



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108137695 B

(45) 授权公告日 2022.03.29

(21) 申请号 201680056234.5

C07K 16/30 (2006.01)

(22) 申请日 2016.08.25

A61P 35/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108137695 A

(56) 对比文件

WO 2015053871 A3, 2015.06.11

(43) 申请公布日 2018.06.08

Miyazaki等. Loss of Disialyl Lewis a, the Ligand for Lymphocyte Inhibitory Receptor Sialic Acid-.《cancer research》. 2004, 第64卷(第13期), 第4498-4505页.

(30) 优先权数据

1515094.9 2015.08.25 GB

noble. Characterisation of anti-glycan.《the university of nottingham》. 2011, 第1-263页.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.03.27

noble. Characterisation of anti-glycan.《the university of nottingham》. 2011, 第1-263页.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2016/052647 2016.08.25

Tsuchida等. Synthesis of Disialyl Lewis a (Lea) Structure in Colon Cancer Cell.《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》. 2003, 第278卷(第25期), 第22787-22794页.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/033020 EN 2017.03.02

molinaro等. Cancer vaccines and carbohydrate epitopes.《vaccine》. 2011, 第29卷(第48期), 第8802-8826页.

(73) 专利权人 斯坎塞尔有限公司

审查员 陈盛峰

地址 英国牛津郡

(72) 发明人 L·G·达兰特 M·范客美尔贝克

权利要求书2页 说明书37页

S·蒂瓦达 T·帕森斯

序列表10页 附图40页

R·麦金托什

(74) 专利代理机构 北京市中伦律师事务所

11410

代理人 杨黎峰 钟锦舜

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

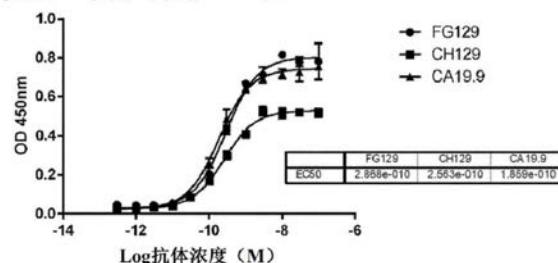
(54) 发明名称

作为功能性癌症靶标的、不在糖脂而在糖蛋白上表达的唾液酸化二路易斯A及其抗体

ELISA- 唾液酸化路易斯a-HAS结合

(57) 摘要

本发明涉及能够结合唾液酸化二路易斯^a的分离的特异性结合成员,以及用于治疗癌症的相关治疗和药物组合物。



1. 一种对唾液酸化二路易斯^a、唾液酸化路易斯^{a-x}和单唾液酸化路易斯^a为特异性的分离的抗体或抗体片段,其中所述单唾液酸化路易斯^a结合到糖蛋白,并且其中所述抗体或抗体片段包含以下6个CDR:

- a) GFTFNTYA (CDRH1), IRSKSNNYAT (CDRH2) 和 VGYGSGGNY (CDRH3); 和
- b) QSLLNSGNQKNY (CDRL1), WAS (CDRL2) 和 QNDYSSPFT (CDRL3)。

2. 根据权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中,所述抗体或抗体片段不与结合到糖脂的单唾液酸化路易斯^a结合。

3. 根据权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中,所述单唾液酸化路易斯^a通过包含至少4个聚糖单体单元的聚糖链连接到蛋白质。

4. 根据权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中,所述抗体或抗体片段是mAb FG129或嵌合FG129 (CH129),或其片段,其中所述mAb FG129由SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成并且所述嵌合FG129 (CH129) 由SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成。

5. 根据权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中,所述抗体或抗体片段是双特异性的。

6. 根据权利要求5所述的抗体或抗体片段,其中,所述双特异性抗体或抗体片段还对CD3是特异性的。

7. 根据权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中,所述抗体或抗体片段包含轻链可变序列,其包含所述CDRL1、CDRL2和CDRL3,以及重链可变序列,其包含所述CDRH1、CDRH2和CDRH3。

8. 根据权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中,所述结合结构域由人抗体框架携带。

9. 根据权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中,所述抗体或抗体片段包含VH结构域和VL结构域,所述VH结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的残基1至117,所述VL结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的残基1至114。

10. 根据权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中,所述抗体或抗体片段包含人抗体恒定区。

11. 根据权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中,所述抗体片段是Fab、(Fab')2、scFv、Fv、Fd或双抗体。

12. 根据权利要求11所述的抗体或抗体片段,其中,所述抗体片段是scFv,其按照以下顺序包含:1) 前导序列;2) 重链可变区;3) 3x GGGGS间隔子;4) 轻链可变区;以及5) 聚丙氨酸和用于纯化的6x His标签。

13. 根据权利要求11所述的抗体或抗体片段,其中,所述抗体片段是scFv,其按照以下顺序包含:1) 前导序列;2) 轻链可变区;3) 3x GGGGS间隔子;以及4) 重链可变区,任选地还包含5'或3'纯化标签。

14. 根据权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中,所述抗体或抗体片段以嵌合抗原受体(CAR)的形式提供。

15. 根据权利要求14所述的抗体或抗体片段,其中,所述抗体片段是以嵌合抗原受体(CAR)的形式以重链-轻链取向或轻链-重链取向提供的scFv。

16. 根据权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中,所述抗体是单克隆抗体。

17. 根据权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中,所述抗体或抗体片段是人源化、嵌合

或饰面抗体。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的抗体或抗体片段,其中,所述抗体或抗体片段是药物缀合物。

19. 根据权利要求18所述的抗体或抗体片段,其中所述药物缀合物是抗体药物缀合物(ADC)。

20. 根据权利要求1-19中任一项所述的抗体或抗体片段在制备用于在需要它的受试者中治疗或预防癌症的药物中的用途,其中,所述癌症是结直肠癌、胃癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌或乳腺癌。

21. 根据权利要求20所述的用途,其中,所述抗体或抗体片段单独施用或与其它治疗组合施用,或布置成待施用。

22. 一种核酸,其包含编码根据权利要求1-19中任一项所述的抗体或抗体片段的序列。

23. 根据权利要求22所述的核酸,其中,所述核酸是质粒、载体、转录或表达盒形式的构建体。

24. 一种重组宿主细胞,其包含根据权利要求22或23所述的核酸。

25. 根据权利要求1至19中任一项所述的抗体或抗体片段在制备用于在需要它的受试者中检测癌症的诊断剂中的用途,其中所述抗体或抗体片段检测在来自个体的样品中仅附着于糖蛋白的唾液酸化二路易斯^a和唾液酸化路易斯^{a-x}和/或单唾液酸化路易斯^a,其中所述癌症是结直肠癌、胃癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌或乳腺癌。

