迟体内畸胎瘤的形成。

[0225] 将人胚胎干细胞的单细胞悬浮液(每只动物 5×10^6 个细胞)与缓冲液或mAb 2448-F(ab')₂-ADC在4℃预孵育20分钟, 然后注入SCID小鼠的右后腿肌肉中。与对照组相比, F(ab')₂-ADC能够预防肿瘤形成(图26A)。将人胚胎干细胞的单细胞悬浮液(每只动物 5×10^6 个细胞)注射到SCID小鼠的右后腿肌肉中(n=3)。随后在腹膜内施用缓冲液和ADC。

[0226] 与对照组相比, 观察到SCID小鼠中2448-F(ab')₂-ADC形成的预防或延迟的畸胎瘤形成(图26B)。结果证明了mAb 2448用作ADC以预防或延迟体内畸胎瘤形成的能力。

[0227] 使用CD28共刺激结构域和IgG₄Fc区接头结构域构建CAR(2448)。将T2A元件和eGFP插入与CAR构建体相同的开放阅读框的下游。

[0228] 利用mAb 2448的V_H和V_L区构建第二代CAR以确定抗体以CAR形式的效用。利用eGFP元件作为CAR表达的报告分子(图27)。

[0229] 在CAR(2448) T细胞与表达补体抗原的靶细胞共孵育后, 与T细胞活化相关的细胞因子上调。

[0230] 在暴露于表达靶膜联蛋白A2的IGROV-1细胞后, 观察到CAR(2448) T细胞显著增加T

细胞细胞因子(图28)。高水平的IFN- γ 、IL-2、GM-CSF和TNF- α 表明肿瘤清除所必需的T细胞亚群的激活。

[0231] 与非靶特异性CAR对照相比,在将T细胞与靶IGROV1细胞共孵育后,多种细胞因子显示细胞因子产生的显著增加。

[0232] 用IGROV-1孵育的CAR (2448) T细胞上调多种细胞因子 (GM-CSF、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-17A和TNF- α) 表明多个T细胞亚群被激活,表明CAR (2448) 构建体激活广泛的T细胞亚群的能力(图29)。

[0233] 与非特异性CAR对照相比,CAR (2448) 介导针对靶细胞的T细胞细胞毒性。

[0234] CAR (2448) T细胞以剂量依赖性方式介导针对靶IGROV-1细胞的细胞毒性(图30)。

[0235] CAR (2448) T细胞介导靶细胞的生长抑制。

[0236] 将靶IGROV-1细胞与CAR-T细胞共孵育。与非靶标特异性CAR对照相比,CAR (2448) T细胞的所有剂量水平均显示靶细胞生长的抑制(图31)。

[0237] CAR (2448) T细胞在数小时的过程中介导其对IGROV1靶细胞的细胞毒性作用。

[0039] Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 [0040] 20 25 30
 [0041] Asn Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 [0042] 35 40 45
 [0043] Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
 [0044] 50 55 60
 [0045] Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 [0046] 65 70 75 80
 [0047] Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 [0048] 85 90 95
 [0049] Tyr Tyr Ile Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 [0050] 100 105 110
 [0051] Lys Arg
 [0052] <210> 3
 [0053] <211> 348
 [0054] <212> DNA
 [0055] <213> 人工序列
 [0056] <220>
 [0057] <223> 分离的抗体
 [0058] <400> 3
 [0059] gtacagctgc aggagtcagg acctgacctg gtgaaacctt ctcggtcact ttcactcacc 60
 [0060] tgcactgtca ctggctactc catcaccagt ggttatagct ggcactggat cccggcagttt 120
 [0061] ccaggaaaca aactggaatg gatgggctac atacactaca gtggtagcac taagtacaac 180
 [0062] ccatctctca aaagtcgaat ctctatcact cgagacacat ccaagaacca gttcttctctg 240
 [0063] cagttgaatt ctgtgactac tgaggacgca gccacatatt actgtgcaag ggggagtaac 300
 [0064] tacggatttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca 348
 [0065] <210> 4
 [0066] <211> 342
 [0067] <212> DNA
 [0068] <213> 人工序列
 [0069] <220>
 [0070] <223> 分离的抗体
 [0071] <400> 4
 [0072] gacattgagc tcaccagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact 60
 [0073] atgagctgca agtccagtca gagcctttta tatagtaacg atcaaaagaa ctacttggcc 120
 [0074] tggtaccaac agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atctattagg 180
 [0075] gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
 [0076] atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatatctat 300
 [0077] cctctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gaaataaac gg 342

[0117]	65	70	75	80
[0118]	Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln			
[0119]		85	90	95
[0120]	Tyr Tyr Ile Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu			
[0121]		100	105	110
[0122]	Lys Arg			
[0123]	<210> 7			
[0124]	<211> 351			
[0125]	<212> DNA			
[0126]	<213> 人工序列			
[0127]	<220>			
[0128]	<223> 分离的抗体			
[0129]	<400> 7			
[0130]	caggtgaaac tgcaggagtc aggacctgac caggtgaaac cctctcagtc actttcactc	60		
[0131]	acctgcactg tcaactgtcta ctccatcacc agtggttata gctggcactg gatccggcag	120		
[0132]	tttccaggaa acaaactgga atggatgggc tacatacact acagtggtag tactaagtac	180		
[0133]	aacctatctc tcaaaagtgc attctctatc actcgagaca catccaagaa ccagttcttc	240		
[0134]	ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aagagggacc	300		
[0135]	gacaatgctg tggactactg gggccaaggg accacggtea ccgtctcctc a	351		
[0136]	<210> 8			
[0137]	<211> 342			
[0138]	<212> DNA			
[0139]	<213> 人工序列			
[0140]	<220>			
[0141]	<223> 分离的抗体			
[0142]	<400> 8			
[0143]	gacattgagc tcaccagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttaat	60		
[0144]	atgagctgca agtccagtc gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc	120		
[0145]	tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaattgctga tttactgggc atccagtagg	180		
[0146]	gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc	240		
[0147]	atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatatctat	300		
[0148]	cctctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac gg	342		
[0149]	<210> 9			
[0150]	<211> 11			
[0151]	<212> PRT			
[0152]	<213> 人工序列			
[0153]	<220>			
[0154]	<223> 分离的抗体			
[0155]	<400> 9			

- [0195] <210> 14
[0196] <211> 9
[0197] <212> PRT
[0198] <213> 人工序列
[0199] <220>
[0200] <223> 分离的抗体
[0201] <400> 14
[0202] Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Leu Thr
[0203] 1 5
[0204] <210> 15
[0205] <211> 32
[0206] <212> DNA
[0207] <213> 人工序列
[0208] <220>
[0209] <223> 分离的抗体
[0210] <400> 15
[0211] gctactccat caccagtggg tatagctggc ac 32
[0212] <210> 16
[0213] <211> 48
[0214] <212> DNA
[0215] <213> 人工序列
[0216] <220>
[0217] <223> 分离的抗体
[0218] <400> 16
[0219] acatacacta cagtggtagc actaagtaca acccatctct caaaagtc 48
[0220] <210> 17
[0221] <211> 24
[0222] <212> DNA
[0223] <213> 人工序列
[0224] <220>
[0225] <223> 分离的抗体
[0226] <400> 17
[0227] ggagtaacta cggatttgac tact 24
[0228] <210> 18
[0229] <211> 51
[0230] <212> DNA
[0231] <213> 人工序列
[0232] <220>
[0233] <223> 分离的抗体

- [0234] <400> 18
- [0235] agtccagtcagagcctttta tatagtaacg atcaaaagaa ctacttggcc t 51
- [0236] <210> 19
- [0237] <211> 21
- [0238] <212> DNA
- [0239] <213> 人工序列
- [0240] <220>
- [0241] <223> 分离的抗体
- [0242] <400> 19
- [0243] gggcatctat tagggaatct g 21
- [0244] <210> 20
- [0245] <211> 27
- [0246] <212> DNA
- [0247] <213> 人工序列
- [0248] <220>
- [0249] <223> 分离的抗体
- [0250] <400> 20
- [0251] agcaatatta tatctatcct ctcacgt 27
- [0252] <210> 21
- [0253] <211> 11
- [0254] <212> PRT
- [0255] <213> 人工序列
- [0256] <220>
- [0257] <223> 分离的抗体
- [0258] <400> 21
- [0259] Val Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser Trp His
- [0260] 1 5 10
- [0261] <210> 22
- [0262] <211> 8
- [0263] <212> PRT
- [0264] <213> 人工序列
- [0265] <220>
- [0266] <223> 分离的抗体
- [0267] <400> 22
- [0268] Gly Thr Asp Asn Ala Val Asp Tyr
- [0269] 1 5
- [0270] <210> 23
- [0271] <211> 17
- [0272] <212> PRT

- [0273] <213> 人工序列
 [0274] <220>
 [0275] <223> 分离的抗体
 [0276] <400> 23
 [0277] Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 [0278] 1 5 10 15
 [0279] Ala
 [0280] <210> 24
 [0281] <211> 7
 [0282] <212> PRT
 [0283] <213> 人工序列
 [0284] <220>
 [0285] <223> 分离的抗体
 [0286] <400> 24
 [0287] Trp Ala Ser Ser Arg Glu Ser
 [0288] 1 5
 [0289] <210> 25
 [0290] <211> 33
 [0291] <212> DNA
 [0292] <213> 人工序列
 [0293] <220>
 [0294] <223> 分离的抗体
 [0295] <400> 25
 [0296] tctactccat caccagtgggt tatagctggc act 33
 [0297] <210> 26
 [0298] <211> 48
 [0299] <212> DNA
 [0300] <213> 人工序列
 [0301] <220>
 [0302] <223> 分离的抗体
 [0303] <400> 26
 [0304] acatacacta cagtggtagt actaagtaca acccatctct caaaagtc 48
 [0305] <210> 27
 [0306] <211> 24
 [0307] <212> DNA
 [0308] <213> 人工序列
 [0309] <220>
 [0310] <223> 分离的抗体
 [0311] <400> 27

[0312] ggaccgacaa tgctgtggac tact 24
 [0313] <210> 28
 [0314] <211> 51
 [0315] <212> DNA
 [0316] <213> 人工序列
 [0317] <220>
 [0318] <223> 分离的抗体
 [0319] <400> 28
 [0320] agtccagtca gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc t 51
 [0321] <210> 29
 [0322] <211> 21
 [0323] <212> DNA
 [0324] <213> 人工序列
 [0325] <220>
 [0326] <223> 分离的抗体
 [0327] <400> 29
 [0328] gggcatccag tagggaatct g 21
 [0329] <210> 30
 [0330] <211> 339
 [0331] <212> PRT
 [0332] <213> 人工序列
 [0333] <220>
 [0334] <223> 分离的抗体
 [0335] <400> 30
 [0336] Met Ser Thr Val His Glu Ile Leu Cys Lys Leu Ser Leu Glu Gly Asp
 [0337] 1 5 10 15
 [0338] His Ser Thr Pro Pro Ser Ala Tyr Gly Ser Val Lys Ala Tyr Thr Asn
 [0339] 20 25 30
 [0340] Phe Asp Ala Glu Arg Asp Ala Leu Asn Ile Glu Thr Ala Ile Lys Thr
 [0341] 35 40 45
 [0342] Lys Gly Val Asp Glu Val Thr Ile Val Asn Ile Leu Thr Asn Arg Ser
 [0343] 50 55 60
 [0344] Asn Ala Gln Arg Gln Asp Ile Ala Phe Ala Tyr Gln Arg Arg Thr Lys
 [0345] 65 70 75 80
 [0346] Lys Glu Leu Ala Ser Ala Leu Lys Ser Ala Leu Ser Gly His Leu Glu
 [0347] 85 90 95
 [0348] Thr Val Ile Leu Gly Leu Leu Lys Thr Pro Ala Gln Tyr Asp Ala Ser
 [0349] 100 105 110
 [0350] Glu Leu Lys Ala Ser Met Lys Gly Leu Gly Thr Asp Glu Asp Ser Leu

[0351]	115	120	125
[0352]	Ile Glu Ile Ile Cys Ser Arg Thr Asn Gln Glu Leu Gln Glu Ile Asn		
[0353]	130	135	140
[0354]	Arg Val Tyr Lys Glu Met Tyr Lys Thr Asp Leu Glu Lys Asp Ile Ile		
[0355]	145	150	155
[0356]	Ser Asp Thr Ser Gly Asp Phe Arg Lys Leu Met Val Ala Leu Ala Lys		
[0357]	165	170	175
[0358]	Gly Arg Arg Ala Glu Asp Gly Ser Val Ile Asp Tyr Glu Leu Ile Asp		
[0359]	180	185	190
[0360]	Gln Asp Ala Arg Asp Leu Tyr Asp Ala Gly Val Lys Arg Lys Gly Thr		
[0361]	195	200	205
[0362]	Asp Val Pro Lys Trp Ile Ser Ile Met Thr Glu Arg Ser Val Pro His		
[0363]	210	215	220
[0364]	Leu Gln Lys Val Phe Asp Arg Tyr Lys Ser Tyr Ser Pro Tyr Asp Met		
[0365]	225	230	235
[0366]	Leu Glu Ser Ile Arg Lys Glu Val Lys Gly Asp Leu Glu Asn Ala Phe		
[0367]	245	250	255
[0368]	Leu Asn Leu Val Gln Cys Ile Gln Asn Lys Pro Leu Tyr Phe Ala Asp		
[0369]	260	265	270
[0370]	Arg Leu Tyr Asp Ser Met Lys Gly Lys Gly Thr Arg Asp Lys Val Leu		
[0371]	275	280	285
[0372]	Ile Arg Ile Met Val Ser Arg Ser Glu Val Asp Met Leu Lys Ile Arg		
[0373]	290	295	300
[0374]	Ser Glu Phe Lys Arg Lys Tyr Gly Lys Ser Leu Tyr Tyr Tyr Ile Gln		
[0375]	305	310	315
[0376]	Gln Asp Thr Lys Gly Asp Tyr Gln Lys Ala Leu Leu Tyr Leu Cys Gly		
[0377]	325	330	335
[0378]	Gly Asp Asp		

