

發明專利說明書

中文說明書替換本(99年3月)

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 93121655

※ 申請日期： 93.7.20

※IPC 分類： C07K16/18,

A61K 39/395,

A61P 35/00,

G01N 33/534, 33/574

一、發明名稱：(中文/英文)

RG1 抗體及其用途

RG1 ANTIBODIES AND USES THEREOF

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

德商先靈公司

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT

代表人：(中文/英文)

1. 安德列斯 波莎曼拉

BROSAMLE, ANDREAS

2. 席莫納 庫利拉

KURILLA, SIMONE

住居所或營業所地址：(中文/英文)

德國柏林市木勒街 178 號

178 MULLERSTRASSE, D-13342 BERLIN, GERMANY

國籍：(中文/英文)

德國 GERMANY

三、發明人：(共 5 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 理查 哈金斯
HARKINS, RICHARD
2. 黛伯拉 帕克斯
PARKES, DEBORAH
3. 勾登 派瑞
PARRY, GORDON
4. 里那堤 派瑞
PARRY, RENATE
5. 道格拉斯 史克奈德
SCHNEIDER, DOUGLAS

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 U.S.A.
2. 美國 U.S.A.
3. 英國 U.K.
4. 德國 GERMANY
5. 美國 U.S.A.



四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項第一款或第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2003年07月22日；60/489,032

2.

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於針對多肽RG1之新穎抗體，該RG1係優先表現於前列腺腫瘤細胞及其他腫瘤細胞中。詳言之，本發明係關於此等抗體用於治療及偵測癌症及癌轉移之用途。

【先前技術】

前列腺癌是男性常發生的疾病，因為約有三分之一年齡超過45歲的男性發現罹患前列腺癌。有證據顯示係遺傳及環境兩種原因所造成，而大多數病例是兩個因素結合所造成的結果。家族性癌症研究業已推論遺傳傾向性在約5-10%所有前列腺癌上有作用，且在約45%55歲以下男性之前列腺癌上有作用。

有證據證明，前列腺癌是以多階段疾病方式發展的，其中前驅病變之一是前列腺上皮內瘤形成 (prostatic intraepithelial neoplasia; PIN)。該疾病早期階段是男性荷爾蒙依賴性的，而後期階段則不依賴荷爾蒙。已知為良性前列腺增生的前列腺增生失調症在臨床上常常被偵測到，但可能不是在癌症發展中的階段，然而，其通常係與前列腺癌有關聯性。發生在前列腺的癌症通常為多病灶性的，一般而言成長緩慢，且為異質性。後期階段癌症常常會轉移至淋巴結及骨骼。

前列腺癌通常係藉由身體檢查及藉由血清中前列腺特異抗原 (PSA) 含量加以診斷的。徹底前列腺切除術 (radical prostatectomy) 是治療局部化疾病的選項。末期轉移症目前

係以藉由睪丸切除術或 GnRH(促性腺激素釋放激素)治療所誘發之抑制男性荷爾蒙療法及藉由抗男性荷爾蒙療法來治療。然而，末期疾病幾乎總是會變成對荷爾蒙具有抗性，且無法治癒進行性的疾病。除此之外，存在與徹底前列腺切除術及抑制男性荷爾蒙療法相關之嚴重副作用，此等副作用包括會發生與徹底前列腺切除術相關之高風險失禁與陽痿，及與抑制男性荷爾蒙療法相關之骨折與骨質疏鬆症。

因此，極需針對早期及晚期前列腺癌二者的新治療方法，亦明顯需要新診斷藥劑，因為其會明顯影響治療的選項。例如，若疾病已發展到前列腺之外且已轉移至淋巴結，則不採用徹底前列腺切除術，因為該療法對惡化的疾病沒有效果，但卻具有顯著非吾人所樂見之副作用。可偵測活體內轉移的藥劑是具有重要價值。

特異蛋白質表現的變化業已在前列腺癌中得到證實，包括後期前列腺癌之異常 p53 表現、TGF- β 受體含量之降低，E-鈣黏附蛋白(E-cadherin)、C-Cam(細胞黏附分子)及數種整合素(integrin)含量之降低。致癌基因 bcl-2 之表現在後期男性荷爾蒙獨立型腫瘤中會劇烈上升，且表現高含量 bcl-2 患者的預後相對較差。雖然前述基因表現之變化有良好文獻記錄，但尚未證實基因表現的變化為引起疾病之原因。因此，識別出其表現與前列腺腫瘤之存在或發展有關之新蛋白質是有用的，其可作為針對前列腺癌診斷及治療之組合物的分子目標。

多肽 RG1(參看美國專利第 5,871,969 號)是 Mindin/

F-spondin 家族之同質物，其係胞外基質蛋白質。RG1 多肽經證明可高度表現在前列腺組織中(參看 WO 98/45442)，且應作為用以診斷及治療前列腺癌及其他表現 RG1 多肽之癌症的有用標的物。

【發明內容】

本發明提供針對 RG1 多肽具有高度選擇性之抗體或其鍵結-抗原之抗體片段、或其變體，該等可用於偵測與 RG1 表現相關病狀(諸如前列腺癌、腎癌、結腸癌或卵巢癌)之偵測方法及此等病狀之治療。

為此，本發明一目的為提供可特異性地結合至存在於 RG1 多肽中之抗原決定部位(SEQ ID NO:2)的經分離抗體或其鍵結-抗原之抗體片段或其變體。特佳者係以小於或等於 $1 \mu\text{M}$ 、更佳者小於或等於 100 nM ，且最佳者小於或等於 10 nM 之解離常數(K_D)而結合至 RG1 多肽之抗原決定部位的人類抗體。

根據本發明進一步之較佳實施例係提供經分離抗體及其鍵結-抗原之抗體片段，其包括含有 SEQ ID NO:26 或 SEQ ID NO:29 胺基酸序列之輕鏈可變區。

本發明亦提供經分離抗體及其鍵結-抗原之抗體片段，其包括含有 SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:31 胺基酸序列之重鏈可變區。特佳實施例為人類抗體，其包含具有 SEQ ID NO:26 胺基酸序列之輕鏈可變區，及具有 SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:28 胺基酸序列之重鏈可變區。另一特佳實施例為人類抗體，其包含具有 SEQ ID

NO:29胺基酸序列之輕鏈可變區，及具有SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31胺基酸序列之重鏈可變區。

在本發明進一步之態樣中，具有與前述胺基酸序列80%一致的胺基酸序列之輕鏈可變區及重鏈可變區亦涵蓋在內。

本發明亦提供編碼前述抗體輕鏈及重鏈可變區之核苷酸序列。較佳者為包括藉由包含SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:23核苷酸序列編碼之輕鏈可變區的抗體。同樣較佳者為包括藉由包含SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25核苷酸序列編碼之重鏈可變區的抗體。

根據本發明此態樣之特定較佳實施例，該等抗體係經共軛至可偵測標記，以作為投藥至試管中細胞、活體外細胞及活體內細胞或投藥至多細胞機體之診斷劑。特佳者係與放射性標記、酵素、發色團、螢光劑共軛之抗體。特佳偵測方法為免疫閃爍掃描法及正子放射斷層攝影術，其中免疫閃爍掃描法所用之抗體係與放射性同位素(例如¹¹¹In或^{99m}Tc)共軛，或正子放射斷層攝影術所用之抗體係與⁴³Sc、⁴⁴Sc、⁵²Fe、⁵⁵Co、⁶⁸Ga、⁶⁴Cu、⁸⁶Y或^{94m}Tc共軛。

在本發明另一態樣中係提供與例如蓖麻蛋白或放射性同位素之治療劑共軛之抗體，其係用於投藥至試管內細胞、活體外細胞及活體內細胞或投藥至多細胞有機體。有關於此，較佳者為具有細胞毒性的治療劑。特佳治療劑為與放射性同位素(例如⁹⁰Y及¹⁷⁷Lu)共軛之抗體。在關於此之特定較佳實施例係投與人類患者此等共軛抗體，以治療具有藉

由RG1表現為特徵之病狀，例如前列腺癌，及詳言之，為末期轉移性前列腺癌。

本發明另一態樣係RG1抗體或其結合抗原片段與可偵測標記或細胞毒素劑之共軛作用可藉由使用選自由下列各物組成之群的螯合劑來完成：對-SCN-苄基-DTPA及其衍生物，1,4,7,10-四氮雜環十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA)及其衍生物，及1,4,7-三氮環壬烷-N,N',N''-四乙酸(NOTA)及其衍生物。

本發明另一態樣係治療與RG1多肽表現相關病狀(例如前列腺癌)之方法，其係使用本發明免疫共軛物。

本發明另一態樣係偵測與RG1多肽表現相關病狀(例如前列腺癌)之方法，其係使用本發明免疫共軛物。

本發明另一態樣係提供肽及抗個體基因型抗體，其可用以刺激免疫反應。

熟習此項技術者從下文所描述者可容易地瞭解本發明其它目的、特徵、優勢及態樣。但是應當瞭解，下文所描述及特定實施例在指示本發明較佳實施例時僅以說明之方式給出。熟習此項技術者閱讀下文所描述及本發明其它部分將可輕易地瞭解本發明精神及範疇內的各種變化及修改。

【實施方式】

定義

如同本專利說明書、實例及附加之申請專利範圍中所使用，除非另有不同說法，否則下列術語具有經指示的含義。

"rg1"係指具有SEQ ID NO:1中所示序列之聚核苷酸及編

碼具有 SEQ ID NO:2 中所示 RG1 胺基酸序列之多肽的聚核苷酸；及係指編碼 RG1 變體、衍生物及片段及變體與衍生物之片段的聚核苷酸。*rgl* 亦係指由 RNA 組成此類聚核苷酸，以及係指編碼 SEQ ID NO:2 中所示多肽序列的聚核苷酸之補碼 (complement) 的聚核苷酸。

"RG1" 係指具有 SEQ ID NO:2 中所示胺基酸序列的多肽、其變體及衍生物，以及 SEQ ID NO:2 之片段、其變體及衍生物。當關連到 SEQ ID NO:2 多肽時之術語 "變體"、"片段" 及 "衍生物" 意指為本質上保有與 SEQ ID NO:2 之多肽相同的生物及 / 或免疫活性之多肽。

"生物活性" 係指自然存在的 RG1 多肽之結構性、調節性或生化性功能。

"免疫活性" 係指 (1) 自然、重組或合成 RG1 或其任意片段在適當動物或細胞中可引發特定免疫反應及與特定抗體結合之能力，或 (2) RG1 抗體在活體內與 RG1 結合及引發 RG1 表現組織或腫瘤之增強細胞免疫反應的能力。

"自然存在之 RG1" 係指未經基因工程設計之人體細胞所產生之 RG1，且特定地涵蓋各種起源於多肽之轉譯後改質的 RG1 形式，其中改質包括 (但不限於) 乙醯化、羧化、糖基化、磷酸化、脂化、醯化及裂解。

"天然 RG1" 或 "nRG1" 係指為其天然構型之 RG1。

"聚核苷酸" 通常係指任何聚核糖核苷酸或聚脫氧核糖核苷酸，其可為未經改質之 RNA 或 DNA，或經改質之 RNA 或 DNA。因此，舉例而言，本專利說明書所用之聚核苷酸尤

其係指單股及雙股DNA、單股及雙股區之混合DNA、單股及雙股RNA，及單股及雙股區之混合RNA，包含單股、或更通常為雙股、或單股與雙股區混合的DNA及RNA之雜交分子。此外，本專利說明書所用之聚核苷酸係指包含RNA或DNA或RNA及DNA兩者的三股區域。此等區域之股可源自相同分子或不同分子。該等區域包括所有一或多種分子，但更通常僅涉及一區域之若干分子。三螺旋區域其中之一的分子通常為寡核苷酸。

如本專利說明書所用之術語"聚核苷酸"包括前述DNA或RNA，其包含一或多種改質鹼基(modified base)。因此，具有為穩定性或其它原因而經改質之主鏈的DNA或RNA係為本專利說明書術語所指之"聚核苷酸"。此外，包含奇特鹼基(例如肌苷)或改質鹼基(例如經氙標記之鹼基)之DNA或RNA為本專利說明術語所指之聚核苷酸(僅舉出兩個實例)。

應瞭解，為了諸多熟習此項技術者所知之目的，對DNA及RNA已作出各式各樣的改質。本專利說明書採用術語"聚核苷酸"包含此等以化學性、酵素性或新陳代謝性方式改質之聚核苷酸形式，以及具有病毒及細胞(包括簡單及複雜細胞)中DNA及RNA特性之化學形式。

"寡核苷酸"係指相對較短之聚核苷酸，通常該術語係指單股脫氧核糖核苷酸，但其尤其亦可指單股或雙股核糖核苷酸、RNA:DNA雜交及雙股DNA。寡核苷酸(例如單股DNA探針寡核苷酸)通常係藉由化學方法加以合成，例如在自動化寡核苷酸合成儀上所進行之方法。但是，寡核苷酸可藉

由各種其它方法來製得，包括試管內重組DNA介導之技術，及藉由DNA在細胞及組織中之表現。"寡核苷酸"或"寡聚物"或聚核苷酸"片段"、"部分"，或"片段"係指至少約10個核苷酸及至多60個核苷酸之聚核苷酸序列，較佳為約15至30個核苷酸，且更佳為約20-25個核苷酸。

如本專利說明書所用之"多肽"包括下述所有的多肽。多肽之基本結構在此項技術中為吾人所熟知且已描述於無數教科書及其它出版物中。在本專利說明書，本文中該術語係指任何包含兩或多個經由肽鍵在直鏈中彼此接合之胺基酸的肽或蛋白質。如本文所使用，該術語係指短鏈(在此項技術中其通常亦稱為，例如，肽、寡聚肽及寡聚物)及較長鏈(此項技術中其一般稱為蛋白質，具有多種類型)中之兩者。

咸應瞭解，多肽常常含有常稱為20自然存在胺基酸之20胺基酸以外的胺基酸，及在特定胺基酸中經改質之諸多胺基酸(其係藉由例如糖基化及其它轉譯後改質之自然方法或者藉由此項技術中熟知之化學改質技術來進行)。普通性改質包括糖基化、脂附著、硫酸鹽化、穀胺酸殘基之 γ -羧化，羥基化及ADP-核糖基化，且此等及其它方法描述於大多數基本教材中，例如，I.E. Creighton, *Proteins-Structure and Molecular Properties*, 第2版，W.H. Freeman and Company, New York, 1993。許多關於此主題的詳細評論是公開可取得的，例如 Wold, F.之 *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson 編著，Academic Press, New York,

第 1-12 頁, 1983; Seifter 等人, *Meth. Enzymol.* 182: 626-646, 1990 及 Rattan 等人, *Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663: 48-62, 1992 中所提供者。

咸應瞭解, 一如吾人所熟知且如前述, 多肽並非總是完全直鏈的。例如, 多肽可因為泛素化作用 (ubiquitination) 而具有支鏈, 且其通常會因為轉譯後情況 (包括自然發生情況及因人為處理所引起的非自然發生情況) 而成為具有或不具有支鏈的環。環狀多肽、具支鏈多肽及具支鏈之環狀多肽可藉由非轉譯自然方法及藉由完整性合成方法加以合成。

改質可以發生在多肽中的任意位置, 包括肽主鏈、胺基酸側鏈及胺基或羧基終端。實際上, 以共價方式改質而封阻多肽中胺基或羧基或兩者在自然存在之多肽及合成多肽中是常見的, 且此等改質作用亦可存在於本發明多肽中。例如, 於 *E. coli* 中蛋白水解過程之前所製得之多肽的胺基終端殘基幾乎總是為 N-甲醯甲硫胺酸。

出現於多肽中之改質作用通常具有的功能是視其如何製得。對於 (例如) 藉由在宿主中表現選殖基因而製得之多肽而言, 改質之性質及程度大部分將取決於宿主細胞轉譯後改質能力及存在於多肽胺基酸序列中之改質訊號。例如, 如吾人所熟知, 糖基化作用常常不會出現在細菌宿主 (例如 *E. coli*) 中。據此, 當糖基化作用有需要時, 多肽應在可進行糖基化的宿主中表現, 通常是真核細胞。昆蟲細胞常會執

行與哺乳動物細胞相同之轉譯後糖基化作用，且因此，業已發展出昆蟲細胞表現系統，以有效地表現出其中具有天然樣式的糖基化哺乳動物蛋白質。類似的考量應用至其他的改質作用。

一般而言，如本文所使用，多肽一詞涵蓋所有該等改質，特別是這些存在於藉由在宿主細胞表現出聚核苷酸所合成之多肽的改質。

"衍生物"係指分別衍生自自然存在之 *rg1*、RG1 或源於結合抗體之 RG1 的聚核苷酸或多肽，其係藉由化學方式改質，例如泛素化、標記(例如，以放射性核、各種以酵素方式的改質作用)、聚乙二醇化(pegylation)(藉由聚乙二醇進行之衍生作用)或藉由插入或取代，例如鳥胺酸之胺基酸(或取代編碼例如胺基酸的核苷酸)來實現，其通常不會發生於人類蛋白質中。

如本文所使用之"編碼多肽之聚核苷酸"涵蓋包括編碼本發明多肽序列的聚核苷酸，尤其是具有 SEQ ID NO:2 所示胺基酸序列的 RG1 多肽。該術語涵蓋包括編碼多肽之單獨連續區或非連續區(例如，被內含子中斷)及額外之區的聚核苷酸。