26. 根据权利要求25所述的用途,其中,通过所述抗体或抗体片段检测的聚糖模式用于针对个体的分层治疗选择。

27. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至19中任一项所述的抗体或抗体片段,以及药学上可接受的载体。

28. 根据权利要求27所述的药物组合物,其还包括至少一种其它药物活性。

作为功能性癌症靶标的、不在糖脂而在糖蛋白上表达的唾液酸化二路易斯A及其抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及唾液酸化二路易斯^a(sialyl-di-Lewis^a)在癌症中的靶向和结合成员，例如单克隆抗体(mAb)，其结合糖蛋白上表达而脂质上不表达的该聚糖。

背景技术

[0002] 聚糖结构存在于蛋白质和糖脂骨架上，并且由于糖基转移酶的表达改变，聚糖结构可以在癌症中大量过表达。在N-连接的糖基化过程中，ER中的蛋白质被支化的9甘露糖(man)₉复合物修饰。当蛋白质离开ER时，甘露糖苷酶I去除甘露糖(man)₅中的4个，然后甘露糖苷酶II去除另外2个(man)₃。糖基转移酶然后在该甘露糖核心上构建复杂的聚糖结构。这些聚糖对蛋白质折叠和功能至关重要。生成对于在蛋白质上表达的聚糖的mAb是一个问题，因为mAb很少看到仅看到小聚糖，但通常会识别给出非常严格的表达的特异性蛋白质上的聚糖。

[0003] 在癌发生期间，糖基化过程高度失调导致癌细胞表面处的改变聚糖表达，导致肿瘤相关的碳水化合物抗原(TACA)出现。在肿瘤中，TACA不仅被异常表达并且与正常组织相比具有密集分布，但它们也涉及许多生理过程，例如蛋白质折叠和运输、粘附和细胞增殖，使其成为治疗性mAb的有吸引力的靶标。

[0004] 路易斯碳水化合物是mAb治疗的理想候选物，因为它们在正常组织中的分布非常有限，并且在源自上皮细胞的癌症中过表达，特别是在胰腺癌和胃肠癌中。它们通过糖基转移酶的作用通过在糖蛋白和糖脂上的寡糖前体链上连续添加岩藻糖而形成，并且可以分成I型链(其形成路易斯^a和路易斯^b)和II型链(其形成路易斯^x和路易斯^y)。

[0005] 唾液酸化路易斯^a是参与内皮白细胞粘附的E-选择素的配体，并且在肝胆系统、胰腺和胃肠道的癌症中过表达，而其天然形式的二唾液酸化路易斯^a具有额外的唾液酸糖，在非恶性上皮细胞中被发现。发现了唾液酸化路易斯^a的表达增加了胰腺癌(16、27)和结肠癌(14、15)的转移潜能。在胰腺癌和结肠癌中，唾液酸化路易斯^a也被用作肿瘤标志物以监测对治疗的反应(13、17、18)。唾液酸化二路易斯^a(它具有在癌症中发现的单一唾液酸，但也具有重复的路易斯^a，并且仅在蛋白质上发现)，其由多种胰腺肿瘤表达，但具有非常有限的正常组织表达。最近，使用患者接种策略产生人唾液酸化路易斯^amAb，所述患者接种策略示出了与唾液酸化路易斯^a特异性结合并在异种移植模型中表现出ADCC、CDC和抗肿瘤活性(20)。其中一种mab 5B1是人IgG1，不管神经氨酸是内源产生的(N-乙酰-神经氨酸)还是外源衍生的(N-羟乙酰-神经氨酸)，以及它是否在长或短间隔子上，其主要与唾液酸化路易斯^a结合。与唾液酸化二路易斯^a或唾液酸化路易斯^{a-x}(Sialyllewis^{a-x})结合很弱且不明显。第二种mab 7E3是人IgM，不管神经氨酸是内源产生的(N-乙酰-神经氨酸)还是外源衍生的(N-羟乙酰-神经氨酸)，以及它是否在长或短的间隔子上，其等同地与唾液酸化路易斯^a结合，并且与唾液酸化二路易斯^a或唾液酸化路易斯^{a-x}结合。这种抗唾液酸化路易斯^amab可能具有不可接受的正态分布，这得到GivaRex(一种小鼠单克隆抗体)的观察结果的支持，并

且其专利(WO0191792)在临床前研究中被放弃。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种改进的唾液酸化二路易斯^a的结合成员。

[0007] 根据本发明的第一方面,提供了一种分离的特异性结合成员,其能够结合唾液酸化二路易斯^a。

[0008] 结合成员可以对唾液酸化二路易斯^a是特异性的。在一个实施方式中,结合成员可以对唾液酸化二路易斯^a和唾液酸化路易斯^{a-x}是特异性的。结合成员可以对唾液酸化二路易斯^a是特异性的。在一个实施方式中,结合成员可以对存在于肿瘤组织中的唾液酸化二路易斯^a和唾液酸化二路易斯^{a-x}是特异性的。结合成员可能不结合,或可能不显著结合与糖脂结合的单唾液酸化路易斯^a。另外地或替代地,结合成员可能不结合,或可能不显著结合二唾液酸化路易斯^a。结合成员可能不结合,或可能不显著结合存在于健康(非肿瘤)组织中的二唾液酸化路易斯^a。

[0009] 可以提供合成的(即非天然的)分子来表征结合成员结合特异性。这种形式可以包含存在于蛋白质或脂质(例如糖蛋白或糖脂)上的唾液酸化二路易斯^a、唾液酸化路易斯^{a-x}、二唾液酸化路易斯^a或单唾液酸化路易斯^a分子中的任一种。合成分子可以包含具有外源衍生的N-羟乙酰-神经氨酸或内源衍生的N-乙酰-神经氨酸的唾液酸化路易斯^a。在一个实施方式中,结合成员可以结合单唾液酸化路易斯^a,其中单唾液酸化路易斯^a存在于糖蛋白上。结合成员可以对唾液酸化二路易斯^a、唾液酸化路易斯^{a-x}和单唾液酸化路易斯^a是特异性的,其中单唾液酸化路易斯^a存在于糖蛋白上。在一个实施方式中,其中结合成员结合存在于糖蛋白上的单唾液酸化路易斯^a,单唾液酸化路易斯^a可以通过间隔子(例如聚合物)与蛋白质连接。聚合物可以包含任何天然或合成分子,其允许唾液酸化路易斯^a结合到结合成员的沟槽(groove)中。聚合物链可以包含聚糖链或氨基酸(即多肽)。连接单唾液酸化路易斯^a与糖蛋白的聚糖链可以包含至少4个聚糖单体单元。或者,连接单唾液酸化路易斯^a与糖蛋白的聚糖链可以包含至少5个聚糖单体单元。或者,连接单唾液酸化路易斯^a与糖蛋白的聚糖链可以包含至少6个聚糖单体单元。或者,连接单唾液酸化路易斯^a与糖蛋白的聚糖链可以包含至少7个聚糖单体单元。或者,连接单唾液酸化路易斯^a与糖蛋白的聚糖链可以包含至少8个聚糖单体单元。连接单唾液酸化路易斯^a与糖蛋白的多肽可以包含至少4个氨基酸。或者,连接单唾液酸化路易斯^a与糖蛋白的多肽可以包含至少5个氨基酸。或者,连接单唾液酸化路易斯^a与糖蛋白的多肽可以包含至少6个氨基酸。或者,连接单唾液酸化路易斯^a与糖蛋白的多肽可以包含至少7个氨基酸。或者,连接单唾液酸化路易斯^a与糖蛋白的多肽可以包含至少8个氨基酸。