图 1A

C51 基因序列 (重链) (SEQ ID NO.: 7)

CAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGACCAGGTGAAACCCTCTCAGTCACTTT
 CACTCACCTGCACTGTCAGTGTTCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACT
 GGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAATGGATGGGCTACATACTACTACA
GTGGTAGTACTAAGTACAACCCATCTCTCAAAGTTCGATTCTCTATCACTCGA
 GACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACA
 CAGCCACATATTACTGTGCAAGAGGGGACCGACAATGCTGTGGACTACTGGGGC
 CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

C51 基因序列 (轻链) (SEQ ID NO.: 8)

GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAGAAGG
 TTAATATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAGCAATCAAAG
AACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAATTGCTGATT
 TACTGGGCATCCAGTAGGGAATCTGGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGG
 ATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCA
 GTTTATTACTGTCAGCAATATTATATCTATCCTCTCACGTTCGGTGCTGGGACC
 AAGCTGGAGCTGAAACGG

图 1B

C51 氨基酸序列 (重链) (SEQ ID NO.: 5)

QVKLQESGPDQVKPSQSLTCTVTVYSITSGYSWHWIRQFPGNKLEWMGYIHYSG
STKYNPSLKSRFSITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARGTDNAVDYWG
 QGTTVTVSS

C51 氨基酸序列 (轻链) (SEQ ID NO.: 6)

DIELTQSPSSLAVSVGEKVNMSCKSSQSLLYSSNOKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYW
ASSRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISVKAEDLAVYYCQOYYIYPLTFGAGTKLEL
 KR

图 1C

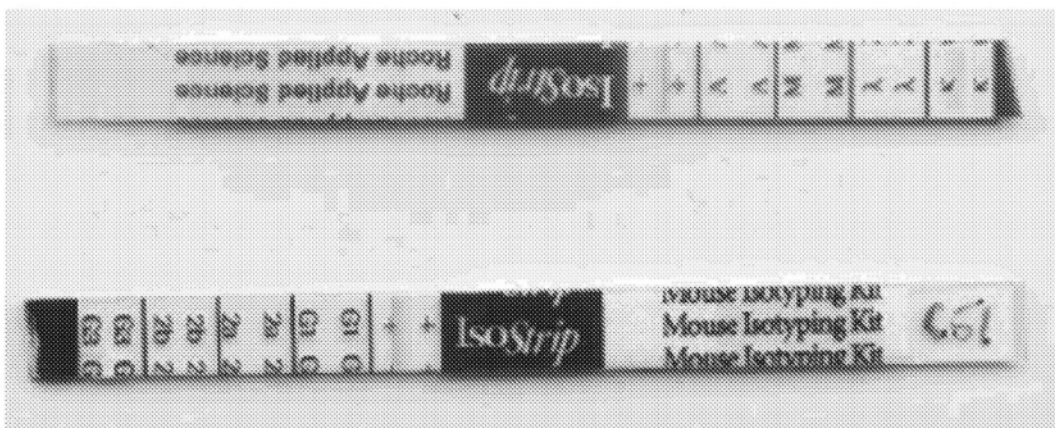


图1

A

乳腺癌细胞系											
C51	BT474	BT20	CAMA1	HCC1937	HCC1954	HCC2218	HS578T	MCF7	MDA-MB-231	SKBR3	T47D
	4	2	4	3	0	4	2	4	4	4	4
结直肠癌细胞系											
C51	COLO205	HCC2998	HCT15	HCT116	HT29	KM12	LS174T	SW620			
	4	0	0	0	2	2	2	2			
肾脏癌细胞系											
C51	786O	A498	ACHN	CAK1	UO31	RXF393	SN12C	TK10			
	4	3	4	3	3	3	0				
肝脏癌细胞系				正常细胞系							
C51	HEP3B	HEPG2	HUH7	PLC	C51	IMR90	IOSE523	HEK293	HFF	HEp-2	HEp-1
	3	1	4	4		0	0	0	0	0	0
卵巢癌细胞系											
C51	CAOV3	CH1	IGROV1	OV17R	OV98	OVCA432	OVCAR3	OVCAR8	OVCA433	PEA1	SKOV3
	3	0	3	0	2	3	3	4	2	4	3

说明

4	>80% 结合
3	60%-80% 结合
2	40%-60% 结合
1	10%-40% 结合
0	<10% 结合

B

卵巢			mAb 克隆	乳腺			mAb 克隆
EMT 类别†	细胞系	C51*	C51*	EMT 类别†	细胞系	C51*	C51*
E	CaOV3	+++	+++	E	BT474	++++	++++
E	OVCAR3	++++	++++	E	CAMA1	++++	++++
E	OVCAR8	++++	++++	E	HCC2218	++++	++++
E	OV98	++	++	E	MDA463	++++	++++
E	IGROV1	+++	+++	E	MCF7	++++	++++
IE	OV17R	-	-	E	SKBR3	++++	++++
IE	OVCA432	+++	+++	E	T47D	++++	++++
IE	OVCA433	++	++	IE	BT20	++++	++++
IM	CH1	-	-	IE	HCC1937	+++	+++
IM	HEY	-	-	IM	HCC1954	++++	++++
IM	HEYC2	-	-	M	MCF10A	++	++
IM	SKOV3	+++	+++	M	MDA-MB-231	+	+
IM	SKOV3(D10)	+	+	M	BT549	-	-
M	A2780	-	-	M	HS578T	++++	++++
M	COLO720E	-	-	U	184B5	++++	++++
M	HEYA8	-	-	U	HCC1395	-	-
M	OVCAR10	-	-				
M	TOV112	-	-				
U	IOSE523	-	-				