多肽"片段"、"部分"，或"片段"為一段至少約 5 個胺基酸之胺基酸殘基，通常為至少約 7 個胺基酸，典型為至少約 9 至 13 個胺基酸，且在各種實施例中為至少約 17 個或更多胺基酸。"片段"係指具有與前述 RG1 多肽或 RG1 之抗體及其變體或衍生物之胺基酸序列部分(但並非全部)完全相同之胺

基酸序列的多肽。

將"缺失(deletion)"定義為聚核苷酸或胺基酸序列之任一者中之變化，其中分別缺少一或多個聚核苷酸或胺基酸殘基。

"插入(insertion)"或"加成(addition)"係導致分別加成一或多個聚核苷酸或胺基酸殘基的聚核苷酸或胺基酸序列與自然存在之聚核苷酸或胺基酸序列相比較而言之變化。

"取代"導因於分別以不同的聚核苷酸或胺基酸置換一或多個聚核苷酸或胺基酸所產生。

如本文所使用之術語聚核苷酸或多肽之"變體"如下文及本揭示內容之其它地方詳盡描述。

聚核苷酸變體為其中聚核苷酸序列與參考聚核苷酸不同之聚核苷酸。一般而言，差別是有限的，因此參考聚核苷酸與變體聚核苷酸序列整體而言非常相似，且在許多區域是相同的。

變體聚核苷酸序列的改變可能是靜止的。意即，其可能不會改變由該聚核苷酸所編碼之胺基酸。當改變限於此類靜止變化時，變體將會編碼與參考聚核苷酸相同的胺基酸序列之多肽。亦如下所述，變體聚核苷酸序列中的變化可能會改變由參考聚核苷酸所編碼之多肽的胺基酸序列，此等聚核苷酸變化會導致參考序列所編碼之多肽中的胺基酸產生下文討論之取代、加成、缺失、融合及切斷。

多肽變體為其中胺基酸序列不同於參考多肽之多肽。一般而言，差別是有限的，因此參考多肽與變體多肽的序列

在整體而言是非常相似，且在許多區域是相同的。變體多肽及參考多肽之胺基酸序列可能因一或多個取代、加成、缺失、融合及切斷(其可能以存在任何組合)而不同。編碼此等相同或相似多肽之重組變體係藉由使用遺傳密碼中之"冗餘密碼"加以合成或選擇。可將各種密碼子取代作用(諸如，可產生各式限制酵素作用位置之靜止變化)引入選殖至最佳化質粒或病毒載體或特定原核或真核系統中之表現。亦可引入突變以改質多肽之特性，以改變結合配位體之親合性、鏈間親合性或多肽退化性或週轉率。

如本文中所討論，本發明所包括之多肽、抗體或免疫球蛋白分子之胺基酸序列中的次要變化也涵蓋其中，其限制條件為該胺基酸序列變化維持在原始序列至少80%，更加為至少85%、90%、95%，且最佳為99%。詳言之，保守胺基酸序列之置換涵蓋在內。保守胺基酸置換發生在其側鏈相聯之胺基酸家族內的置換。基因性編碼之胺基酸通常分為下列家族：(1)酸性(天門冬胺酸、穀胺酸)；(2)鹼性(賴胺酸、精胺酸、組胺酸)；(3)非極性(丙胺酸、纈胺酸、亮胺酸、異亮胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、蛋胺酸、色胺酸)；及(4)不帶電荷極性(甘胺酸、天冬醯胺酸、穀醯胺、半胱胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸)。更佳之家族為：絲胺酸及蘇胺酸為脂族羥基族；天冬醯胺及穀醯胺為含胺基族；丙胺酸、纈胺酸、亮胺酸及異亮胺酸為脂族；且苯丙胺酸、色胺酸及酪胺酸為芳香族。例如，合理地認為以異亮胺酸或纈胺酸隔離取代亮胺酸，以穀胺酸取代天門冬胺酸，以絲胺酸

取代蘇胺酸，或以結構上相關聯之胺基酸進行相似胺基酸取代而不會對所得分子之結合性或特性產生主要影響，特別是如果該取代並未涉及結構位置內之胺基酸。藉由比較多肽衍生物與未改質多肽之特異活性，可輕易地確定具有功能的肽中胺基酸是否有變化。為本發明應用之目的，本發明涵蓋所主張之抗體的變體，其保持低於1 μM 之對RG1抗原決定部位之結合親合性(K_D)。

使用下列術語描述兩個或多個以上的聚核苷酸或胺基酸序列之間的序列關係："參考序列(reference sequence)"、"比較窗口(comparison window)"、"序列一致性(sequence identity)"、"序列一致性百分比"、"大體一致性(substantial identity)"、"相似性(similarity)"及"同質性(homologous)"。"參考序列"是作為序列比較基礎之經界定序列；參考序列可能是較大序列之子集(subset)(例如，一如全長cDNA或序列列表中給定之基因序列之片段)，或可能包含完整cDNA或基因序列。一般而言，參考序列長度至少18個核苷酸或6個胺基酸，常常長度為至少24個核苷酸或8個胺基酸，且長度通常至少48個核苷酸或16個胺基酸。因為兩個聚核苷酸或胺基酸序列可能各自(1)包含於兩分子之間相似的序列(意即完整聚核苷酸或胺基酸序列之部分)，且(2)可進一步包含於兩聚核苷酸或胺基酸序列之間分歧的序列，所以兩(或更多)分子間的序列之比較通常係藉由在"比較窗口"上比較兩分子之序列以識別及比較序列相似性之局部區域來完成。如本文所使用之"比較窗口"係指至少18個鄰近核苷

酸位置或6個胺基酸之概念上的片段，其中聚核苷酸序列或胺基酸序列可與至少18個鄰近核苷酸或6個胺基酸序列之參考序列比較，且其中比較窗口中之聚核苷酸序列的部分與參考序列(其不包含加成或缺失)相比可包含20%或更少之加成、缺失、取代，及類似狀況(意即，中斷)以用於該等兩個之最佳對準。用來對準比較窗口之最佳對準序列可藉由 Smith 及 Waterman 之局部同源算法 (local homology algorithm), *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981)來進行，藉由 Needleman 及 Wunsch 之局部相同算法, *J. Mol. Biol.* 48:443(1970)來進行，藉由 Pearson 及 Lipman 之尋找相似性方法, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A)* 85:2444(1988)來進行，藉由此等算法之計算化執行 (Wisconsin 遺傳軟體包 7.0 版 (遺傳計算機組, 575 Science Dr., Madison, Wis.) 中 GAP、BESTFIT、FASTA 及 TFASTA, Geneworks, 或 MacVector 軟體包) 來進行，或藉由檢測來進行，且選擇由各種方法產生之最佳對準(意即，產生與比較窗口最高相同百分比)。

術語"序列一致性"意為兩個聚核苷酸或胺基酸序列在比較窗口上係一致的(意即，以核苷酸-核苷酸或殘基-殘基為基礎)。術語"序列一致性百分比"係藉由在比較窗口上比較兩個最佳對準序列來計算，決定兩個序列中出現一致核酸鹼基(例如 A、T、C、G、U 或 I)或殘基之數目，以得到配對位置的數目，配對位置數目除以比較窗口之總位置數目(意即，窗口大小)，並將結果乘以 100 來得到序列一致性百分比。用於本文之術語"大體一致性"表示聚核苷酸或胺基酸

序列之特徵，其中聚核苷酸或胺基酸包含具有至少85%序列一致性之序列，較佳至少90至95%序列一致性，更通常至少99%序列一致性，一致性係與參考序列在至少18個核苷酸(6個胺基酸)位置之比較窗口上，常常係至少24-48個核苷酸(8-16胺基酸)位置上之比較窗口上比較而得，其中序列一致性百分比藉由比較參考序列與可包括缺失或加成(總計為比較窗口上參考序列之20%或更少)之序列來計算。該參考序列可為較大序列之子集。當用於描述多肽時，術語"相似性"係藉由將一種多肽之胺基酸序列及保守胺基酸替代物與第二種多肽序列進行比較來測定。當用於描述聚核苷酸時，術語"同質性"係指兩個聚核苷酸或其指定序列引入適當核苷酸插入或核苷酸缺失時，當最佳對準及比較時是為一致的，至少70%核苷酸，通常為約75%至99%，且更佳者至少約98%至99%核苷酸是相同的。

"抗體"或"鍵結-抗原之抗體片段"係指完整抗體或其片段，其可與完整抗體競爭特異性結合。據稱，當解離常數小於或等於1 μM 、較佳小於或等於100 nM且最佳小於或等於10 nM時，抗體或鍵結-抗原之抗體片段可特異地與抗原結合。可藉由熟習此項技術者已知之方法來量測結合力，一實例為使用BIAcore™工具。抗體片段包含完整抗體之部分，較佳為完整抗體之抗原結合或可變區。結合片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段；雙功能抗體；線性抗體；單鏈抗體分子；及自抗體片段形成之多特異性抗體(C. A. K Borrebaeck, editor(1995)Antibody

Engineering(Breakthroughs in Molecular Biology), Oxford University Press; R. Kontermann & S. Duebel, editors(2001) Antibody Engineering(Springer Laboratory Manual), Springer Verlag)。吾人瞭解，除了"雙特異性"或"雙功能性"抗體之外的抗體各個結合位置具有一致性。

"抗原決定部位"包括任意能夠與免疫球蛋白或T細胞受體特異性結合之蛋白質決定子。抗原決定部位決定子通常係由具有化學活性之表面分子群(例如胺基酸或糖側鏈)組成，且通常具有特異性三維結構特徵及荷質比(specific charge)特徵。若藉由熟習此項技術者熟知方法進行之競爭結合檢定顯示出一種抗體會與第二種抗體競爭，則稱為兩種抗體"結合相同的抗原決定部位"。

"重組體"或"重組DNA分子"係指非自然存在或藉由將另外兩個單獨序列片段以人工方式加以組合後所製得之聚核苷酸序列。"以重組方式生成"表示係以人工方式組合，其通常係藉由化學合成方法或藉由人工處理(例如藉由遺傳工程技術)聚核苷酸之分離片段來完成。通常進行此種人工操作處理係為以編碼相同或保守胺基酸之冗餘密碼子來置換密碼子，雖然通常是為引入或移除序列識別部位。或者，執行此處理以便將具有所要功能的聚核苷酸片段接合在一起，以產生包含普通自然形式中未被發現之所需功能之組合的單一遺傳體。限制酶識別部位、調整序列、控制序列或其它有用特徵可藉由設計而併入。"重組DNA分子"包括選殖選體及表現載體。"重組體"亦可指編碼多肽之聚核苷

酸，並可利用重組DNA技術加以製備。

"經分離"意為"藉由人的手"來改變其自然狀態；意即，若其為自然存在狀況，則其已與其初始環境不同或從其初始環境中移除，或者兩者。例如，自然存在之聚核苷酸或自然存在於活動物內的自然狀態之多肽並未"經分離"，但與其自然狀態共存物質分開之相同聚核苷酸或多肽則係為"經分離"的，如用於本文該術語。例如，以聚核苷酸而言，術語經分離意為該聚核苷酸與其自然存在之染色體及細胞是分開的。聚核苷酸及多肽可存在於諸如培養基調配物、用於將聚核苷酸或多肽引入(例如)細胞之溶液、用於化學反應或酶反應之組合物或溶液等之例如其非為自然存在之組合物的組合物中，且其中保持屬於本文中所採用該術語之含義內的分離之聚核苷酸或多肽。

"大體上純淨"及"大體上同質"可交替使用，且係描述RG1多肽或其片段，或編碼多肽或其片段之聚核苷酸片段，其中此多肽或聚核苷酸係與其自然伴隨之組份分開。RG1多肽或其片段，或編碼多肽或其片段之DNA片段與其自然狀態伴隨之天然污染物分開時，其大體上是不含有自然相關的組份。因此，以化學合成方式或在細胞系統中合成的多肽是不同於其在自然原來細胞所產生者，該多肽大體上是不含其自然相關的組份。相似地，以化學方式合成或在細胞系統中合成的聚核苷酸是不同於其在自然原來細胞所產生者，該聚核苷酸大體上是不含其自然相關的組份。

"聚合酶鏈反應"或"PCR"係指一過程，其中DNA之特異性

部分被擴增，如在頒於1987年7月28日之美國專利號No.4,683,195中描述。一般而言，需要用到相關或不相關之多肽片段末端之序列信息，從而設計寡核苷酸引子；此等引子指向彼此，且與待擴增模板之反向股的序列是一致性的或相似的。兩引子之5'終端核苷酸與該經擴增物質之末端是相符。PCR可用於擴增來自基因體DNA、總細胞RNA轉錄之cDNA、質粒序列等之特異性DNA序列(通常參看Mullis等人，*Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51:263, 1987; Erlich, ed., *PCR Technology*, Stockton Press, NY, 1989)。

"嚴苛性(stringency)"通常發生在 T_m (熔點)-5°C(低於探針之 T_m 5°)至低於 T_m 約20°C至25°C之範圍內。熟習此項技術者將瞭解，嚴苛雜交作用可用以識別或偵測相同聚核苷酸序列，或用以識別或偵測相似或相關之聚核苷酸序列。如本文所使用，術語"嚴苛條件"意指雜交作用僅發生在兩序列之間同一性達到至少95%及較佳至少97%時。

如本文所使用之"雜交"，應包括"其中聚核苷酸股藉由鹼基對而與互補股接合之任何程序"(Coombs, J., *Dictionary of Biotechnology*, Stockton Press, New York, N.Y., 1994)。

"治療有效劑量"係指可改善病狀之症狀或病症的多肽或其抗體、拮抗劑或抑制劑(包括反義分子(antisense molecule)及核酶(ribozyme))之量。在癌症或其轉移之治療中，當一劑量使腫瘤或轉移生長減緩或停止，或發現腫瘤或轉移之尺寸縮小從而引起受檢者壽命延長時，即認為此劑量為治療上有效劑量。若劑量導致患者總體生活品質之提高(意

即，緩解痛苦)，則亦可認為其為治療上有效劑量。該等化合物之治療效力及毒性可藉由標準醫藥程序於細胞培養或實驗動物中測定，例如ED₅₀(對50%動物總數具有治療效果之劑量)及LD₅₀(對50%動物總數之致命劑量)。治療效果及毒性效果之間的劑量比係治療指數(therapeutic index)，且其可以比率ED₅₀/LD₅₀來表現。

如本文所使用"治療"或"療法"涵蓋人類患者病狀之治療，該病狀包括以RG1含量上升為特徵之病狀，例如前列腺癌或晚期轉移前列腺癌。

抗體

本發明係關於抗體、其鍵結-抗原之抗體片段，及抗體及片段之變體，該等可專一性地與RG1多肽結合，尤其係與具有胺基酸序列SEQ ID NO:2之RG1多肽結合。該等抗體可為(例如)多株抗體或單株抗體，更佳者為單株抗體，仍更佳者為嵌合性抗體或擬人化抗體，且仍更佳者為人類抗體。

本發明所涵蓋之該等抗體、鍵結-抗原之抗體片段及抗體與片段之變體係以小於或等於1 μM之解離常數(K_D)與RG1多肽之抗原決定部位結合。更佳者係以小於或等於100 nM之K_D而結合之抗體。最佳者係以小於或等於10 nM之K_D而結合之抗體。本發明亦涵蓋可辨識且結合於與下述抗體所結合之抗原決定部位相同之抗原決定部位的抗體，且該抗體可經由使用熟習此項技術者熟知技術進行之競爭性結合研究加以測定。

本發明該等抗體、鍵結-抗原之抗體片段，及抗體及片段之變體係由輕鏈可變區及重鏈可變區構成。有關於此，本發明較佳實施例為抗體、其鍵結-抗原之抗體片段或其變體，包括具有與胺基酸序列SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:29至少80%、更佳至少90%、仍更佳至少95%，且仍更佳99%之序列一致性之輕鏈可變區。同樣較佳實施例為抗體、其鍵結-抗原之抗體片段或其變體，包括具有與胺基酸序列SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31至少80%，更佳至少90%，仍更佳至少95%，且仍更佳99%之序列一致性之重鏈可變區(參看圖3及4)。

本發明特佳實施例為包含具有經核苷酸序列SEQ ID NO:20及NO:23分別編碼之胺基酸序列SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:29之輕鏈可變區的抗體或其鍵結-抗原之抗體片段或其變體。

同樣特佳者為包含具有選自經核苷酸序列SEQ ID NO:21、22、24及25分別編碼之胺基酸序列SEQ ID NO:27、28、30或31中之一胺基酸序列之重鏈可變區的抗體或其結合抗原或其變體。

有關於此，特佳者為包含具有胺基酸序列SEQ ID NO:26之輕鏈可變區及進一步包含具有胺基酸序列SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28之重鏈可變區的抗體、其鍵結-抗原之抗體片段或其變體，及包含具有胺基酸序列SEQ ID NO:29之輕鏈可變區及進一步包含具有胺基酸序列SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31之重鏈可變區的第二抗體。