[0010] 本发明有利地提供了一种结合成员,例如单克隆抗体,其示出了对唾液酸化二路易斯^a和唾液酸化路易斯^{a-x}的高特异性。当它通过聚糖链与糖蛋白连接时,它还可以与单唾液酸化路易斯^a结合,表明需要至少4种以正确构象存在的碳水化合物以结合,以及需要间隔子(例如聚糖链)以允许插入到抗体沟槽中。与其它单唾液酸化路易斯^a结合maAb相比,这种限制给予其与糖蛋白而不与糖脂结合的独特能力。与其它mab相比,它不能识别单独的唾液酸化路易斯^a,可以防止它与在糖脂上的该糖结合,并给予其独特和非常限制性的正常(即非癌性)组织结合特性。不受理论束缚,结合成员可能不结合与糖脂结合的唾液酸化路

易斯^a,因为脂质太疏水以不允许聚糖插入到深度抗体沟槽中。

[0011] 本文的发明已提供、表征和嵌合了一种结合成员,例如FG129mAb。该mAb靶向新型聚糖、唾液酸化二路易斯^a(其具有在癌症中发现的单一唾液酸,但也具有重复的路易斯^a,并且仅在蛋白质上发现),其由多种胰腺肿瘤表达,但具有非常有限的正常组织表达。嵌合FG129(CH129)在肿瘤上诱导强的ADCC和CDC反应,表明抗原是免疫介导杀伤的良好靶标。通过FG129与识别和激活T细胞的第二种mAb的重组,这可以进一步增强T细胞杀伤作用。因此,除了诱导ADCC的抗体外,人源化mAb的进一步应用是产生靶向FG129和CD3抗原的双特异性mAb。这种双特异性的适应症可以是但不限于胰腺癌。mAb FG129还内化并递送有效杀死肿瘤细胞的药物,证明其ADC潜能。

[0012] 本发明还提供了分离的特异性结合成员,其能够结合仅附着于糖蛋白的唾液酸化二路易斯^a和唾液酸化路易斯^{a-x} Neu5Aca2-3Galb1-3(Fuca1-4)GlcNAcb1-3Galb1-4(Fuca1-3)GlcNAcb和单唾液酸化路易斯^aNeu5Aca2-3Galb1-3(Fuca1-4)GlcNAcb。这种结合成员可以用于治疗癌症的方法中。本发明还提供了这种结合配偶体在制造用于治疗癌症的药物中的用途。本发明还提供了治疗癌症的方法,其包括将本发明的结合配偶体施用于需要这种治疗的受试者。

[0013] 在一个方面,本发明提供了mAb FG129,其结合仅附着于糖蛋白的唾液酸化二路易斯^a和唾液酸化路易斯^{a-x}和单唾液酸化路易斯^a。

[0014] 另一方面,本发明提供了嵌合hIgG1 129,其结合仅附着于糖蛋白的唾液酸化二路易斯^a和唾液酸化路易斯^{a-x}和单唾液酸化路易斯^a。

[0015] 在本发明中,我们示出了鼠IgG1k mAb FG129,其与唾液酸化二路易斯^a结合,并且通过用肿瘤质膜脂质提取物免疫Balb/c小鼠而产生。它们结合到多种肿瘤细胞系的细胞表面,但不结合任何血液或内皮细胞。

[0016] 结合成员可以能够结合一些胰腺肿瘤,例如患者群体中胰腺肿瘤的至少70%或74%。结合成员可以能够结合一些胃肿瘤,例如在患者群体中胃肿瘤的至少45%或50%。结合成员可以能够结合一些结直肠肿瘤,例如在患者群体中结直肠肿瘤的至少30%或36%。结合成员可以能够结合一些卵巢肿瘤,例如在患者群体中卵巢肿瘤的至少25%或27%。结合成员可以能够结合一些非小细胞肺癌,例如在患者群体中非小细胞肺癌的至少5%或7%。结合成员的肿瘤组织结合可以通过对肿瘤组织微阵列(TMA)的免疫组织化学(IHC)来评估。

[0017] 在一个实施方式中,结合成员不结合或不显著结合非癌性组织,例如非癌性心脏、脑、胃或肾组织。另外地或替代地,结合成员对胆囊、回肠、肝脏、肺、食道、胰腺、皮肤或胸腺的非癌性组织具有低亲和力或不显著结合。

[0018] 结合成员可以能够以小于约 10^{-6} M的亲和力(KD)结合糖蛋白存在的唾液酸化路易斯^a。结合成员可以能够以小于约 10^{-7} M的亲和力(KD)结合糖蛋白存在的唾液酸化路易斯^a。结合成员可以能够以小于约 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或 10^{-12} M的亲和力(KD)结合糖蛋白存在的唾液酸化路易斯^a。结合成员可以能够以小于约 10^{-13} M的亲和力(KD)结合糖蛋白存在的唾液酸化路易斯^a。结合成员可以能够以 10^{-8} 1/s或更小的解离速率(Kd)结合糖蛋白存在的唾液酸化路易斯^a。结合成员可以能够以至少约 10^4 1/Ms的结合速率(Ka)结合糖蛋白存在的唾液酸化路易斯^a。结合亲和力可以通过表面等离子体共振Biacore X来测量。

[0019] 本发明的另一方面提供了分离的特异性结合成员，其包含重链结合结构域CDR1、CDR2和CDR3以及轻链结合结构域CDR1、CDR2和CDR3。本发明可以提供分离的特异性结合成员，其包含一个或多个选自图1a或2a的残基26至33 (CDRH1)、50-59 (CDRH2) 以及98至106 (CDRH3) 的氨基酸序列的结合结构域。