图2

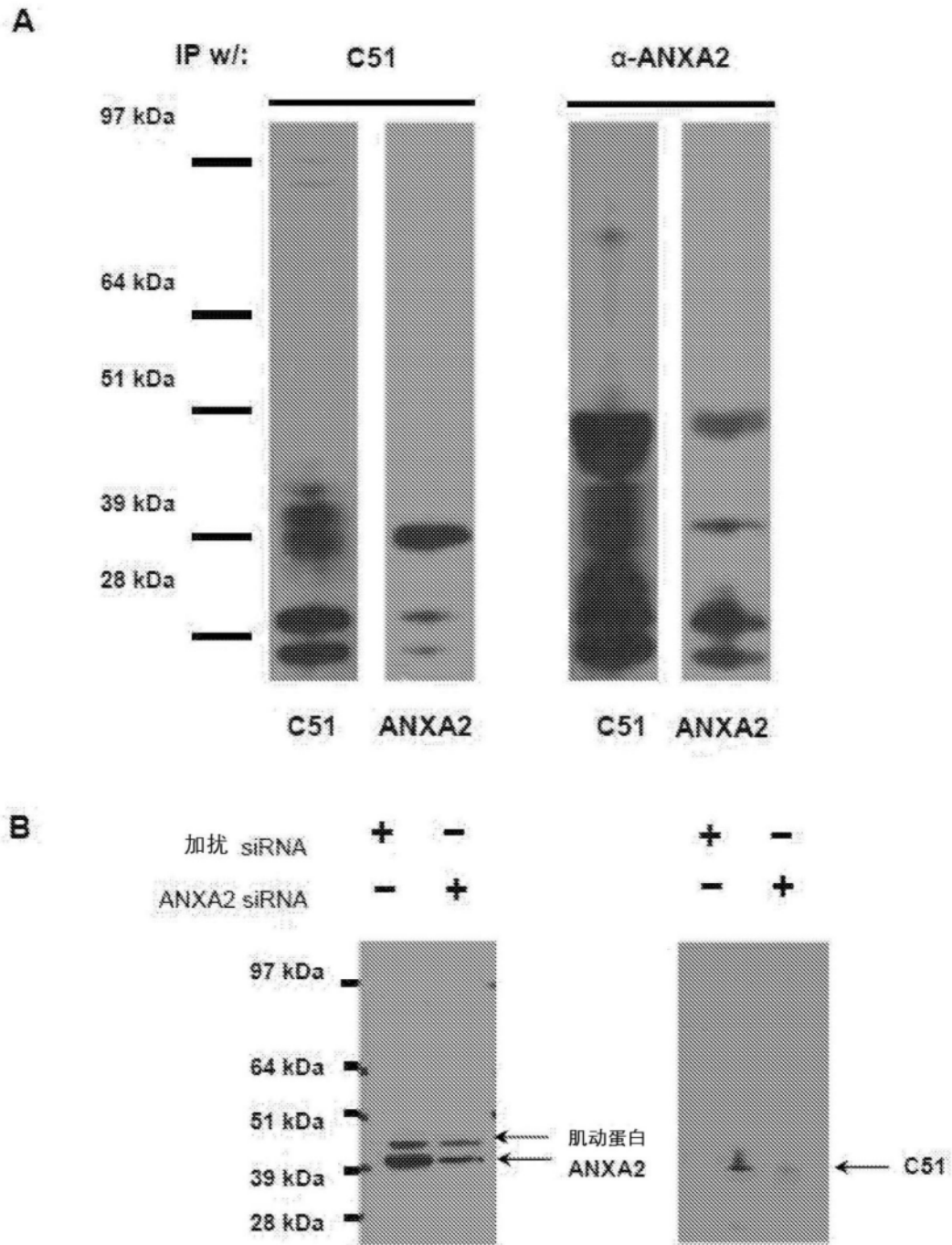


图3

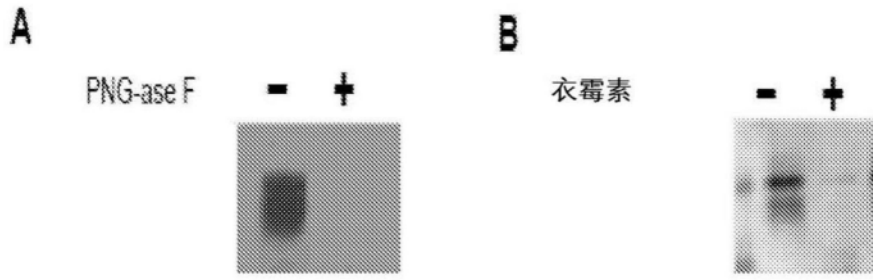


图4

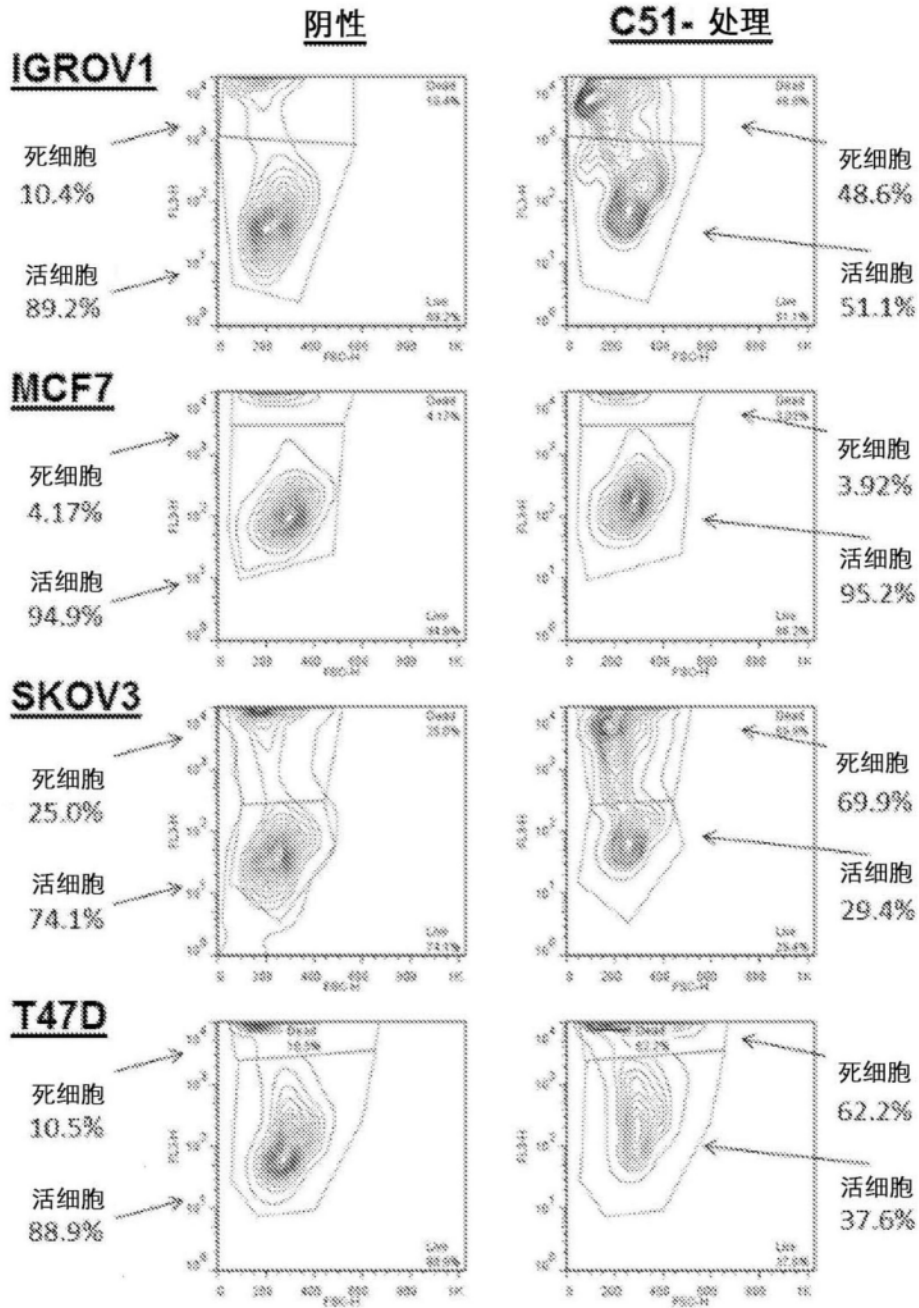


图5

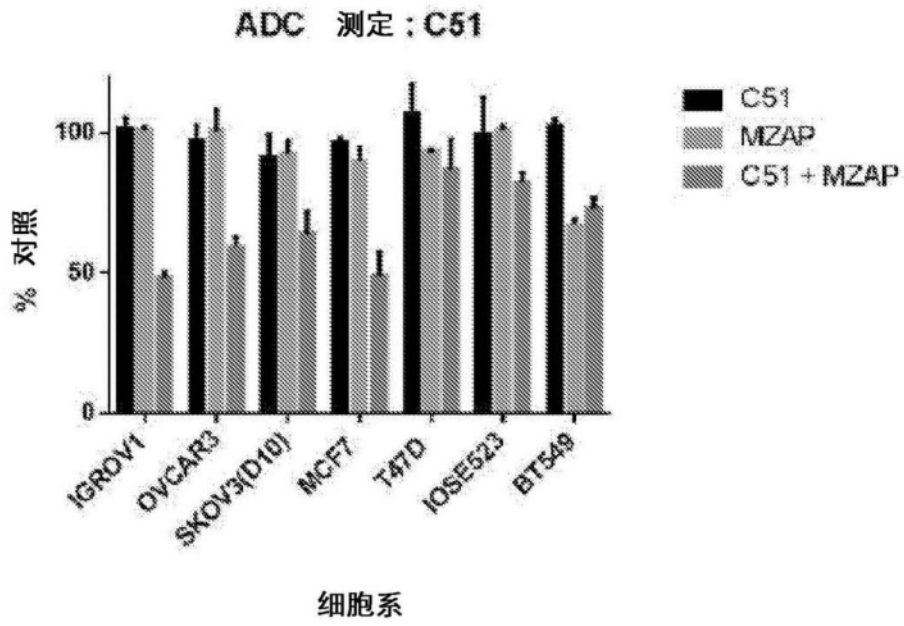


图6

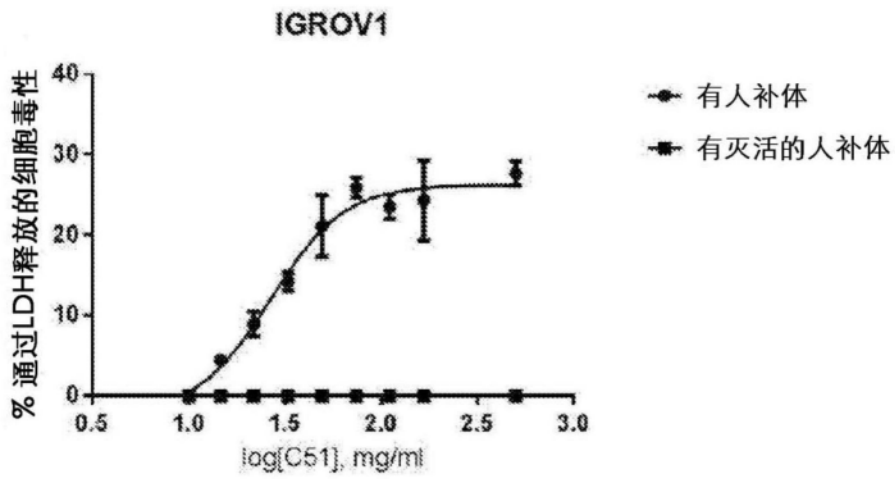


图7

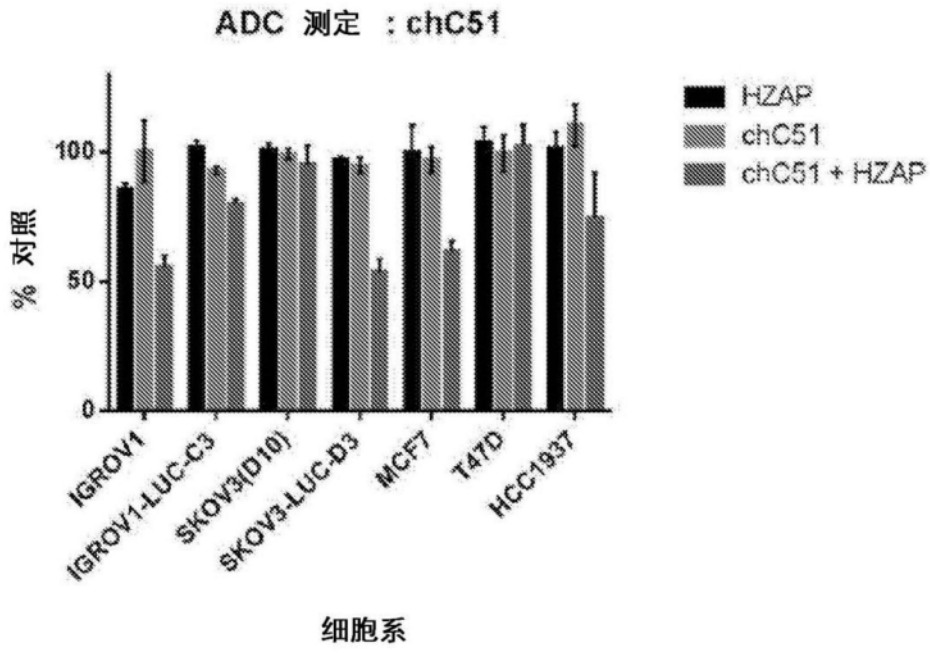


图8

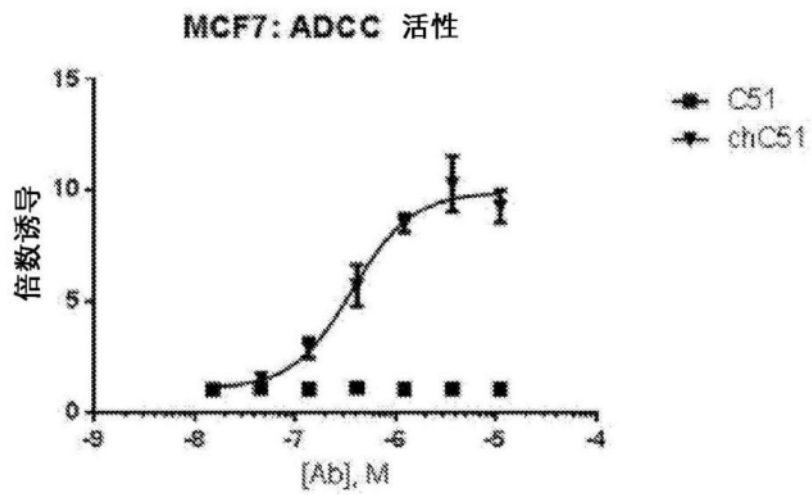


图9

图 10A**基因序列 2448 (重链) (SEQ ID NO.:3)**

GTACAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAAACCTTCTCGGTCAC~~TTT~~CAC
 TCACCTGCAC~~TG~~TCAC~~TGG~~CTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGG
 ATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAACTGGAATGGATGGGCTACATACACTACAGT
GGTAGCACTAAGTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGA
 CACATCCAAGAACCAGTTCTTCTGCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACGCA
 GCCACATATTACTGTGCAAGGGGGAGTAACTACGGATTGACTACTGGGGCCA
 AGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

基因序列 2448 (轻链) (SEQ ID NO.:4)

GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAGAAGG
 TTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAACGATCAAAAG
AACTACTTGGCCTGGTACCAACAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATT
 TACTGGGCATCTATTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGA
 TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAG
 TTTATTACTGTCAGCAATATTATATCTATCCTCTCACGTTCGGTGCTGGGACCA
 AGCTGGAATAAAAACGG

图 10B**氨基酸序列 2448 (重链) (SEQ ID NO.:1)**

VQLQESGPD~~L~~VKPSRSL~~S~~LCTVTGYSITSGYSWHWIRQFPGNKLEWMGYYIHYSGST
KYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDAATYYCARGSNYGFDYWGQGTTLTV
 SS

氨基酸序列 2448 (轻链) (SEQ ID NO.:2)

DIELTQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSNDQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYW
ASIRESGV~~P~~DRFTGSGSGTDFLTISSVKAEDLAVYYCQOYYIYPLTFGAGTKLEIKR

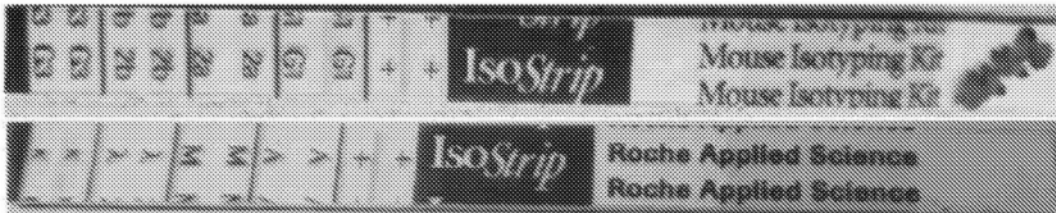
图10C

图10

A

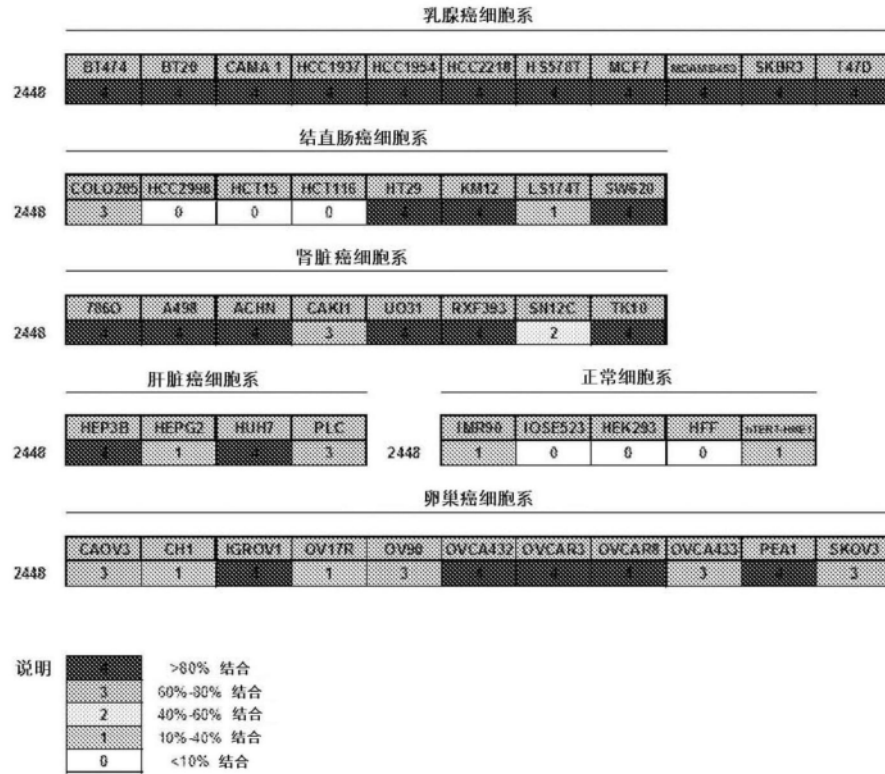


图11

B

卵巢		mAb 克隆	乳腺		mAb 克隆
EMT 类别 ¹	细胞系	2448 ²	EMT 类别 ¹	细胞系	2448 ²
E	CaOV3	+++	E	BT474	++++
E	OVCAR3	+++	E	CAMA1	++++
E	OVCAR8	++++	E	HCC2218	++++
E	OV90	+++	E	MDA453	++++
E	IGROV1	++++	E	MCF7	++++
IE	OV17R	+	E	SKBR3	++++
IE	OVCA432	++++	E	T47D	++++
IE	OVCA433	+++	IE	BT20	++++
IM	CH1	+	IE	HCC1937	++++
IM	HEY	-	IM	HCC1954	++++
IM	HEYC2	-	M	MCF10A	++
IM	SKOV3	+++	M	MDA-MB-231	-
IM	SKOV3(D10)	+	M	BT549	-
M	A2780	-	M	HS578T	++
M	COLO720E	-	U	184B5	++++
M	HEYA8	-	U	HCC1395	-
M	OVCAR10	-			
M	TOV112	-			
U	IOSE523	-			