最佳者為如下之人類抗體、或其鍵結-抗原之抗體片段或其變體：(a)由具有胺基酸序列SEQ ID NO:26之輕鏈可變區及具有胺基酸序列SEQ ID NO:27之重鏈可變區所組成的抗體，(b)由具有胺基酸序列SEQ ID NO:26之輕鏈可變區及具有胺基酸序列或SEQ ID NO:28之重鏈可變區所組成的抗體，(c)由具有胺基酸序列SEQ ID NO:29之輕鏈可變區及具有胺基酸序列SEQ ID NO:30之重鏈可變區所組成的抗體，或(d)由具有胺基酸序列SEQ ID NO:29之輕鏈可變區及具有胺基酸序列或SEQ ID NO:31之重鏈可變區所組成的抗體。

抗體生成

RG1多肽、片段或衍生物，或表現該等之細胞可作為免疫原之用，以產生針對其之抗體(Harlow, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press, NY(1989))。此項技術中各種已知程序可用來產生該等抗體及片段(C. A. K Borrebaeck, editor (1995) *Antibody Engineering* (Breakthroughs in Molecular Biology), Oxford University Press; R. Kontermann & S. Duebel, editors (2001) *Antibody Engineering* (Springer Laboratory Manual), Springer Verlag)。

藉由將多肽直接注射至動物或將多肽投與動物(較佳為非人類)可獲得針對RG1所產生之抗體，如此所獲得之抗體隨後可與多肽自身結合。以此方式，即使僅編碼該多肽一片段之序列仍可用以產生與整個天然多肽結合之抗體。該等抗體隨後可用以從表現該多肽之組織中分離出該多肽。

不需要使用經純化RG1蛋白質或RG1肽以產生RG1抗體的
另一方法係包括"DNA免疫作用"或以細胞為基礎之免疫作
用，其中"DNA免疫作用"係利用編碼RG1之DNA創造出表現
載體或病毒並使用該等表現載體或病毒轉染或感染可表現
RG1之用以產生抗體動物之宿主組織細胞；其中細胞為基
礎之免疫作用係將在試管內所創造可表現RG1的細胞株用
於免疫作用程序。

單株抗體係使用任何可提供以連續細胞株培養產生抗體
的技術來製備。實例包括融合瘤技術(Kohler及Milstein,
Nature 256:495-497, 1975)、人類B細胞融合瘤技術(Kozbor
等人, *Immunology Today* 4:72, 1983)及用以製備人類單株
抗體之EBV融合瘤技術(Cole等人, *Monoclonal Antibodies
and Cancer*, Alan R. Liss, Inc., 77-96, 1985)。對於使用可表
現RG1細胞株之以細胞為基礎的免疫作用而言，消減免疫
作用可用來使該動物變成對母細胞株具有免疫耐受性
(Sleister, H. M.及Rao, A. G., *J. Immunological Methods*
261:213-220, 2002)。

另外，發展用於"嵌合性抗體"之生成，將小鼠抗體基因
接合至人類基因以獲得具有適當抗原特異性及生物活性之
技術亦可使用(Morrison等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
81:6851-6855, 1984; Neuberger et al., *Nature* 312:604-608,
1984; Takeda et al., *Nature* 314:452-454, 1985)。或者，揭示
用於產生單鏈抗體的技術(美國專利案第4,946,778號)可適
用於產生RG1-特異性之單鏈抗體。

此外，利用美國專利案第5,877,397及5,569,825號(其以全文引用方式併入本文)中所描述之方法，或藉由使用Xenomouse™，如Mendez等人在*Nature Genetics* 15:146-156, 1997中所描述者可用以產生"人類"抗體。此等抗體亦可使用噬菌體顯示技術產生(Rader等人, *Current Opinion in Biotechnology* 8:155-168, 1997; Aujame et al., *Human Antibodies* 8:155-168, 1997)。人類抗體的產生非常具有吸引力，因為該等抗體預期可最小化小鼠或源於小鼠的單株抗體固有的免疫性及過敏反應。產生可辨識RG1多肽(SEQ ID NO:2)抗原決定部位之人類抗體在實例4中說明。

藉由誘發活體內淋巴球母群體的產生或篩檢出高特異性結合試劑之重組免疫球蛋白庫或群組亦可產生抗體，如Orlandi等人(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833-3837, 1989)及Winter與Milstein(*Nature* 349:293-299, 1991)所揭示。

亦可生成含有針對RG1特異性結合位置之抗體片段。通常，使用抗體片段而非整個抗體是有利的，因為更小尺寸之片段可導致更快速的清除率，且亦可提供較良好進入至固體腫瘤的方式。

此等片段包括(但不限於)：藉由胃液蛋白酶消化抗體分子所生成之F(ab')₂片段；及藉由還原F(ab')₂片段之二硫橋鍵後所生成之Fab片段。或者，建立Fab表現庫，以便快速及容易識別出具有所要特異性的單株Fab片段(Huse等人, *Science* 256:1270-1281, 1989)。所有的Fab、Fv及ScFv抗體片段可在*E. coli*表現且自*E. coli*分泌出來，或者可在各種真

核細胞表現系統中表現，如此可以大量產生此等片段。另一種方式是，直接從 *E. coli* 回收 Fab'-SH 片段，並以化學方式偶合以形成 F(ab')₂ 片段 (Carter 等人, *Bio/Technology* 10:163-167(1992))。其它用於產生抗體片段之技術為熟習此項技術者所知。亦可設想出單鏈 Fv 片段 (scFv)、雙功能抗體、微型抗體及其它工程設計抗體片段 (參看美國專利案第 5,5761,894 號及第 5,587,458 號；Hudson 等人, *Nature Medicine* 9:129-133, 2003)。Fv 及 sFv 片段為具有完整組合位置 (其缺乏恒定區) 種類的實例；因此，其在活體內使用期間，可能會顯示出降低的非特異性結合，且尤其較佳係用作為顯像劑 (C. A. K. Borrebaeck, 編者 (1995) *Antibody Engineering* (Breakthroughs in Molecular Biology), Oxford University Press; R. Kontermann & S. Diebel, editors (2001) *Antibody Engineering* (Springer Laboratory Manual), Springer Verlag)。抗體片段亦可為 "線性抗體"，例如，如美國專利案第 5,641,870 號中所述。此線性抗體片段可為單特異性或雙特異性。

本專利說明書亦涵蓋所描述之抗體或抗體片段之變體，且該等可使用任何保守及非保守突變之技術及準則來製得，例如美國專利第 5,364,934 號。變異包括取代、缺失或插入一或多個編碼該抗體之密碼子，進而導致胺基酸序列與天然抗體序列比較時發生變化。所涵蓋之此等變異的效用將包括導致 (1) 降低對蛋白質水解作用易感性或可藉由氧化失去活性，(2) 形成蛋白質錯合物之結合親合性或對抗原

的結合親合性之改變，(3)活體內清除或體內分解之改變，(4)抗體同型或異型之變化，(5)抗體之功能特性(例如Fc受體結合力)之變化，(6)抗原決定部位序列之改變，以降低或增加免疫原性，及(7)此等類似物之物理化學或功能特性之其它變化。最小化胺基酸序列變化數目(介於RG1抗體與同質性蛋白質抗體間的高度同質性區域)是決定出可插入、取代或缺失之胺基酸殘基而沒有負面影響所要活性的指引。所允許之變異係在序列中以系統化方式進行插入、缺失或取代胺基酸，並測試所得變體針對天然序列所具有之活性來加以決定。

特佳類型之取代變體係與取代親本抗體(例如人類抗體)中一個更高可變區中的殘基有關。一般而言，進一步篩選出用以發展所得變體相對於親本抗體(變體是生成自該親本抗體)而言是具有改良的生物特性。一種用以生成此等取代變體之便利方法係涉及使用噬菌體顯示技術之親合性成熟作用(Schier R., *J. Mol. Biol.*, 263:551-67, 1996)。然後，以本專利說明書所述(參看實例4)篩檢該變體生物活性(例如結合親合性)。為識別可成為良好改質候選者的高可變區殘基，進行丙胺酸掃描突變發生作用以識別出明顯可促成抗原結合之高可變區殘基。經一或多個相關檢定中發現具有優良特性之抗體可經受進一步的發展。

本專利說明書出現之RG1胺基酸序列(SEQ ID NO:2)可用以篩選出用於產生抗體的RG1多肽之特異性區域。如熟習此項技術者將瞭解，抗體所指向的RG1多肽之區域或抗原

決定部位可隨所要之應用而變化。例如，意欲用於免疫檢定中以偵測前列腺細胞上膜結合RG1之抗體應當指向RG1多肽上可近性抗原決定部位。顯示免疫結構之RG1多肽之區域及其它區域及領域可容易地使用此項技術中已知之各種其它方法加以識別，例如Chou-Fasman、Garnier-Robson或Jameson-Wolf分析。包含此等殘基之片段尤其適合於生成抗RG1抗體。有效之片段包括(但不限於)序列PLGGESICSAGAPAKYSIT (SEQ ID NO:8); HSSDYSMWRKNQYVS(SEQ ID NO:10); DAGTDSGFTFSSPNFATIPQDTV (SEQ ID NO:11);及NEIVDSASVPET(SEQ ID NO:12)。該等區域多株抗體之生成描述於實例4中。

辨識RG1抗原決定部位之抗體的用途

本發明抗體、鍵結-抗原之抗體片段及其變體可尤其用於管理癌症之診斷檢定、成像方法，及治療方法，其中該等癌症之RG1會過度表現，包括前列腺癌、腎癌、結腸癌及卵巢癌。

本發明提供用以偵測RG1多肽及診斷癌症(例如前列腺癌)各種有效的免疫檢定。此等檢定一般包含一或多種RG1抗體，該等抗體能夠識別且結合RG1多肽。最佳抗體係選擇性與RG1結合，且不會與非RG1多肽結合(或弱結合)。該等檢定包括此項技術中已知的各種免疫檢定形式，包括(但不限於)各種類型之放射性免疫檢定、酵素連結免疫吸附法，及類似檢定。另外，本發明亦提供能夠偵測前列腺癌之免疫成像方法，包括(但不限於)使用經標記RG1抗體之放射性

閃爍掃描成像方法。此等檢定在臨床上用於癌症(例如前列腺癌)之偵測、監測及預後。

該上述抗體可用以分離或識別出可表現本發明多肽的選殖體，或用以純化本發明多肽，其係藉由將抗體附著於固體載體以分離及/或經由親合性層析法進行純化。

另外，使用細胞分選術及純化技術，RG1抗體可用來分離RG1陽性細胞。詳言之，例如使用以抗體為基礎之細胞分選術或親合性純化技術，RG1抗體可用以從異種移植腫瘤組織、從培養細胞等來分離出前列腺癌細胞。本發明RG1抗體其它用途包括生成抗個體基因型抗體，該抗個體基因型抗體與RG1多肽極為類似。

RG1抗體可用於偵測前列腺癌的存在或腫瘤轉移。此等含RG1細胞在各種生物樣品(包括血清、前列腺及其它組織活體切片樣品)中之存在可用RG1抗體來偵測。另外，RG1抗體可用於各種成像方法中，例如用 ^{99m}Tc (或其它同位素)共軛抗體的免疫閃爍掃描法。例如，可使用與最近描述的使用 ^{111}In 共軛抗-PSMA抗體之方案相似的成像方案來偵測一再發生性及轉移性前列腺癌(Sodee等人 *Clin. Nuc. Med.* 21: 759-766, 1997)。另一種可使用之偵測方法為正電子發射斷層攝影術(positron emitting tomography)(參看Herzog等人, *J. Nucl. Med.* 34:2222-2226, 1993)。

本發明RG1抗體可經可偵測標記加以標記或共軛至第二分子上，諸如細胞毒素劑，並將第二分子目標定在RG1陽性細胞上(Vitetta, E.S. et al., *Immunotoxin Therapy*, in

DeVita, Jr, V.T. et al., eds, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 4th ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 2624-2636, 1993)。細胞毒素劑之實例包括(但不限於)蓖麻毒素、阿黴素、道諾黴素、紫杉酚、溴化乙錠、絲裂黴素、足葉乙甙、tenoposide、長春新鹼、長春鹼、秋水仙鹼、二羥基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、放射菌素 D、白喉毒素、埃博黴素(epothilones)、假單胞菌外毒素(PE)A、PE40、相思豆毒素、及糖皮質激素及其它化學治療劑，以及放射性同位素。可藉由遺傳方式或化學方式將該抗體融合至適當細胞激素、化學激素、干擾素或生長因子(該等具有所需抗腫瘤生物活性)來建造出細胞毒素或抗增生標地性融合蛋白質(Asgeirsdottir 等人, *Biochem. Pharmacol.* 15:1729-1739, 2003)。適用之可偵測標記包括(但不限於)放射性同位素螢光化合物、生物發光化合物、化學冷光化合物、金屬螯合劑或酵素。用於免疫療法或用作可偵測標記之適用放射性同位素包括下列各物：銻-124、銻-125、砷-74、銻-103、銻-140、鉍-7、鉍-j206、鉍-207、鎘-109、鎘-115m、鈣-45、銻-139、銻-141、銻-144、銻-137、鉻-51、鈷-56、鈷-57、鈷-58、鈷-60、鈷-64、鉕-169、鎘-152、鈷-153、金-195、金-199、鈳-175、鈳-181、銻-111、碘-123、碘-131、銻-192、鐵-55、鐵-59、氬-85、鉛-210、鐳-177、錳-54、汞-197、汞-203、鉍-99、鉍-147、鐳-237、鎳-63、銻-95、鐵-185+191、鈾-103、鉍-195m、鐳-143、鉍-147、鐳-233、鐳-2226、銻-186、銻-86、鈳-103、鈳-106、

鈦-44、鈦-46、硒-75、銀-110m、銀-11、鈉-22、鋇-85、鋇-89、鋇-90、硫-35、鉍-182、鐳-99m、碲-125、碲-132、鉍-170、鉍-204、鈷-228、鈷-232、錫-113、鈦-44、鎢-185、鈾-48、鈾-49、鐳-169、鈾-88、鈾-90、鋅-65及鋅-95。

將抗體放射性進行標記係使用螯合劑來完成的，該螯合劑係以共價方式附著至抗體上，其中該放射性核係插入至螯合劑中。較佳螯合劑闡明於：Srivagtava等人 *Nucl. Med. Bio.* 18:589-603, 1991 及 McMurry 等人，*J. Med. Chem.* 41:3546-3549, 1998，或源自所謂NOTA螯合劑，發表於H. Chong, K. 等人，*J. Med. Chem.* 45:3458-3464, 2002，其均以全文引用的方式併入本文。雙功能螯合劑衍生物對-SCN-苄基-DTPA(Brechbiel等人 *Inorg. Chem.* 25:2772-2781, 1986) 是特佳用於放射性同位素與RG1抗體之共軛作用；例如，環己基-DTPA(CHX-A"-DTPA, Wu等人，*Bioorg. Med. Chem.* 10:1925-1934, 1997)及MX-DTPA (1B4M-DTPA, McMurry等人，*J. Med. Chem.*, 41: 3546-3549, 1998)，以及1,4,7-三氮雜環壬烷-N,N',N"-三乙酸(NOTA)(Chong等人，*J. Med. Chem.* 45:3458-3464, 2002)。可藉由Nikula等人，*Nucl. Med. Biol.* 3:387-390, 1995之方法來完成共軛作用。以免疫閃爍掃描法而言，放射性同位素 ^{111}In 或 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 是特佳之偵測標記。正電子發射斷層攝影術之較佳可偵測標記為 ^{43}Sc 、 ^{44}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{55}Co 、 ^{68}Ga 、 ^{64}Cu 、 ^{86}Y 及 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 。對於免疫療法而言，可使用發射 β 放射性同位素 ^{46}Sc 、 ^{47}Sc 、 ^{48}Sc 、 ^{72}Ga 、 ^{73}Ga 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{109}Pd 、 ^{111}Ag 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、

^{186}Re 及 ^{188}Re 及發射 α 同位素 ^{211}At 、 ^{211}Bi 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 及 ^{214}Bi 。較佳為 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{72}Ga 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Cu 及 ^{212}Bi ，且特佳者為 ^{90}Y 及 ^{177}Lu 。

前列腺癌及其它癌症之免疫療法

本發明提供各種用於治療前列腺及其它癌症的免疫治療方法，包括抗體療法、活體內疫苗，及活體外免疫治療方法。其它癌症包括腎癌、結腸癌及卵巢癌。在一種方法中，本發明係提供系統性使用RG1抗體以治療前列腺癌。例如，未經共軛RG1抗體可引入至患者，如此該抗體會結合至前列腺癌細胞上、癌細胞中或與癌細胞相關之RG1，且藉由包括補體調節細胞溶解、抗體依賴性細胞毒性、改變RG1之生理功能及/或抑制配位體結合或訊號轉換通道的機制來調節細胞及腫瘤之破壞。如前述，與毒性劑(例如蓖麻毒素或放射性同位素)共軛之RG1抗體亦可治療性用於將毒性劑直接傳送至帶有RG1前列腺腫瘤之細胞，並藉以破壞該腫瘤細胞。