[0020] 结合结构域可以包含基本上如图1a或2a的1-117 (VH) 所示的氨基酸序列。在一个实施方式中，成员包含结合结构域，其包含基本上如图1a或2a的氨基酸序列的残基98至106 (CDRH3) 所示的氨基酸序列。在该实施方式中，分离的特异性结合成员可以另外包含一个或两个，优选两个结合结构域，其基本上为如图1a和2a所示的氨基酸序列的残基26至33 (CDRH1) 和残基50-59 (CDRH2) 。

[0021] 另一方面，本发明提供了分离的特异性结合成员，其包含一个或多个选自图1b或2b的残基27至38 (CDRL1)、56-58 (CDRL2) 以及95至103 (CDRL3) 的氨基酸序列的结合结构域。

[0022] 结合结构域可以包含基本上如图1b和2b的氨基酸序列的残基95至103 (CDRL3) 所示的氨基酸序列。在该实施方式中，分离的特异性结合成员可以另外包含一个或两个，优选两个结合结构域，其基本上为如图1b和2b所示的氨基酸序列的残基27至38 (CDRL1) 和残基56至58 (CDRL2) 。

[0023] 在一个实施方式中，可变重链和/或轻链可以包含抗体FG129的HCDR1-3和LCDR1-3。在另一个实施方式中，可变重链和/或轻链可以包含抗体FG129的HCDR1-3和LCDR1-3，以及FG129的框架区。

[0024] 包含多个相同或不同序列的结合结构域或其组合的特异性结合成员包括在本发明内。每个结合结构域可以由人抗体框架携带。例如，一个或多个框架区可以取代完整人抗体或其可变区的框架区。

[0025] 本发明的一种分离的特异性结合成员包含基本上如图1b或2b所示的氨基酸序列的残基1至114 (VL) 所示的序列。

[0026] 在一些实施方式中，具有图1a或2a的CDR的序列的结合成员可以与具有图1b或2b的CDR的序列的结合成员组合。

[0027] 在一个实施方式中，结合成员可以包含轻链可变序列，其包含LCDR1、LCDR2和LCDR3，其中，

[0028] LCDR1包含QSLLNSGNQKNY，

[0029] LCDR2包含WAS，以及

[0030] LCDR3包含QNDYSSPFT；以及

[0031] 重链可变序列，其包含HCDR1、HCDR2和HCDR3，其中，

[0032] HCDR1包含GFTFNTYA，

[0033] HCDR2包含IRSKSNNYAT，以及

[0034] HCDR3包含VGYGSGGNY。

[0035] 另一方面，本发明提供了一种包含VH结构域和VL结构域的结合成员，所述VH结构域包含图1a或2a的氨基酸序列的残基1至117，并且所述VL结构域包含图1b或2b的氨基酸序列的残基1至114。

[0036] 本发明还包括如上所述的结合配偶体，但是其中结合结构域的序列基本上如图1或2所示。因此，提供了如上所述的结合配偶体，但是其中一个或多个结合结构域区别在图1

或2中所示的那些1至5、1至4、1至3、2或1个取代。

[0037] 本发明还包括结合配偶体,其具有与图1和2中所示的VH和VL序列结合相同表位的能力。mAb的表位是mAb结合的抗原区域。如果每种抗体竞争性抑制(阻断)其它抗体与抗原的结合,则两种抗体结合相同或重叠的表位。也就是说,如在竞争性结合测定中所测量的,与缺乏竞争性抗体的对照相比,1x、5x、10x、20x或100x过量的一种抗体抑制另一种抗体的至少50%但优选75%、90%或甚至99%的结合(参见例如Junghans等,Cancer Res.50:1495,1990,其通过引用并入本文)。

[0038] 因此,本发明进一步提供了一种结合成员,其与包含具有图1a或2a的残基1至117的氨基酸序列的VH链和具有图1b或2b的残基1至114的氨基酸序列的VL链的抗体竞争结合仅附着于糖蛋白的唾液酸化二路易斯a和唾液酸化路易斯a-x和单唾液酸化路易斯^a。

[0039] 在一个优选的实施方式中,竞争性结合配偶体与具有图1a或2a的残基1至117的氨基酸序列的VH链和具有图1b或2b的残基1至114的氨基酸序列的VL链的抗体竞争结合仅附着于糖蛋白的唾液酸化二路易斯^a。

[0040] 在另一个实施方式中,竞争性结合配偶体与具有图1a的残基1至117的氨基酸序列的VH链和具有图1b的残基1至114的氨基酸序列的VL链的抗体,或者与具有图2a的残基1至117的氨基酸序列的VH链和具有图2b的残基1至114的氨基酸序列的VL链的抗体竞争结合仅附着于糖蛋白的唾液酸化二路易斯a和唾液酸化路易斯a-x和单唾液酸化路易斯a。

[0041] 优选地,竞争性结合配偶体是抗体,例如单克隆抗体,或本文全文提及的任何抗体变体或片段。

[0042] 一旦已经分离出具有本文所述的期望性质的单一原型mAb,例如FG129mAb,通过使用本领域已知的方法产生具有相似性质的其它mAb是简单的。例如,Jespers等,Biotechnology 12:899,1994的方法(其通过引用并入本文)可用于指导选择具有相同表位且因此与原型mAb具有类似性质的mAb。使用噬菌体显示,首先将原型抗体的重链与一组(优选人)轻链配对以选择聚糖结合mAb,然后将新的轻链与一组(优选人)重链配对以选择与原型mAb具有相同表位的(优选人)聚糖结合mAb。

[0043] 能够结合仅附着于糖蛋白的唾液酸化二路易斯^a和唾液酸化路易斯^{a-x}和单唾液酸化路易斯^a并诱导ADCC或内化,并且与图1或2的VH或VL结构域在VH和/或VL结构域中至少90%、95%或99%相同的MAB包含在本发明中。提及的90%、95%或99%同一性可以是与VH和/或VL结构域的框架区。特别地,CDR区可以是相同的,但框架区可以变化高达1%、5%或10%。优选地,这种抗体通过少量功能上无关紧要的氨基酸取代(例如保守取代)、缺失或插入而不同于图1或2的序列。在本发明的任何实施方式中,特异性结合对可以是抗体或抗体片段、Fab、(Fab')2、scFv、Fv、dAb、Fd或双抗体。在一些实施方式中,抗体是多克隆抗体。在其它实施方式中,抗体是单克隆抗体。本发明的抗体可以是人源化、嵌合或饰面抗体,或者可以是任何物种的非人抗体。在一个实施方式中,本发明的特异性结合配偶体是小鼠抗体FG129,其包含如图1a所示的重链和如图1b所示的轻链。