图11

C

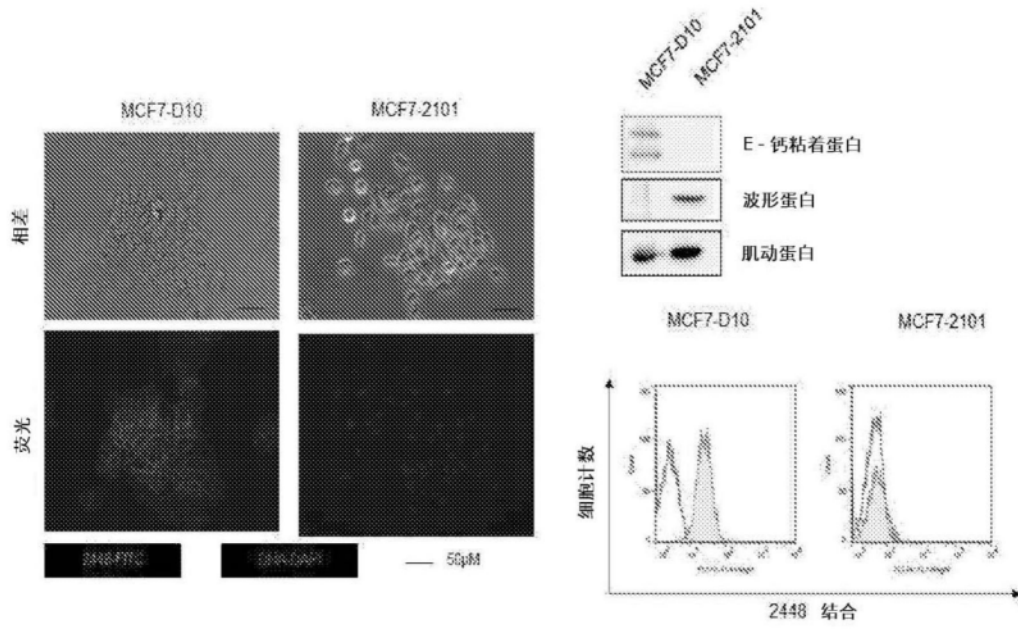
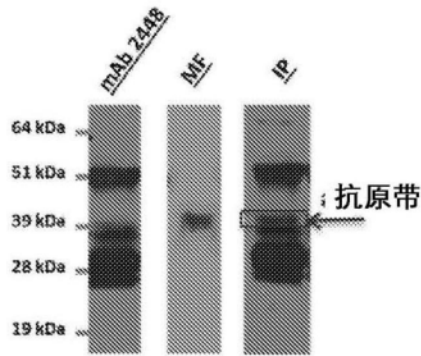


图11

A



B

编号	# 肽	# AAs	MW [kDa]	描述
P07355	4	339	38.6	膜联蛋白 A2 OS= 人 GN=ANXA2 PE=1 SV=2 - [ANXA2_人]

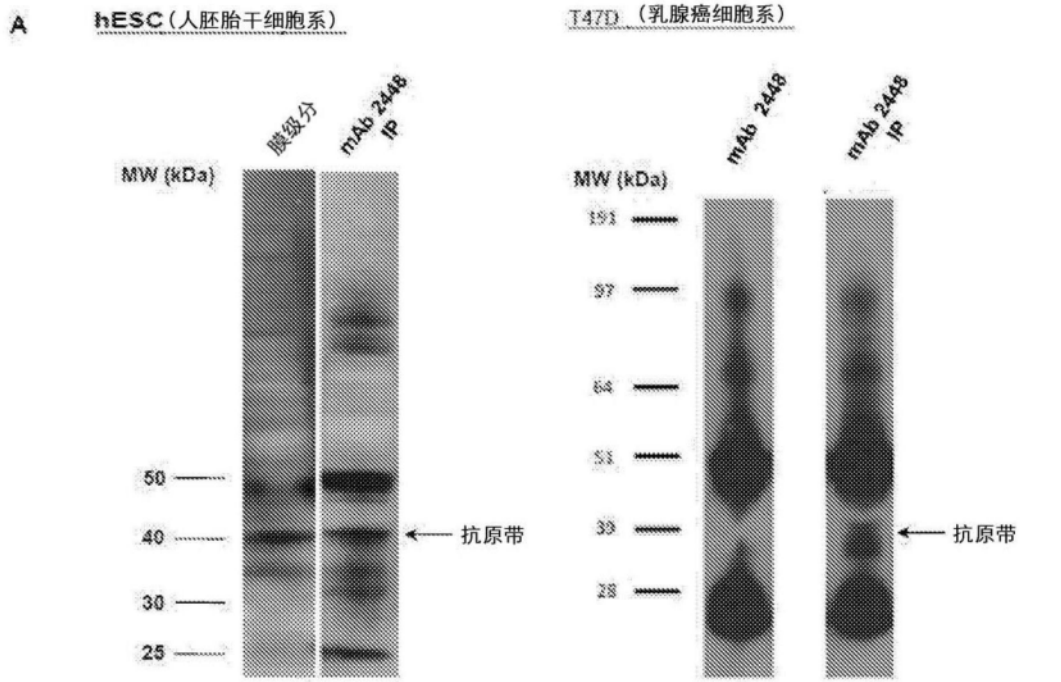
C

```

MSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKAYTNFDAERDALNIETAIKIKGVDEVTV
NILTNRSSNAQRQDI AFAYQRR TKKELASALKSALSGHLETVILGLLKTPAQYDASEL
KASMKGLGTD EDSLIEICSR TNQELQEINR VYKEMYKTDLEKDIISDTS GDFR KLM
VALAKGRRAEDGSVIDYELIDQDARDLYDAGV KRKGT DVPKVISIMTERSVPHLQ
KVFDRYKSYSPYD MLESIRKEVKGDLENAFLNLVQC IQNKPLYFADRLYDSMKGK
GTRDKVLRIMVSRSEVDMLKIRSEFKRKYGKSLYYIQQDTKGDYQKALLYLCGG
DD
    
```

(SEQ ID NO: 30)

图12



B hESC 质谱结果

MS/MS 样品名称	蛋白质名称	蛋白质 Mw(Da)	蛋白质 id Prob	独特肽的编号	% 基因覆盖
DataSC-WJ-C2-230610 (F16655)	膜联蛋白 A2 OS = 人 GN=ANXA2	38,568.10	100.00%	11	45.70%
DataSC-WJ-D2-230610 (F16656)	膜联蛋白 A2 OS = 人 GN=ANXA2	38,568.10	100.00%	12	49.90%
DataSC-WJ-E2-230610 (F16658)	膜联蛋白 A2 OS = 人 GN=ANXA2	38,568.10	100.00%	14	54.60%

T47D 质谱结果

LCMS 样品	蛋白质名称	% 基因覆盖	独特肽的编号	蛋白质 MW [kDa]
SC_2448_B_100412	膜联蛋白 A2 OS = 人 GN=ANXA2 PE=1 SV=2	37.46	11	38.6
SC_2448_C_100412	膜联蛋白 A2 OS = 人 GN=ANXA2 PE=1 SV=2	54.57	16	38.6
SC1_2448C_02	膜联蛋白 A2 OS = 人 GN=ANXA2 PE=1 SV=2 -[ANXA2_ 人]	31.86	10	38.6

图13

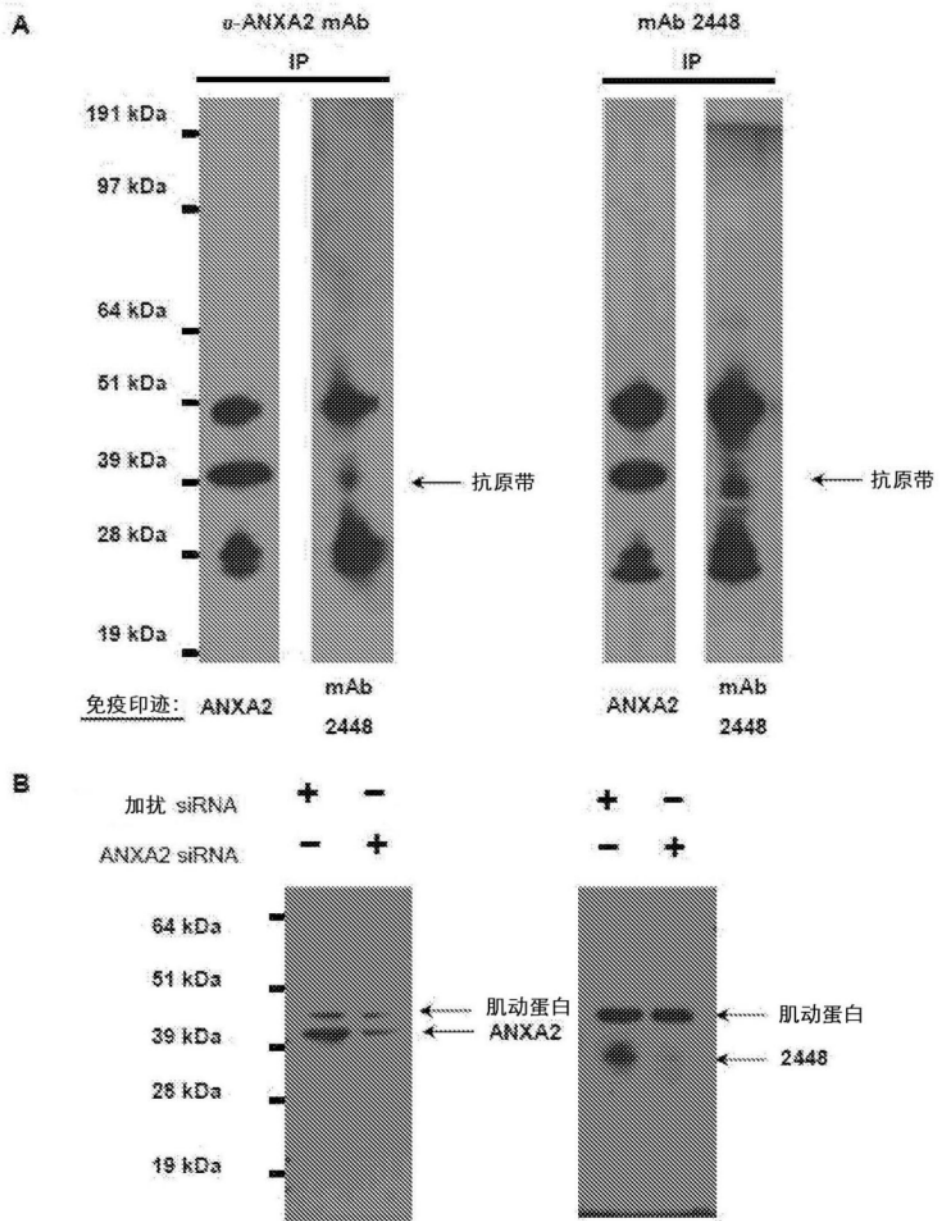
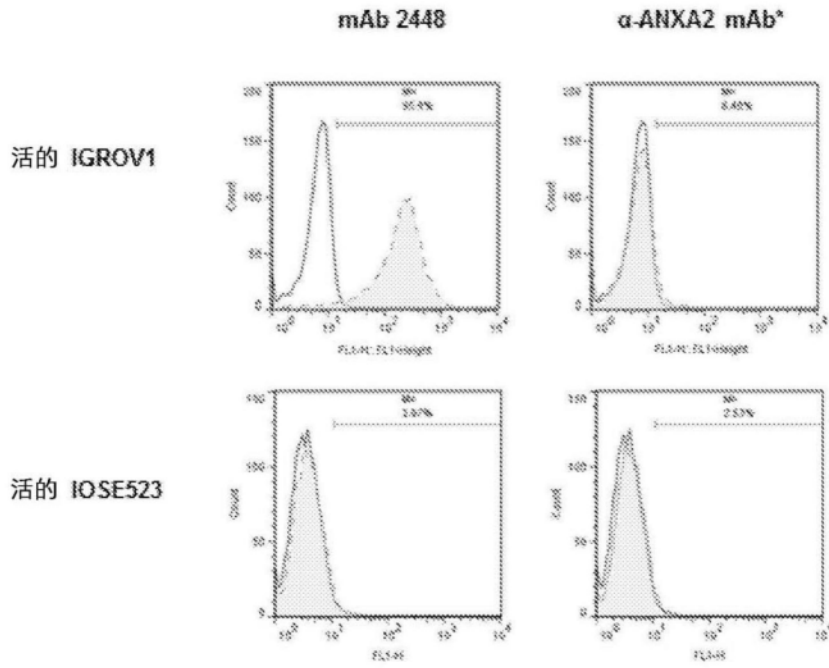