使用RG1抗體之前列腺癌免疫療法係遵循已成功用於其它類型癌症之各種方法所得的教示，該等其它類型癌症包括(但不限於)結腸癌(Arlen等人，*Crit. Rev. Immunol.* 18: 133-138, 1998)、多發性骨髓瘤(Ozaki等人，*Blood* 90: 3179-3186, 1997; Tsunenari等人，*Blood* 90: 2437-2444, 1997)、胃癌(Kasprzyk等人，*Cancer Res.* 52: 2771-2776, 1992)、B-細胞淋巴瘤(Funakoshi等人，*Immunther. Emphasis Tumor Immunol.* 19: 93-101, 1996)、白血病(Zhong等人，*Leuk.*

Res. 20: 581-589, 1996)、結腸直腸癌(Moun等人, *Cancer Res.* 54:6160-6166, 1994; Velders等人, *Cancer Res.* 55:4398-4403, 1995)及乳腺癌(Shepard 等人, *J. Clin. Immunol.* 11:117-127, 1991)。

本發明進一步提供經調配以包含RG1多肽或其片段之疫苗。疫苗中腫瘤抗原用以生成用於抗癌療法之體液及細胞調節免疫之用途係此項技術中為吾人熟知且已用於使用PSMA及齧齒類PAP免疫原之前列腺癌(Hodge等人, *Int. J. Cancer* 63:231-237, 1995; Fong等人, *J. Immunol.* 159:3113-3117, 1997)。此等方法可藉由使用RG1多肽或其片段或RG1-編碼核苷酸分子及可表現且適當地呈現RG1免疫原之重組載體而容易地加以實現。

例如, 病毒基因傳遞系統可用於傳遞RG1-編碼核酸分子。各種可用於實行本發明之此態樣的病毒基因傳遞系統包括(但不限於)牛痘、鳥痘、金絲雀痘、腺病毒、流行性感感冒、脊髓灰質炎病毒、腺相關病毒、慢病毒(lentivirus)及sindbus病毒(Restifo, in *Curr. Opin, Immunol.* 8:658-663, 1996)。非病毒傳遞系統亦可採用, 該系統係藉由將編碼RG1多肽或其片段之裸DNA引入至患者以誘發抗腫瘤反應。在一個實施例中, 係採用全長人類*rgl* cDNA。在另一實施例中, 係採用人類*rgl* cDNA片段。在另一實施例中, 係採用編碼特異性T淋巴球(CTL)抗原決定部位之*rgl*核酸分子。CTL抗原決定部位可使用特異性演算法(例如Epimer, Brown University)加以測定, 以識別RG1多肽內能夠最佳地

與指定HLA等位基因結合之肽。

亦可採用各種活體外策略。一種方法涉及使用樹突細胞以便將RG1多肽作為抗原而呈遞至患者免疫系統。樹突細胞會表現MHC第I及第II類、B7共刺激物及IL-12，且因此為高度特異性之抗原呈遞細胞。在前列腺癌中，以前列腺特異性膜抗原(PSMA)之肽脈衝的自體同源樹突細胞正用於臨床試驗第I階段，以刺激前列腺癌患者之免疫系統(Tjoa et al., *Prostate* 28: 65-69, 1996; Murphy等人, *Prostate* 29: 371-380, 1996)。樹突細胞可用以將RG1多肽呈遞至MHC第I及第II類分子之T細胞。在一個實施例中，自體同源樹突細胞係經以能夠與MHC分子結合之RG1加以脈衝。在另一實施例中，樹突細胞係以該完全RG1多肽加以脈衝。而另一實施例涉及使用各種此項技術中已知之載體來設計樹突細胞中*rg1*基因之過度表現，該載體諸如腺病毒(Arthur等人, *Cancer Gene Ther.* 4:17-25, 1997)、逆轉錄酶病毒(Henderson等人, *Cancer Res.* 56:3763-3770, 1996)、短病毒、腺相關病毒、DNA轉染(Ribas et al., *Cancer Res.* 57:2865- 2869, 1997)，及腫瘤起源RNA轉染(Ashley等人, *J. Exp. Med.* 186:1177-1182, 1997)。

抗個體基因型抗RG1抗體亦可作為疫苗用於抗癌療法，以誘發針對可表現RG1多肽之細胞的免疫反應。詳言之，抗個體基因型抗體之生成在此項技術中為吾人所熟知的，且可容易地適合產生抗個體基因型抗RG1抗體，該抗個體基因型抗RG1與RG1多肽上之抗原決定部位極為類似(參看

例如，Wagner等人，*Hybridoma* 16:33-40, 1997;Foon等人，*J. Clin. Invest.* 96:334-342, 1995; Herlyn等人，*Cancer Immunol Immunother* 43:65-76, 1996)。此一抗個體基因型抗體可用於抗個體基因型療法，其目前係與其它針對腫瘤抗原之抗個體基因型抗體施行。

可採用基因免疫法，以便針對表現RG1癌細胞產生預防性或治療性之體液免疫反應及細胞免疫反應。使用本文描述之RG1編碼DNA分子，包含編碼RG1多肽/免疫原之DNA及適當調控序列的構築體可直接注射至個體的肌肉或皮膚內，如此該肌肉或皮膚細胞會吸收該構築體並表現出該經編碼之RG1多肽/免疫原。該RG1多肽/免疫原可以細胞表面多肽表現或被分泌出來。該RG1多肽/免疫原之表現會導致產生對抗前列腺癌之預防性或治療性體液及細胞免疫。可使用此項技術中各種已知的預防性及治療性基因免疫技術(作為回顧，參看網際網路位址www.genweb.com公開之資訊及文獻)。

識別結合至RG1之試劑的檢定

本發明亦係關於可用於識別結合至RG1之試劑(意即，抗體、肽等等)的檢定及方法。詳言之，結合至RG1之試劑可藉由RG1配位體或其它試劑或組份與RG1結合之能力及/或抑制/刺激RG1活性的能力加以識別。

如上所述，藉由以含有抗原區(意欲作為抗體之目標的RG1多肽之部分)之肽來免疫適當哺乳動物受檢者可獲得抗體。此等試劑可用於競爭性結合研究，以識別出第二代抑

制劑及阻斷RG1活性。

結合RG1多肽之試劑(例如RG1抗體)可用於調節RG1活性、用於將抗癌劑目標指定在適當的哺乳動物細胞上，或用於識別可阻斷RG1相互作用之試劑。藉由使用與RG1結合之試劑可將表現RG1之細胞指定為目標物或識別出來。

如何使用RG1結合之試劑取決於RG1結合之試劑的性質。例如，RG1結合之試劑可用於：將共軛毒素(例如白喉毒素、霍亂毒素、蓖麻毒素或假單胞菌毒素)傳遞至RG1表現細胞；調節RG1活性；直接殺死表現RG1細胞；或用於篩檢以識別競爭性結合劑。例如，RG1抑制劑可以直接用來抑制RG1表現細胞之生長，而RG1結合之試劑可用作為診斷劑。

醫學組合物及投藥

本發明亦係關於醫藥組合物，其可單獨包含 $rg1$ 聚核苷酸、RG1多肽、抗體、激動劑、拮抗劑或抑制劑，或與至少一種其它試劑組合，例如穩定化合物，其可以任何無菌、生物相容醫藥載劑加以投藥，醫藥載劑包括(但不限於)含鹽溶液、經緩衝含鹽溶液、右旋糖及水。任何此等分子可單獨投與患者，或在其中其與賦形劑或醫藥學上可接受之載劑混合之醫藥組合物中与其它試劑、藥物或激素組合投藥。在本發明一個實施例中，該醫藥學上可接受之載劑係醫藥學上惰性的。

本發明亦係關於醫藥組合物之投藥，此投藥方式是以經口服或非經腸方式完成的。非經腸傳遞之方法包括局部、

動脈內(直接至腫瘤)、肌肉內、皮下、髓內、鞘內、心室內、靜脈內、腹膜內或鼻內投藥。除活性成分之外，此等醫藥組合物可含有適當醫藥學上可接受之載劑，包含賦形劑及助劑，其有助於將活性化合物加工成醫藥學上可使用之製劑。關於調配及投藥之技術的進一步細節可見最新版 Remington's Pharmaceutical Sciences(Ed. Maack Publishing Co, Easton, Pa.)。

用於口服投藥之醫藥組合物可使用此項技術中所熟知的醫藥學上可接受之載劑以適於口服之劑量來調配。該等載劑使得醫藥組合物調配為錠劑、丸劑、糖錠劑、膠囊、液劑、凝膠劑、糖漿、漿劑、懸浮液劑及類似物，以便患者攝取。

用於口服使用之醫藥製劑可經由將活性化合物與固體賦形劑組合來獲得，視情況研磨所得混合物，若有必要則在添加適當助劑後處理顆粒混合物，以獲得錠劑或糖錠劑核。適當賦形劑為碳水化合物或蛋白質填充劑，例如糖，包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇；源自玉米、小麥、大米、馬鈴薯或其它植物的澱粉；纖維素例如甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素或羧甲基纖維素鈉；及包括阿拉伯樹膠及黃菁膠之樹膠；及諸如明膠及膠原質之蛋白質。若需要，可添加崩解劑或增溶劑，例如交聯聚乙烯吡咯烷酮、瓊脂、藻酸或其鹽，例如藻酸鈉。

提供具有適當糖衣之糖錠劑核，糖衣為例如濃縮糖溶液，其亦可含有阿拉伯樹膠、滑石粉、聚乙烯吡咯烷酮、



聚羧乙烯凝膠、聚乙二醇及/或二氧化鈦、漆溶液，及適當有機溶液或溶劑混合物。可將染料或色素添加至錠劑或糖錠劑塗層作產品識別或特徵化活性化合物之量，意即劑量。

可口服使用之醫藥製劑包括由明膠製成之推入配合式(push-fit)膠囊，以及由明膠及塗層(例如甘油或山梨醇)製成之柔軟、密封膠囊。推入配合式膠囊可含有與填充劑或黏合劑(例如乳糖或澱粉)、潤滑劑(例如滑石粉或硬脂酸鎂)及視情況之穩定劑混合的活性成分。在柔性膠囊中，活性化合物可溶於或懸浮於適當液體中，例如脂肪油、液體石蠟，或含/不含穩定劑之液態聚乙二醇。

用於非經腸投藥之醫藥調配物包括活性化合物之水溶液。為用於注射，本發明醫藥組合物可在水溶液中調配，較佳在生理上相容緩衝劑中，例如Hank溶液、Ringer溶液，或生理學上緩衝鹽。含水注射懸浮液可含有增加懸浮液黏性之物質，例如羧甲基纖維素鈉、山梨醇或右旋糖酐。另外，活性化合物之懸浮液可製備為適當油性注射懸浮液。適當親脂性溶劑或媒劑包括脂肪油(例如麻油)或合成脂肪酸酯(例如油酸乙酯或甘油三酸酯或脂質體)。視情況懸浮液亦可含有適當穩定劑或增加化合物溶解度之試劑以使製備高濃縮溶液。

以局部或經鼻投藥而言，在調配物中使用適於待穿透特定障壁之滲透劑，該等滲透劑一般在此項技術中是已知的。

套組

本發明進一步關於醫藥包裝及套組，其包含一或多個填

充有一或多種前述本發明組合物成分之容器。與該(等)容器相關者為調節醫藥產品或生物產品之製造、使用或銷售之政府機關規定形式的標示，該標示顯示出用於人類投藥之產品的製造、使用或銷售機關之核准。

製造及儲存

本發明醫藥組合物可以此項技術中已知方式來製造，例如，藉由習知混合、溶解、粒化、制糖錠劑、磨細(levigating)、乳化、封入膠囊、截留或凍乾方法。

該醫藥組合物可以鹽形式提供，且可用許多酸來形成鹽，該等酸包括(但不限於)鹽酸、硫酸、乙酸、乳酸、酒石酸、蘋果酸、丁二酸等等。在相應的游離鹼形式之水性或其它質子溶劑中，鹽趨向於更可溶。在其它狀況下，較佳製劑可為pH值範圍4.5-5.5之1 mM-50 mM組胺酸、0.1%-2%蔗糖、2%-7%甘露醇中之經凍乾粉末，其在使用前與緩衝劑組合。

在包含可接受載劑中調配之本發明化合物的醫藥組合物製備之後，可將其置放於適當容器中且標示用於所指示之症狀的治療。為便RG1投藥，此標示應當包括投藥之量、頻率及方法。

治療有效劑量

適用於本發明醫藥組合物包括其中含有有效量之活性成分以達成所要之目的(意即，治療以RG1表現為特徵之特定病狀)之組合物。有效劑量之測定係在熟習此項技術者能力所及範圍內。

對於任意化合物，治療有效劑量最初可在細胞培養檢定(例如腫瘤細胞)或動物模型(通常為小鼠、兔子、狗或豬)中之任一者中來估計。動物模型亦用來達成所要之濃度範圍及投藥途徑。此資訊可隨後用來測定人類投藥之有效劑量及途徑。

治療有效劑量係指可緩解症狀或病症之蛋白質或其抗體、拮抗劑或抑制劑之量。此等化合物之治療效應及毒性可在細胞培養或試驗動物中藉由標準醫藥程序來測定，例如ED₅₀(對50%總體之有效治療劑量)及LD₅₀(對50%總體之致命劑量)。治療效應及毒性效應之間的劑量比為治療指數，且其係以比率ED₅₀/LD₅₀表現。具有較大治療指數之醫藥組合物較佳。使用獲自細胞培養檢定及動物研究之資料來調配供人類使用之劑量範圍。此等化合物劑量較佳在循環濃度以內之範圍，其包括ED₅₀而具有很小或無毒性。劑量視採用之劑型、患者敏感度及投藥途徑而定在此範圍內變化。

個別醫師鑒於待治療之患者來選擇具體劑量。調整劑量及投藥以提供足夠含量之活性部分或保持所要之效應。可考慮之額外因素包括病狀之嚴重性，例如腫瘤大小及位置；患者年齡、體重及性別；飲食、投藥時間及頻率、藥物組合物、反應靈敏度，及對療法的耐受性/反應。視特定調配物半衰期及清除率而定，長期作用醫藥組合物可每3至4天、每週，或每兩週投藥1次。

視投藥途徑而定，正常劑量自0.1至100,000微克變化，直

至總劑量為約1 g。文獻中有提供特殊劑量及傳遞方法的指導。參看美國專利案第4,657,760號；第5,206,344號；或第5,225,212號。熟習此項技術者可針對聚核苷酸採用與對蛋白質或其抑制劑所採用之不同的調配物。相似地，聚核苷酸或多肽之傳遞對特定細胞、症狀、位置等具有特定性。放射性標記抗體之較佳特異活性係在0.1至10 mCi/mg之蛋白質範圍內變化 (Riva 等人，*Clin. Cancer Res.* 5; 3275s-3280s, 1999; Wong 等人，*Clin. Cancer Res.* 6:3855-3863, 2000; Wagner 等人，*J. Nuclear Med* 43:267-272, 2002)。

本發明進一步藉由下列實例來描述。提供該等實例僅用於參考特定實施例來說明本發明。此等例證在說明本發明之某些特定態樣時，並未描繪所揭示發明之侷限性或限制所揭示發明之範疇。

除非另外詳情描述，否則均使用熟習此項技術者所熟知且常用之標準技術來執行所有實例。下列實例之常用分子生物學技術可如標準實驗室手冊中所述來執行，例如 Sambrook 等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989。

實例1：人類 *rgl* 聚核苷酸之確認

藉由搜尋 Incyte's LifeSeq® 資料庫，*rgl* 經確認係為前列腺中所表現之基因。藉由使用 Incyte 所提供用於搜索資料庫之 "蛋白質功能" 工具注解搜索資料庫，從而確認核苷酸

序列，在注解資料庫中之細胞黏附分子類別中發現該核苷酸序列且被描述為f-spondin的同系物。對*rgl*聚核苷酸序列在資料庫中庫的集合中之分佈的Electronic Northern分析揭示：*rgl*在前列腺庫中係以高含量表現，而在一些其他組織庫則以低含量表現，包括源自正常及腫瘤組織者。

將資料庫中*rgl*選殖體中聚核苷酸序列段組成鄰近連續聚核苷酸序列，及編輯該鄰近連續序列之後，在所預定組成之聚核苷酸中鑑別出全長編碼序列。此序列編碼與f-spondin及Mindin-2具有同一性質的蛋白質。

Incyte選殖體1640796、1712252及1880265係獲自Incyte，以用於試驗工作，而選殖體3360733則經識別是含有最5'核苷酸序列。此選殖體經完全定序，並含有該預期RG1蛋白質之完全編碼序列。此序列示於SEQ ID NO：1。

實例2：*rgl* mRNA表現

藉由使用Taqman檢定之半定量PCR(Perkin-Elmer)來測定*rgl* mRNA在各種正常及腫瘤組織及細胞株樣品中的表現。業已根據獲自Stanford University醫學院泌尿學系之經改良Gleason分級系統，將前列腺正常、良性及腫瘤組織樣品分級。用標準程序從該組織樣品分離出RNA，源自其它腫瘤及正常組織之RNA則可購自商業資源，包括Clontech及Biochain。前列腺腫瘤細胞株，(PC-3, LNCaP及DU145)，係獲自American Type Culture Collection，並以標準方法使用含血清培養基在培養液中繁殖。在裸鼠中建立源自該等細胞株之異種移植物腫瘤，且在植入後大約4-6週從小鼠獲