[0044] 在另一个实施方式中,本发明的特异性结合配偶体是嵌合抗体FG129,其包含如图2a所示的重链和如图2b所示的轻链。

[0045] 本发明的特异性结合成员可以携带可检测或功能性标记。

[0046] 在进一步的方面,本发明提供了分离的核酸,其包含编码本发明方面的特异性结

合成员的序列,以及制备本发明的特异性结合成员的方法,其包括在引起所述结合成员的表达条件下表达所述核酸,并回收结合成员。

[0047] 根据本发明的特异性结合成员可用于治疗或诊断人或动物体的方法,例如治疗患者(优选人)的肿瘤的方法,其包括向所述患者施用有效量的本发明的特异性结合成员。本发明还提供了本发明的特异性结合成员在药物中的用途,以及本发明的特异性结合成员在制造用于诊断或治疗肿瘤的药物中的用途。

[0048] 本发明还提供了本发明的特异性结合成员所结合的抗原。在一个实施方式中,提供了能够结合,优选具体地通过本发明的特异性结合成员结合的唾液酸化二路易斯^a。唾液酸化二路易斯^a可以以分离形式提供,并可用于筛选以进一步开发特异性结合成员。例如,可以筛选化合物文库中的特异性结合唾液酸化二路易斯^a的文库成员。唾液酸化二路易斯^a可以在蛋白质骨架上。当在蛋白质骨架上时,如通过SDS-PAGE所测定的,其可以具有约为50-150kDa的分子量。

[0049] 在另一方面,本发明提供了能够特异性结合唾液酸化二路易斯^a和唾液酸化路易斯^{a-x}的分离的特异性结合成员在结直肠、胃、胰腺、肺、卵巢和乳腺肿瘤的诊断或预后中的用途。另一方面,本发明提供了能够特异性结合仅附着于糖蛋白的唾液酸化二路易斯^a和唾液酸化路易斯^{a-x}和单唾液酸化路易斯^a的分离的特异性结合成员在结直肠、胃、胰腺、肺、卵巢和乳腺肿瘤的诊断或预后中的用途。

[0050] 本发明进一步提供了用于诊断癌症的方法,其包括使用本发明的特异性结合配偶体来检测来自个体的样品中仅附着于糖蛋白的唾液酸化路易斯^a和唾液酸化路易斯^{a-x}和单唾液酸化路易斯^a。在一些实施方式中,在诊断方法中,由结合配偶体检测到的聚糖的模式用于为个体分层治疗选择。

[0051] 下面进一步详细描述本发明的这些和其它方面。

[0052] 如本文所用,“特异性结合成员”是一对彼此具有结合特异性的分子的成员。特异性结合对的成员可以是天然来源的,也可以是全部或部分合成产生的。该对分子中的一个成员在其表面上具有一个区域,该区域可以是突起或空腔,其特异性结合并因此与该对分子中另一个成员的特定空间和极性组织互补。因此,该对的成员具有彼此特异性结合的特性。特异性结合对的类型的实例是抗原抗体、生物素-抗生物素蛋白、激素-激素受体、受体-配体、酶-底物。本发明通常涉及抗原-抗体型反应,尽管它也涉及本文定义的与抗原结合的小分子。

[0053] 如本文所用,“治疗”包括可以有益于人或非人动物,优选哺乳动物的任何方案。治疗可以针对现有的病症或可以是预防性的(预防性治疗)。

[0054] 如本文所用,“肿瘤”是组织的异常生长。它可能是局部的(良性)或侵入附近组织(恶性)或远处组织(转移性)。肿瘤包括导致癌症的肿瘤生长,并且包括食管、结直肠、胃、乳腺和子宫内膜肿瘤,以及癌组织或细胞系,包括但不限于白血病细胞。如本文所用,“肿瘤”在其范围内还包括子宫内膜异位症。

[0055] 如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有特异性结合抗原的抗原结合位点的分子,不管是天然的还是部分或全部合成产生的。该术语还涵盖具有与抗体结合结构域相同或同源的结合结构域的任何多肽或蛋白质。这些可以从天然来源获得,或者它们可以部分或全部合成产生。抗体的实例是免疫球蛋白

白同种型(例如IgG, IgE, IgM, IgD和IgA)及其同种型亚型;包含抗原结合结构域例如Fab, scFv, Fv, dAb, Fd的片段;和双抗体。抗体可以是多克隆或单克隆的。单克隆抗体可以被称为“mAb”。

[0056] 有可能采取单克隆抗体和其它抗体,并使用重组DNA技术技术来产生保留原始抗体特异性的其它抗体或嵌合分子。这些技术可能涉及将编码抗体的免疫球蛋白可变区或CDR的DNA引入不同免疫球蛋白的恒定区或恒定区加框架区。参见例如EP-A-184187, GB 2188638A或EP-A-239400。产生抗体的杂交瘤或其它细胞可能会发生基因突变或其它变化,这可能会或可能不会改变所产生抗体的结合特异性。

[0057] 由于抗体可以以多种方式进行修饰,因此术语“抗体”应该被解释为涵盖具有所需特异性的结合结构域的任何特异性结合成员或物质。因此,该术语涵盖抗体片段、抗体的衍生物、功能等同物和同系物、人源化抗体,其包括任何包含免疫球蛋白结合结构域的多肽,无论是天然的还是全部或部分合成的。因此包括与另一多肽融合的包含免疫球蛋白结合结构域或等同物的嵌合分子。在EP-A-0120694和EP-A-0125023中描述了嵌合抗体的克隆和表达。人源化抗体可以是具有非人(例如小鼠)抗体的可变区和人抗体的恒定区的修饰抗体。制备人源化抗体的方法描述于例如美国专利号5225539中。

[0058] 已经显示完整抗体的片段可以执行结合抗原的功能。结合片段的实例是(i)由VL、VH、CL和CH1结构域组成的Fab片段;(ii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iii)由单个抗体的VL和VH结构域组成的Fv片段;(iv)由VH结构域组成的dAb片段[25];(v)分离的CDR区;(vi)F(ab')2片段,包含两个连接的Fab片段的二价片段;(vii)单链Fv分子(scFv),其中VH结构域和VL结构域通过允许两个结构域结合以形成抗原结合位点的肽连接子连接[26、27];(viii)双特异性单链Fv二聚体(PCT/US92/09965);以及(ix)“双抗体”,通过基因融合构建的多价或多特异性片段(WO94/13804;[28])。

[0059] 双抗体是多肽的多聚体,每个多肽包括包含免疫球蛋白轻链的结合区的第一结构域和包含免疫球蛋白重链的结合区的第二结构域,两个结构域连接(例如通过肽连接子)但不能彼此结合以形成抗原结合位点:抗原结合位点通过多聚体内一种多肽的第一结构域与多聚体内另一种多肽的第二结构域的结合而形成(WO94/13804)。