图14



名称	公司	克隆性	物种	同种型	免疫原
*	BD	单克隆抗体	小鼠	IgG1	人膜联蛋白 II aa.123-328

图15

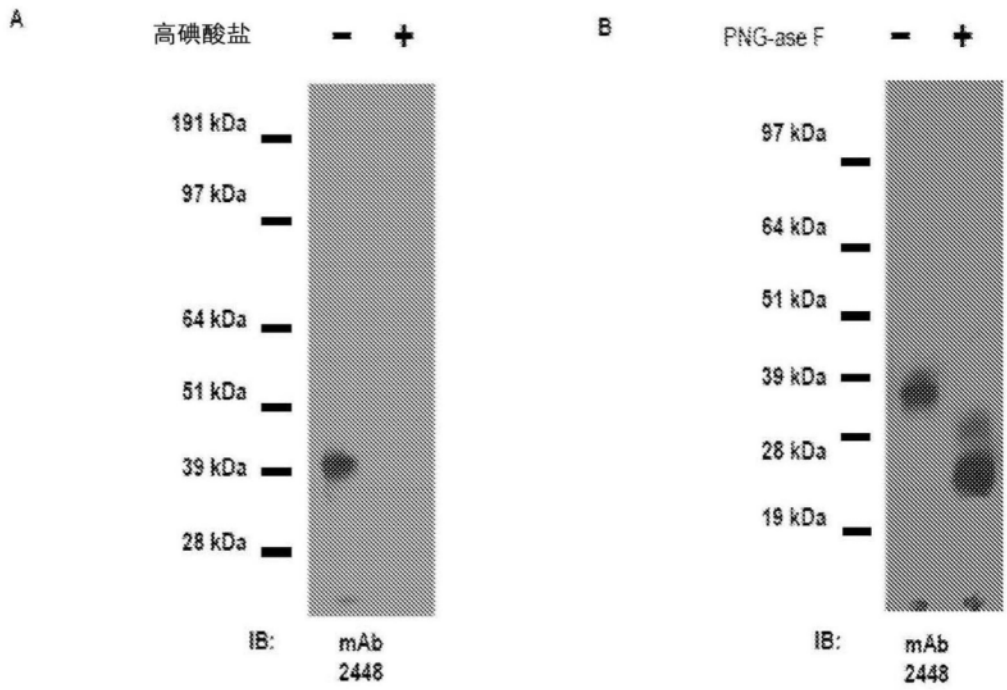


图16

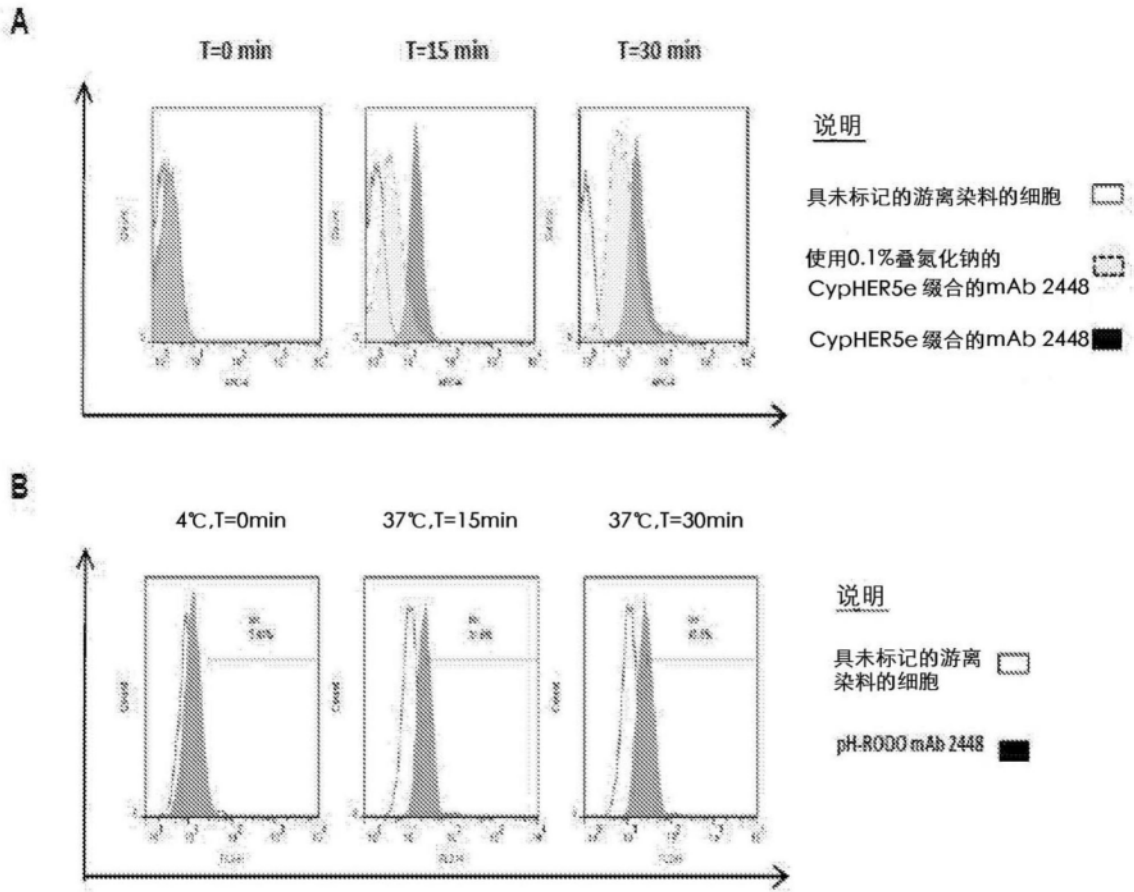


图17

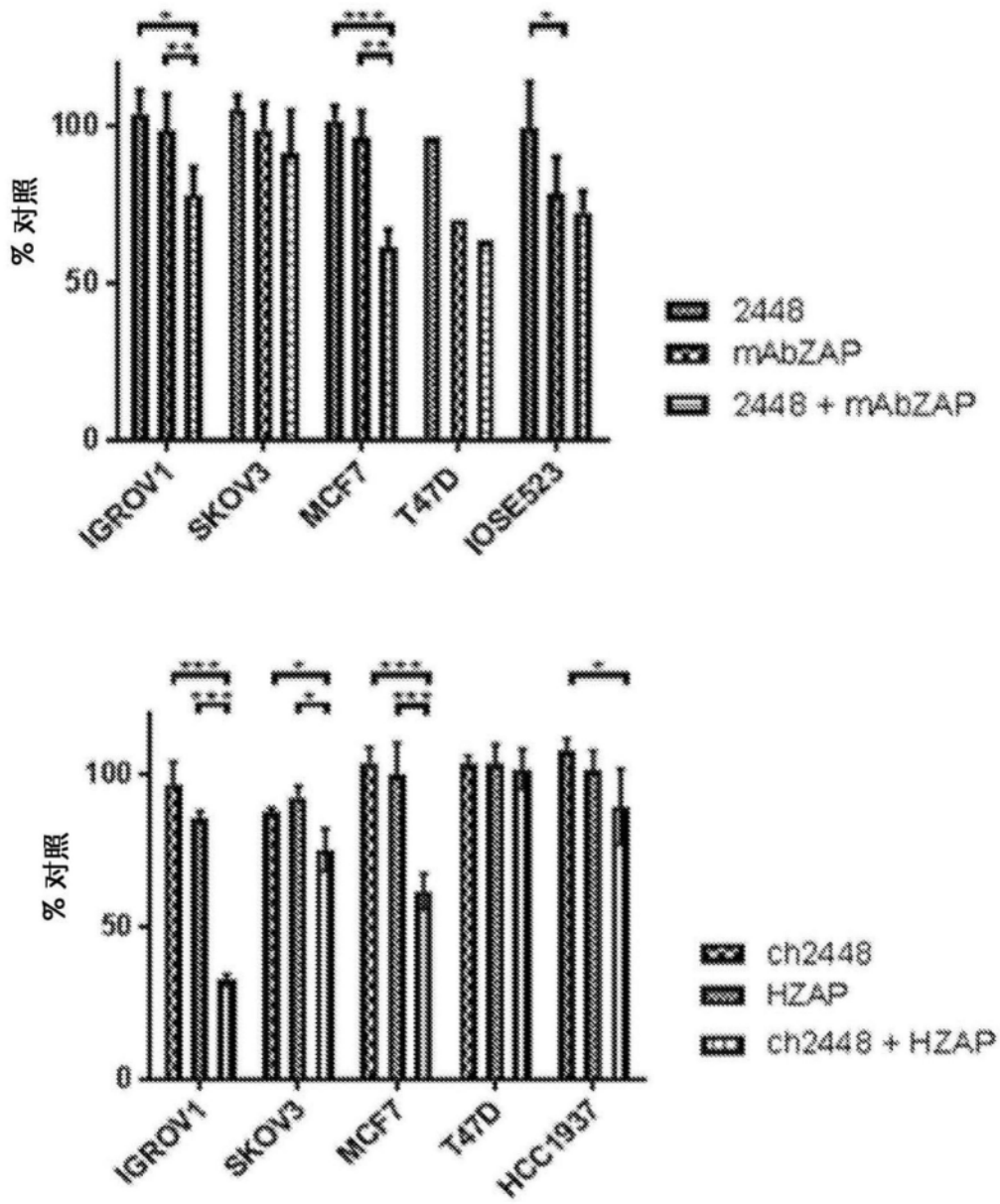


图18

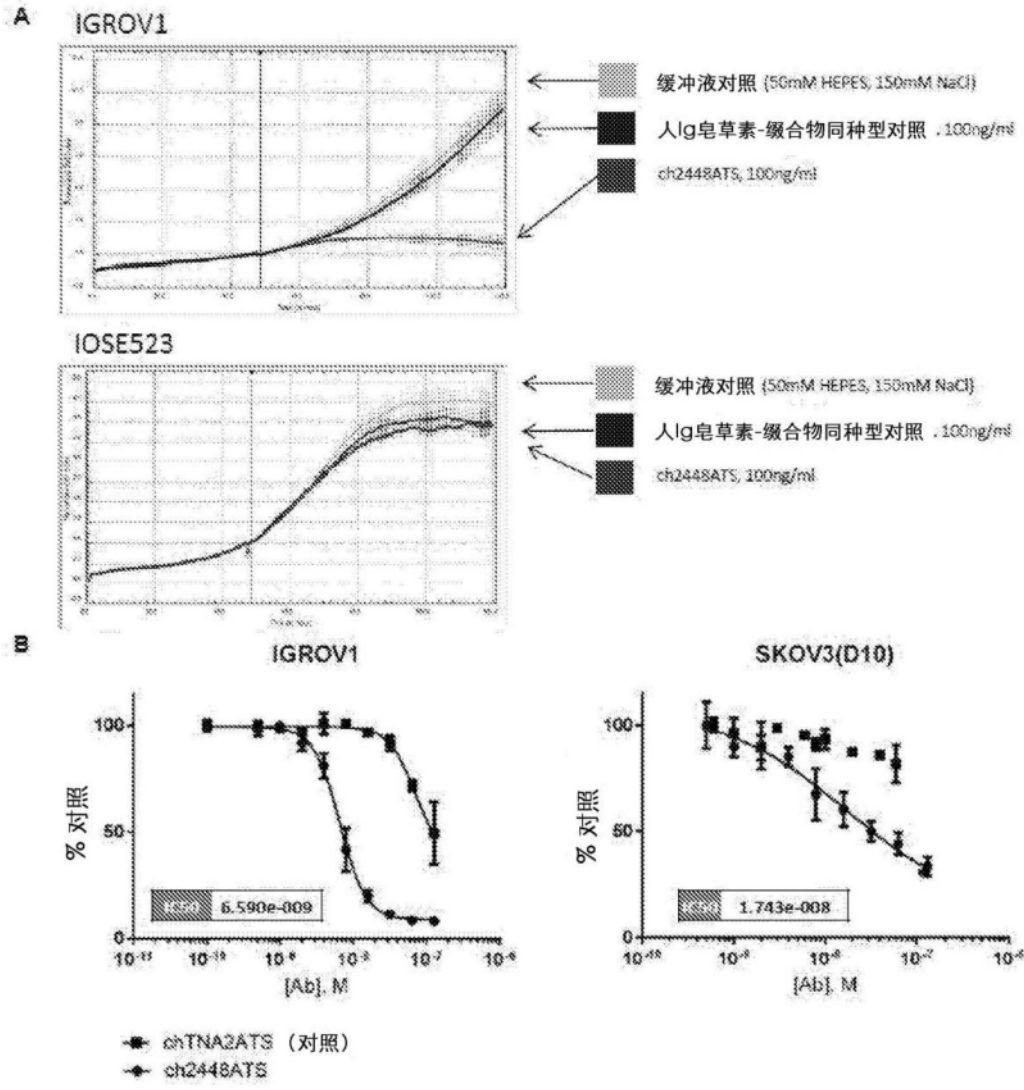
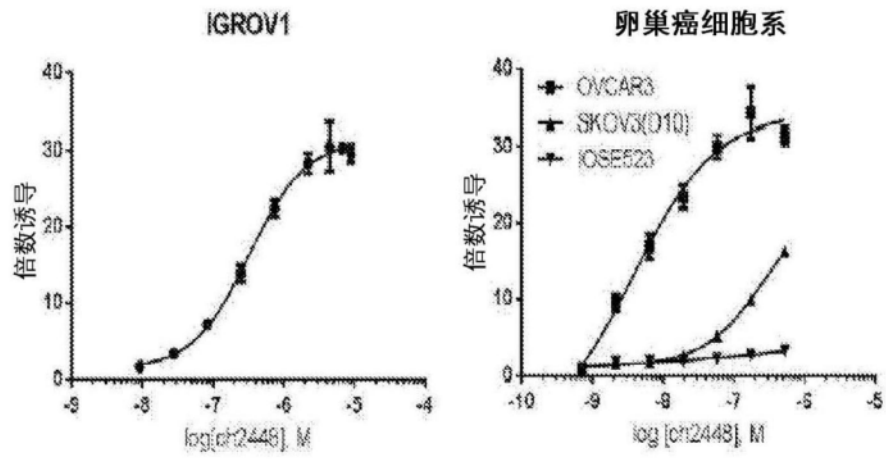


