

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03804634.2

[51] Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 5 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 1317303C

[22] 申请日 2003.2.20 [21] 申请号 03804634.2

[30] 优先权

[32] 2002. 2. 26 [33] US [31] 60/359,299

[86] 国际申请 PCT/IT2003/000098 2003.2.20

[87] 国际公布 WO2003/072608 英 2003.9.4

[85] 进入国家阶段日期 2004.8.26

[73] 专利权人 希格马托制药工业公司

地址 意大利罗马

[72] 发明人 R·德圣缇斯 A·M·安纳斯塔斯

[56] 参考文献

US 5624659 A 1997.4.29

US 6335014 B1 2002.1.1

Antibody – guided three – step therapy for high grade glioma withyttrium – 90 biotin. PAGANELLI G ET AL, EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, Vol. 26 No. 4 1999

Teascin in human neoplasia: Immunohistochemical observations using seven different clones of monoclonal antibodies. SHRESTHA PRASHANTA ET AL, INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, Vol. 8 No. 4 1996

审查员 杨振宇

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 陈轶兰

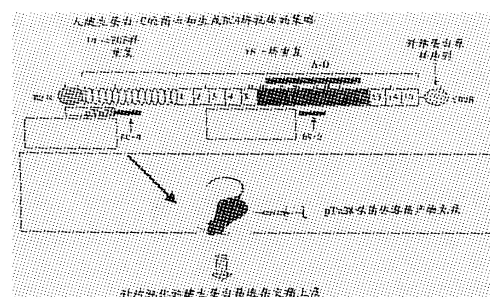
权利要求书 3 页 说明书 28 页 附图 11 页

[54] 发明名称

抗人腱生蛋白单克隆抗体

[57] 摘要

本发明描述了一种新的抗人腱生蛋白 ST2146 单克隆抗体，其被赋予与天然抗原的高亲和性和高肿瘤选择性。cST2146 杂交瘤在密度培养条件下稳定产生所述抗体，并适于工业开发基于 ST2146 的产品。ST2146 表现出治疗和诊断应用均可开发利用的特性。



1. 抗人腱生蛋白单克隆抗体，其轻链和重链可变区序列分别为 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2，以及结合在人腱生蛋白 C 的 EGF 样重复之中的抗原性表位的其蛋白水解片段。

2. 权利要求 1 的抗体及其片段，进一步含有额外的标志和/或诊断剂。

3. 权利要求 1 或 2 的抗体及其片段，其中所述抗体为鼠抗体。

4. 权利要求 3 的抗体及其片段，其中鼠恒定区被人对应物或者生物学或药理学活性部分所替换。

5. 权利要求 4 的抗体及其片段，其中所述生物学活性部分选自：抗生物素蛋白家族的成员、用于刺激定向肿瘤的免疫学效应物的生长因子。

6. 权利要求 4 的抗体及其片段，其中所述药理学活性部分选自：毒素、超抗原、细胞因子或用于增强抗肿瘤治疗效力的任何其它蛋白质。

7. 权利要求 1 或 2 的抗体及其片段的缀合物。

8. 权利要求 7 的缀合物，其中生物学或药理学活性部分连接到所述抗体或其片段。

9. 权利要求 8 的缀合物，其中所述生物学活性部分选自用于刺激定向肿瘤的免疫学效应物的生长因子，或者所述药理学活性部分选自毒素、超抗原、细胞因子或用于增强抗肿瘤治疗效力的任何其它蛋白质、抗肿瘤药物、放射性同位素。

10. 权利要求 1-9 任一项的抗体或其片段或缀合物的生物素化衍生物。

11. 产生权利要求 1 的抗体的杂交瘤细胞系，根据布达佩斯条约的规定在 2002 年 1 月 29 日保藏于 Advanced Biotechnology Center，保藏号为 PD02003。

12. 制备权利要求 1 的抗体的方法，包括培养权利要求 11 的杂交

瘤和分离所述抗体。

13. 权利要求 1-9 任一项的抗体或其片段或缀合物或权利要求 10 的生物素化衍生物用于制备检测表达腱生蛋白的疾病的诊断工具的用途。

14. 权利要求 13 的用途, 其中所述疾病是肿瘤。

15. 权利要求 14 的用途, 其中所述肿瘤选自神经胶质瘤、乳腺肿瘤、肺癌、纤维肉瘤和鳞状细胞癌。

16. 权利要求 13-15 任一项的用途, 其中所述诊断工具用于体内显像技术中。

17. 权利要求 1-9 任一项的抗体或其片段或缀合物或权利要求 10 的生物素化衍生物用于制备治疗表达腱生蛋白的疾病的药物的用途。

18. 权利要求 17 的用途, 其中所述疾病是肿瘤。

19. 权利要求 18 的用途, 其中所述肿瘤选自囊性脑肿瘤、神经胶质瘤、乳腺肿瘤、肺癌、纤维肉瘤和鳞状细胞癌。

20. 权利要求 17-19 任一项的用途, 其中所述药物为适于实施三步预靶向方法的试剂盒的形式。

21. 治疗试剂盒, 其由 5 个小瓶组成, 其第一个小瓶装有权权利要求 10 的生物素化衍生物; 第二个小瓶装抗生物素蛋白; 第三个小瓶装生物素化白蛋白; 第四个小瓶装链霉抗生物素; 第五个小瓶装放射性标记的生物素或生物素衍生物。

22. 权利要求 21 的治疗试剂盒, 其中所述小瓶适于人类注射。

23. 编码权利要求 1 或 3 或 4 的抗体或其片段的 DNA。

24. 含有权利要求 23 的 DNA 的载体。

25. 含有权利要求 24 的载体的宿主细胞。

26. 权利要求 1-9 任一项的抗体或其片段或缀合物与第二种腱生蛋白特异性抗体在三明治测定中相联合用于制备测定循环腱生蛋白水平的诊断试剂盒的用途。

27. 诊断试剂盒, 包含权利要求 1-9 任一项的抗体或其片段或缀

合物。

28. 容器, 任选包括多个隔室, 包含权利要求 10 的生物素化抗体或其片段, 适用于三步预靶向方法用治疗试剂盒中的缓冲液和试剂。

29. 权利要求 28 的容器, 还包含优先针对 A-D 片段的单独的腱生蛋白特异性抗体。

30. 权利要求 28 的容器, 还包含单独的肿瘤特异性抗体。

31. 权利要求 1 或 2 的抗体与第二种腱生蛋白特异性抗体相联合用于制备在三明治 ELISA 体外诊断测定中使用的试剂的用途, 条件为所述第二种抗体与腱生蛋白的第二种抗原性表位结合, 所述体外 ELISA 诊断测定用于测定样品中腱生蛋白的水平。

32. 药物组合物, 包含权利要求 1-9 任一项的抗体和/或其片段和/或缀合物, 与至少一种药学上可接受的赋形剂和/或载体相混合。

抗人腱生蛋白单克隆抗体

本发明涉及抗人腱生蛋白单克隆抗体，用于获得它们的方法和材料，所述抗体在制备分别用于诊断和治疗表达腱生蛋白的肿瘤的诊断工具和药物中的用途，和适用于医学领域的包含所述抗体的材料。

发明背景

肿瘤治疗的特异性常常是确定治疗成功的限制步骤。事实上，某些抗癌剂的毒性作用的发生和耐受性降低限制了其应用和患者的生活质量。

毒性的降低与对癌细胞的治疗的选择性直接关联。单克隆抗体代表了特异性靶向肿瘤的理想方式，并且当与抗生物素蛋白/生物素扩增系统联合时，构成极其强有力和选择性的途径在肿瘤部位递送活性部分。

腱生蛋白是一种胞外基质蛋白，其显示出在胚胎发生期间的位点限制性表达，并且在伤口愈合和肿瘤发生期间可在成人组织中以及新形成的肿瘤血管中发现。腱生蛋白在正常成人组织中缺失，但在多种实体肿瘤的基质中表达，如神经胶质瘤（Burdon 等人，Cancer Res. 43:2796-2805, 1983），乳腺（Chiquet-Ehrismann 等人，1986），肺癌（Natali 等人，Intl. J. Cancer 54:56-68, 1989），纤维肉瘤和鳞状细胞癌（Ramos D. M.等人，Int. J. Cancer 75:680-687, 1998）。腱生蛋白见于神经胶质瘤中，但在正常脑组织中未发现。有关腱生蛋白的讨论，可参见 WO 92/04464，Wistar 和相关的参考文献。

基于 EP 0 496 074 的教导，G. Paganelli 等人开发了一种用于全身性和局部区域性治疗肿瘤的三步预靶向方法（Cremonesi M.等人，Eur. J. Nucl. Med. 26(2):110-120, 1999; Paganelli G.等人，Eur. J. Nucl. Med. 26(4): 348 - 357, 1999; Paganelli G.等人，Cancer Biother. & Radiopharm. 16(3):227-235, 2001）。

有关三步预靶向方法的其它参考文献有 WO 94/04702 和 US 5,578,287。

三步预靶向治疗是基于静脉内序贯施用生物素化抗胰生蛋白单克隆抗体、链霉抗生物素和 ^{90}Y 标记的生物素，分别在链霉抗生物素和 ^{90}Y 标记的生物素之前两次追加施用抗生物素蛋白和生物素化白蛋白，以降低非特异性本底。Paganelli 的三步预靶向方法的选择性有赖于使用抗胰生蛋白单克隆抗体。与靶向肿瘤细胞抗原相比，靶向胞外基质表现出不受肿瘤细胞抗原调变作用的影响，从而代表一种抗肿瘤治疗的理想靶标。

三步预靶向治疗的给药剂量和时间安排已固定以达到最佳的肿瘤/非肿瘤分布比。从包括在 Paganelli 的研究中的 48 名成胶质细胞瘤 (GBM) 或多形性成胶质细胞瘤 (AA) 患者获得的数据显示其实质上无毒性，除外对链霉抗生物素的一些过敏反应（这可通过使用抗生物素蛋白来克服），并且初步表明了治疗效力。实际上，在治疗结束后 2 个月，25% 的患者显示出肿瘤体积减小（完全反应（肿瘤减小 $>50\%$ ）= 6%）；部分反应（肿瘤减小 $<50\%$ ）= 11%；较小反应（肿瘤减小 $<25\%$ ）= 8%），52% 的患者未进展，总体反应率超过 77%。在这些患者中有一些，其预期寿命小于 6 个月，而实际上治疗反应持续一年以上（Paganelli 等，1999）。