取該異種移植物腫瘤。藉由標準程序從該腫瘤分離出RNA。

以Taqman為基礎之PCR分析係使用引子：CGC GCA TAG CTC CGA CTA C(SEQ ID NO:3)及GCC GCG TCC GCA AAG(SEQ ID NO:4)及Taqman探針：6-FAM-AGG AAG AAC CAG TAC GTC AGT AAC GGG CTG-Tamra(SEQ ID NO:5)來進行的。

此等引子及探針係使用Perkin Elmer的Primer Express軟體來設計，且藉由Synthetic Genetics來合成的。PCR反應進行30-40次循環，且使用前列腺RNA來量化，以產生用於相對比較之標準曲線。該分析證明：前列腺中可偵測到最高量之*rgl* mRNA，而在數種其它組織中*rgl* mRNA含量明顯地降低。

實例3：BHK細胞中RG1之生成

選殖：自Incyte質粒3360733獲得RG1編碼區域。編碼序列於使用1×Pfu Turbo聚合酶緩衝劑(Stratagene, La Jolla, CA)/200 μM dNTPs/0.2 μM寡核苷酸引子/2.5U Pfu Turbo聚合酶(Stratagene)之標準PCR反應(100 ul)中，以下列引子進行PCR擴增：SST115(5'-TCCCTCTAGAGCCACC ATGGAAAACCCCAGCCCGGC-3')(SEQ ID NO:6)及SST113 (5'-AAGGCATCACGTGTTAGACGCAGTTATCAGGGACG-3')(SEQ ID NO:7)。PCR擴增條件如下：95°C 3分鐘，(95°C 15秒，60°C 30秒，72°C 2分鐘)×35，72°C 7分鐘。所得經PCR擴增產物使用QIAquick PCR管柱(Qiagen, Valencia, CA)純化，並以XbaI及PmlI限制酶消化，以產生1010 bp片段，使用BIO

101 GeneClean Kit(Vista, CA)從1%瓊脂糖凝膠純化該片段。將經純化片段接合(使用 Epicentre Fast Link Kit)(Epicenter, Madison, WI)至非細胞病變 Sindbis表現載體 pSINrep21(Agapov等人, 1998, *PNAS* 95: 12989-12994), 用 XbaI 及 PmlI 消化, 並轉型至 DH5 α 感受性細胞 (Life Technologies, Gaithersburg, CA) 中, 且在含有胺必西林 (ampicillin)(100 ug/ml)之LB瓊脂平板上進行篩選。篩選出一個會在含有胺必西林之LB培養基上生長之菌落, 並藉由序列分析來確認其含有所插入之RG1編碼序列。此質粒被稱為pPEG6。

表現: 根據製造商說明書使用 Lipofectamine Plus 試劑 (Life Technologies, Gaithersburg, MD), 使用2微克pPEG6轉染 $1-3 \times 10^5$ 幼倉鼠腎細胞 (BHK)。轉染之後, 將細胞在外加胎兒血清之DMEM中培育24-48小時, 此段時間, 該細胞會分成1至10, 並藉由添加嘌呤黴素 (2.5 ug/ml最終濃度)及含有血清之DMEM開始篩選含有質粒之細胞。在細胞長滿之後(嘌呤黴素添加4-5天後), 以PBS清洗細胞, 分成1至10, 且添加含有血清及5 ug/ml嘌呤黴素之DMEM培養基。在額外2-3天後, 以不含血清之DMEM及5 ug/ml嘌呤黴素替換該培養基, 生長2-3天, 且藉由Western分析法, 使用RG1抗體在培養基中偵測到RG1蛋白質之存在。偵測到RG1蛋白質含量為1 $\mu\text{g/ml}$ 。

純化: 將經轉染為穩定過表現且分泌RG1蛋白質至生長培養基中的幼倉鼠腎細胞 (BHK) 培養在含有胎兒牛血清之

培養基中。當長到快要滿時(subconfluent)，將細胞轉換至不含血清培養基中24-48小時。收集培養基，將其離心以移除細胞並儲存在攝氏-80度。進行純化之前，將培養基前立即解凍並置於冰上。添加蛋白酶抑制劑，以冰冷20 mM乙酸钠緩衝液(pH值為6.5)將培養基稀釋10倍，且在純化整個過程中保持在攝氏4度下。將經稀釋樣品以0.5 ml/分鐘之流速裝載至Q-瓊脂糖陰離子交換管柱上並用相同緩衝液洗滌。使用線性NaCl梯度(於緩衝液中之0-80%之1M NaCl，0.5%每分鐘)進行沖提，同時收集溶離份。RG1會在大約75 mM NaCl下沖提出來，藉由SDS PAGE及西方墨點法測定。併集含有RG1之溶離份，藉由超過濾濃縮，並進一步以Superdex 75凝膠過濾管柱加以純化。經純化BHK-RG1係作為產生人類mab(其對天然RG1(nRG1)蛋白質有特異性)之免疫原，且可作為篩檢及特徵化該等抗體之抗原之用。

實例4：抗體生成

多株抗體：製備對抗衍生自RG1蛋白質序列之5種合成性多肽序列之兔子多株抗血清。選擇該等序列的原因是因為其預期位置係位於蛋白質表面，以便生成更可能辨識表面抗原決定部位之抗血清。用胺丁酸(Abu)置換掉半胱胺酸殘基，以幫助合成。針對該5種肽之特定胺基酸序列、RG1蛋白質位置及名稱如下所示。

<u>名稱</u>	<u>位置</u>	<u>胺基酸序列</u>
1C	28-46	PLGGESICSAGAPAKYSIT(SEQ ID NO:8)
2C	46-64	TFTGKWSQTAFPKQYPLFR(SEQ ID NO:9)

- 3C 77-91 HSSDYSMWRKNQYVS(SEQ ID NO:10)
4C 188-210 DAGTDSGFTFSSPNFATIPQDTV(SEQ ID NO:11)
5C 263-274 NEIVDSASVPET(SEQ ID NO:12)

藉由額外羧基末端半胱胺酸將肽以共價方式偶合至鑰孔噉血藍蛋白(KLH)，以作為免疫原之用。相似地，製備牛血清白蛋白(BSA)共軛物，以便經由ELISA抗血清滴定量分析。

2種動物各以肽進行免疫。初次免疫作用係以Freund完全佐劑(0.5 mg/動物)進行，隨後在3週間隔期以肌肉內方式以Freund不完全佐劑(0.25 mg/動物)追加。週期性抽取試驗血液，並藉由ELISA來量測抵抗特異性BSA-肽共軛物之抗體效價，且與免疫前的血清做比較。對抗肽1C及3C之抗血清經顯示具有活性。對抗肽2C之抗血清則不會辨識RG1多肽。對抗肽4C及5C之抗血清沒有測試。

單株抗體：藉由將轉殖基因小鼠進行免疫產生對抗RG1之單株抗體，其係對抗在*E.coli*細胞中所表現RG1多肽及6-組胺酸-標記之RG1融合蛋白質。這些動物的脾細胞與骨髓瘤細胞融合，以生成融合瘤細胞。以ELISA篩檢所得融合瘤細胞，以得到可產生對抗RG1肽及蛋白質之抗體的融合瘤。

對天然RG1具有特異性的人類單株抗體亦係藉由將轉殖基因小鼠進行免疫後加以製備的，該等小鼠含有經破壞小鼠重鏈及小鼠κ輕鏈基因座。(美國專利第5,877,397號)。源自C57BL/6J近親交配系(Medarex)之轉殖基因小鼠係以經

純化RG1蛋白質進行免疫，該RG1蛋白質係在穩定轉染BHK細胞株中生成的(參看實例3)。

將抗原與完全Freund(Sigma, F5881)佐劑混合用於方案1之第一及第二免疫化；其後，將抗原與不完全Freund(Sigma, F5506)混合。對於第二方案，完全Freund用於第一免疫化且其後使用不完全Freund。各個小鼠接受使用乳化針而與佐劑1：1混合的100 μ L PBS中之25 μ g天然RG1(nRG1)。以0.2 mL製備之抗原注射入小鼠腹膜腔。

融合瘤製備：將P3 \times 63 ag8.653骨髓瘤細胞系(ATCC CRL 1580, lot F-15183)用於融合。將原始ATCC小瓶解凍並在培養液中培養增生，自此所增生的細胞製備種子儲備細胞的冷凍小瓶。將細胞保持在培養液中3-6個月，一週繼代兩次。源自P388D1(ATCC, TIB-63FL)細胞之上清液用作融合瘤之調理培養基。簡而言之，細胞生長並增生至200 ml，固定培養生長~7天。將經抽出的上清液進行離心並經由0.2 μ m無菌過濾器過濾。該細胞株繼代3-6月，並然後再解凍新的小瓶。

含有5% FBS(Hyclone, #AKE11828)及P/S(Cellgro, #30002029)之DMEM(Cellgro#10013271, 10013270)用於培養骨髓瘤及P388D1細胞。將額外培養基補劑添加至融合瘤生長培養基，其包括5%之Origen-融合瘤選殖因子(IGEN, #36684, 36908)，5%之P388D1調理性培養基(11/15/00, 12/21/00 DH)，10% FCS(Hyclone, #AKE11828)， β -巰基乙醇(Gibco#1076640)，Genetacin(Gibco #1079874)，Hepes

(Cellgro-#25060041)及HAT(Sigma, H 0262; 1.0×10^{-4} M次黃嘌呤, 4.0×10^{-7} M胺基蝶呤, 1.6×10^{-5} M胸苷)或HT(Sigma, H0137; 1.0×10^{-4} M次黃嘌呤, 1.6×10^{-5} M胸苷)。

使用PEG及標準方法將脾細胞與骨髓瘤細胞融合。所得融合瘤細胞接種至50個96槽培養盤中，第一次融合時係接種200 μ l/槽。融合後10-12天進行人類IgG_K抗體之初始ELISA篩檢。隨後藉由6-組胺酸捕捉式ELISA來篩檢人類IgG_K陽性反應的細胞槽。此篩檢得到源自3個融合物之8個人類抗體之分離物：3個IgM，1個IgG3，及4個IgG1亞型抗體。

將具有鍵結-抗原之抗體之細胞槽中的融合瘤細胞第一次轉移至24槽培養盤中，並再次針對特異性重新篩檢。可藉由極限稀釋次選殖出天然RG1特異性融合瘤，以確保細胞的單株特性。在發展過程中的數個階段，將產生與天然RG1(nRG1)結合之抗體的融合瘤細胞冷凍在IGEN冷凍培養基中，以保存該等細胞。將該等細胞株的培養基冰凍，並以如下所述用於純化出抗體。8個分離物中的4個被測定為具有足夠特異性，可藉此進一步研究。

抗體之純化：4個上述人類單株RG1抗體使用蛋白質G瓊脂糖親合色譜法從細胞調理性培養基純化。藉由離心及過濾將細胞自培養基移除，使培養基經過蛋白質G管柱。隨後將該管柱在PBS中洗滌以移除未經結合的物質。以100 mM甘胺酸(pH值為2.5)沖提出經結合的抗體，且立即藉由添加10% v/v 1M Tris(pH值為8)來中和該溶離份。併聚含有抗體

之溶離份，以PBS透析，藉由SDS PAGE來測試純度，並藉由ELISA檢定抗原結合活性。

抗體之篩檢：抗體之篩檢係使用幾種不同檢定程序來進行：

A. hlgG_{rk} ELISA篩檢：96槽微量盤(Falcon, # 3912)經以1 ug/ml抗人類IgG κ 或溶於PBS中之抗人類IgG κ (50 ul/槽)塗覆整夜。將培養盤中培養基吸出，並用含有5%雞血清之PBS 0.05% Tween 20在室溫下阻斷1小時(100 μ l/槽)，隨後以PBS-tween洗滌3次。將融合瘤上清液在阻斷緩衝液中稀釋1:2，且在室溫下培育1小時(100 μ l/槽)用於篩檢。培育之後，在添加二級抗體HRP抗人類IgGFc(Jackson, #109-036-098)或HRP抗人類IgG κ (Sigma, #A-7164)之前(100 μ l/槽)，將培養盤以阻斷緩衝液洗滌3次。將二級抗體在室溫下培育1小時並接著將培養盤以阻斷緩衝液洗滌2次。使用含有80 ul ABTS(Sigma, # A1888)，8 μ l H₂O₂之10 ml檸檬酸鹽緩衝液(pH值為4.0)使各培養盤呈色，且在A_{415-490nm}下讀取。

B. RG1結合ELISA：攝氏4度下，將96槽微量盤以PBS中之0.5- 1.0 ug/槽的純化天然RG1蛋白質(50 ul/槽)塗覆整夜。吸出細胞槽培養基並接著添加100 ul/槽之PBS-tween+5%雞血清來阻斷反應，隨後在室溫下培育1小時。隨後將培養盤以阻斷緩衝液洗滌3次。接著將經連續稀釋之樣品(血清、融合瘤supe、純化mab等)以50 ul/槽添加至各個細胞槽中。在室溫下培育1小時隨後以阻斷緩衝液洗滌3次。隨

後以HRP抗人類IgGFc二級抗體在阻斷緩衝液中於室溫下培育該等細胞槽1小時並接著如前述洗滌3次。使用前述受質將該培養盤呈色並使用96槽培養盤讀取器量測A_{405 nm}的讀值。

C. 捕捉式ELISA方法：為了測定與天然構型之RG1蛋白質結合之mab，使用捕捉式ELISA形式。將含有6組胺酸表現標記之RG1蛋白質(6His-RG1)在BHK細胞中表現並用作抗原。根據標準方法，使用NiNTA瓊脂糖親合色譜法從調理性培養基中純化出6His-RG1。

在96槽NiNTA培養盤(Qiagen NiNTA HisSorb)上使用濃度1.5 ug/ml PBS加0.2% BSA(PBS/BSA, 100 ul/槽)在4攝氏度下隔夜捕捉經純化6His RG1。以含有0.05% Tween 20 (PBST)之PBS將細胞槽洗滌3次。將樣品(融合瘤上清液，血清，純化mab等)在PBS/BSA中稀釋並在培養盤上於室溫下培育1-2小時(50 ul/槽)並接著以PBST洗滌3次。二級抗體(HRP-標記山羊抗人類IgGFc)在PBS/BSA中稀釋至1:5000，以50 ul/槽添加至培養盤並在室溫下培育1小時。

以PBST將培養盤洗滌3次，並如在ELISA中進行呈色反應。使用ELISA培養盤讀取器量測405 nm下之吸光度。

D. BIAcore表面電漿共振(SPR)檢定：使用SPR，將親本融合瘤上清液進一步篩檢，以藉由親合力將選殖體以質量方式分級。使用標準胺偶合及pH 4.0之乙酸鹽及MEPES緩衝鹽(HBS)之流動相中的60 ug/ml抗體將兔子抗人類IgGFc(Pierce, 31142)固定至感應晶片(Biacore, BR-1000-12)

上。融合瘤培養基以5 ul/分鐘通過該表面，以捕捉至該表面並接著以HBS洗滌至基礎線。接著將純化、天然、BHK-RG1蛋白質(400 nM)通過該表面並以SPR來量測結合。在注射最後，將HBS通過該表面以量測抗體：RG1錯合體的解離。SPR量測值隨時間之斜率是解離率的指標，斜率越大，表示解離越快，且因此該抗體之親合力越低。

實例5：抗體之西方墨點分析

抗血清係藉由西方墨點法測試針對RG1之特異性。以COS細胞中瞬間表現之RG1、自LNCaP細胞分泌之天然RG1及自轉染幼倉鼠腎細胞(BHK)生成之RG1上測試RG1特異性抗血清(該等係對抗前述序列1C及3C)。RG1特異性抗血清進一步從下列各物製備之溶解物上測試：LNCaP腫瘤、LNCaP細胞、PC3腫瘤、PC3細胞及數種人類前列腺腫瘤之臨床樣品。細胞及組織溶解於清潔緩衝劑中，煮沸5分鐘後，將10 ul之各種溶解物裝載至12% SDS-聚丙烯醯胺凝膠上，以解析蛋白質。經分離蛋白質隨後轉漬至硝化纖維膜上，藉由同質性肽及異質性肽存在下的結合來確認RG1抗體之結合特異性。RG1特異性抗血清可在所有的樣品中偵測到蛋白質，但PC-3細胞及PC-3腫瘤除外。

對天然RG1具有特異性之人類mab之西方墨點分析證實：此等抗體僅在非還原條件下於墨點上辨識RG1，此推論該等mab係與更為天然形式之RG1結合。

實例6：分泌自LNCaP細胞的天然RG1蛋白質之純化

藉由西方墨點分析顯示組織培養生長之LNCaP細胞可分

泌出天然RG1蛋白質。為了純化該天然蛋白質，將細胞置於無血清培養基中生長48小時。收集該無血清經調理的培養基、離心去除所有細胞，並藉由超過濾濃縮大約50倍。經濃縮培養基隨後以20 mM乙酸鈉緩衝液(pH值為6.5)稀釋10倍，並裝載至Q-瓊脂糖陰離子交換管柱上。管柱沖提液係由氯化鈉梯度(0.5%每分鐘)構成，同時收集2.0 ml溶離份。該RG1蛋白質在大約75 mM NaCl(藉由西方墨點及SDS PAGE測定)下沖提出來。該天然RG1蛋白質與在細菌中所表現之6-組胺酸-RG1融合蛋白質相比，呈現以略微較低之分子量，大概是因為它缺少融合肽。