[0060] 当要使用双特异性抗体时,这些可以是常规的双特异性抗体,其可以以多种方式制备[29],例如化学制备或从杂交杂交瘤制备,或可以是上述的任何双特异性抗体片段。可能优选使用scFv二聚体或双抗体而不是完整抗体。双抗体和scFv可以在没有Fc区的情况下构建,仅使用可变结构域,可能会降低抗独特型反应的效果。

[0061] 其它形式的双特异性抗体包括[30]中描述的单链“Janusins”。

[0062] 与双特异性完整抗体相反,双特异性双抗体也可能是有用的,因为它们可以容易地在大肠杆菌中构建和表达。使用来自文库的噬菌体显示(WO94/13804)可容易地选择适当结合特异性的双抗体(和许多其它多肽,如抗体片段)。如果双抗体的一个臂要保持恒定,例如具有针对抗原X的特异性,则可以制备其中另一臂变化并选择适当特异性的抗体的文库。

[0063] 术语“唾液酸化二路易斯^a”是指以下结构:

[0064] Neu5Aca2-3Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ1-3Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ。

[0065] 术语“单唾液酸化路易斯^a”是指以下结构:

[0066] Neu5Aca2-3Galb1-3(Fuca1-4)GlcNAcb。

[0067] 术语“唾液酸化路易斯^{a-x}”是指以下结构：

[0068] Neu5Aca2-3Galb1-3(Fuca1-4)GlcNAcb1-3Galb1-4(Fuca1-3)GlcNAcb。

[0069] “抗原结合结构域”是包含与抗原的部分或全部特异性结合并互补的区域的抗体的部分。当抗原较大时，抗体可能仅与抗原的特定部分结合，该部分被称为表位。抗原结合结构域可以由一个或多个抗体可变结构域提供。抗原结合结构域可以包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)。

[0070] “特异性”通常用于指特异性结合对的一个成员不会显示出任何显著结合与其特异性结合配偶体以外的分子的情况，并且例如与任何其它分子具有小于约30%的交叉反应性。在其它实施方式中，它与任何其它分子具有小于20%、10%或1%的交叉反应性。该术语也适用于例如抗原结合结构域对许多抗原携带的特定表位具有特异性的情况下，在这种情况下，携带抗原结合结构域的特异性结合成员将能够结合携带表位的各种抗原。

[0071] 根据本发明，“分离的”是指其中本发明的特异性结合成员或编码这种结合成员的核酸将优选为的状态。成员和核酸通常不含或基本上不含与它们天然相关的材料，例如在其天然环境中发现时与它们相关的其它多肽或核酸，或当它们被制备(当这种制备是通过重组DNA技术在体外或体内实施时)时在其制备环境(例如细胞培养物)中与它们相关的其他多肽或核酸。可以用稀释剂或佐剂配制特异性结合成员和核酸，并且仍然对于实际目的而被分离，例如，如果用于涂覆微量滴定板以用于免疫测定，则通常将成员与明胶或其它载体混合，或者当用于诊断或治疗时，将与药学上可接受的载体或稀释剂混合。特异性结合成员可以是天然或通过异源真核细胞系统糖基化的，它们也可以是(例如如果通过在原核细胞中表达产生的)非糖基化的。

[0072] “基本上如其所示”是指本发明的CDR区域将与图1或2的特定区域相同或高度同源。“高度同源”意指在CDR中可以产生1至5、1至4、1至3、2或1个取代。

[0073] 本发明还在其范围内包括具有图1或2中所示氨基酸序列的多肽，具有图A或B中所示核酸序列的多核苷酸以及与其具有基本同一性的序列，例如70%，80%，85%，90%，95%或99%的同一性。两个氨基酸序列或两个核酸序列的百分比同一性通常通过比对用于最佳比较目的的序列(例如，可以在第一序列中引入空位以与第二序列最佳比对)并比较在相应位置的氨基酸残基或核苷酸来确定。“最佳比对”是导致最高百分比同一性的两个序列的比对。百分比同一性通过比较序列内的相同氨基酸残基或核苷酸的数量(即，同一性% = 相同位置的数量/位置的总数×100)来确定。

[0074] 两个序列之间的百分比同一性的确定可以使用本领域技术人员已知的数学算法来完成。比较两个序列的数学算法的一个实例是Karlin和Altschul(1990)[31]的算法，其在Karlin和Altschul(1993)[32]中进行了修改。Altschul等(1990)[33]的NBLAST和XBLAST程序已经合并了这种算法。BLAST核苷酸搜索可以用NBLAST程序，得分=100，字长=12进行以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可以用XBLAST程序，得分=50，字长=3进行以获得与本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对，可以如Altschul等(1997)[34]所述使用Gapped BLAST。或者，PSI-Blast可用于执行检测分子间远距离关系的迭代搜索(同上)。当使用BLAST、GappedBLAST和PSI-Blast程序时，可以使用各个程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数。参见<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。用于比较序列的数学算法的另一个实例是Myers和Miller[35]的

算法。作为GCG序列比对软件包的一部分的ALIGN程序(版本2.0)包含了这种算法。本领域已知的用于序列分析的其它算法包括Torellis和Robotti (1994) [36]中描述的ADVANCE和ADAM;以及Pearson和Lipman (1988) [37]中描述的FASTA。在FASTA中,ktup是一个控制选项,用于设置搜索的灵敏度和速度。

[0075] 本发明的分离的特异性结合成员能够结合唾液酸化二路易斯^a碳水化合物,其可以是在蛋白质部分上的唾液酸化二路易斯^a。在一个实施方式中,CDR3区被携带在允许将这些区域结合至唾液酸化二路易斯^a碳水化合物的结构中,其中CDR3区包含基本上如图1a和2a的残基98-106(CDRH3)以及图1b和2b的残基95至103所示的氨基酸序列。

[0076] 携带本发明的CDR3的结构通常是抗体重链或轻链序列或其基本部分,其中CDR3区位于对应于通过重排的免疫球蛋白基因编码的天然存在的VH和VL抗体可变区的CDR3区的位置。参考<http://www.imgt.org/>可以确定免疫球蛋白可变区的结构和位置。基本上如图1a和2a的残基98-106所示的氨基酸序列可作为在人重链可变结构域或其基本部分中的CDR3而携带,并且基本上如图1b和图2b的残基95-103所示的氨基酸序列可作为在人轻链可变结构域或其基本部分中的CDR3而携带。