生物素化抗胰生蛋白抗体的作用是将生物素定位在肿瘤部位并使其介导随后的抗生物素蛋白和 $^{90}\text{-Y}$ -生物素积聚。

抗胰生蛋白抗体公开于例如 Duke University 的 US 5,624,659，Rikagaku 的 JP 2219590 和上面提及的 WO 92/04464。

一种抗胰生蛋白公开在 Siri A.等，Nucl. Acid Res. 19(3):525-531, 1991；Balza E.等，FEBS 332:39-43, 1993，其用于治疗目的用途公开在上面提及的 Cremonesi M.等，Eur. J. Nucl. Med. 26(2):110-120, 1999；Paganelli G.等，Eur. J. Nucl. Med. 26(4):348-357, 1999；Paganelli G.等，Cancer Biother. & Radiopharm. 16(3):227-235, 2001。已知在本领域中用于生成所述抗胰生蛋白抗体的克隆是 BC4。

本申请发现 BC4 克隆不适于工业开发和调控目的, 因为其产生额外的非功能性轻链(很可能来源于亲本骨髓瘤), 其表达水平在培养规模升级的压力下增加, 从而妨碍大规模抗体纯化。

发明概述

现已发现, 一种抗人胰生蛋白单克隆抗体解决了上述问题, 即可以产生一种缺乏非功能性轻链表达的单克隆抗体。

因此, 该抗体是本发明的目的, 本发明的目的还有获得所述抗体的方法, 其在治疗中的应用, 特别是制备用于治疗特征在于胰生蛋白表达的疾病如肿瘤的药物。

发明描述

本发明提供了抗体和抗体片段, 其还可含有额外的标志和诊断剂; 包含这些抗体和抗体片段的组合物; 以及含有它们的诊断和治疗组合物; 它们在治疗和诊断中的应用和制备这些抗体和抗体片段的方法。

本发明还涉及编码抗体和片段的 DNA、含有 DNA 的载体、含有载体的宿主细胞、编码 SEQ ID NO:1 和 2 的蛋白的 DNA 编码的蛋白; 编码蛋白和片段的 DNA; 特异性 CDR 和包含或含有 CDR 的蛋白。

根据本发明, 所述抗体在一个实施方案中特征在于轻链和重链可变区序列分别是 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2。这些序列显示于图 10 和 11。为了简洁, 本发明的优选抗体将命名为 ST2146。尽管本发明集中于 ST2146 作为本发明的一个示例, 本领域技术人员将认识到, 一旦给予本发明的公开内容, 可以产生其它类似的抗体和 ST2146 的抗体片段以及这些类似抗体的抗体片段, 并在本发明范围之内使用它们。这些类似的抗体可由本领域技术人员通过合理数量的试验来产生。

本发明因此提供了特异性结合胰生蛋白的抗体或抗体片段或抗体嵌合体(例如小鼠-人嵌合体)或免疫球蛋白分子。本发明提供了抗体或抗体片段或抗体嵌合体或免疫球蛋白分子, 其包含 ST2146 可变轻链 CDR 和/或 ST2146 可变重链 CDR 中的至少之一。本发明的抗体或抗体片段或抗体嵌合体或免疫球蛋白分子可以是抗体、Fv 片段、Fab 片段、F(ab)₂ 片段、单链抗体或者多聚抗体。本发明的抗体或抗体片

段或抗体嵌合体或免疫球蛋白分子可以是 IgM、IgD、IgG、IgA 或 IgE 分子。

本发明提供了抗体或抗体片段或抗体嵌合体或免疫球蛋白分子，其包含 SEQ ID NO:1、2、9、11、13、15、17 或 19 中的至少之一。

本发明还提供了核酸序列，其编码本发明的氨基酸序列，如 SEQ ID NO:1、2、9、11、13、15、17 或 19 的序列。本发明因此提供了编码本发明的抗体或抗体片段或抗体嵌合体或免疫球蛋白分子的 DNA 序列。这种 DNA 序列包括选自 SEQ ID NO:3、4、10、21、14、16、18 或 20 的至少一种 DNA 序列或亚序列。

另一个实施方案涉及编码本发明的抗体或抗体片段或抗体嵌合体或免疫球蛋白分子产物的纯化的核酸分子。编码本发明的免疫球蛋白产物的核酸分子可以使用常规技术制备。例如，可以使用寡核苷酸合成仪合成寡核苷酸并将其连接在一起形成功能性可读框，其编码本发明的免疫球蛋白产物。所述核酸分子，一旦合成，可以克隆到核酸载体中。核酸载体如质粒、粘粒、噬菌粒、酵母质粒、噬菌体载体、TI 质粒等在本领域中是已知的。载体可以是表达载体。表达载体和表达体系可从供应商如 Stratagene (La Jolla, Calif) 购得。

本发明的另一个实施方案涉及包含本发明的核酸的细胞。细胞可以通过转染制备。转染方法是已知的，并且用于原核细胞和真核细胞转染的试剂盒可从商业来源（例如 Stratagene, La Jolla, Calif）购买。

本发明的另一个实施方案涉及本发明的抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物用于检测或诊断疾病的方法的用途，包括以下步骤：使来自受试者的组织样本与其在允许在所述抗体、抗体片段、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物与腱生蛋白之间形成复合体的条件下相接触，以及测定所述复合体的形成。

本发明的另一个实施方案涉及本发明的抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物或者本发明的核酸用于制备治疗表达腱生蛋白的疾病特别是肿瘤的药物的用途。癌症免疫治疗方法是已知的。参见例如 Old, L. J. Immunotherapy for Cancer, Scientific American,

September 1996.

另一个实施方案涉及包含本发明的抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物的治疗组合物。本发明的免疫球蛋白产物可以以包含所述抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物以及药学上可接受的载体或稀释剂的组合物的形式提供。该治疗组合物可以用于治疗哺乳动物如人的疾病。所述药物应以本发明的抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物的治疗有效量施用于哺乳动物。

在其用作治疗剂的用途中，本发明的抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物可以连接到一种活性剂上。连接可以通过共价键或通过抗体表位键。例如，抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物可以与二抗交联，其中所述二抗可具有对所述活性剂的亲和性。所述活性剂可以是细胞毒性剂。这里所用的术语“细胞毒性剂”指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语旨在包括放射性同位素（例如 I, Y, Pr）、化疗剂和毒素如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段。所述活性剂可以是化疗剂。化疗剂是用于治疗癌症的化合物。化疗剂的实例包括阿霉素、羟柔红霉素、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷（“Ara-C”）、环磷酰胺、噻替哌、白消安、cytoxan、紫杉醇、氮甲蝶呤、顺铂、马法兰、长春碱、博来霉素、依托泊甙、异环磷酰胺、丝裂霉素 C、米托蒽醌、长春新碱、长春瑞宾、卡铂、替尼泊甙、柔红霉素、洋红霉素、氨基蝶呤、放线菌素、丝裂霉素、esperamicin（参见 U.S. Pat. No. 4,675,187）、美法仑以及其它相关的氮芥类。所述活性剂可以是细胞因子。术语细胞因子是对由一个细胞群释放的作为细胞间介质作用于另一个细胞的蛋白质的通称。这种细胞因子的实例是淋巴因子、单核因子和传统的多肽激素。包括在细胞因子中的有生长激素如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素；甲状旁腺激素；甲状腺素；胰岛素；胰岛素原；松弛素；松弛素原；糖蛋白激素如卵泡刺激激素（FSH）、甲状腺刺激激素（TSH）和促黄体生成素（LH）；肝生长因子；成纤维细胞生长因子；催乳素；胎盘催乳素；肿瘤坏死因子；米勒抑制物质；小鼠促性腺激素相关肽；

抑制素;活化素;血管内皮生长因子;整联蛋白;血小板生成素(TPO);神经生长因子如 NGF;血小板生长因子;转化生长因子(TGF);胰岛素样生长因子-I 和-II;促红细胞生成素(EPO);骨诱导因子;干扰素如干扰素- α , - β 和- γ ;集落刺激因子(CSF);粒细胞-巨噬细胞CSF(GM-CSF);和粒细胞-CSF(G-CSF);白介素(IL)如 IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12;肿瘤坏死因子;和其它多肽因子包括 LIF 和试剂盒配体(KL)。这里所用的术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养的蛋白以及天然序列细胞因子的生物学活性等同物。

为了进行诊断,可以将本发明的抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物连到标记上,如连到可检测的化合物或组合物上,其直接或间接缀合到所述抗体。所述标记可以自身是可检测的(例如放射性同位素标记或荧光标记),或者在酶标记的情况下,可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

本发明还预期生成所公开的 CDR 的突变体,通过突变 CDR 序列中的一个或多个氨基酸。已知适宜地定位于 CDR 中的单一氨基酸替换可足以升高亲和性。研究人员已采用定点诱变使某些免疫球蛋白产物的亲和性增加约 10 倍。这种通过突变 CDR 而增加或降低抗体亲和性的方法是公知常识(参见例如 Paul, W. E., *Fundamental Immunology*, Raven Press, NY, N.Y. 1993, 第 23 章)。因此,对本发明 CDR 的氨基酸替换、缺失或添加以增加或降低结合亲和性或特异性也在本发明预期之中。

本发明的另一方面是提供用于治疗患有肿瘤的个体的药物,所述肿瘤诸如囊性脑肿瘤、神经胶质瘤、乳腺肿瘤、肺癌、纤维肉瘤或鳞状细胞癌,包括向患有肿瘤如囊性脑肿瘤(例如表达髓生蛋白的肿瘤)的人类对象施用治疗有效量的结合髓生蛋白的本发明的抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物。给药步骤可以通过将抗体沉积在肿瘤腔中而实现。

在此还公开了治疗实体肿瘤的方法,其包括:首先从患病人类对

象的实体组织器官（例如脑）除去实体肿瘤（例如表达髓生蛋白的肿瘤）；然后在去除所述实体肿瘤的位置在对象的器官中形成密闭的切除腔；然后向该对象施用治疗有效量的抗肿瘤剂如本发明的抗体、抗体片段、抗体嵌合体或免疫球蛋白产物（例如结合髓生蛋白的抗体），其对所述实体肿瘤的细胞具有选择性毒性。在本发明的一个实施方案中，给药步骤通过将抗肿瘤剂沉积在切除腔中而实现。