實例7：前列腺及前列腺癌轉移中之RG1表現的

免疫組織化學著色

藉由LifeSpan Biosciences, Inc.測定人類各種組織(包括腎臟、肺臟、胰臟、肌肉、腦及前列腺，及淋巴結與骨轉移)中RG1蛋白質之表現。額外之前列腺組織獲自史丹佛大學史丹佛學院泌尿學系並於Berlex測試。該組織切片使用標準程序進行脫石蠟。多株抗體RG1-3C係作為初級抗體，而該偵測系統由使用具有Vector紅色基質套組(Sk5002)的Vector ABC-AP套組(AK5002)構成。在不含初級抗體下進行著色係為陰性控制組。

檢查數位患者的前列腺腫瘤及正常前列腺組織中RG1之表現。在所有狀況下，前列腺腫瘤樣品均發現呈現強烈著色(表示有RG-1表現)。RG-1表現在正常前列腺組織各有不同，從幾無著色至顯著著色。

藉由免疫組織化學在已知含有前列腺腫瘤轉移之淋巴結及骨骼樣品亦可偵測到RG1表現。正常淋巴結或骨骼不會顯示出著色。

實例 8：RG1 抗體之定序

藉由標準方法測定如上述實例 4 中所產生及純化的兩種人類 RG1 抗體 (C 及 B) 之核酸序列。B 輕鏈可變區之核苷酸序列指定為 SEQ ID NO:20，而 B 重鏈可變區之核苷酸序列指定為 SEQ ID NO:21。C 輕鏈可變區之核苷酸序列指定為 SEQ ID NO:23，而 C 重鏈可變區之核苷酸序列指定為 SEQ ID NO:24。

測定此等可變鏈區之相應預測胺基酸序列，並指定為 SEQ ID NO:26 (B 輕鏈)；SEQ ID NO:27 (B 重鏈)；SEQ ID NO:29 (C 輕鏈)；SEQ ID NO:30 (C 重鏈)。參看圖 3 及 4。

實例 9：RG1 抗體之結合常數的測定

與天然 RG1 蛋白質結合之 mab 的動力學常數 (K_D 、 k_a 及 k_d) 係藉由 BIAcore 使用捕捉形式來測定，其中可溶解、天然 RG1 蛋白質係結合至位於感應晶片上之固定化 mab。免疫純兔子抗人類 IgG Fc (Pierce, 31142) 使用標準胺偶合方法共價固定於感應晶片 CM5 (Biacore, BR-1000-12) 上。使用稀釋於 10 mm 乙酸鹽中之 100 ug/ml 抗體，pH 值為 4.0，以 5 ul/分鐘來使用。HBS-EP (Biacore, BR-1001-88) 係作為流動相之用，未反應部位以乙醇胺來阻斷。以 HBS 將 mab 稀釋至 200 nM，且以每循環 10 ul/分鐘速率注射 50 ul。BHK-RG1 之連續稀釋液 (12.5-400 nM) 與固定 mab 結合，以 20 ul/分鐘進行 8

分鐘抗原注射完成後，立即量測解離動力學。在每個循環之後，使用 25 μl 之 10 mm 甘胺酸 (pH 值為 1.8) 再生該表面並接著以 HBS 洗滌該表面。

通常，運行五次濃度及一次培養基對照。使用儀器製造商提供值軟體 (BIAevaluation 3.0) 將資料配合入 1 : 1 Langmuir 模型中，並計算動力學常數。平衡常數係為具有有利解離速率 (10^{-4}s^{-1}) 之奈莫耳濃度範圍。表 1 顯示 4 種人類抗體之動力學常數。

表 1：人類 RG-1 抗體 A、B、C 及 D 之動力學常數。此等抗體之動力學常數係藉由使 1 : 1 的 Langmuir 模型配合獲自 BIAcore 研究的數據來測定。 K_a ：結合率 (1/s)； K_d ：解離率 (1/s)； K_D ：親合力 (M)

M ab	$K_a(1/M\text{ s})$	$K_d(1/s)$	$K_D(M)$
A	2.3×10^4	1.9×10^{-4}	8.9×10^{-9}
B	2.9×10^4	2.3×10^{-4}	8.4×10^{-9}
C	2.5×10^4	8.4×10^{-4}	3.36×10^{-8}
D	3.17×10^4	2.95×10^{-3}	9.27×10^{-8}

實例 10：RG1 抗體之放射性標記

螯合劑與 RG1 抗體之共軛作用：利用修改自 Nikula 等人 *Nucl. Med. Biol.*, Vol. 22, No.3, pp.387-390, 1995 之方法，將雙功能螯合劑對 -SCN- 苄基 -DTPA (Macrocyclics, Inc.) 以共價方式連接至抗體上。在此程序期間所使用之所有試劑及設備於使用必須是不含金屬，以避免螯合劑失去活性。

所有溶液以低金屬試劑、高純度(MilliQ)水及經處理以移除微量金屬之Chelex來製備。以10 mM EDTA漂洗所有設備並接著用MilliQ水充分漂洗。

在緩衝交換成50 mM碳酸鈉緩衝液、150 mM NaCl(pH值為8.5)之前，利用在AKTA層析法系統使用Pharmacia 26/10脫鹽管柱，先以1 mM EDTA在室溫下處理經純化mab(~20 mg)1小時，以移除所有金屬。併聚含有抗體之溶離份，並藉由超過濾法(Centricon 30)將其濃縮至大約2 mg/ml。100 mg/ml對-SCN-苄基-DTPA儲存溶液在無水DMSO中新鮮製備。共軛反應係使用50-100倍莫耳過量之DTPA，使其在室溫下隔夜進行。反應混合物隨後緩衝交換成50 mM乙酸钠、150 mM NaCl，pH值為6.5(放射性標記緩衝液)，並藉由超過濾濃縮至至少3 mg/ml。抗體共軛物於攝氏4度下穩定於該緩衝液中達數週。藉由BCA測定蛋白質濃度，並藉由ELISA確認抗原結合的活性。

RG1抗體之放射性標記：在無金屬的條件下，將DTPA共軛抗體以 ^{90}Y 或 ^{111}In 進行放射性標記，以作為帶有腫瘤動物活體內研究之用。通常，係將10 mg抗體共軛物與10 mCi之 $^{90}\text{YCl}_3$ 或 $^{111}\text{InCl}_3$ (PerkinElmer生命科學)在室溫下於厚重護罩之後，以輕度方式混合1小時。添加EDTA至1 mM並在室溫下反應10分鐘。反應混合物通過26/10脫鹽管柱(已在無金屬PBS中預平衡)運行，以便從未結合 ^{90}Y 分離出經放射性標記抗體，並交換緩衝液。收集1 ml溶離份並彙聚含有抗體之溶離份。藉由BCA測定蛋白質濃度。使用針對 ^{90}Y 之

液體閃爍計數器或針對 ^{111}In 之 γ 計數器來測定1 ul樣品之總放射性。以mCi/mg蛋白質來計算特異活性，且通常範圍介於0.25至1.0 mCi/mg之間。藉由根據Nikula等人*Nucl. Med. Biol.* 22:387-390, 1995之瞬間薄層層析儀(ITLC)來測定放射性純度。通常，大於98%之放射性與蛋白質有關。放射共軛物之抗體結合活性係藉由針對非共軛抗體標準(^{90}Y 共軛物)之ELISA方法或使用經固定化RG1蛋白質(^{111}In 共軛物)之固相放射性免疫結合檢定法加以測定。在所有狀況下，放射性共軛物之抗原結合與未共軛抗體之抗原結合無法區別。

實例11：經 ^{111}In 標記之RG1抗體的腫瘤特異性聚積

將置於母膠中之 1×10^7 LNCaP細胞以皮下注射(s.c.)方式共同接種至5-6週大雄性無胸腺裸鼠脅腹，以建立腫瘤異種移植物。當腫瘤達到體積150-400 mm^3 時(腫瘤細胞接種後大約4-6週)進行生物分布研究。將經 ^{111}In 標記之人類RG1抗體(C、B、A)及非特異性人類IgG₁對照抗體(特異活性，0.3 mCi/mg)以靜脈內投藥方式投與4組12隻帶有LNCaP異種移植物的老鼠中。老鼠在解剖前先以心臟穿刺法抽血。取出血液、腫瘤及所有主要器官，在分析天平上稱重，及以 γ 計數器中計算放射性。血液、個別器官及殘餘屍體中所測之放射性總和來測定全身清除率。所有數據係進行放射性同位素衰減校正。結果以每公克組織注射劑量的百分比表示。RG1特異性抗體顯示出具有高腫瘤特異性聚積(參看圖1)。

實例 12：以經⁹⁰Y-標記RG1抗體之腫瘤生長抑制作用

將置於母膠中之 1×10^7 LNCaP細胞以皮下注射(S.C.)方式共同接種至5-6週大雄性無胸腺裸鼠脅腹，以建立腫瘤異種移植物。當腫瘤達到體積 $50-350 \text{ mm}^3$ 時(腫瘤細胞接種後5週)開始治療。將帶有腫瘤的動物平均分配至4個治療組($n = 13/\text{組}$)。以腹腔注射方式(i.p.)，將單劑經放射標記抗體B、C及非特異性IgG₁(125 $\mu\text{Ci}/\text{動物}$)投用至帶有LNCaP移植物的小鼠，第4治療組係以i.p.注射方式給予食鹽溶液。注射後，監測經⁹⁰Y標記RG1特異性抗體對衍生自LNCaP的腫瘤生長的影響達32天。彼時，殺死動物並將腫瘤取出及稱重。藉由監測體重來決定健康狀況。與注射經⁹⁰Y標記之非特異性抗體或媒劑對照物之動物所得結果相比，經⁹⁰Y標記之特異性人類RG1抗體之單劑投藥對腫瘤生長會產生顯著的抑制作用。(參看圖2)。

實例 13：RG1抗體在CHO細胞中的選殖及表現

突變發生：將編碼抗RG1抗體B及C可變區之野生型cDNA的進行定點突變發生，以便產生可更常在人類中表現之同種異型抗原免疫球蛋白。使用QuickChange®多定點突變發生方法(Stratagene)來進行突變發生，其中係以TOPO/BVH及TOPO/CVH(Medarex)作為模板。將H13Q、M90T及M92V點突變(point mutation)引入至B cDNA(BVH_3m)及將H13Q、M90T引入至C cDNA(CVH_2m)係使用引子(GGGGAGGCTTGGTACAACCTGGGGGGGTCCCTGAG; SEQ ID NO:14) 及 (GAACAGC

CTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTTATTACTGTGCAAG;
SEQ ID NO:15)。藉由DNA序列分析確認突變作用，及導致
產生分別具有SEQ ID NO:22及SEQ ID NO:25突變重鏈可變
區。該等兩個重鏈可變區之預測胺基酸序列分別示於SEQ
ID NOS:28及31。

表現載體之構築：pIE_SRY1fa(Medarex)之表現載體含有
分別編碼人類IgG1(fa單倍體)之CH及CL區域及kappa鏈之
cDNA。為了使B及C輕鏈可變區以讀框方式選殖入
pIE_SRY1fa，使用引子對
BVK_F(GGGAAAGCTTGCCACCATGGAAACCCCAGCG; SEQ
ID NO:16) 及 BVK_R(CAGTCCGTACGTTT
GATCTCCACCTTGGTCC; SEQ ID NO:17)分別在BVL及
CVL cDNA之5'及3'末端引入相容HindIII/Bsiw部位(下劃
線)。藉由PCR產生之所得VL cDNA選殖至pIE_SRY1fa之
HindIII/Bsiw部位，以製造pIE/BVL及CVL。使用相同策略
以讀框方式將VH融合物(包括BVH、BVH_3m、CVH及
CVH_2m)構築至pIE/BVL及CVL。簡言之，
CVH_F(GTCAGGATGCGGCCGCCAC
CATGGAGTTTGTGCTGAGCT; SEQ ID NO:18)及CVH_R
(ACCGATGGGCCCTTGGTGGA; SEQ ID NO:19)係用以將
NotI/ApaI部位引入於以PCR方式擴增之VH cDNA之末端。
PCR產物經以NotI/ApaI消化，並插入pIE/BVL及pIE/CVL之
CH區域的上游，確保在對應pIE衍生物中的VH區域係與CH
區域在讀框內。最終構築體命名為pIE/B、pIE/B_3m、pIE/C

及 pIE/C_2m。所有插入物業經 DNA 序列分析確認。

DG44及DXB11細胞之轉染及選擇/擴增。轉染前一天，將補充有 F12 培養基及 5% FCS 之約 4×10^6 DG44 及 DXB11 細胞接種在 P100 培養盤中。每一 P100 培養盤使用 Lipfectamine 2000 (Invitrogen) 及 24 μ g 線性化質粒 DNA (pIE/B_3m 或 pIE/C_2m) 進行轉染作用。轉染後 4 小時換培養基。轉染後約 24 小時施加篩選條件。

以含有 5% 經透析 FBS、2 mM L-穀醯胺及 G418 (400 μ g/ml) 但不含核糖核苷及脫氧核糖核苷之 MEM 培養基首先進行篩選。將長滿到約 90% 之細胞分配至 $4 \times$ P100 培養盤中，並以 G418 外加各種濃度胺甲喋呤 (methotrexate) 進行共同篩選。一週後，將存活細胞於篩選培養基存在下，以 100 細胞/培養盤的濃度接種至 96 槽孔盤中。以針對重組抗體表現作用之 ELISA 方法篩檢出存活的選殖細胞。在濃度增加之胺甲喋呤下，藉由連續篩選擴增具有最高表現水平之 10 個選殖細胞的基因複本數，並將鎖選出的選殖細胞適應於無血清培養基，以製備主細胞庫。

前述說明書中提及之所有出版物及申請案均以引用的方式併入本文。儘管已參照本發明特殊實施例來描述了本發明，但是熟習此項技術者應當瞭解，在不背離本發明之真正精神及範疇下可作出各種改變且可用等價形式取代。此外，可作出諸多改進以使特殊情況、材料、物質組合物、方法、方法步驟或多個步驟適合本發明之目的、精神及範

疇。所有該等修改意欲屬於附加之申請專利範圍之範疇內。

【圖式簡單說明】

圖 1：經 ^{111}In 標記之 RG1 抗體之生物分布：藉由 ^{111}In 對 3 個 RG1 抗體 (A、B 及 C)、一非特異性 hlgG₁ 對照抗體及 Proscint™ 進行放射性標記。將經放射性標記之抗體 (特異活性：0.3 mCi/mg) i.v. 投藥至帶有腫瘤 (LNCaP) 裸鼠內。在第 6、24、120 及 150 小時 p.i. 犧牲每組 12 隻動物 (每時間點 3 隻動物) 且監測腫瘤、血液及肝臟中之積聚。(參看實例 11)

圖 2：經 ^{90}Y 標記之 RG1 抗體的抗腫瘤效應：向帶有 LNCaP 腫瘤動物注射經 ^{90}Y 標記之抗體 (抗 RG1 抗體 B 及 C 或非特異性 IgG₁，特異活性，0.5 mCi/mg)。將單一劑量之 125 μCi ^{90}Y 標記之 RG1 抗體 (B、C) i.p. 投藥。小鼠在第 32 天犧牲且切除腫瘤並將其稱重。(見實例 12)

圖 3：人類單株抗體 B 之可變鏈區之胺基酸序列，包括變異之可變重鏈區。V_L (SEQ ID NO:26)、V_H (SEQ ID NO:27)、V_{H_3m} (SEQ ID NO:28)。

圖 4：人類單株抗體 C 之可變鏈區之胺基酸序列，包括變異之可變重鏈區。V_L (SEQ ID NO:29)、V_H (SEQ ID NO:30)、V_{H_2m} (SEQ ID NO:31)。

99年3月5日修(更)正本

序 列 表

- <110> 德商先靈公司
 <120> RG1 抗體及其用途
 <130> 51791BUSM1
 <140> 093121655
 <141> 2004-07-20
 <150> US 60/489,032
 <151> 2003-07-22
 <160> 31
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 1785
 <212> DNA
 <213> 智人
 <220>
 <221> CDS
 <222> (296)..(1291)
 <223>
 <400> 1

```

agaaaggggt gcggcagcac tgccagggga agagggtgat ccgacccggg gaaggtcgct      60
gggcagggcg agttgggaaa gcggcagccc ccgcccccc cgcagcccct tctcctcctt      120
tctcccacgt cctatctgcc tctcgctgga ggccaggccg tgcagcatcg aagacaggag      180
gaactggagc ctcatggcc ggcccggggc gccggcctcg ggcttaaata ggagctccgg      240
gctctggctg ggacccgacc gctgccggcc gcgctcccgc tgctcctgcc gggtg atg      298
                                                Met
                                                1

gaa aac ccc agc ccg gcc gcc gcc ctg ggc aag gcc ctc tgc gct ctc      346
Glu Asn Pro Ser Pro Ala Ala Ala Leu Gly Lys Ala Leu Cys Ala Leu
          5                10                15