图19

A



B

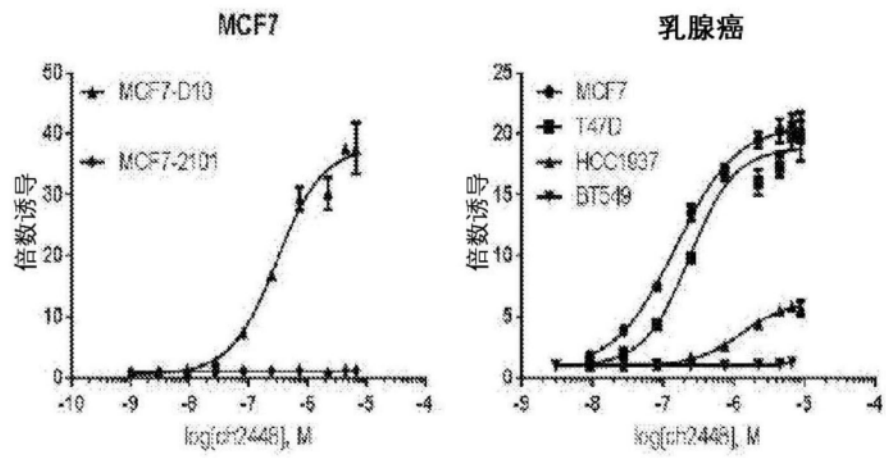


图20

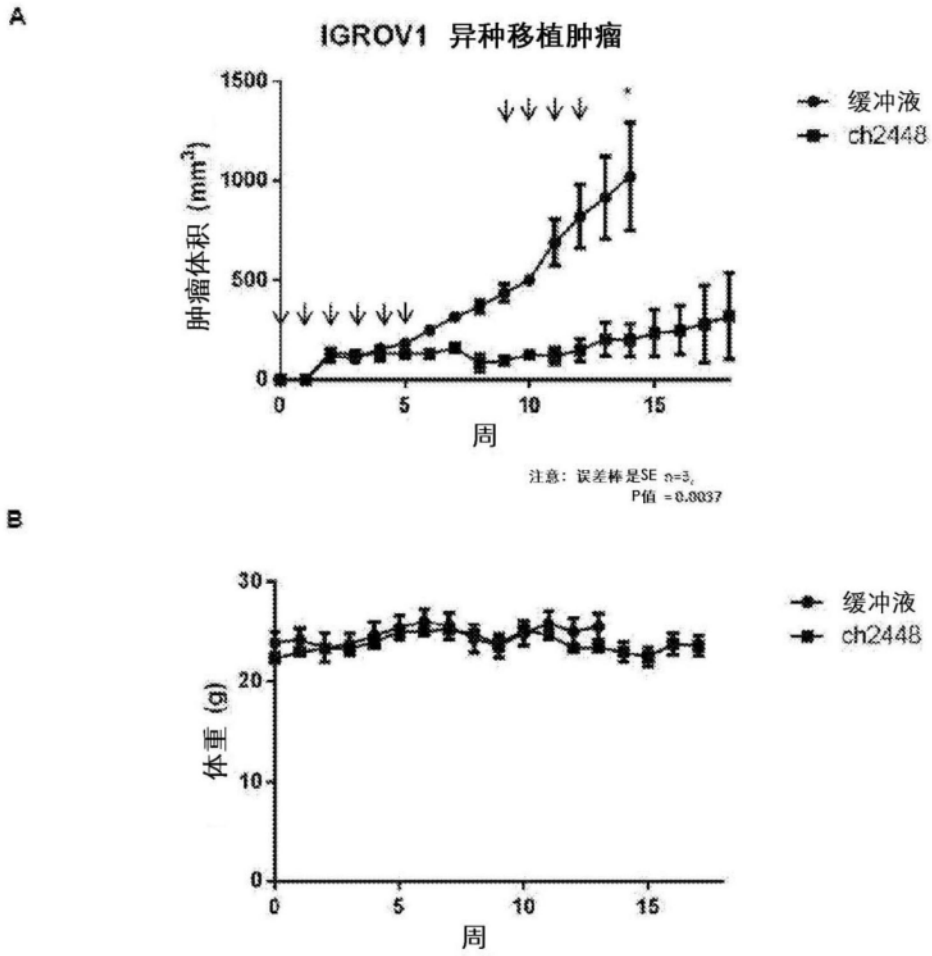


图21

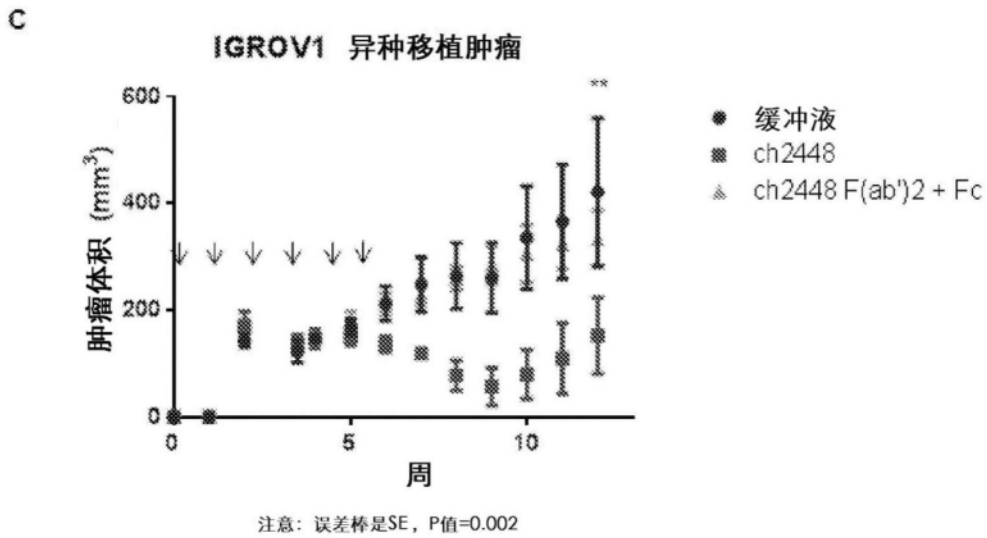
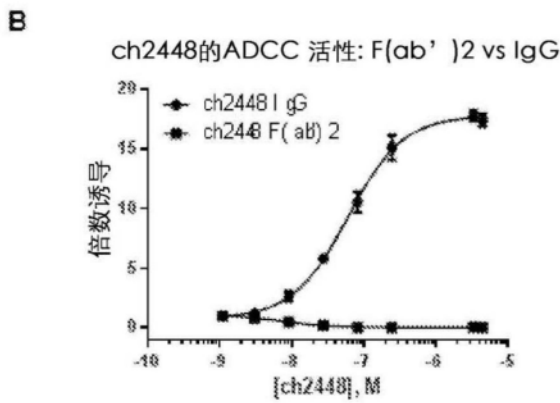
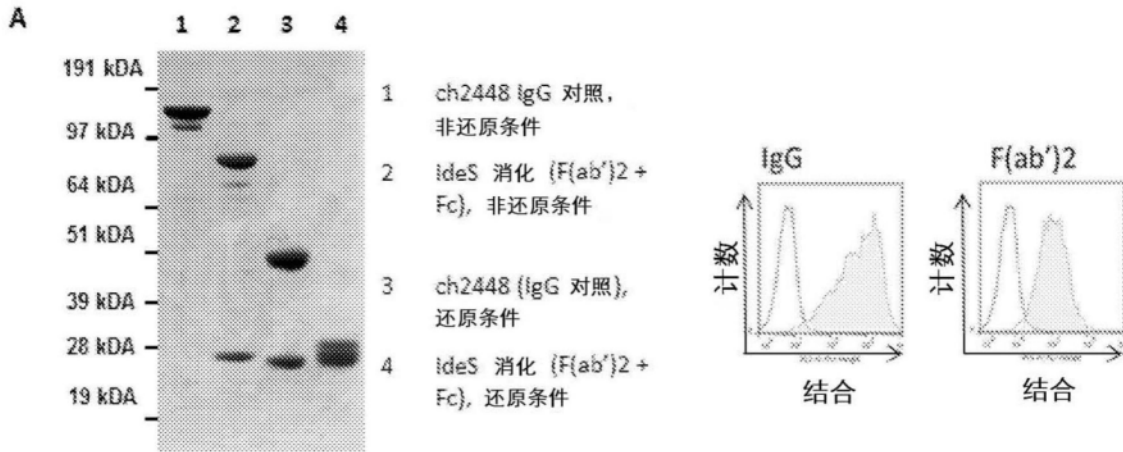