本发明的另一个目的是所述抗体的蛋白水解片段，其与人髓生蛋白 C 的 EGF 样重复之中的抗原性表位结合。在本发明描述过程中，抗体片段旨在表示那些与人髓生蛋白 C 的 EGF 样重复之中的抗原性表位结合的片段。

在本发明的另一个实施方案中，所述抗体及其片段可进一步含有额外的标志和/或诊断剂。所述标志和/或诊断剂对于本发明所涉及领域的技术人员而言是熟知的。

根据本发明一个优选的实施方案，所述抗体或其蛋白水解片段是生物素化的。

本发明的另一个目的是杂交瘤细胞系，在此称为 cST2146，其产生所述抗体。

所述杂交瘤细胞系已根据布达佩斯条约的规定于 2002 年 1 月 29 日保藏于 Advanced Biotechnology Center, L.go Rosanna Benzi, 10 16132 GENOVA- Italy, 指定的保藏号为 N°PD02003。

本发明还包括编码所述抗体或其片段的 DNA、特异性 CDR 和包含或含有 CDR 的蛋白、含有所述 DNA 的载体和含有所述载体的宿主细胞。

本发明的另一个目的是所述抗体的重组衍生物。具体而言，优选的重组衍生物是其中鼠恒定区被人对应物所替换的那些（Ferrer C.等，J. Biotechnol. 52:51-60, 1996）或其中鼠恒定区被生物活性部分所替换的那些，所述生物活性部分如抗生物素蛋白家族的成员（Manuel L. 等，J. Immunol., 163:4421-4426, 1999），用于刺激定向肿瘤的免疫学效应物的生长因子（如 G-CSF, GM-CSF），或者其中鼠恒定区被药理

学活性部分所替换的那些，所述药理学活性部分如毒素、超抗原、细胞因子或用于增强抗肿瘤治疗效力的任何其它蛋白 (Di Massimo A.M. 等, British J. Cancer 75(6):822-828, 1997; Parente D.等, Anticancer Research 17(6A):4073-4074, 1997)。

获得所述重组衍生物的方法是本领域公知的。

本发明的另一个目的是所述抗体的缀合衍生物。

具体而言，优选的缀合衍生物是其中生物活性部分通过常规方法连接到所述抗体的那些。生物活性部分的实例是抗生物素蛋白家族的成员，用于刺激定向肿瘤的免疫学效应物的生长因子 (如 G-CSF, GM-CSF)，药理学活性部分如毒素、超抗原、细胞因子或用于增强抗肿瘤治疗效力的任何其它蛋白质，抗肿瘤药物，放射性同位素。

根据本发明，单克隆抗人胰生蛋白抗体或其片段的重组衍生物或缀合物也表示为“衍生物”。

在本发明一个最特别优选的实施方案中，除了抗体和片段之外，其衍生物也是生物素化的。

本发明的又一个目的是产生如上定义的抗体的杂交瘤细胞系。所述杂交瘤已根据布达佩斯条约的规定在 2002 年 1 月 29 日保藏于 Advanced Biotechnology Center，保藏号为 PD02003。

作为本发明的另一个目的，提供了用于制备所述单克隆抗体的方法，所述方法包括培养以上杂交瘤细胞系和分离所述抗体。

本发明的另一个目的是所述抗人胰生蛋白单克隆抗体用于制备治疗表达胰生蛋白的疾病特别是肿瘤的药物用途。

表达胰生蛋白的肿瘤的非限定性示例性列举为神经胶质瘤、乳腺肿瘤、肺癌、纤维肉瘤和鳞状细胞癌。

本发明的又一方面是用于肿瘤的放射免疫治疗的药物，其施用于患有表达胰生蛋白的肿瘤的对象，并包含所述单克隆抗体或其蛋白水解片段或衍生物。在优选的实施方案中，所述单克隆抗体或其蛋白水解片段或衍生物是生物素化的，在更特别优选的实施方案中，所述药物适于放射免疫治疗，特别是用于实施三步预靶向方法，如现有技术

中所描述的, 例如 EP 0 496 074, *European Journal of Nuclear Medicine* Vol.26, No 4; April 1999; 348-357 和 US 5,968,405。在这后一方面, 本发明的药物应为试剂盒的形式, 所述试剂盒由 5 个小瓶组成, 其第一个小瓶装有生物素化抗体或其片段或衍生物; 第二个小瓶装有抗生物素蛋白; 第三个小瓶装有生物素化白蛋白; 第四个小瓶装有链霉抗生物素; 第五个小瓶装有放射性标记的生物素或生物素衍生物。这一种类的试剂盒在 *European Journal of Nuclear Medicine* Vol.26, No 4; April 1999; 348-357 中提供。抗生物素蛋白包括抗生物素蛋白、链霉抗生物素、PEG-抗生物素蛋白或 PEG-链霉抗生物素、二-或多-抗生物素蛋白或者二-或多-链霉抗生物素。放射性标记的生物素含有放射性核素, 如在 EP 0 496 074 中公开的, 优选 ^{90}Y 。生物素衍生物公开于例如 WO 02/066075。这一种类的试剂盒公开于 *European Journal of Nuclear Medicine* Vol.26, No 4; April 1999; 348-357。优选所述小瓶适于人类注射。

本发明抗体的重组衍生物以及其缀合物也可便利地用于肿瘤治疗。尽管本发明的抗体以及其片段、衍生物和缀合物合适地用于治疗髓生蛋白相关肿瘤, 特别是通过免疫治疗, 放射免疫治疗是本发明的优选实施方案。

包含生物素化形式的抗体或其片段的具体容器, 优选为适于注射的小瓶的形式, 是本发明的另一个目的。

在本发明的另一个实施方案中, 在治疗试剂盒中, 生物素化抗体与优先针对 A-D 片段的其它髓生蛋白特异性抗体相组合。或者, 生物素化抗体与其它肿瘤特异性抗体相组合。有关所述种类的试剂盒的一般教导在 EP 0 496 074, *European Journal of Nuclear Medicine* Vol.26, No 4; April 1999; 348-357 和 US 5,968,405 中提供。

具体而言, 本发明还包括一种容器, 其任选包括多个隔室, 其中包含生物素化抗体或其片段或衍生物、缓冲液和适用于三步预靶向方法的治疗试剂盒中的试剂。

本发明的另一个目的是所述单克隆抗体或其片段或重组衍生物或

缀合物或其生物素化衍生物用于制备诊断工具的用途，所述诊断工具用于检测表达胰生蛋白的疾病，特别是用于肿瘤的体内显像。

在本发明一个特定实施方案中，所述单克隆抗体或其片段或衍生物与第二种胰生蛋白特异性抗体联合用于三明治测定中，用于制备诊断试剂盒，以测定循环胰生蛋白的水平。三明治测定是例如一种 ELISA 体外测定，其条件为所述第二种抗体与胰生蛋白的第二种抗原性表位结合，所述体外 ELISA 测定用于测定循环胰生蛋白的水平。

包含所述抗体或其片段或衍生物的诊断或治疗试剂盒是本发明的又一目的。

本发明的这些目的和其它目的在以下描述中还通过实施例和附图的方式进行了具体公开。

附图简述

图 1 显示了人胰生蛋白-C、相关的重组抗原性片段和试剂、以及用于生成 BC-4 样抗体的策略的图解。

图 2 显示了通过用唾液酸酶消化抗体，对 ST2146 重链可变性的糖苷性质的证实。

图 3 显示了 ST2146 相对于 BC4 的总体同质性。

图 4 显示了与 BC4 的抗原性表位相比，ST2146 结合人胰生蛋白表位的蛋白质印迹（泳道 D 空白）。

图 5 显示了竞争性 ELISA，其中 ST2146 与 BC4 强烈竞争与人胰生蛋白的结合，而 ST2077 显示出仅仅部分竞争。ST2077 是在生成 ST2146 的操作中获得的胰生蛋白特异性单克隆抗体。ST2077 显示出类似 ST2146 的特异性（人胰生蛋白的 EGF 样重复区）但其针对的抗原性表位仅仅部分干扰 BC4/ST2146 表位。

图 6 显示了与 BC4 的完全活性峰相比，由 ELISA 确定的 ST2146 的免疫反应性。

图 7 显示了 ST2146 的生物分布研究的方案。

图 8 显示了 ST2146 的生物分布，与 BC4 相比（biot=生物素化的；IR = 免疫反应性，表示为在 ELISA 中获得 1.0 O.D.的抗体量）。

图 9 显示了 ST2146 的肿瘤/非肿瘤比, 与 BC4 相比。

图 10 显示了 ST2146 可变轻链 (VL) 的序列 (SEQ ID NO:1 (全长氨基酸), 3 (编码氨基酸的 DNA), 9 (CDR1 的轻链氨基酸), 10 (CDR1 的轻链 DNA), 11 (CDR2 的轻链氨基酸), 12 (CDR2 的轻链 DNA), 13 (CDR3 的轻链氨基酸), 14 (CDR3 的轻链 DNA) 和 21 (全长 DNA))。

图 11 显示了 ST2146 可变重链 (VH) 的序列 (SEQ ID NO:2 (全长氨基酸), 4 (编码氨基酸的 DNA), 15 (CDR1 的重链氨基酸), 16 (CDR1 的重链 DNA), 17 (CDR2 的重链氨基酸), 18 (CDR2 的重链 DNA), 19 (CDR3 的重链氨基酸), 和 20 (CDR3 的重链 DNA) 以及 22 (全长 DNA))。

发明详述

ST2146 获自相应的杂交瘤细胞克隆 cST2146, 在以下实施例中详细给出。

就本发明的工业方面而言, 在此公开的抗体应适宜地配制成药物组合物或诊断试剂盒, 正如本技术领域通常所作的那样。

药物组合物在本领域中是常规的, 并可由本领域技术人员基于公知常识而制备。药物组合物的实例在本发明中提及的参考文献中给出。这同样适用于诊断试剂盒。特别优选的是用于肿瘤放射免疫治疗的试剂盒, 如在上面提及的 Paganelli 等的论文和 EP 0 496 074 中所公开的。

包含所述抗体和/或其片段和/或重组衍生物和/或缀合物与至少一种药学上可接受的赋形剂和/或载体相混合的药物组合物包括在本发明的范围之内。

以下实施例进一步例示本发明。

实施例 1

为了生成具有 BC4 的特异性但不表达非功能性轻链的新杂交瘤细胞克隆, 用 pTn28 大肠杆菌噬菌体溶菌产物免疫 Balb/c 小鼠。pTn28 是 λ gt11 重组克隆, 编码人腱生蛋白的 EGF 样重复的一个片段, 先前显示出其包含 BC4 表位 (Balza E. 等, 1993)。人腱生蛋白-C、相关的