```

ctc ctg gcc act ctc ggc gcc gcc ggc cag cct ctt ggg gga gag tcc Leu Leu Ala Thr Leu Gly Ala Ala Gly Gln Pro Leu Gly Gly Glu Ser 20 25 30	394
atc tgt tcc gcc gga gcc ccg gcc aaa tac agc atc acc ttc acg ggc Ile Cys Ser Ala Gly Ala Pro Ala Lys Tyr Ser Ile Thr Phe Thr Gly 35 40 45	442
aag tgg agc cag acg gcc ttc ccc aag cag tac ccc ctg ttc cgc ccc Lys Trp Ser Gln Thr Ala Phe Pro Lys Gln Tyr Pro Leu Phe Arg Pro 50 55 60 65	490
cct gcg cag tgg tct tcg ctg ctg ggg gcc gcg cat agc tcc gac tac Pro Ala Gln Trp Ser Ser Leu Leu Gly Ala Ala His Ser Ser Asp Tyr 70 75 80	538
agc atg tgg agg aag aac cag tac gtc agt aac ggg ctg cgc gac ttt Ser Met Trp Arg Lys Asn Gln Tyr Val Ser Asn Gly Leu Arg Asp Phe 85 90 95	586
gcg gag cgc ggc gag gcc tgg gcg ctg atg aag gag atc gag gcg gcg Ala Glu Arg Gly Glu Ala Trp Ala Leu Met Lys Glu Ile Glu Ala Ala 100 105 110	634
ggg gag gcg ctg cag agc gtg cac gcg gtg ttt tcg gcg ccc gcc gtc Gly Glu Ala Leu Gln Ser Val His Ala Val Phe Ser Ala Pro Ala Val 115 120 125	682
ccc agc ggc acc ggg cag acg tcg gcg gag ctg gag gtg cag cgc agg Pro Ser Gly Thr Gly Gln Thr Ser Ala Glu Leu Glu Val Gln Arg Arg 130 135 140 145	730
cac tcg ctg gtc tcg ttt gtg gtg cgc atc gtg ccc agc ccc gac tgg His Ser Leu Val Ser Phe Val Val Arg Ile Val Pro Ser Pro Asp Trp 150 155 160	778
ttc gtg ggc gtg gac agc ctg gac ctg tgc gac ggg gac cgt tgg cgg Phe Val Gly Val Asp Ser Leu Asp Leu Cys Asp Gly Asp Arg Trp Arg 165 170 175	826
gaa cag gcg gcg ctg gac ctg tac ccc tac gac gcc ggg acg gac agc Glu Gln Ala Ala Leu Asp Leu Tyr Pro Tyr Asp Ala Gly Thr Asp Ser 180 185 190	874
ggc ttc acc ttc tcc tcc ccc aac ttc gcc acc atc ccg cag gac acg Gly Phe Thr Phe Ser Ser Pro Asn Phe Ala Thr Ile Pro Gln Asp Thr 195 200 205	922



gtg acc gag ata acg tcc tcc tct ccc agc cac ccg gcc aac tcc ttc Val Thr Glu Ile Thr Ser Ser Ser Pro Ser His Pro Ala Asn Ser Phe 210 215 220 225	970
tac tac cca cgg ctg aag gcc ctg cct ccc atc gcc agg gtg aca ctg Tyr Tyr Pro Arg Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ile Ala Arg Val Thr Leu 230 235 240	1018
gtg cgg ctg cga cag agc ccc agg gcc ttc atc cct ccc gcc cca gtc Val Arg Leu Arg Gln Ser Pro Arg Ala Phe Ile Pro Pro Ala Pro Val 245 250 255	1066
ctg ccc agc agg gac aat gag att gta gac agc gcc tca gtt cca gaa Leu Pro Ser Arg Asp Asn Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Val Pro Glu 260 265 270	1114
acg ccg ctg gac tgc gag gtc tcc ctg tgg tgc tcc tgg gga ctg tgc Thr Pro Leu Asp Cys Glu Val Ser Leu Trp Ser Ser Trp Gly Leu Cys 275 280 285	1162
gga ggc cac tgt ggg agg ctc ggg acc aag agc agg act cgc tac gtc Gly Gly His Cys Gly Arg Leu Gly Thr Lys Ser Arg Thr Arg Tyr Val 290 295 300 305	1210
cgg gtc cag ccc gcc aac aac ggg agc ccc tgc ccc gag ctc gaa gaa Arg Val Gln Pro Ala Asn Asn Gly Ser Pro Cys Pro Glu Leu Glu Glu 310 315 320	1258
gag gct gag tgc gtc cct gat aac tgc gtc taa gaccagagcc ccgcagcccc Glu Ala Glu Cys Val Pro Asp Asn Cys Val 325 330	1311
tggggcccc cggagccatg ggggtgtcggg ggctcctgtg caggctcatg ctgcaggcgg	1371
ccgagggcac aggggggtttc gcgctgctcc tgaccgcggt gaggccgcgc cgaccatctc	1431
tgactgaag ggccctctgg tggccggcac gggcattggg aacagcctc ctctttccc	1491
aaccttgctt cttaggggcc cccgtgtccc gtctgtctc agcctctcc tctgcagga	1551
taaagtcac cccaaggctc cagctactct aaattatgtc tccttataag ttattgctgc	1611
tccaggagat tgtccttcat cgtccagggg cctggctccc acgtggttgc agatacctca	1671
gacctggtgc tctaggctgt gctgagccca ctctcccag ggcgcatcca agcgggggcc	1731

acttgagaag tgaataaatg gggcggtttc ggaagcgtca aaaaaaaaaa aaaa

1785

- <210> 2
- <211> 331
- <212> PRT
- <213> 智人

<400> 2

Met Glu Asn Pro Ser Pro Ala Ala Ala Leu Gly Lys Ala Leu Cys Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Thr Leu Gly Ala Ala Gly Gln Pro Leu Gly Gly Glu
 20 25 30

Ser Ile Cys Ser Ala Gly Ala Pro Ala Lys Tyr Ser Ile Thr Phe Thr
 35 40 45

Gly Lys Trp Ser Gln Thr Ala Phe Pro Lys Gln Tyr Pro Leu Phe Arg
 50 55 60

Pro Pro Ala Gln Trp Ser Ser Leu Leu Gly Ala Ala His Ser Ser Asp
 65 70 75 80

Tyr Ser Met Trp Arg Lys Asn Gln Tyr Val Ser Asn Gly Leu Arg Asp
 85 90 95

Phe Ala Glu Arg Gly Glu Ala Trp Ala Leu Met Lys Glu Ile Glu Ala
 100 105 110

Ala Gly Glu Ala Leu Gln Ser Val His Ala Val Phe Ser Ala Pro Ala
 115 120 125

Val Pro Ser Gly Thr Gly Gln Thr Ser Ala Glu Leu Glu Val Gln Arg
 130 135 140

Arg His Ser Leu Val Ser Phe Val Val Arg Ile Val Pro Ser Pro Asp



<210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人造序列
 <220>
 <223> 引子

<400> 3

cgcgcatagc tccgactac

19

<210> 4
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人造序列
 <220>
 <223> 引子

<400> 4

gccgcgtccg caaag

15

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人造序列
 <220>
 <223> 探針

<400> 5

aggaagaacc agtacgtcag taacgggctg

30

<210> 6
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人造序列
 <220>
 <223> 引子

<400> 6

tccctctaga gccacatgg aaaaccccag cccggc

36



<210> 7
<211> 35
<212> DNA
<213> 人造序列
<220>
<223> 引子 2

<400> 7

aaggcatcac gtgtagacg cagttatcag ggacg

35

<210> 8
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Pro Leu Gly Gly Glu Ser Ile Cys Ser Ala Gly Ala Pro Ala Lys Tyr
1 5 10 15

Ser Ile Thr

<210> 9
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Thr Phe Thr Gly Lys Trp Ser Gln Thr Ala Phe Pro Lys Gln Tyr Pro
1 5 10 15

Leu Phe Arg

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

His Ser Ser Asp Tyr Ser Met Trp Arg Lys Asn Gln Tyr Val Ser
 1 5 10 15

<210> 11

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人

<400> 11

Asp Ala Gly Thr Asp Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Pro Asn Phe Ala
 1 5 10 15

Thr Ile Pro Gln Asp Thr Val
 20

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

Asn Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Val Pro Glu Thr
 1 5 10

<210> 13

<211> 330

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 13

Met Glu Asn Val Ser Phe Ser Leu Asp Arg Thr Leu Trp Val Phe Leu
 1 5 10 15

Leu Ala Met Leu Gly Ser Thr Ala Gly Gln Pro Leu Gly Gly Glu Ser
 20 25 30



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

Lys Trp Ser Gln Thr Ala Phe Pro Lys Gln Tyr Pro Leu Phe Arg Pro
 50 55 60

Pro Ala Gln Trp Ser Ser Leu Leu Gly Ala Ala His Ser Ser Asp Tyr
 65 70 75 80

Ser Met Trp Arg Lys Asn Glu Tyr Val Ser Asn Gly Leu Arg Asp Phe
 85 90 95

Ala Glu Arg Gly Glu Ala Trp Ala Leu Met Lys Glu Ile Glu Ala Ala
 100 105 110

Gly Glu Lys Leu Gln Ser Val His Ala Val Phe Ser Ala Pro Ala Val
 115 120 125

Pro Ser Gly Thr Gly Gln Thr Ser Ala Glu Leu Glu Val His Pro Arg
 130 135 140

His Ser Leu Val Ser Phe Val Val Arg Ile Val Pro Ser Pro Asp Trp
 145 150 155 160

Phe Val Gly Ile Asp Ser Leu Asp Leu Cys Glu Gly Gly Arg Trp Lys
 165 170 175

Glu Gln Val Val Leu Asp Leu Tyr Pro His Asp Ala Gly Thr Asp Ser
 180 185 190

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Pro Asn Phe Ala Thr Ile Pro Gln Asp Thr
 195 200 205

Val Thr Glu Ile Thr Ala Ser Ser Pro Ser His Pro Ala Asn Ser Phe
 210 215 220

Tyr Tyr Pro Arg Leu Lys Ser Leu Pro Pro Ile Ala Lys Val Thr Phe
 225 230 235 240

Val Arg Leu Arg Gln Ser Pro Arg Ala Phe Ala Pro Pro Ser Leu Asp
 245 250 255

Leu Ala Ser Arg Gly Asn Glu Ile Val Asp Ser Leu Ser Val Pro Glu
 260 265 270

Thr Pro Leu Asp Cys Glu Val Ser Leu Trp Ser Ser Trp Gly Leu Cys
 275 280 285

Gly Gly Pro Cys Gly Lys Leu Gly Ala Lys Ser Arg Thr Arg Tyr Val
 290 295 300

Arg Val Gln Pro Ala Asn Asn Gly Thr Pro Cys Pro Glu Leu Glu Glu
 305 310 315 320

Glu Ala Glu Cys Ala Pro Asp Asn Cys Val
 325 330

- <210> 14
- <211> 34
- <212> DNA
- <213> 人造序列
- <220>
- <223> 引子
- <400> 14

ggggaggcctt ggtacaacct ggggggtccc tgag

34

- <210> 15
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> 人造序列
- <220>

<223> 引子

<400> 15

gaacagcctg agagccgagg acacggctgt gtattactgt gcaag 45

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 引子

<400> 16

gggaagcttg ccacatgga aaccccagcg 30

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 引子

<400> 17

cagtcgtacg tttgatctcc accttggctc 30

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 引子

<400> 18

gtcaggatgc ggccgccacc atggagtttg tgctgagct 31

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 引子

<400> 19

accgatgggc ccttgggtgga

20

<210> 20

<211> 381

<212> DNA

<213> 智人

<400> 20

atggaaacc cagcgagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120

ctctctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatagta gctcgctcac tttcggcggg 360

gggaccaagg tggagatcaa a 381

<210> 21

<211> 441

<212> DNA

<213> 智人

<400> 21

atggagtttg tgctgagctg ggttttcctt gttgctatat taaaaggtgt ccagtgtgag 60

gttcagctgg tgcaagtctgg gggaggcttg gtacatcctg gggggtcctt gagactctcc 120

tgtgcaggct ctggattcac cttcagtagc tatgttatgc actggcttcg ccaggctcca 180

ggaaaaggtc tggagtgggt atcagttatt ggtactggtg gtgtcacaca ctatgcagac 240

tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca agaactcctt gtatcttcaa 300

atgaacagcc tgagagccga ggacatggct atgtattact gtgcaagatg gggttactat 360
 ggttcgggga gttatgagaa tgatgctttt gatatctggg gccaaaggac aatggtcacc 420
 gtctcttcag cctccaccaa g 441

<210> 22
 <211> 441
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 22

atggagtttg tgctgagctg ggttttcctt gttgctatat taaaagggtg ccagtgtgag 60
 gttcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacaacctg gggggtcctt gagactctcc 120
 tgtgcaggct ctggattcac cttcagtagc tatgttatgc actggcttcg ccaggctcca 180
 ggaaaaggctc tggagtgggt atcagttatt ggtactgggtg gtgtcacaca ctatgcagac 240
 tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca agaactcctt gtatcttcaa 300
 atgaacagcc tgagagccga ggacacggct gtgtattact gtgcaagatg gggttactat 360
 ggttcgggga gttatgagaa tgatgctttt gatatctggg gccaaaggac aatggtcacc 420
 gtctcttcag cctccaccaa g 441

<210> 23
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 23

atggaaacc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
 gaaatttgtg tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240
 gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcactcac tttcggcgga 360

gggaccaagg tggagatcaa a 381

<210> 24

<211> 423

<212> DNA

<213> 智人

<400> 24

atggagtttg tgctgagctg ggttttcctt gttgctatat taaaagggtg ccagtgtgag 60

gttcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacatcctg gggggtcctt gagactctcc 120

tgtgcaggct ctggattcac cttcagtagc tatgtcatgc actgggttcg ccaggctcca 180

ggaaaaggtc tggagtgggt atcagtaatt ggtactgggt gtgtcacaaa ctatgcagac 240

tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcc aagaactcctt gtatcttcaa 300

atgaacagcc tgagagccga ggacatggct gtgtattact gtgcaagatg gggggactgg 360

gatgatgctt ttgatatctg gggccaaggg acaatgggtca cegtctcttc agcctccacc 420

aag 423

<210> 25

<211> 423

<212> DNA

<213> 智人

<400> 25

atggagtttg tgctgagctg ggttttcctt gttgctatat taaaagggtg ccagtgtgag 60

gttcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacaacctg gggggtcctt gagactctcc 120

tgtgcaggct ctggattcac cttcagtagc tatgtcatgc actgggttcg ccaggctcca 180

ggaaaaggtc tggagtgggt atcagtaatt ggtactgggt gtgtcacaaa ctatgcagac 240

tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcc aagaactcctt gtatcttcaa 300



atgaacagcc tgagagccga ggacacggct gtgtattact gtgcaagatg gggggactgg 360
 gatgatgctt ttgatatctg gggccaaggg acaatgggtca ccgtctcttc agcctccacc 420
 aag 423

<210> 26
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 26

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110

Ser Ser Ser Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 27

<211> 147
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 27

Met Glu Phe Val Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Val Met His Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr His Tyr Ala Asp
 65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Met Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Glu Asn Asp
 115 120 125

Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala
 130 135 140

Ser Thr Lys
 145

<210> 28

<211> 147
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 28

Met Glu Phe Val Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Val Met His Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr His Tyr Ala Asp
 65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Glu Asn Asp
 115 120 125

Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala
 130 135 140

Ser Thr Lys
 145

<210> 29

<211> 127
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 29

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110

Gly Ser Ser Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 30
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 30

Met Glu Phe Val Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15



Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr Asn Tyr Ala Asp
 65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Asp Trp Asp Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

<210> 31

<211> 141

<212> PRT

<213> 智人

<400> 31

Met Glu Phe Val Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr Asn Tyr Ala Asp
 65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Asp Trp Asp Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140



五、中文發明摘要：

本發明係關於針對RG1多肽之抗體、及鍵結-抗原之抗體片段。本發明進一步係關於利用該等抗體及抗體片段以應用於診斷及治療應用之方法。

六、英文發明摘要：

十、申請專利範圍：

1. 一種經分離人類抗體或其抗原結合片段，其中該抗體包含：
 - a) 具有 SEQ ID NO:26 之胺基酸序列之輕鏈可變區及具有 SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:28 之胺基酸序列之重鏈可變區，或
 - b) 具有 SEQ ID NO:29 之胺基酸序列之輕鏈可變區及具有 SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:31 之胺基酸序列之重鏈可變區，
 且其中該抗體或其抗原結合片段結合至具有 SEQ ID NO:2 之胺基酸序列的 RG1 多肽。
2. 如請求項 1 之經分離人類抗體或其抗原結合片段，其中該重鏈可變區具有 SEQ ID NO:27 之胺基酸序列。
3. 如請求項 1 之經分離人類抗體或其抗原結合片段，其中該重鏈可變區具有 SEQ ID NO:28 之胺基酸序列。
4. 如請求項 1 之經分離人類抗體或其抗原結合片段，其中該重鏈可變區具有 SEQ ID NO:30 之胺基酸序列。
5. 如請求項 1 之經分離人類抗體或其抗原結合片段，其中該重鏈可變區具有 SEQ ID NO:31 之胺基酸序列。
6. 一種經分離人類抗體或其抗原結合片段，其結合 SEQ ID NO:2 之 RG1，其中該經分離人類抗體或其抗原結合片段包含：
 - a) 輕鏈 CDR3 序列，其包含 SEQ ID NO:26 之胺基酸殘基 110 至 117，