图22

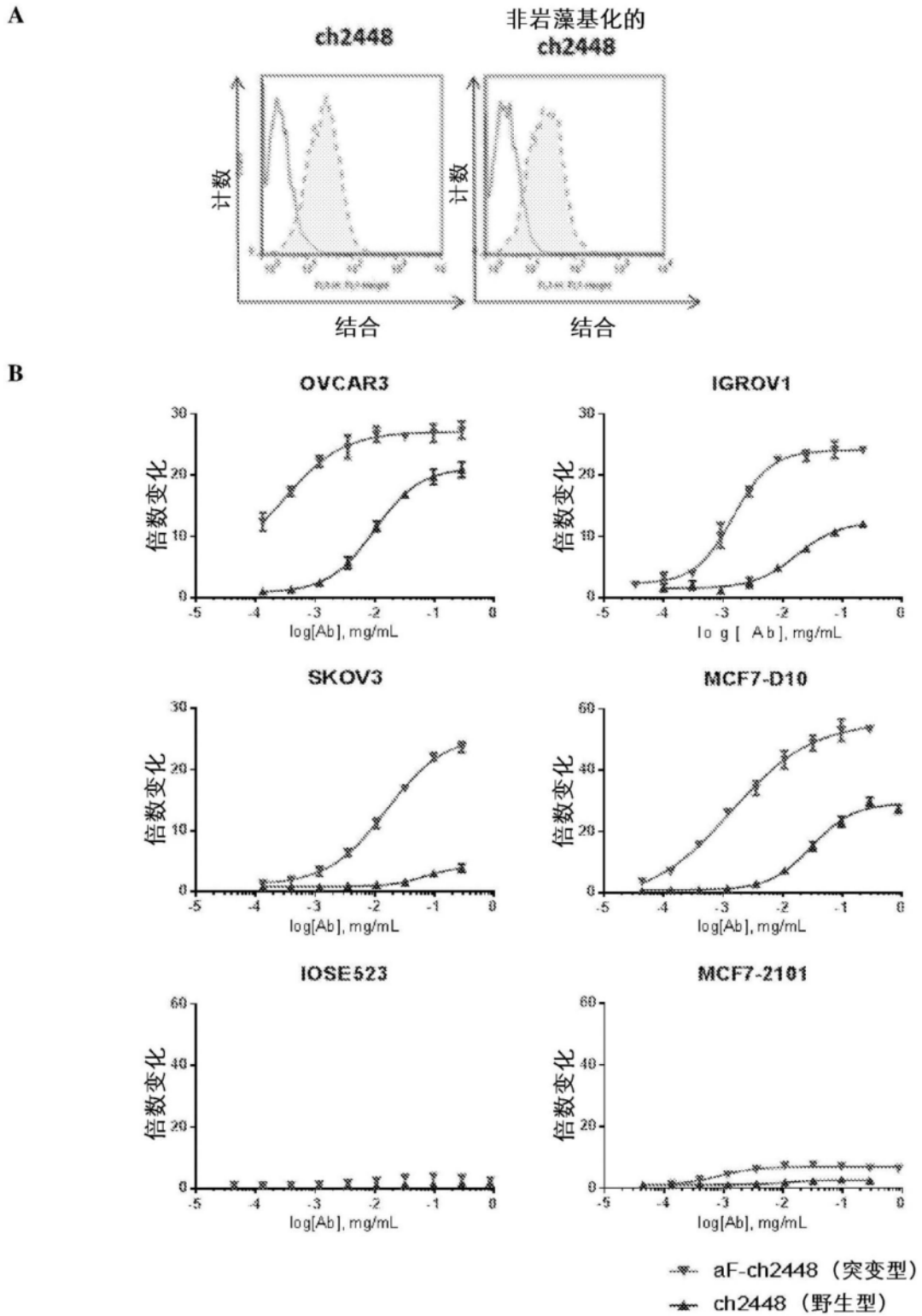


图23

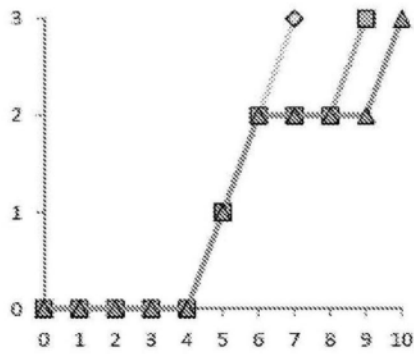
A

mAb 克隆	同种型	hESC	
		HES-3	EB
mAb2448	IgG1	+++	-

缩写词: +, 代表结合; +/-, 代表部分结合; -, 代表未结合; EB, 22天的胚状体

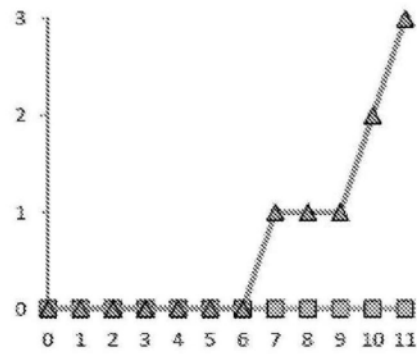
B

缓冲液对照



在注射到SCID小鼠之前, hESC与PBS预孵育。所有3只鼠上均发生畸胎瘤形成。

经处理的 2448



在注射到SCID小鼠之前, hESC与2488预孵育。3只鼠中的2只未形成畸胎瘤。

图24

A

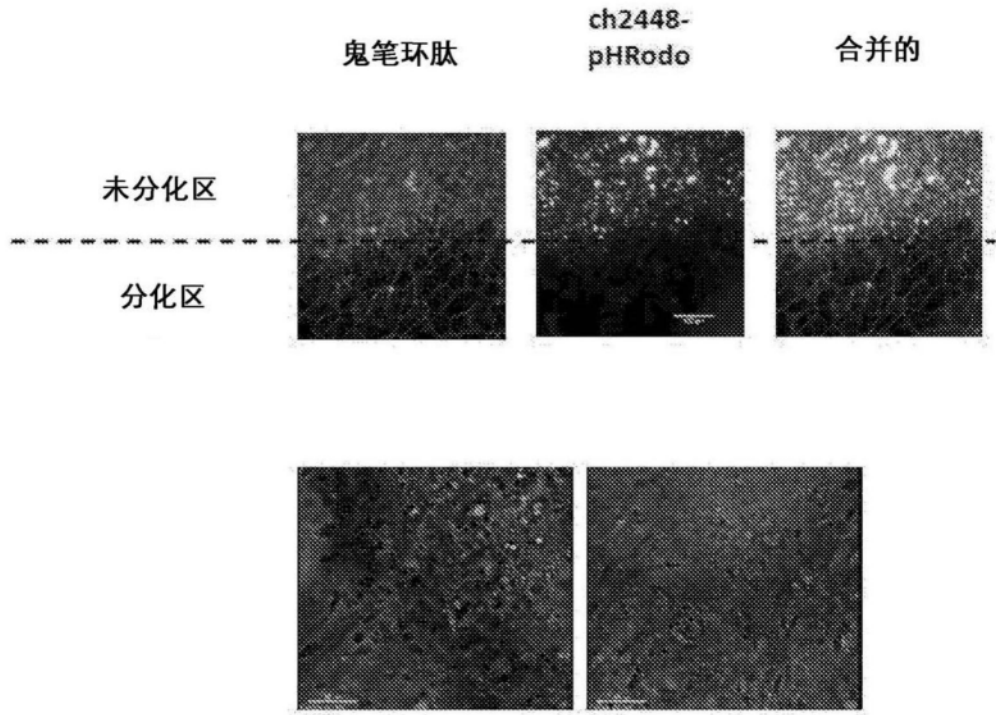


图25

B