[0077] 可变结构域可以来源于任何种系或重排的人可变结构域,或者可以是基于已知的人可变结构域的共有序列的合成可变结构域。使用重组DNA技术,可以将本发明的CDR3衍生的序列引入一组缺乏CDR3区的可变结构域中。

[0078] 例如,Marks等(1992) [38]描述了产生抗体可变结构域库的方法,其中将针对在或邻近可变结构域5'末端的共有引物与共有引物一起用于人VH基因的第三框架区,以提供一组缺乏CDR3的VH可变域全集。Marks等(1992) [38]进一步描述了这个组如何与特定抗体的CDR3组合。使用类似技术,本发明的CDR3衍生的序列可以用缺乏CDR3的VH或VL结构域库改组,并且改组的完全VH或VL结构域与同源VL或VH结构域组合以提供本发明的特异性结合成员。然后可以将所述组合物显示在合适的宿主系统例如W092/01047的噬菌体显示系统中,从而可以选择合适的特异性结合成员。一组可以由来自10⁴个以上个体的成员,例如10⁶至10⁸或10¹⁰个成员的任何组成。

[0079] Stemmer (1994) [39]也公开了类似改组或者组合技术,其描述了与β-内酰胺酶基因有关的技术,但是观察到该方法可以用于产生抗体。另一种替代方法是产生携带本发明的CDR3衍生的序列的新的VH或VL区,其使用例如FG129VH或VL基因的随机诱变以在整个可变区内产生突变。Gram等(1992) [40]描述了这种技术,其使用了易错PCR。

[0080] 可以使用的另一种方法是将诱变指向VH或VL基因的CDR区。Barbas等(1994) [41]和Schier等(1996) [42]公开了这些技术。

[0081] 免疫球蛋白可变结构域的基本部分通常将包含至少三个CDR区,连同它们的插入框架区。该部分还可以包括第一和第四框架区的任一个或两个的至少约50%,该50%是第一框架区的C-末端50%和第四框架区的N-末端50%。可变区的基本部分的N-末端或C-末端的额外残基可以是那些通常不与天然存在的可变区结合的残基。例如,通过重组DNA技术进行的本发明的特异性结合成员的构建可以导致引入由被引入的连接子编码的N-末端或C-末端残基以促进克隆或其它操作步骤,其包括引入连接子以将本发明的可变结构域连接至另外的包括免疫球蛋白重链、其它可变结构域(例如在双抗体的产生中)或蛋白质标记的蛋白质序列,如下面更详细讨论的。

[0082] 本发明的一个实施方式提供了特异性结合成员，其包含基本上如图1所示的VL和VH区的氨基酸序列的一对结合结构域，即图1a和2a的氨基酸1至117 (VH) 以及图1b和2b的氨基酸1-114 (VL)。基于这些序列之一的单一结合结构域形成本发明的其它方面。在基本上如图1a和2a所示的VH区的氨基酸序列的结合结构域的情况下，这种结合结构域可以用作靶向剂，因为已知免疫球蛋白VH结构域能够在特定方式中结合靶抗原。

[0083] 在任一单链特异性结合结构域的情况下，这些结构域可用于筛选能够形成具有与本文公开的FG88抗体一样好或相等的体内特性的双结构域特异性结合成员的互补结构域。

[0084] 这可以通过使用如W092/01047中公开的所谓分级双重组合方法的噬菌体显示筛选方法来实现，其中使用含有H或L链克隆的个体菌落以感染编码另一条链 (L或H) 的克隆的完整文库，并根据噬菌体显示技术例如在参考文献中描述的那些选择所得的双链特异性结合成员。该技术也在Marks等[38]中公开。

[0085] 本发明的特异性结合成员可以进一步包含抗体恒定区或其部分。例如，基于图1b和2b中所示的VL区的特异性结合成员可以在其C-末端连接到抗体轻链恒定结构域，包括人C κ 或C λ 链。类似地，基于图1b和2b中所示的VH区的5个特异性结合成员可以在其C-末端连接到源自任何抗体同种型例如IgG、IgA、IgE和IgM，以及任何同种型亚类特别是IgG1、IgG2和IgG4的全部或部分免疫球蛋白重链。

[0086] 在一个实施方式中，结合成员是scFv，其按照以下顺序包含：1) 前导序列，2) 重链可变区，3) 3x GGGGS间隔子，4) 轻链可变区和5) 聚丙氨酸和用于纯化的6x His标签。在另一个实施方式中，结合成员是scFv，其按照以下顺序包含：1) 前导序列，2) 轻链可变区，3) 3x GGGGS间隔子，和4) 重链可变区，任选地还包含5'或3'纯化标签。在另一个实施方式中，结合成员以嵌合抗原受体 (CAR) 的形式提供。CAR也可以被称为人工T细胞受体、嵌合T细胞受体或嵌合免疫受体。在一个实施方式中，其中结合成员是以嵌合抗原受体 (CAR) 的形式以重链-轻链取向或轻链-重链取向提供的scFv。

[0087] 本发明的特异性结合成员可用于诊断和治疗人或动物受试者的肿瘤的方法。当用于诊断时，本发明的特异性结合成员可以用可检测标记来标记，例如放射性标记如¹³¹I或⁹⁹Tc，其可以使用抗体成像领域已知的常规化学方法附着于本发明的特异性结合成员。标记还包括酶标记，例如辣根过氧化物酶。标记还包括化学部分，例如生物素，其可以通过与特定的同源可检测部分(例如标记的抗生素蛋白)结合来检测。

[0088] 尽管本发明的特异性结合成员本身显示出有效杀死癌细胞，但它们可以另外用功能性标记来标记。功能性标记包括旨在针对癌症部位以导致其破坏的物质。这种功能性标记包括毒素，例如蓖麻毒蛋白和酶，如细菌羧肽酶或硝基还原酶，它们能够将前体药物转化为活性药物。另外，特异性结合成员可以与化学治疗剂或细胞毒剂(例如美登素(DM1和DM4))、欧奈德、奥瑞他汀、加利车霉素、杜卡霉素、多柔比星或放射性标记(例如⁹⁰Y或¹³¹I)连接或以其它方式相关联。

[0089] 此外，取决于待治疗的病症，本发明的特异性结合成员可以单独施用或与其它治疗组合施用，以及同时或顺序施用。因此，本发明进一步提供含有本发明的特异性结合成员和作为组合制剂的活性剂的产品，用于同时、分开或顺序地用于治疗肿瘤。活性剂可以包括化学治疗剂或细胞毒剂，包括5-氟尿嘧啶、顺铂、丝裂霉素C、奥沙利铂和他莫昔芬，其可与本发明的结合成员协同作用。其它活性剂可以包括合适剂量的止痛药，例如非甾体抗炎药