- b) 重鏈 CDR3 序列，其包含 SEQ ID NO:27 之胺基酸殘基 117 至 132，
 - c) 輕鏈 CDR1 序列及 CDR2 序列，其分別包含 SEQ ID NO:26 之胺基酸殘基 44 至 55 及 SEQ ID NO:26 之胺基酸殘基 71 至 77，及
 - d) 重鏈 CDR1 序列及 CDR2 序列，其分別包含 SEQ ID NO:27 之胺基酸殘基 50 至 54 及 SEQ ID NO:27 之胺基酸殘基 69 至 84。
7. 一種經分離人類抗體或其抗原結合片段，其結合 SEQ ID NO:2 之 RG1，其中該抗體包含：
- a) 輕鏈 CDR3 序列，其包含 SEQ ID NO:29 之胺基酸殘基 110 至 117，
 - b) 重鏈 CDR3 序列，其包含 SEQ ID NO:230 之胺基酸殘基 117 至 126，
 - c) 輕鏈 CDR1 序列及 CDR2 序列，其分別包含 SEQ ID NO:29 之胺基酸殘基 44 至 55 及 SEQ ID NO:29 之胺基酸殘基 71 至 77，及
 - d) 重鏈 CDR1 序列及 CDR2 序列，其分別包含 SEQ ID NO:30 之胺基酸殘基 50 至 54 及 SEQ ID NO:30 之胺基酸殘基 69 至 84。
8. 如請求項 1、6 或 7 之經分離人類抗體或其抗原結合片段，其中該抗原結合片段選自由 Fv、F(ab')、F(ab')₂、scFv、微型抗體及雙功能抗體片段所組成之群。
9. 如請求項 1、6 或 7 之經分離人類抗體或其抗原結合片段，

其中該抗體為單株抗體。

10. 一種免疫共軛物，其包含如請求項1、6或7之經分離人類抗體或其抗原結合片段，其中該經分離人類抗體或其抗原結合片段係與治療劑或可偵測標記分子共軛。
11. 如請求項10之免疫共軛物，其中該治療劑係細胞毒素劑。
12. 如請求項11之免疫共軛物，其中該細胞毒素劑係選自由下列組成之群：蓖麻毒素、阿黴素、道諾黴素、紫杉酚 (paclitaxe)、溴化乙錠、絲裂黴素、足葉乙甙、特諾波賽 (tenoposide)、長春新鹼、長春鹼、秋水仙鹼、二羥基炭疽菌素二酮、放射菌素D、白喉毒素、綠膿桿菌外毒素 (PE)A、PE40、蓖麻毒素、相思豆毒素及糖皮質激素及放射性同位素。
13. 如請求項11之免疫共軛物，其中該細胞毒素劑為放射性同位素，且係選自由下列組成之群： ^{46}Sc 、 ^{47}Sc 、 ^{48}Sc 、 ^{72}Ga 、 ^{73}Ga 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{109}Pd 、 ^{111}Ag 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、 ^{211}Bi 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 及 ^{214}Bi 。
14. 如請求項10之免疫共軛物，其中該可偵測標記為放射性標記、酵素、發色團或螢光劑。
15. 如請求項14之免疫共軛物，其中該可偵測標記係放射性標記，且係選自由下列組成之群： ^{43}Sc 、 ^{44}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{55}Co 、 ^{68}Ga 、 ^{64}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{94}mTc 、 ^{111}In 及 ^{99}mTc 。
16. 如請求項10之免疫共軛物，其中該經分離人類抗體或其抗原結合片段與治療劑或可偵測標記之共軛作用係使用選自由下列組成之群之螯合劑：對-SCN-苄基-DPTA及其

衍生物，1,4,7,10-四氮雜環十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA)及其衍生物，及1,4,7-三氮雜環壬烷-N, N', N''-三乙酸(NOTA)及其衍生物。

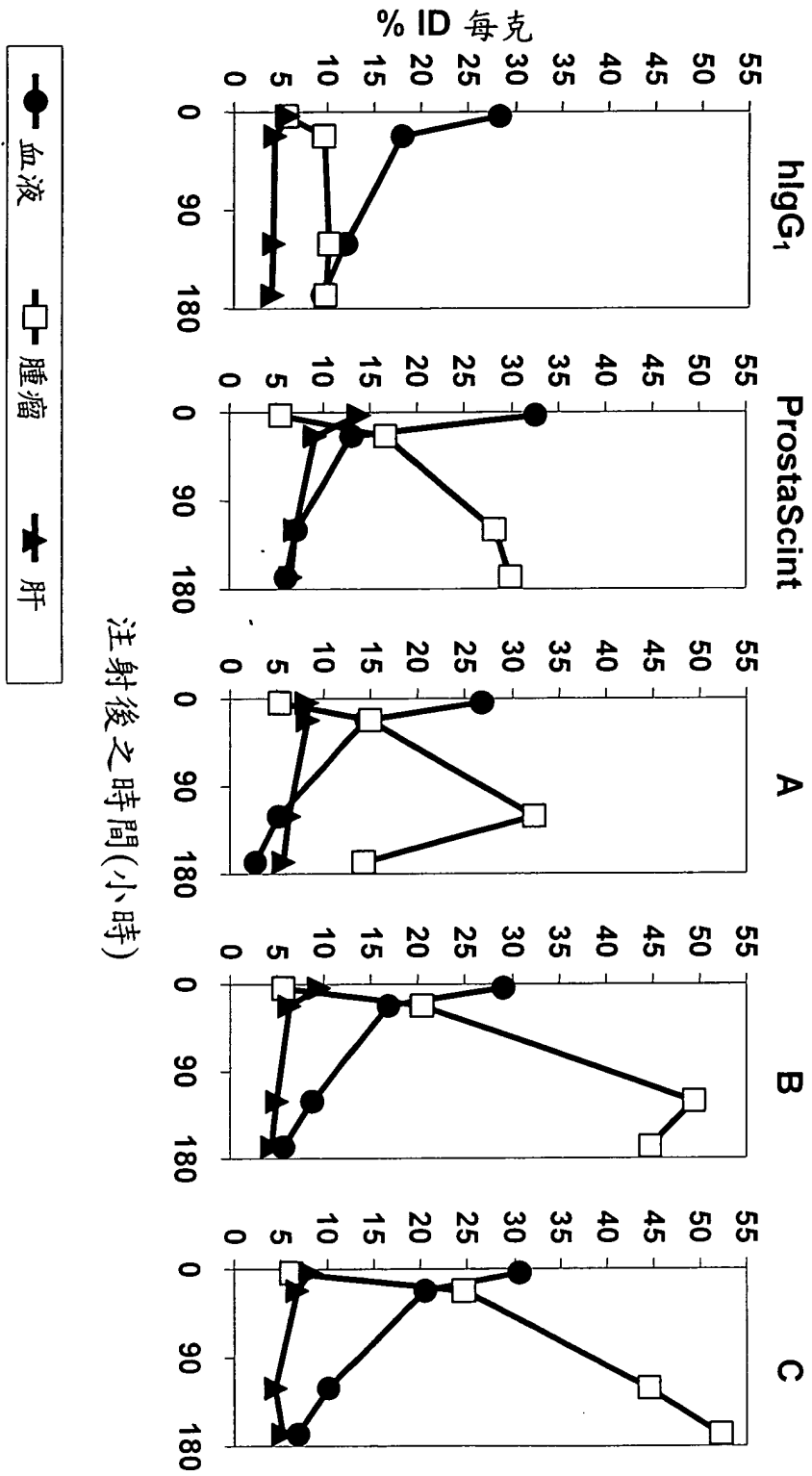
17. 如請求項16之免疫共軛物，其中所使用之螯合劑為環己基-DTPA(CHX-A"-DTPA)或MX-DTPA (1B4M-DTPA)。
18. 如請求項10至17中任一項之免疫共軛物，其係用於治療或診斷。
19. 如請求項10至17中任一項之免疫共軛物，其係用於治療或診斷癌症。
20. 如請求項19之免疫共軛物，其中該癌症為前列腺癌、腎癌、卵巢癌或結腸直腸癌。
21. 一種單鏈抗體分子，其結合至具有SEQ ID NO:2之胺基酸序列的RG1多肽，其中該單鏈抗體分子包含如請求項1、6或7之抗體之抗原結合區域。
22. 一種多肽，其結合至具有SEQ ID NO:2之胺基酸序列的RG1多肽，其中該多肽包含如請求項1、6或7之抗體之抗原結合區域。
23. 一種如請求項10至17中任一項之免疫共軛物之用途，其係用於製備治療或診斷癌症之醫藥組合物。
24. 如請求項23之用途，其中該癌症為前列腺癌、腎癌、卵巢癌或結腸直腸癌。
25. 一種如請求項10至17中任一項之免疫共軛物之用途，其係用於製備選擇性破壞表現具有SEQ ID NO:2之胺基酸序列的人類RG1多肽之細胞的醫藥組合物。

26. 一種有效量之如請求項1至9中任一項之經分離人類抗體或其抗原結合片段之用途，其係用於製備抑制表現具有SEQ ID NO:2之胺基酸序列的人類RG1多肽之細胞的醫藥組合物。
27. 一種如請求項1至8之經分離人類抗體或其抗原結合片段之用途，其係用於製備治療人類病患病狀之醫藥品，其中該病狀係與與具有SEQ ID NO:2之胺基酸序列之RG1多肽的表現相關聯。
28. 如請求項27之用途，其中該病狀為癌症。
29. 如請求項28之用途，其中該癌症為前列腺癌、腎癌、卵巢癌、結腸直腸癌或末期轉移性癌症。
30. 如請求項27之用途，其中該經分離人類抗體或其抗原結合片段係與治療劑共軛。
31. 如請求項30之用途，其中該治療劑係細胞毒素劑。
32. 如請求項31之用途，其中該細胞毒素劑係選自由下列組成之群：蓖麻毒素、阿黴素、道諾黴素、紫杉酚、溴化乙錠、絲裂黴素、足葉乙甙、特諾波賽、長春新鹼、長春鹼、秋水仙鹼、二羥基炭疽菌素二酮、放射菌素D、白喉毒素、綠膿桿菌外毒素(PE)A、PE40、蓖麻毒素、相思豆毒素及糖皮質激素及放射性同位素。
33. 如請求項31之用途，其中該細胞毒素劑為放射性同位素，且係選自由下列組成之群： ^{46}Sc 、 ^{47}Sc 、 ^{48}Sc 、 ^{72}Ga 、 ^{73}Ga 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{109}Pd 、 ^{111}Ag 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、 ^{211}Bi 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 及 ^{214}Bi 。

34. 如請求項30之用途，其中該經分離人類抗體或其抗原結合片段與治療劑之共軛作用係使用選自由下列組成之群之螯合劑：對-SCN-苄基-DPTA及其衍生物，1,4,7,10-四氮雜環十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA)及其衍生物，及1,4,7-三氮雜環壬烷-N, N', N''-三乙酸(NOTA)及其衍生物。
35. 如請求項34之用途，其中所使用之螯合劑為環己基-DTPA(CHX-A''-DTPA)或MX-DTPA (1B4M-DTPA)。
36. 一種醫藥組合物，其包含治療有效量之如請求項1至8之經分離人類抗體或其抗原結合片段。
37. 一種如請求項1至8之經分離人類抗體或其抗原結合片段之用途，其係用於製備治療或診斷癌症之醫藥組合物。
38. 一種有效量之如請求項21之單鏈抗體分子之用途，其係用於製備抑制表現具有SEQ ID NO:2之胺基酸序列的人類RG1多肽之細胞的醫藥組合物。

公告本

十一、圖式：



注射後之時間(小時)

圖 1

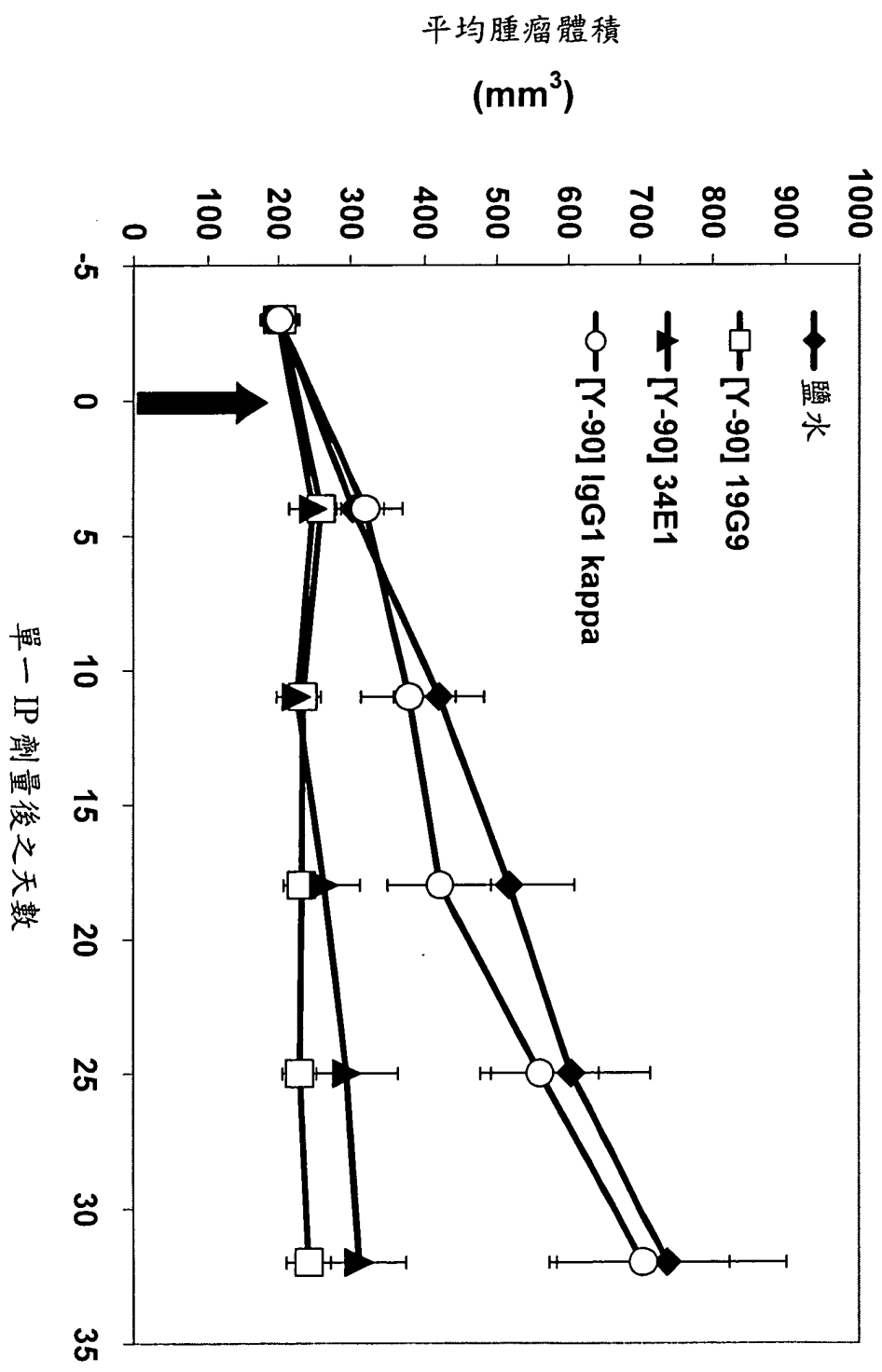


圖 2

huMAb B 可變區序列

 V_L

1 METPAQLLFLLLWLPD^TTGEIVLTQSPGTL^SLS^PGERATL^SCRASQSVS 50
 51 SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF^TLTISRLE 100
 101 PEDFAVYYCQQYSSSLTFGGGTKVEIK 150

 V_H

1 MEFVLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSS 50
 51 YVMHWLRQAPGKGLEWVSVIGTGGVTHYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ 100
 101 MNSLRAEDMAMYCARWGYYGSGSYENDAFDIWGQGMVTVSSASTK 150

 B_{3M} , V_H (血液中之突變)

1 MEFVLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSS 50
 51 YVMHWLRQAPGKGLEWVSVIGTGGVTHYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ 100
 101 MNSLRAEDTAVYYCARWGYYGSGSYENDAFDIWGQGMVTVSSASTK 150

下劃線標出各個可變區之 CDR 序列 (1、2 及 3)

圖 3

HuMAb C 可變區序列

 V_L

1 METPAQLLFLLLLLWLPD¹TTGEIVLTQSPGTL²SLSPGERATL³SCRASQSVS 50
 51 SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE 100
 101 PEDFAVYYCQQYGSSLTFGGGTKVEIK 150

 V_H

1 MEFVLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSS 50
 51 YVMHWVRQAPGKGLEWVSVIGTGGVTNYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQ 100
 101 MNSLRAEDMAVYYCARWGDWDDAFDIWGQGMVTVSSASTK 144

 C_{2m} , V_H (血液中之突變)

1 MEFVLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSS 50
 51 YVMHWVRQAPGKGLEWVSVIGTGGVTNYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQ 100
 101 MNSLRAEDTAVYYCARWGDWDDAFDIWGQGMVTVSSASTK 144

下劃線標出各個可變區之 CDR 序列 (CDR 1、2 及 3)

圖 4

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)