重组抗原性片段和试剂、以及用于生成 BC-4 样抗体的策略的图解在图 1 中给出。通过标准方法将 pTn28 免疫的脾细胞与 Sp2/0Ag14 非生产(non producing)骨髓瘤细胞融合 (Cianfriglia M.等, Methods Enzymol. 121:193210, 1986), 并通过 ELISA 对 SK-MEL-28 (人黑素瘤细胞系) 纯化胰生蛋白筛选杂交瘤群体。胰生蛋白特异性杂交瘤通过在含 FCS 的培养基 (2 次) 和无蛋白的培养基 (3 次) (无动物衍生组分的培养基 HyClone, HyQ^R Perbio) 中有限稀释而克隆。最终选择 cST2146/D3d/F6e 亚克隆, 产生 cST2146 Master Cell Bank (MCB) 和 Working Cell Bank (WCB)。

ST2146 参照材料的产生是通过将 cST2146 杂交瘤细胞在 2L 生物反应器中培养而完成的, 并通过 FACS 分析和通过有限稀释证实 cST2146 Post Production Cell Bank (PPCB) 的稳定性。

ST2146 是 IgG2b/k 同种型的小鼠免疫球蛋白。

证实 ST2146 的轻链组成是同质的, 如还原性 SDS-PAGE 分析所显示, 其还显示出重链的某种程度的异质性。这一观察结果与先前对鼠 IgG2b 同种型所报道的 O-连接的糖基化的可变性一致 (Kim H.等, J. Biol. Chem. 269(16):12345-12350, 1994)。在获自含 FCS 的培养基或无蛋白培养基的三个不同批次中观察到 ST2146 重链条带模式的一致性。对 ST2146 重链可变性的糖苷性质的证实是通过用唾液酸酶消化抗体。用 HiTrap 脱盐柱 (Amersham-Pharmacia) 对 ST2146 进行缓冲液交换至含 150 mM NaCl、pH 6.4 的 10 mM 磷酸钠缓冲液。将 Mab 在 centricons 100,000 MWCO (Millipore) 上浓缩至大约 1mg/ml 的终浓度, 并用 1.5 U/ml 唾液酸酶 (Sigma) 于 37°C 消化 24 小时。将样本在 12% 聚丙烯酰胺凝胶板上进行电泳。凝胶染色通过考马斯亮蓝进行。如预期的那样, 该消化导致较高分子量条带的消除 (图 2)。ST2146 的总体同质性还通过羟磷灰石色谱证实, 其显示 ST2146 的单一峰, 相对于对 BC4 所观察到的 3 个峰 (图 3, 其中对于 BC4, 完全功能对应于峰 3)。

ST2146 结合人胰生蛋白的表位与 BC4 的抗原性表位严格相关 (如

果不完全相同), 如蛋白质印迹 (图 4) 和竞争性 ELISA (图 5) 所显示。在图 5 中, 生物素化 BC4 与增加浓度的 BC4、ST2077 或 ST2146 (作为竞争剂) 混合, 并铺在包被胰生蛋白的平板上。在加入 HRP-链霉抗生物素和相关的显色底物后测量结合。ST2077 是识别在 EGF 样重复之中的胰生蛋白表位的抗体, 该表位与 BC4 表位部分共享。

通过 ELISA 评价 ST2146 的免疫反应性, 与 BC4 的完全活性峰(峰 3) 比较。图 6 显示在最佳抗原浓度 ELISA 中获得 1.0 OD 的 ST2146 的量 (图 A) 比 BC4 的完全反应性峰 3 的量小大约 30 倍, 比 BC4 小大约 100 倍。这一差异在如图 B 中抗原限制的条件下显著扩大, 其中仅仅 ST2146 维持好的免疫反应性。

ST2146 的亲合性通过 BIAcore 评价。所得的 ST2146 的 KD 为 1.4×10^{-9} ($K_a 3.0 \times 10^5$; $k_d 4.1 \times 10^{-4}$)。将 ST2146 亲合性数据与 BC4 比较, BC4 显示出 KD 为 4.9×10^{-9} ($K_a 1.9 \times 10^5$; $k_d 9.3 \times 10^{-4}$)。

经生物素化后维持免疫反应性是待用于预靶向的单克隆抗体的一个基本特征。为了评价生物素化 ST2146 的行为, 研究了不同的抗体: 生物素比, 并将通过 ELISA 测定的生物素化抗体的免疫反应性与 BC4 和 ST1897 比较, 后者是亲合性较低的胰生蛋白特异性单克隆抗体。表 1 中的结果显示, 低生物素化 (2-3 生物素/摩尔) 轻微影响单克隆抗体的免疫反应性, 与其亲合性无关。更高的生物素化, 高达 20 生物素/摩尔, 与免疫反应性下降相关。抗体亲合性越低, 这一下降越高。

表 1

对 ST2146 的生物素化研究

Mab	亲和性 (nM)	%免疫反应性			
		摩尔生物素/抗体			
		2-3	3.5-5	7-10	15-20
ST1897	10	84.8+/-1.3	62.3+/-12.4	26.65+/-13.8	9.45+/-9.26
BC4	4.9	82.4+/-11.5	74.4+/-9.3	67.2+/-12.3	12.6
ST2146	1.4	100	89.6+/-4.39	77.63+/-8.59	52.37+/-3.95

%免疫反应性是 2-3 次独立试验的平均值+/-标准偏差。

生物素化 ST2146 的亲和性通过 BIAcore 测定, 并且无论连接的生物素的数目为何基本上维持。

对不同肿瘤(乳腺、神经胶质瘤、结肠)的免疫组化分析显示 BC4 和 ST2146 类似的选择性。

研究生物素化 ST2146 的药理学行为以确立其定位到肿瘤块的能力。根据图 7 中的方案, 在移植表达胰生蛋白的人肿瘤的裸鼠中进行 ^{125}I -标记的 ST2146 和 BC4 生物素化抗体的生物分布研究。小鼠皮下接受在 0.1ml 无菌溶液中的 4×10^6 HT29 人结肠癌细胞。15 天后, 当肿瘤质量约 100mg 时, 每组 5 只小鼠的试验组静脉内接受 ^{125}I -标记的 BC4、ST2146 或正常小鼠免疫球蛋白 (nMIg), 剂量为在 0.1ml 无菌 PBS 中的 10、2、0.5 或 0.1 μg /小鼠。所有抗体都是生物素化的 (7-10 生物素/摩尔), ST2146 和 BC4 生物素化 Mab 均显示出约 80% 的免疫反应性。每只动物接受以下量的 CPM:

剂量	BC4	ST2146	NMIg
10 μg	632.000	570.000	577.000
2 μg	555.000	639.000	624.000
0.5 μg	310.000	401.000	382.000
0.1 μg	186.000	211.000	174.000

图 8 中的结果显示, BC4 和 ST2146 均特异性定位到肿瘤块。两种抗体在肿瘤部位的量(表示为 % 注射剂量/克组织)是剂量依赖性的, 趋势是 ST2146 积聚更高。而且, 与 BC4 相比, ST2146 显示更好的肿瘤/非肿瘤比, 如图 9 所示。

如 M. Sassano 等, Nucl. Ac. Res. (1994) 22, 1768-1769 所述, 使用退火至抗体恒定区的一对引物 (5'-TGTCAAGAGCTTCAACAGGA) (SEQ ID NO:5), 5'-AAGATGGATACAGTTGGTGC (SEQ ID NO:6)), 从环化 cDNA 扩增 κ 轻链可变区。

如 M. Sassano 等, Nucl. Ac. Res. (1994) 22, 1768-1769 所述, 使用退火至抗体恒定区的下列引物: 寡小鼠 $\gamma 2\text{bCH1}$ GTCAGTACTCAGGGAAGTAGCC (SEQ ID NO:7); 寡小鼠 $\gamma 2\text{b}$

CH3 GCAACGTGAGACACGAGGGTCTG (SEQ ID NO:8), 从环化 cDNA 扩增 γ 重链可变区。

使用以下条件进行 PCR: 94°C 1 分钟, 60°C 1.5 分钟, 72°C 2 分钟, 30 个循环。

将扩增的片段直接克隆到 SmaI 切割的质粒 pUC18 中。对含 κ 轻链的 2 个克隆和含 γ 重链可变区的 4 个克隆进行测序。

测序在 MWG Biotech, Germany 完成。对两条链均进行测序。没有发现模糊不定之处。

图 10 显示 ST2146 可变轻链 (VL) 的序列。

图 11 显示 ST2146 可变重链 (VH) 的序列。

ST2146 与 BC4 的总体对比表征显示, ST2146 具有下列特征:

- 就表位特异性而言, 是 BC4 样单克隆抗体;
- 就重链和轻链组成而言, 是同质的;
- 就重链糖基化而言, 是异质的;
- 就免疫反应性而言, 优于 BC4, 如基于 BC4 异质性所预期的;
- 就亲和性而言, 优于 BC4 约 3 倍;
- 就经生物素化后维持免疫反应性而言, 优于 BC4;
- 对于在免疫组化中的选择性, 类似于 BC4;
- 就肿瘤靶向而言, 优于 BC4。

参考文献列表

Balza E., Siri A., Ponassi M., Caocci F., Linnala A., Virtanen I., Zardi L. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for different epitopes of human tenascin. *FEBS* 332:39-43, 1993.

Chinol M., Casalini P., Maggiolo M., Canevari S., Omodeo E.S., Caliceti P., Veronese F.M., Cremonesi M., Chiolerio F., Nardone E., Siccardi A.G., Paganelli G. Biochemical modifications of avidin improve pharmacokinetics and biodistribution, and reduce immunogenicity. *British Journal of Cancer* 78(2): 189-197, 1998.

Cianfriglia M., Mariani M., Armellini D., Massone A., Lafata M., Presentini L. and Antoni G. Methods for high frequency production of soluble antigen-specific hybridomas; specificities and affinities of monoclonal antibodies obtained. *Methods Enzymol* 121:193-210, 1986.

Cremonesi M., Ferrari M., Chinol M., Stabin M. G., Grana C., Prisco G., Robertson C., Tosi G., Paganelli G. Three-step radioimmunotherapy with yttrium-90 biotin: dosimetry and pharmacokinetics in cancer patients. *Eur J Nucl Med* 26(2):110-120, 1999.