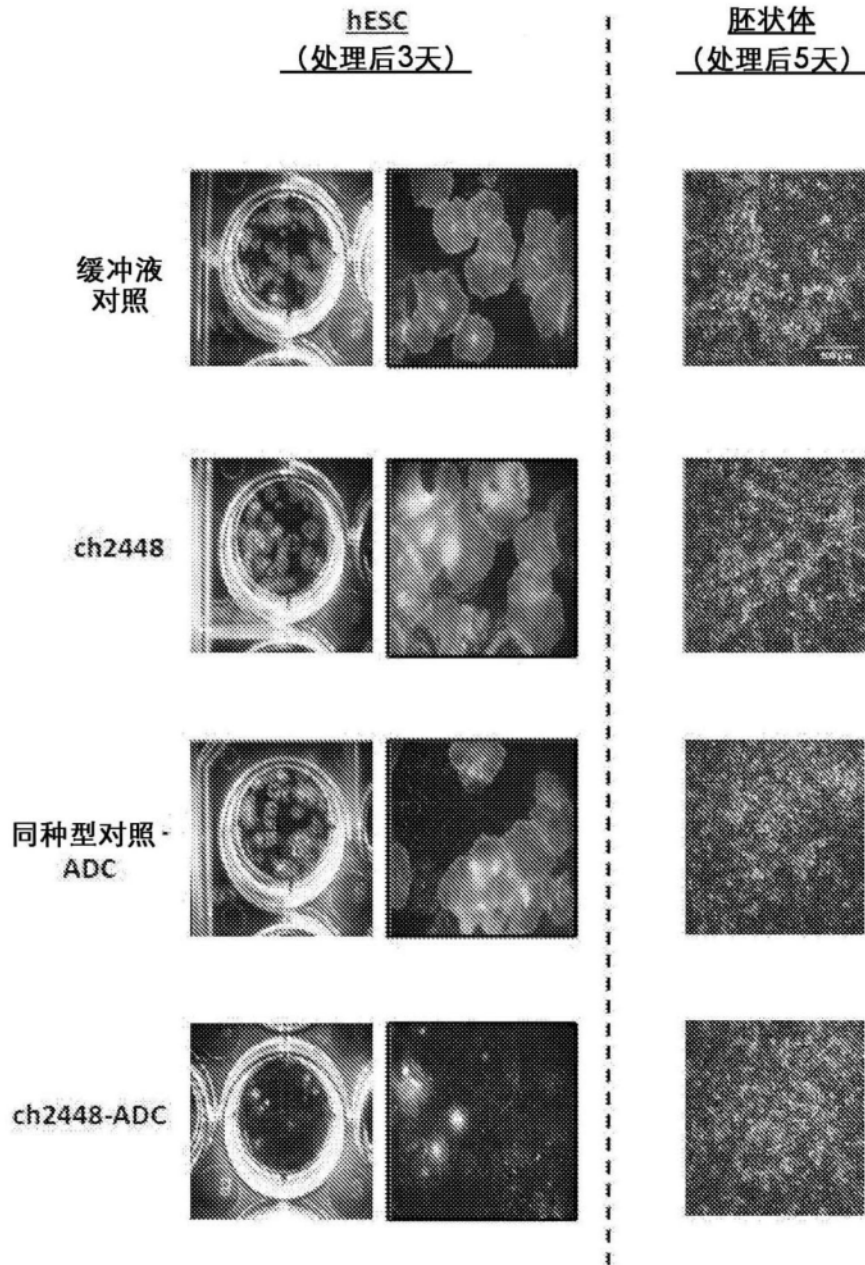


图25

c

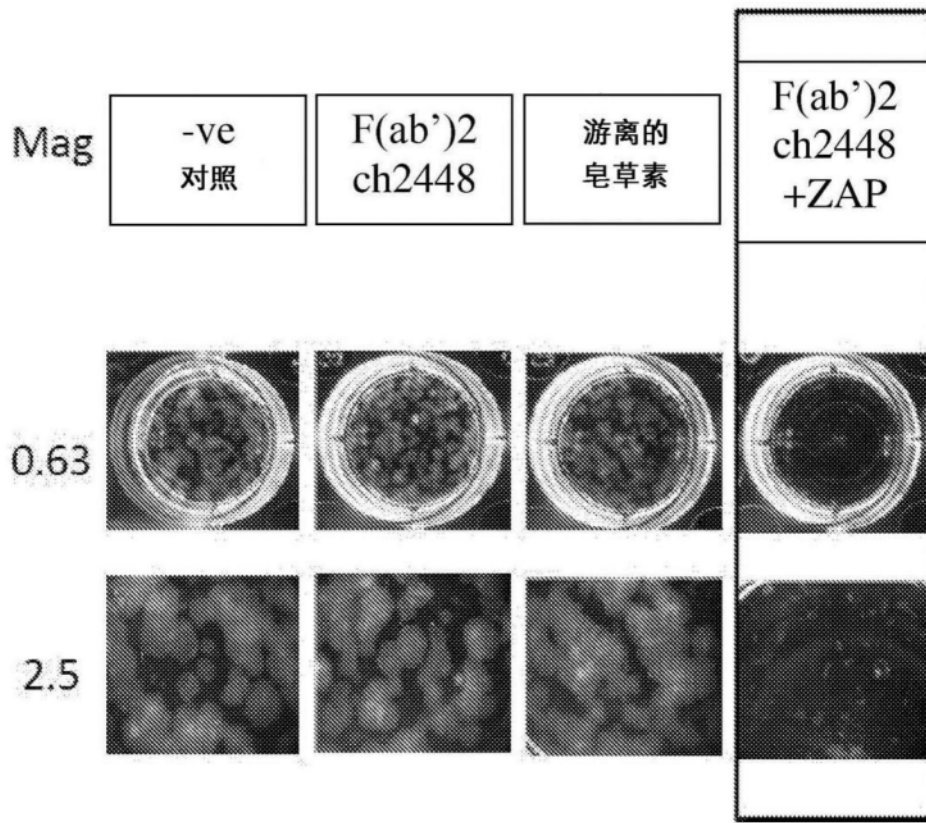


图25

A

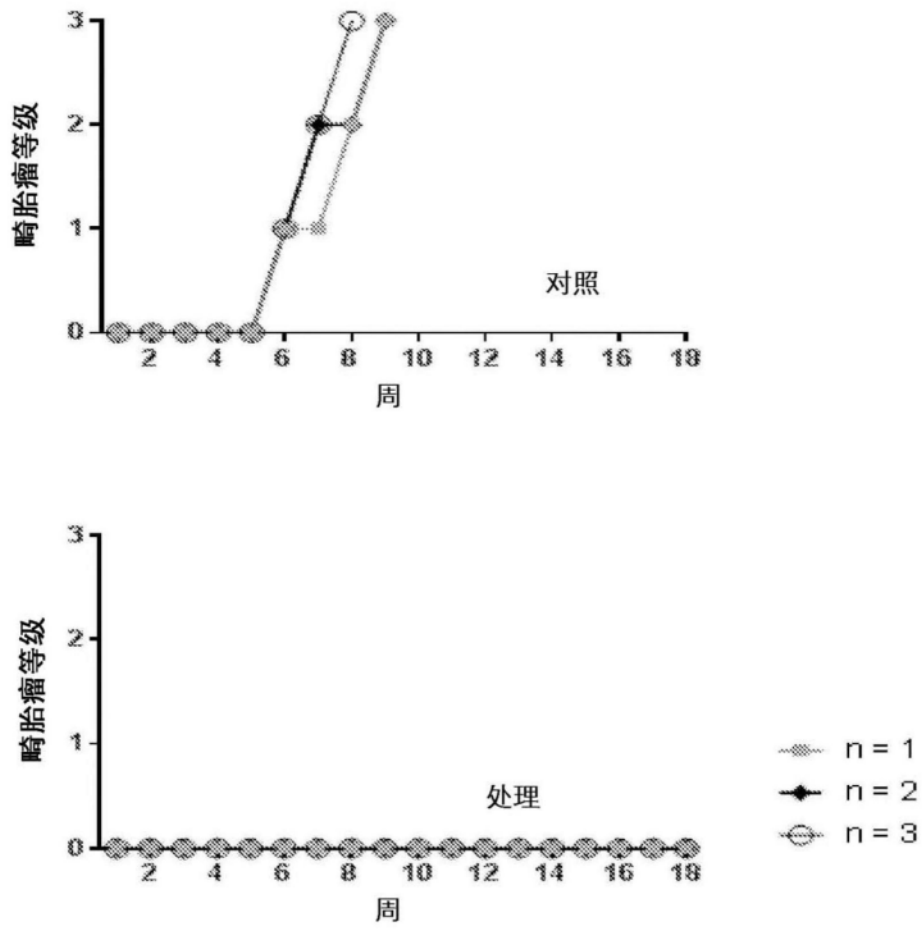


图26

B

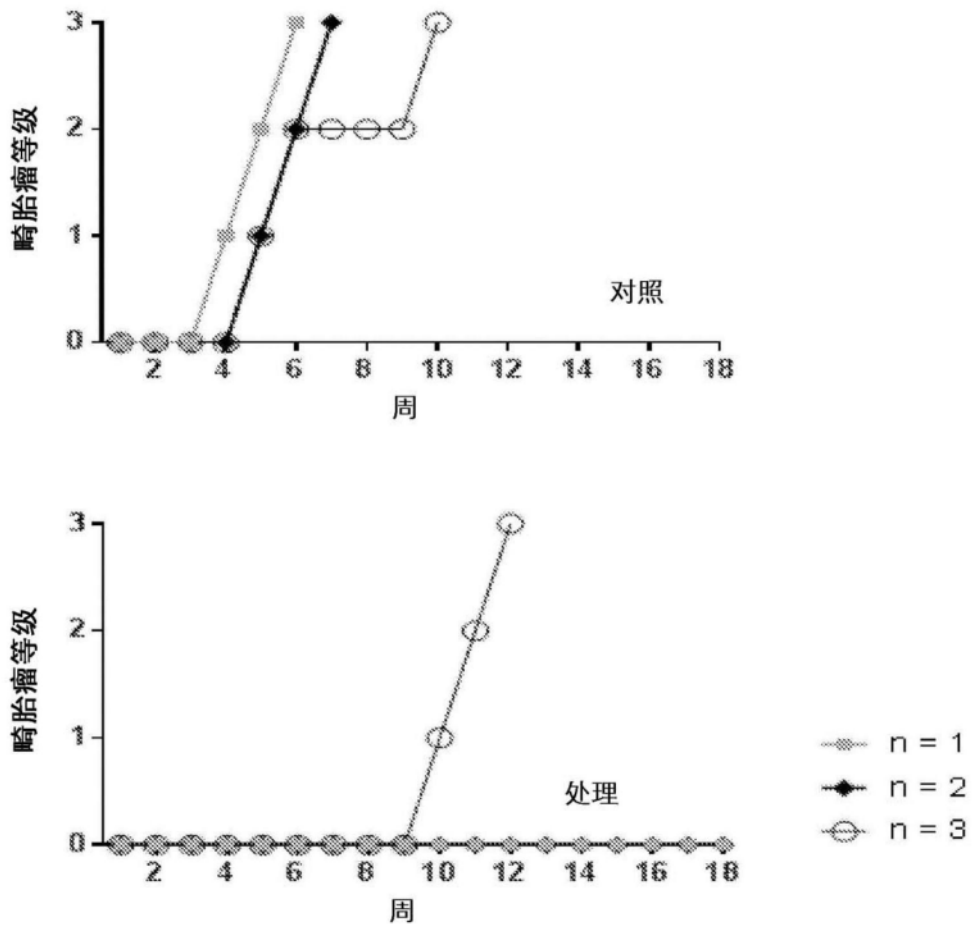


图26

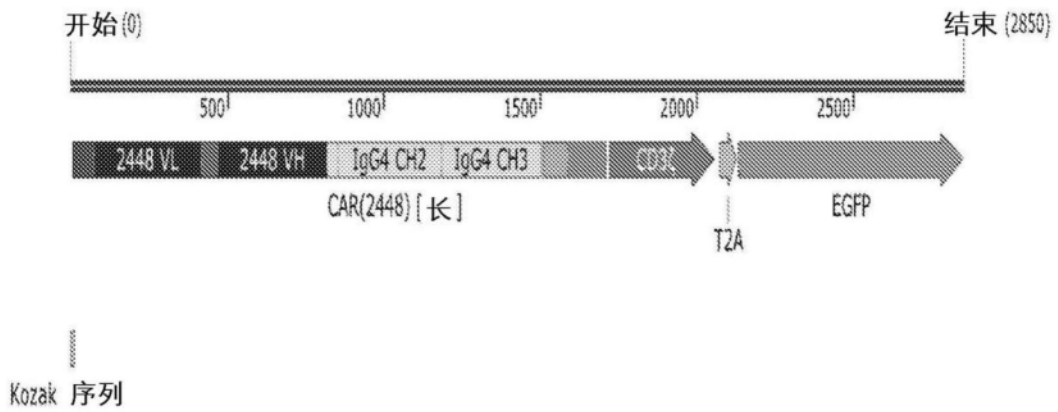


图27

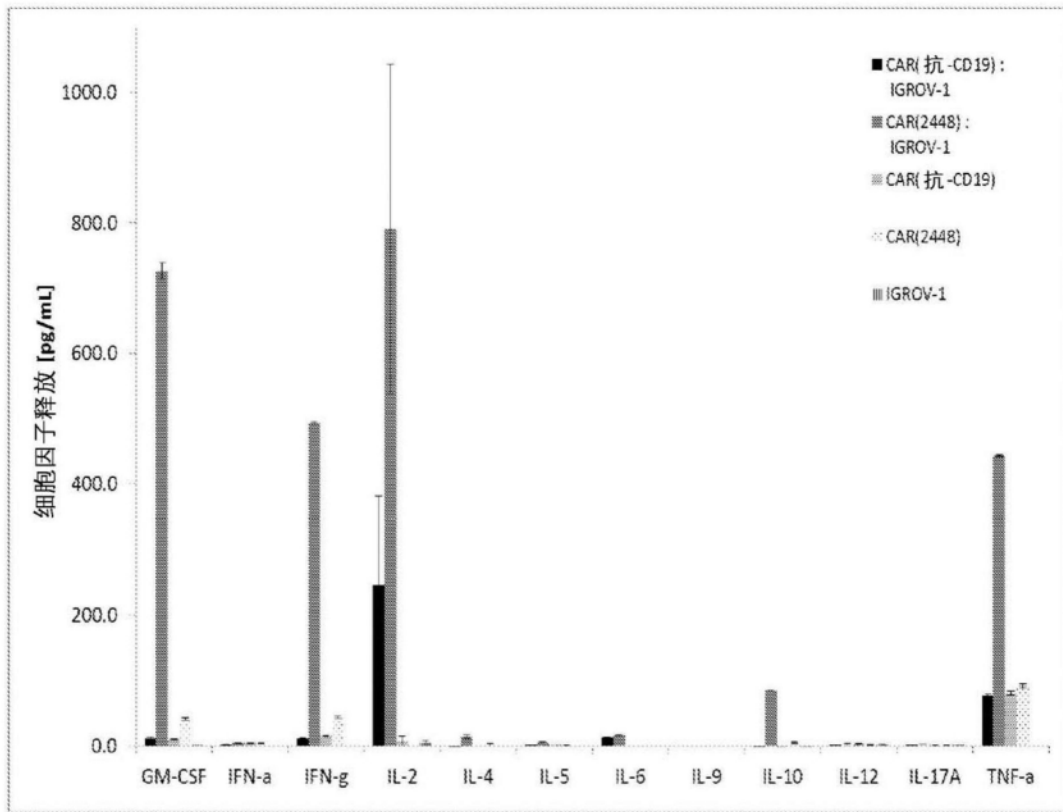


图28

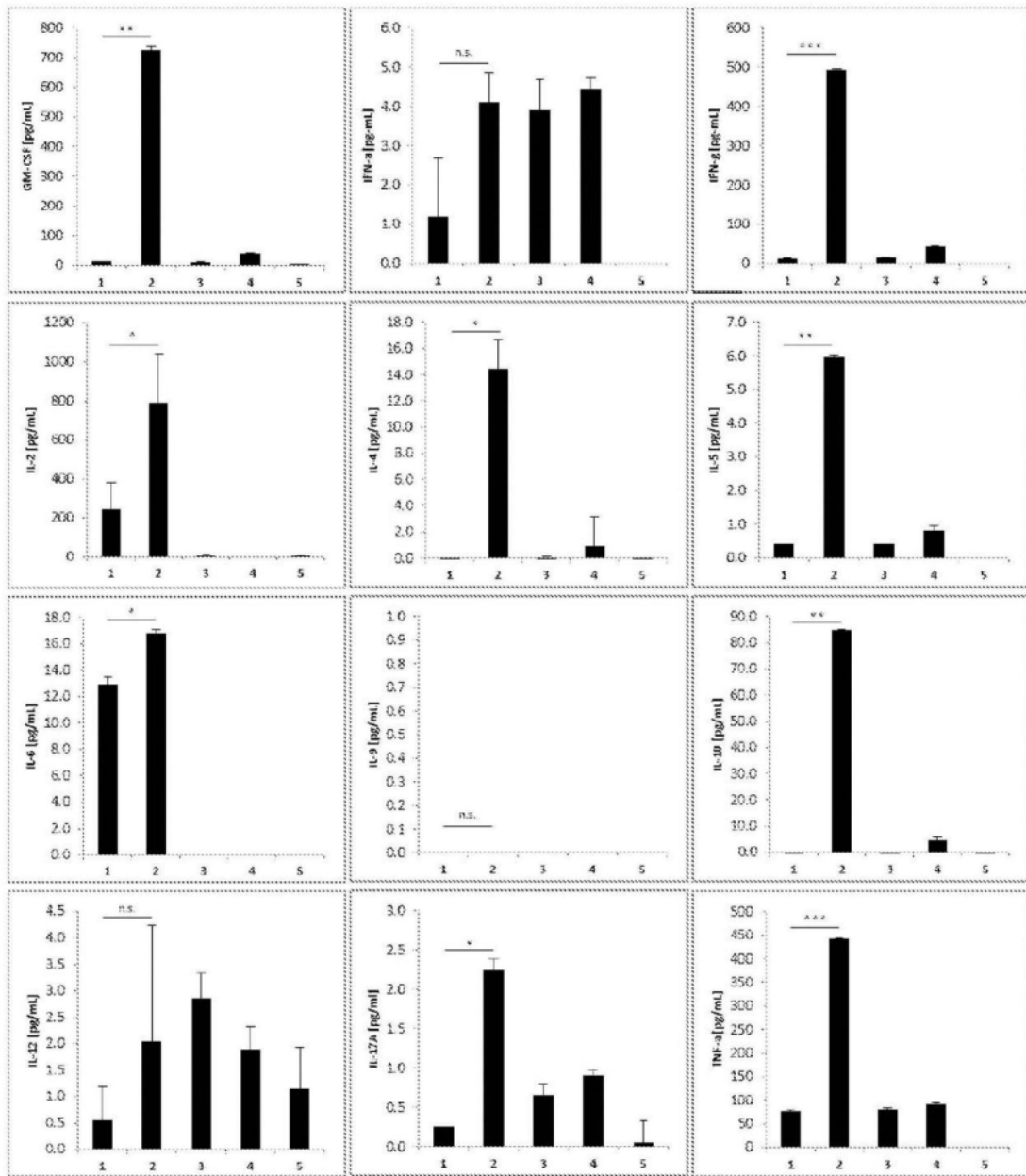


图29

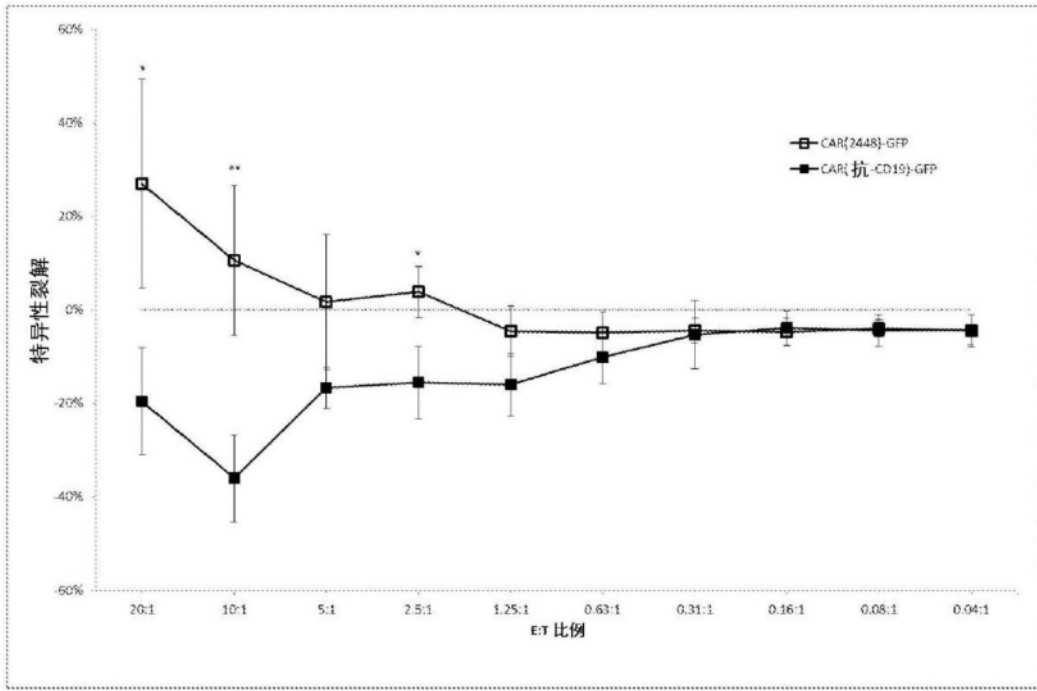


图30

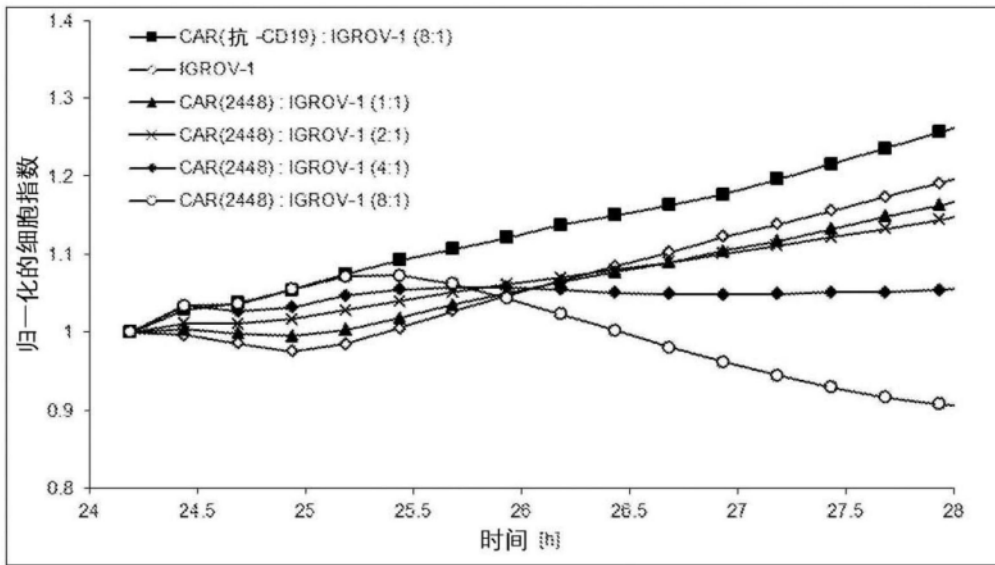


图31