Di Massimo AM., Di Loreto M., Pacilli A., Raucci G., D'Alatri L., Mele A., Bolognesi A., Polito L., Stirpe F. and De Santis R. Immunoconjugates made of an anti EGF-receptor Monoclonal Antibody and Type 1 RIPs from *Saponaria ocymoides* or *Vaccaria pyramidata*. *British J. Cancer* 75(6):822-828, 1997

Parente D., D'Alatri L., Di Massimo AM., Saccinto MP., Novelli S., Pacilli A., Mele A. and De Santis R. Production and in vitro characterization of a recombinant immunotoxin made of a single chain anti-EGF receptor antibody and a type ribosome-inactivating protein (RIP) from filamentous fungus *Aspergillus clavatus*. *Anticancer Research* 17(6A):4073-4074, 1997

Kim H, Yamaguchi Y, Masuda K, Matsunage C, Yamamoto K, Irimura T, Takahashi N, Kato K, Arata Y. O-glycosylation in hinge region of mouse immunoglobulin G2b. *J Biol Chem* 269(16):12345-12350, 1994.

Ferrer C., Anastasi A.M., Di Massimo A.M., Bullo A., Di Loreto M., Raucci G., Pacilli A., Rotondaro L., Mauro S., Mele A. and De Santis R. Expression and characterization of a mouse/human chimeric antibody specific for EGF receptor. *J. Biotechnol.* 52: 51-60, 1996

Manuel L. Penichet,* Young-Sook Kang, † William M. Pardridge, ‡ Sherie L. Morrison,* and Seung-Uon Shin. An Antibody-Avidin Fusion Protein Specific for the Transferrin Receptor serves as a Delivery Vehicle for Effective Brain Targeting: Initial Applications in Anti-HIV Antisense Drug Delivery to the Brain 1. *J Immunol* 163: 4421-4426, 1999.

Paganelli G., Grana C., Chinol M., Cremonesi M., De Cicco C., De Braud F., Robertson C., Zurrida S., Casadio C., Zoboli S., Siccardi A. G., Veronesi U. Antibody-guided three step therapy for high grade glioma with yttrium-90 biotin. *Eur J Nucl Med* 26(4):348-357, 1999.

Paganelli G., Bartolomei M., Ferrari M., Cremonesi M., Broggi G., Maira G., Sturiale C., Grana C., Prisco G., Gatti M., Caliceti P., Chinol M. Pre-targeted locoregional radioimmunotherapy with 90Y-biotin in glioma patients: Phase I study and preliminary therapeutic results. *Cancer Biother & Radiopharm* 16(3):227-235, 2001.

Parente D., D'Alatri L., Di Massimo AM., Saccinto MP., Novelli S., Pacilli A., Mele A. and De Santis R. Production and in vitro characterization of a recombinant immunotoxin made of a single chain anti-EGF receptor antibody and a type ribosome-inactivating protein (RIP) from filamentous fungus *Aspergillus clavatus*. *Anticancer Research* 17(6A):4073-4074, 1997

Ramos D.M. Chen B, Regezi J, Zardi L, Pytela R Tenascin-C matrix assembly in oral squamous cell carcinoma. Int J Cancer 75:680-687, 1998.

Siri A., Carnemolla B., Saginati M., Leprini A., Casari G., Baralle F. and Zardi L. Human tenascin: primary structure, pre-mRNA splicing patterns and localization of the epitope recognized by two monoclonal antibodies. Nucl Acid Res 19(3):525-531, 1991.

所有在此引用或提到的参考文献以其整体引入本文作为参考。

序 列 表

<110> DE SANTIS, RITA
ANASTASI, ANNA MARIA

<120> 抗人腱生蛋白单克隆抗体

<130> 2818-141

<140>

<141>

<150> 60/359,299

<151> 2002-02-26

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 142

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的 ST2146 轻链可变区蛋白质序列

<400> 1

Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
1 5 10 15

Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe
85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile
130 135 140

<210> 2
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述：合成的 ST2146 重链可变区蛋白质序列

<400> 2
 Lys Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Val Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3
 <211> 426
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述：合成的 ST2146 轻链可变区 cDNA 序列

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(426)

<400> 3
 atg agg tgc cta gct gag ttc ctg ggg ctg ctt gtg ctc tgg atc cct 48
 Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
 1 5 10 15
 gga gcc att ggg gat att gtg atg act cag gct gca ccc tct gta cct 96
 Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro
 20 25 30


```

gtc act cct gga gag tca gta tcc atc tcc tgc agg tct agt aag agt 144
Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
      35              40              45

ctc ctg cat agt aat ggc aac act tac ttg tat tgg ttc cta cag agg 192
Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg
      50              55              60

cca ggc cag tct cct cag ctc ctg ata tat cgg atg tcc aac ctt gcc 240
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala
      65              70              75              80

tca gga gtc cca gac agg ttc agt ggc agt ggg tca gga act gct ttc 288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe
      85              90              95

aca ctg aga atc agt aga gtg gag gct gag gat gtg ggt gtt tat tac 336
Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
      100              105              110

tgt atg caa cat cta gaa tat ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag 384
Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
      115              120              125

ctg gag ctg aaa cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc 426
Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile
      130              135              140

```

<210> 4

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的 ST2146 重链可变区 cDNA 序列

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 4

```

aag gtg aaa ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct 48
Lys Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
      1              5              10              15

tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tat gca ttc act agc tac 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr
      20              25              30

aac atg tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt gag tgg att 144
Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
      35              40              45

gga tat att gat cct tac aat ggt gtt act agc tac aac cag aag ttc 192
Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Val Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

```

50	55	60	
aag ggc aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc aca gcc tac			240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt			288
Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
gca aga ggg ggc ggt agt atc tac tat gct atg gac tac tgg ggc caa			336
Ala Arg Gly Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln			
	100	105	110
ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca			360
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

<400> 5
 tgtcaagagc ttcaacagga 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

<400> 6
 aagatggata cagttggtgc 20

<210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

<400> 7
 gtcactgact cagggaagta gcc 23

<210> 8
 <211> 23

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 8
gcaacgtgag acacgagggt ctg 23

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的 ST2146 轻链可变区 CDR1 肽序列

<400> 9
Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 10
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的 ST2146 轻链可变区 CDR1 核苷酸序列

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(48)

<400> 10
agg tct agt aag agt ctc ctg cat agt aat ggc aac act tac ttg tat 48
Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的 ST2146 轻链可变区 CDR2 肽序列

<400> 11
Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的 ST2146 轻链可变区 CDR2 核苷酸序列

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(21)

<400> 12
cgg atg tcc aac ctt gcc tca
Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

21

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的 ST2146 轻链可变区 CDR3 肽序列

<400> 13
Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 14
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的 ST2146 轻链可变区 CDR3 核苷酸序列

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(27)

<400> 14
atg caa cat cta gaa tat ccg ctc acg
Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr
1 5

27

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的 ST2146 重链可变区 CDR1 肽序列

<400> 15
Ser Tyr Asn Met Tyr
1 5

<210> 16
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的 ST2146 重链可变区 CDR1 核苷酸序列

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(15)

<400> 16
agc tac aac atg tac 15
Ser Tyr Asn Met Tyr
1 5

<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的 ST2146 重链可变区 CDR2 肽序列

<400> 17
Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Val Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 18
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的 ST2146 重链可变区 CDR2 核苷酸序列

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(51)

<400> 18

```
tat att gat cct tac aat ggt gtt act agc tac aac cag aag ttc aag 48
Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Val Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
  1             5             10             15
```

```
ggc 51
Gly
```

```
<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
```

```
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的 ST2146 重链可变区 CDR3 肽序列
```

```
<400> 19
Gly Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
  1             5             10
```

```
<210> 20
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
```

```
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的 ST2146 重链可变区 CDR3 核苷酸序列
```

```
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(33)
```

```
<400> 20
ggg ggc ggt agt atc tac tat gct atg gac tac 33
Gly Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
  1             5             10
```

```
<210> 21
<211> 773
<212> DNA
<213> 人工序列
```

```
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的 ST2146 轻链可变区核苷酸序列
```

```
<220>
<221> CDS
<222> (292)..(717)
```

```
<400> 21
cgaggatccc ctgtcaagag cttcaacagg aatgagtgtt agagacaaag gtcctgagac 60
```

```

gccaccacca gctccccagc tccatcctat cttcccttct aagggtcttgg aggcttcccc 120
acaagcgacc taccactgtt gcggtgctcc aaacctcctc cccacctcct tctcctcctc 180
ctccctttcc ttggctttta tcatgctaatt atttgcagaa aatattcaat aaagtgagtc 240
tctgcaaaaa aaaaaaaaaa aaaataaccc cttgataagg aagttctcag a atg agg 297
                                     Met Arg
                                     1

tgc cta gct gag ttc ctg ggg ctg ctt gtg ctc tgg atc cct gga gcc 345
Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro Gly Ala
      5                      10                      15

att ggg gat att gtg atg act cag gct gca ccc tct gta cct gtc act 393
Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr
      20                      25                      30

cct gga gag tca gta tcc atc tcc tgc agg tct agt aag agt ctc ctg 441
Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu
      35                      40                      45

cat agt aat ggc aac act tac ttg tat tgg ttc cta cag agg cca ggc 489
His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly
      55                      60                      65

cag tct cct cag ctc ctg ata tat cgg atg tcc aac ctt gcc tca gga 537
Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly
      70                      75                      80

gtc cca gac agg ttc agt ggc agt ggg tca gga act gct ttc aca ctg 585
Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu
      85                      90                      95

aga atc agt aga gtg gag gct gag gat gtg ggt gtt tat tac tgt atg 633
Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met
      100                      105                      110

caa cat cta gaa tat ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag 681
Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
      115                      120                      125                      130

ctg aaa cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttgggtaccg 727
Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile
      135                      140

agctcgaatt cgtaatcatg tcatagctgt ttctgtgtg aaattg 773

```

<210> 22

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的 ST2146 重链可变区核苷酸序列

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 22

```

aag gtg aaa ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct 48
Lys Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
  1              5              10              15

tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tat gca ttc act agc tac 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr
              20              25              30

aac atg tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt gag tgg att 144
Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
              35              40              45

gga tat att gat cct tac aat ggt gtt act agc tac aac cag aag ttc 192
Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Val Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
              50              55              60

aag ggc aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc aca gcc tac 240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
              65              70              75              80

atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt 288
Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
              85              90              95

gca aga ggg ggc ggt agt atc tac tat gct atg gac tac tgg ggc caa 336
Ala Arg Gly Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
              100              105              110

ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 360
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
              115              120

```

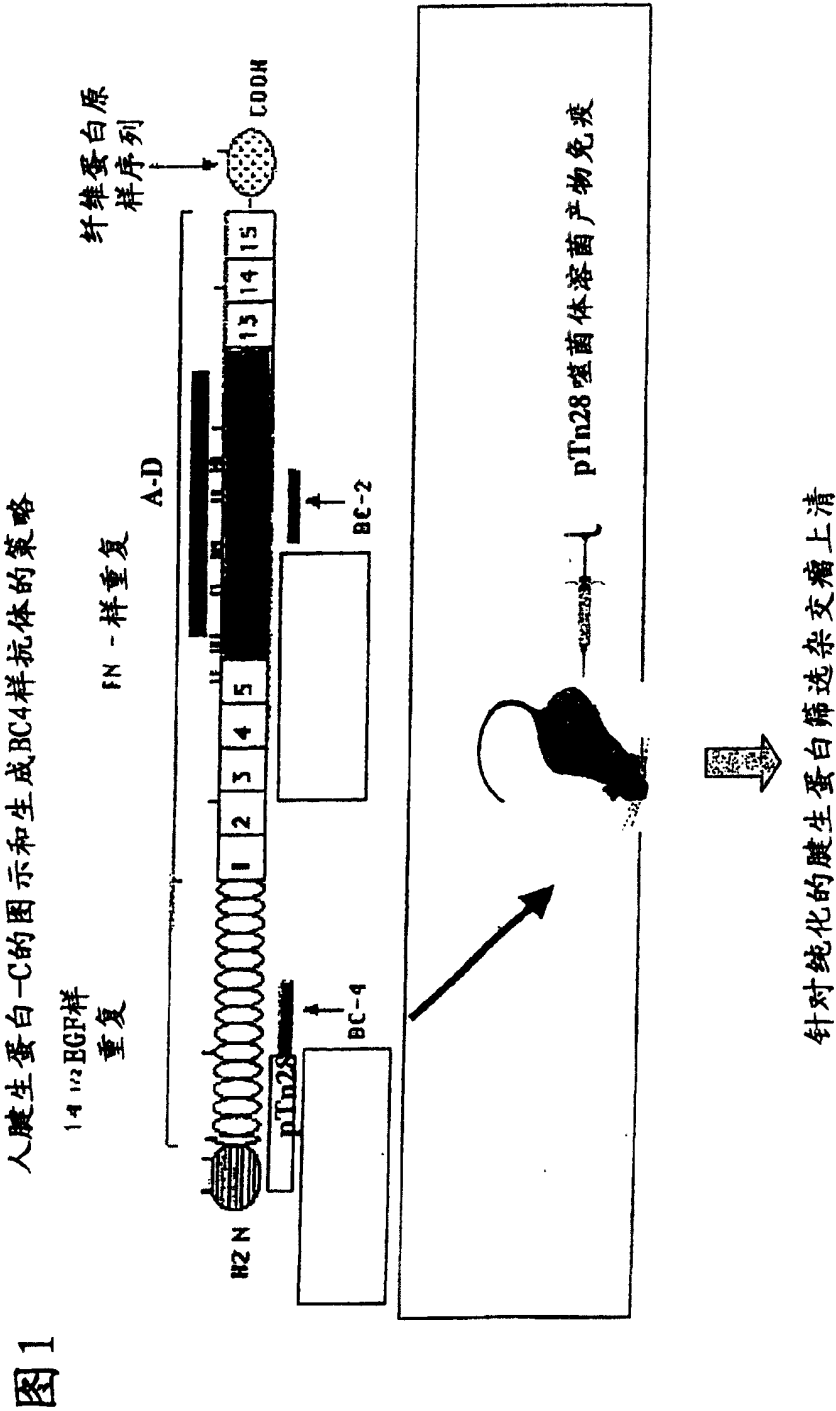
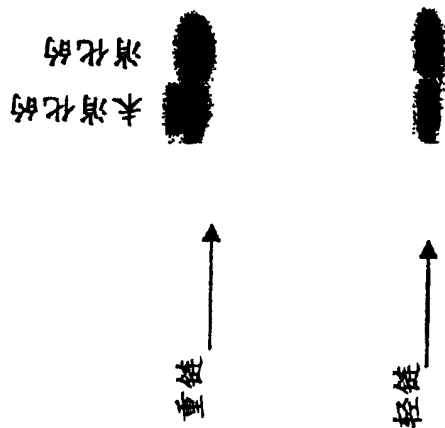
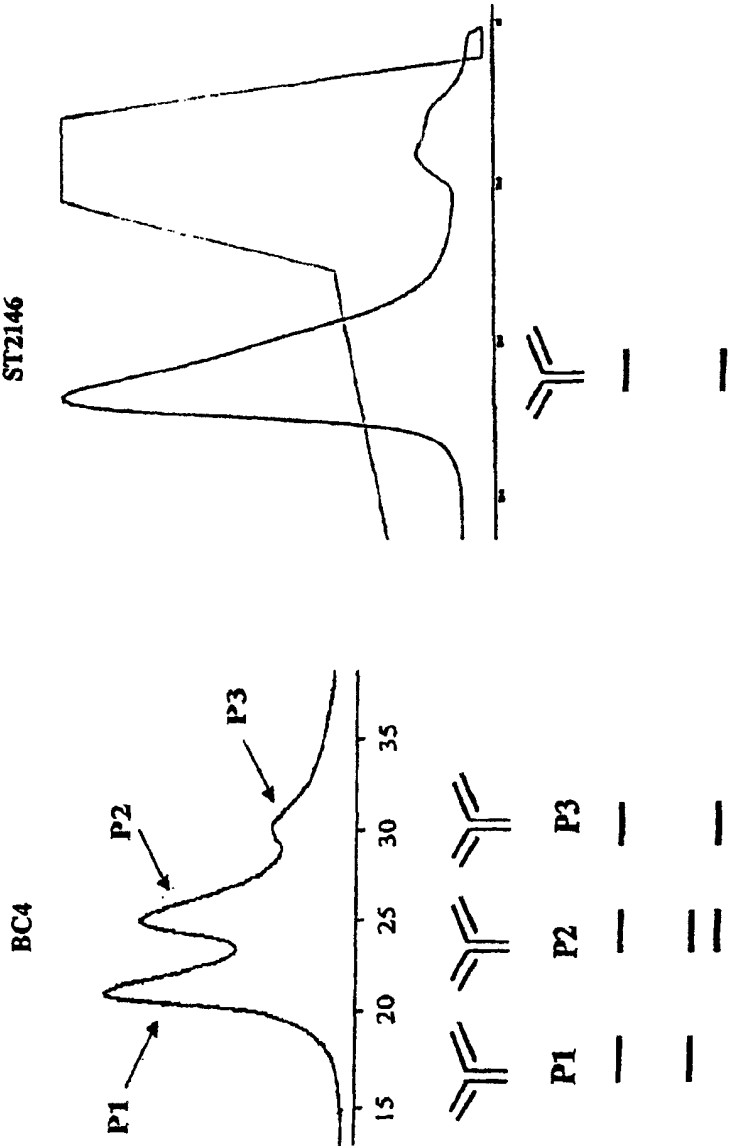



图2 消化ST2146上的唾液酸残基



用HiTrap脱盐柱 (Amersham-Pharmacia) 对ST2146进行缓冲液交换至含150mM NaCl、pH 6.4的10mM磷酸钠缓冲液。将Mab在centricons 100,000 MWC0 (Millipore) 上浓缩至大约1mg/ml的终浓度,并用1.5U/ml 唾液酸酶 (Sigma) 于37℃消化24小时.将样本在12%聚丙烯酰胺凝胶板上进行电泳。凝胶染色通过考马斯亮蓝进行。

图3 BC4和ST2146抗腱生蛋白Mab的羟磷灰石色谱



注:发现红色轻链是非功能性的。因此,完全功能性的BC4仅对应于峰3。

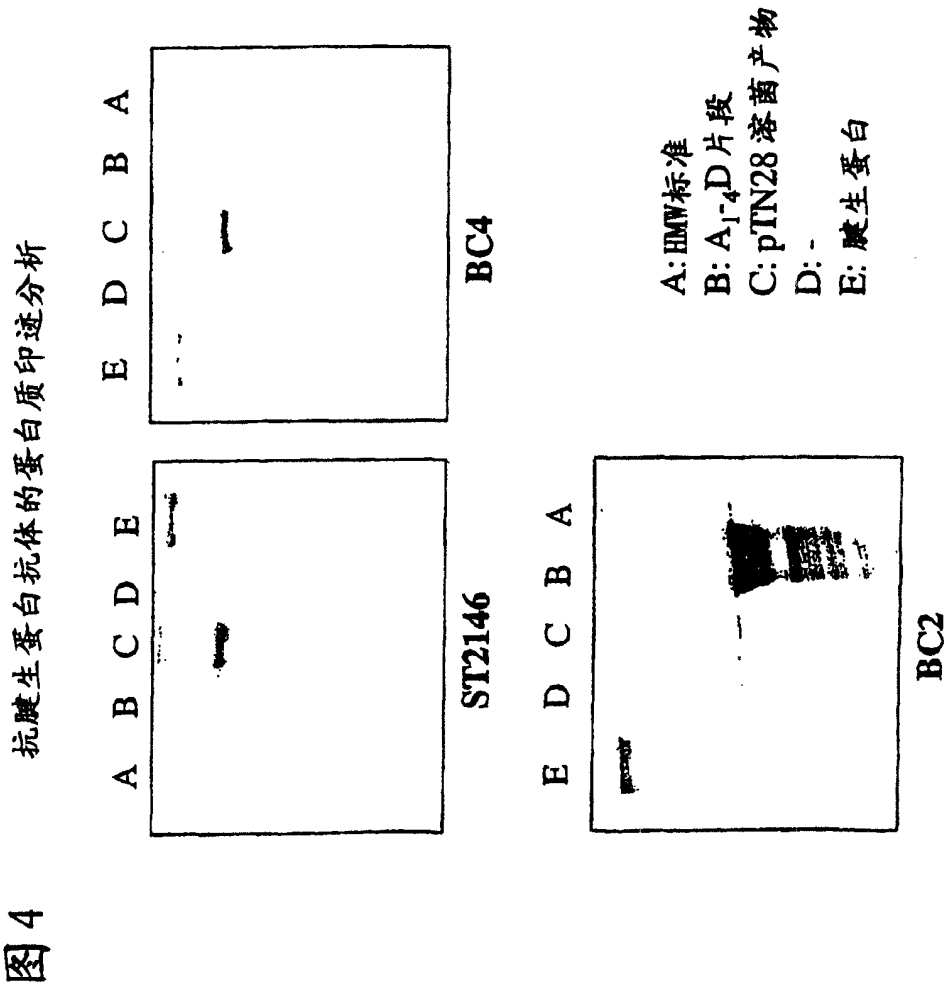
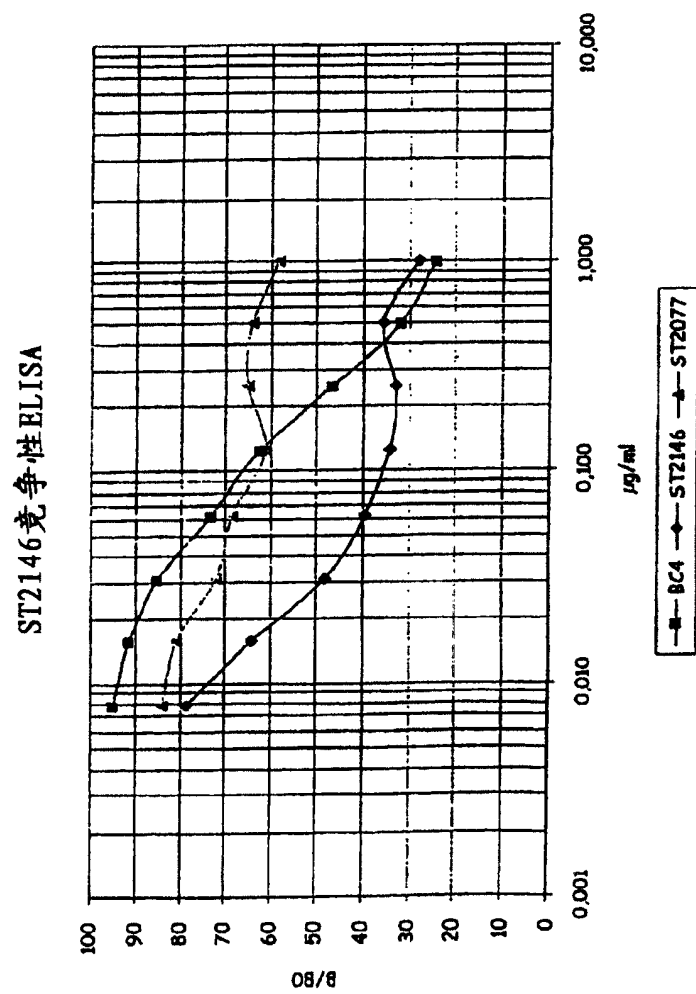


图5



生物素化BC4与增加浓度的BC4、ST2077或ST2146作为竞争剂混合，并铺在包被腱生蛋白的平板上。在加入HRP-链霉抗生物素和相关显色底物后测量结合。ST2077是识别EGF样重复之中的腱生蛋白表位的抗体，该表位与BC4表位部分共享。

图6
ST2146和BC4的免疫反应性

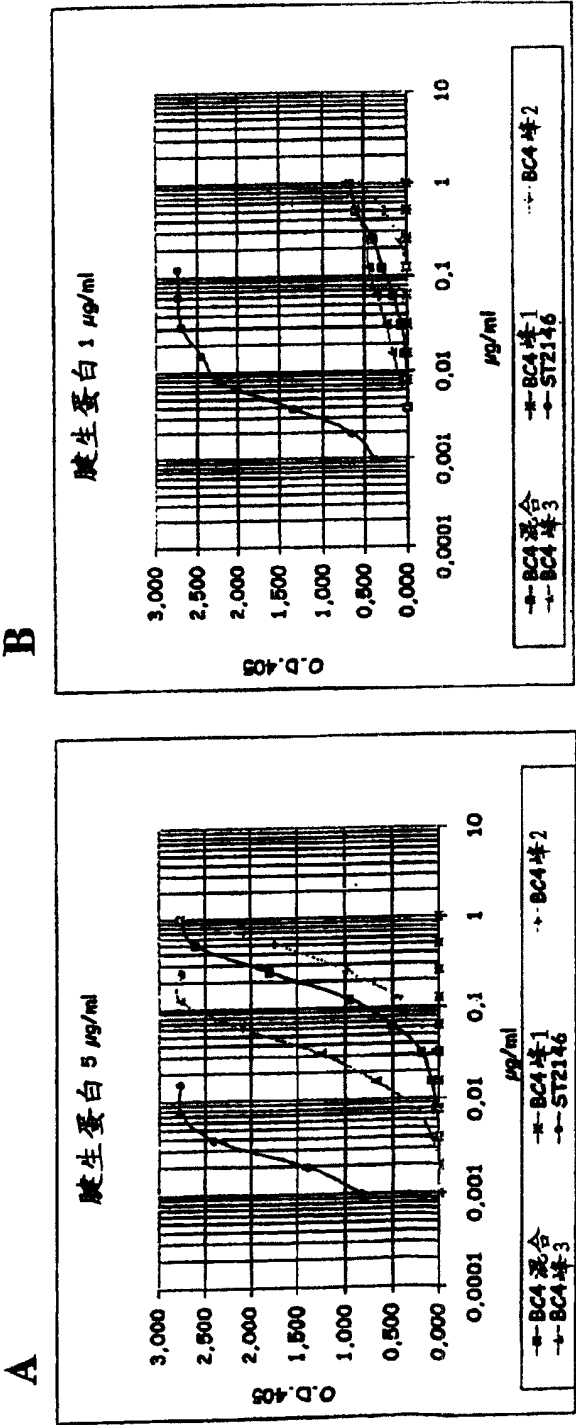


图7 ST2146和BC4生物素化Mab在移植肿瘤的裸鼠中的生物分布研究方案

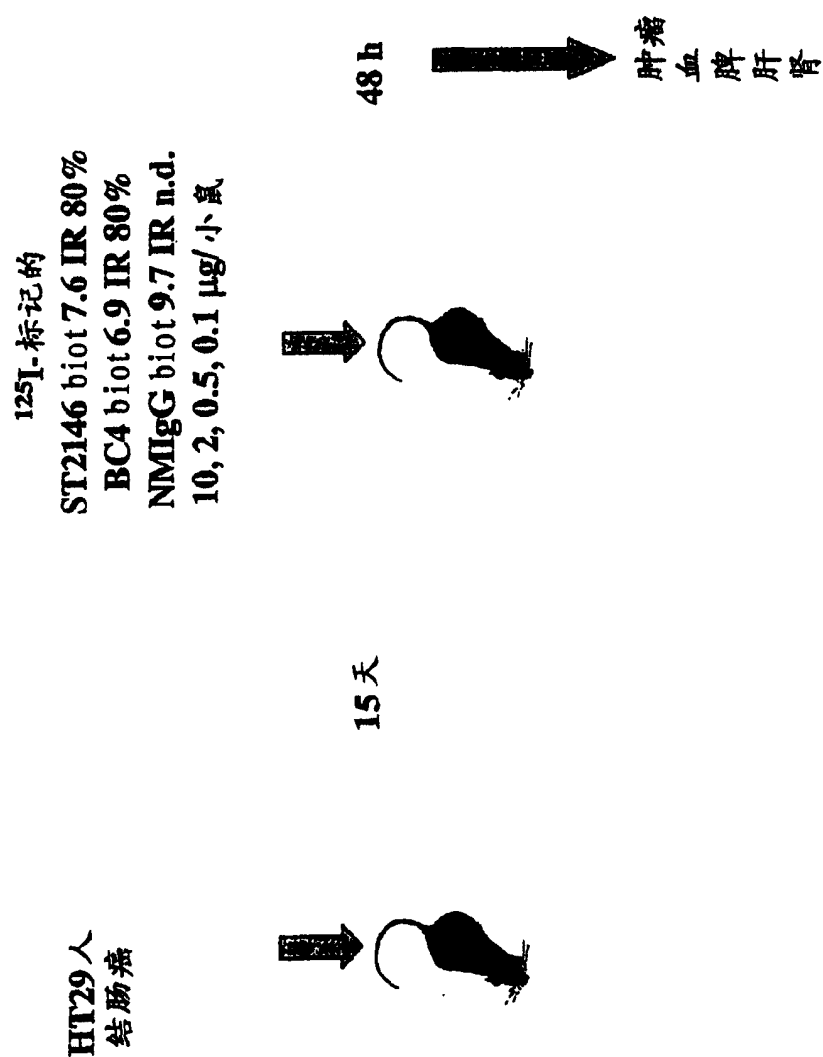


图8
ST2146和BC4生物素化Mab在移植肿瘤的裸鼠中的生物分布

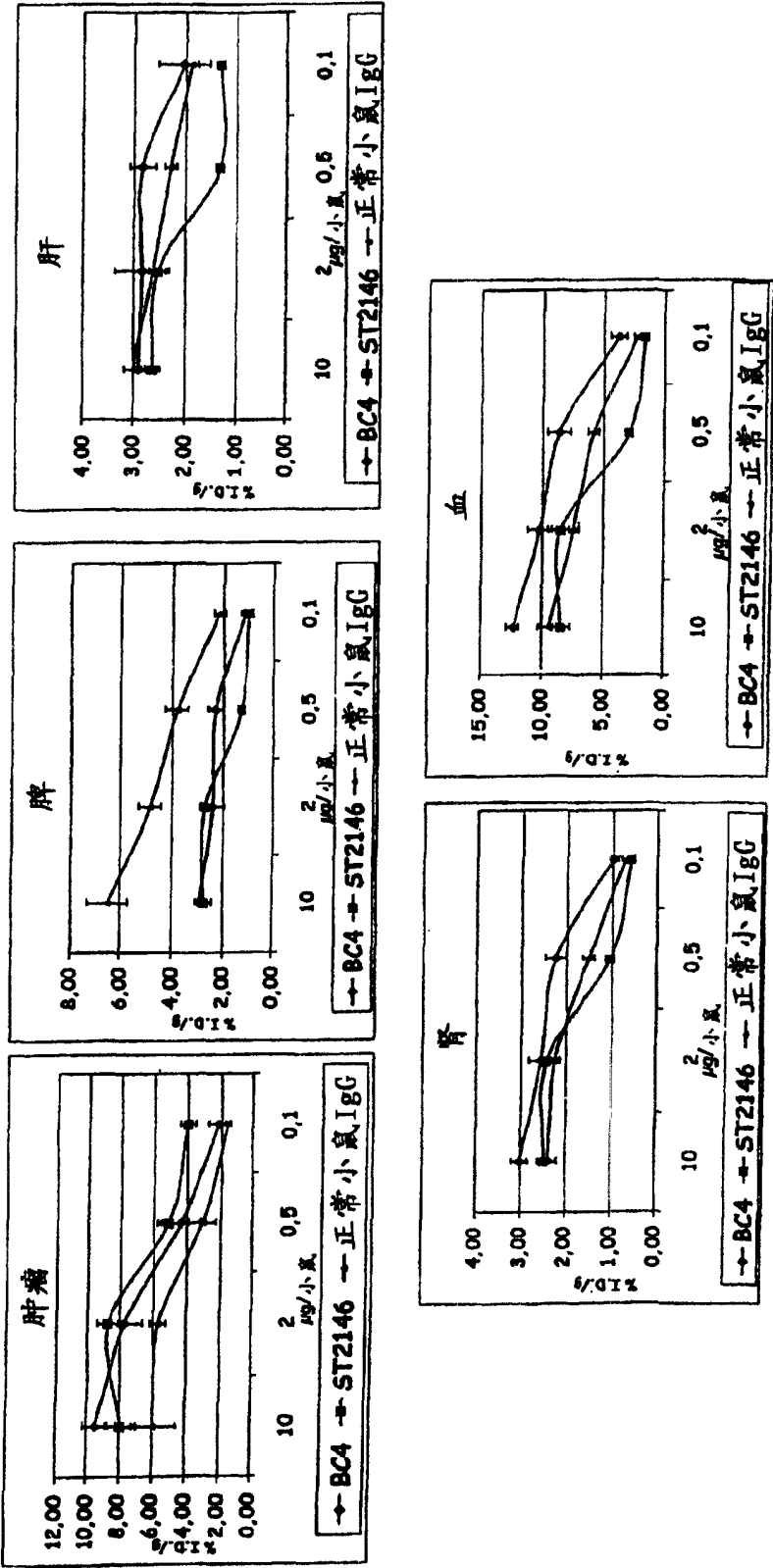


图9
ST2146和BC4生物素化Mab在移植肿瘤的裸鼠中的肿瘤/非肿瘤比

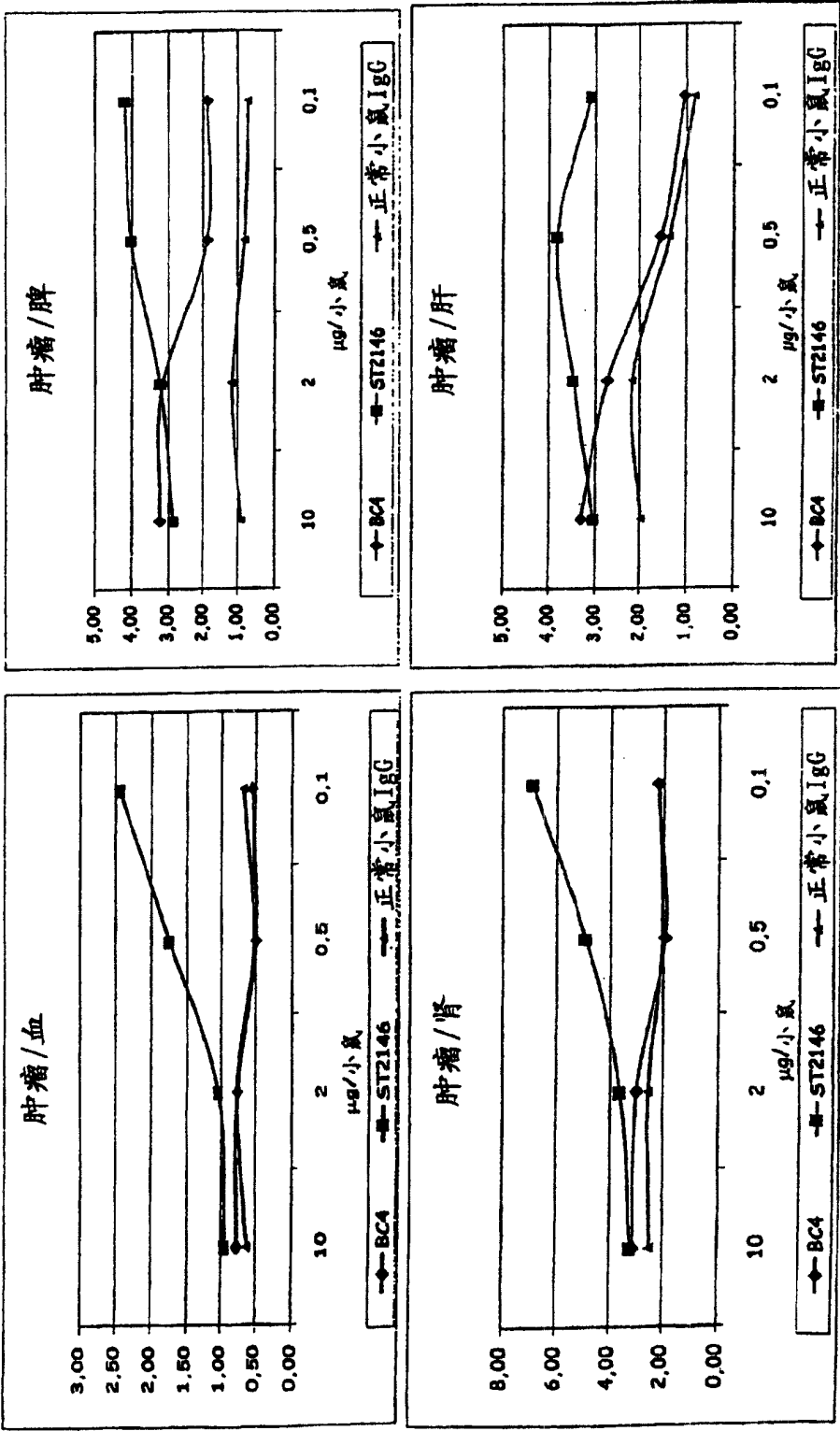


图 10

ST2146轻链可变CDNA序列和推导的氨基酸序列

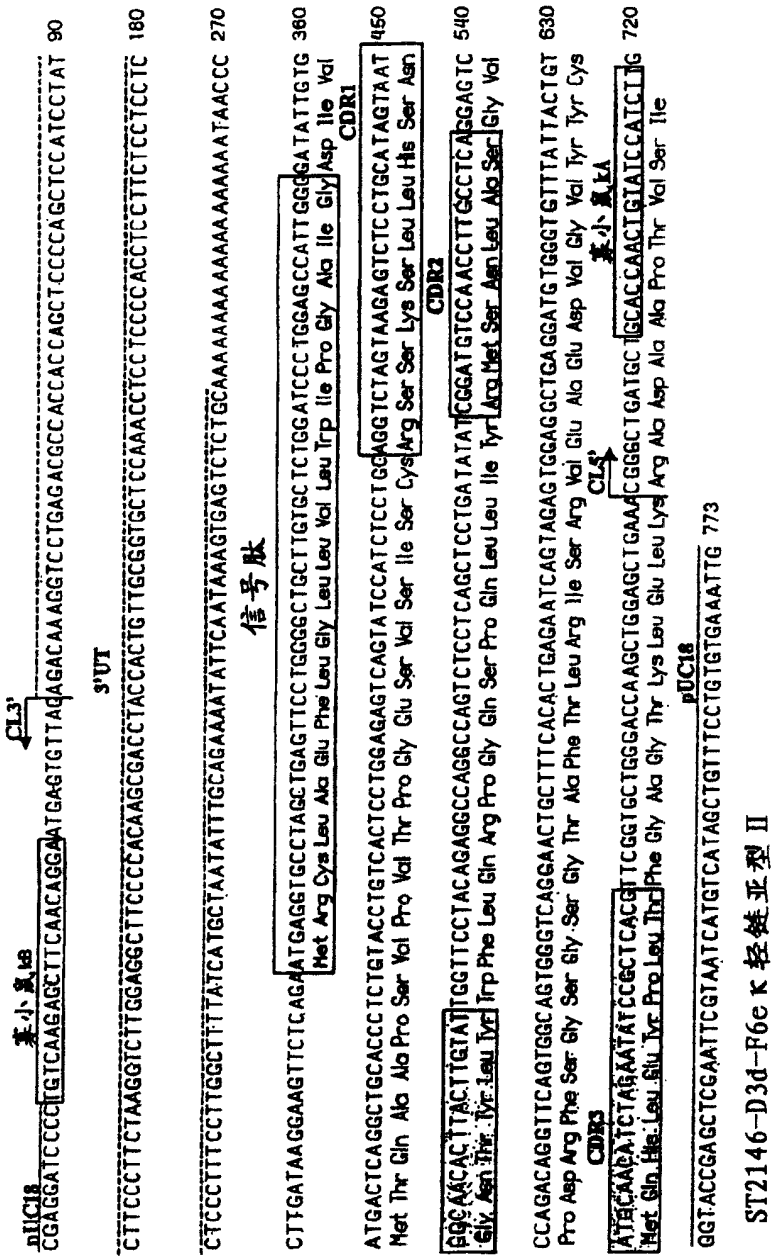


图 11

ST2146重链可变cDNA序列和推导的氨基酸序列

oligo VH1 back

AGGTGAAACTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTATCCTGCAAGGCTTC TGGTTATGCATTCACTTA 90
Lys Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr

CDR1

GCTACAACATGTACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATATATTGATCCTTACAA TGGTGTTACTAGCTACA 180
Ser Tyr Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Val Thr Ser Tyr

CDR2

ACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTTGACAAAGTCTCCAGCACAGCCCTACATGCATCTCAACAGCCCTGACATCTGAGGACT 270
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp

CDR3

CTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGGGGCGGTAGTATCTACTATGCTATGGACTAGTGGGGCCCAAGGACCACCGGTCACCGTCTCCICA 359
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

oligo VH1 for

ST2146 γ 重链亚型 IIa