(例如阿司匹林、扑热息痛、布洛芬或酮洛芬)或鸦片类药物(例如吗啡),或止吐药。

[0090] 不希望受理论束缚,本发明的结合成员与活性剂协同以增强肿瘤杀伤的能力可能不是由免疫效应机制引起的,而可能是结合成员与细胞表面结合的直接后果,所述细胞表面结合到仅附着于糖蛋白上的唾液酸化二路易斯^a和唾液酸化路易斯^{a-x}和单唾液酸化路易斯^a。

[0091] 本发明的特异性结合成员通常以药物组合物的形式施用,所述药物组合物可以包含除了特异性结合成员之外的至少一种成分。

[0092] 除了活性成分之外,药物组合物还可以包含药学上可接受的赋形剂、稀释剂、载体、缓冲剂、稳定剂或本领域技术人员熟知的其它物质。这种物质应该是无毒的,且不应该干扰活性成分的功效。载体或其它物质的确切性质将取决于施用途径,其可以是口服或通过注射,例如静脉内施用。

[0093] 设想注射将是用于组合物的治疗性施用的主要途径,尽管也使用通过导管或其它手术管递送。一些合适的施用途径包括静脉内、皮下、腹膜内和肌内施用。液体制剂可以在从粉末制剂重构后使用。

[0094] 对于静脉注射或在痛苦部位注射,活性成分将为肠胃外可接受的无热原水溶液形式,并具有合适的pH、等渗性和稳定性。本领域的相关技术人员能够使用例如等渗载体如氯化钠注射液、林格氏注射液、乳酸林格氏注射液制备合适的溶液。根据需要,可以包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其它添加剂。

[0095] 用于口服施用的药物组合物可以是片剂、胶囊、粉末或液体形式。片剂可以包含固体载体,例如明胶或佐剂。液体药物组合物通常包含液体载体,例如水、石油、动物或植物油、矿物油或合成油。可以包括生理盐水溶液、葡萄糖或其它糖溶液或二醇类,如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。当制剂是液体时,其可以是例如含有pH 6.8-7.6的非磷酸盐缓冲液的生理盐溶液,或冻干粉末。

[0096] 该组合物还可以通过置于某些组织(包括血液)中的微球体、脂质体、其它微粒递送系统或持续释放制剂施用。持续释放载体的合适实例包括共享物品形式的半渗透性聚合物基质,例如栓剂或微胶囊。可植入或微胶囊持续释放基质包括L-谷氨酸和γ-乙基-L-谷氨酸酯[43]的聚交酯(美国专利3,773,919;EP-A-0058481)共聚物、聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)。含有多肽的脂质体通过公知的方法制备:DE 3,218,121A;Epstein等,PNAS USA,82:3688-3692,1985;Hwang等,PNAS USA,77:4030-4034,1980;EP-A-0052522;EP-A-0036676;EP-A-0088046;EP-A-0143949;EP-A-0142541;JP-A-83-11808;美国专利号4,485,045和4,544,545。一般地,脂质体是小的(约200-800埃)单层类型,其中脂质含量大于约30摩尔%胆固醇,所选择的比例被调整用于多肽渗漏的最佳速率。

[0097] 组合物可以以局部方式施用于肿瘤部位或其它所需部位,或者可以以靶向肿瘤或其它细胞的方式递送。

[0098] 优选将组合物以“治疗有效量”施用于个体,这足以对个体产生益处。实际施用量以及施用的剂量和时间过程将取决于所治疗内容的性质和严重程度。治疗的处方(例如决定剂量等)由全科医生和其它医生负责,并且通常考虑到待治疗的病症、个体患者的状况、递送部位、施用方法和医生已知的其它因素。本发明的组合物特别与现有肿瘤特别是癌症的治疗以及在初始治疗或手术后预防这些病症的复发有关。上述技术和方案的实例可以在

Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Oslo, A. (ed), 1980 [45] 中找到。

[0099] 最佳剂量可以由医生根据许多参数确定, 包括例如年龄、性别、体重、被治疗病症的严重程度、被施用的活性成分和施用途径。通常, 允许受体饱和的多肽和抗体的血清浓度是期望的。浓度超过约0.1nM通常是足够的。例如, 100mg/m²抗体的剂量提供约8天的约20nM的血清浓度。

[0100] 作为粗略的指导, 抗体剂量可以每周给予10-300mg/m²的量。应该以更频繁的间隔使用等效剂量的抗体片段, 以保持血清水平超过允许LecLe^x碳水化合物饱和的浓度。

[0101] 组合物的剂量将取决于结合成员的性质, 例如其结合活性和体内血浆半衰期、在制剂中的多肽浓度、施用途径、部位和剂量率、所涉及的患者的临床耐受性、以及折磨患者的病理状况等, 这完全在医师的技术范围内。例如, 每个患者每次施用300μg抗体的剂量是优选的, 尽管剂量范围可以是每剂量约10μg至6mg。在一系列连续接种过程中使用不同的剂量; 医生可以施用初始接种, 然后用相对较小剂量的抗体加强。

[0102] 本发明还涉及优化用于增强针对癌症的保护性免疫反应的免疫程序。

[0103] 本发明的结合成员可以全部或部分通过化学合成来产生。可以根据完善建立的标准液体或优选固相肽合成方法容易地制备结合成员, 其一般描述广泛可用(参见例如JM Stewart和JD Young, (1984) [46], M. Bodanzsky和A. Bodanzsky, (1984) [47]); 或者它们可以在溶液中, 通过液相法或通过固相、液相和溶液化学的任意组合来制备, 例如通过首先完成各自的肽部分, 然后, 如果需要和适当, 在去除存在的任何保护基之后, 通过相应的碳酸或磷酸或其反应性衍生物的反应引入残基X。

[0104] 生产根据本发明的结合成员的另一种方便的方式是通过在表达系统中使用核酸来表达编码它的核酸。

[0105] 本发明进一步提供了编码本发明的特异性结合成员的分离的核酸。核酸包括DNA和RNA。在优选的方面, 本发明提供了编码如上定义的本发明的特异性结合成员的核酸。这种核酸的实例示于图1和2中。本领域技术人员将能够确定这些核酸的置换、缺失和/或添加, 其仍将提供本发明的特异性结合成员。

[0106] 本发明还提供了包含至少一种如上所述的核酸的质粒、载体、转录或表达盒形式的构建体。本发明还提供了包含一种或多种如上的构建体的重组宿主细胞。如上所述, 编码本发明的特异性结合成员的核酸形成本发明的一个方面, 如同制备特异性结合成员的方法一样, 该方法包括从编码用于其核酸中表达。通过在合适的条件下培养含有核酸的重组宿主细胞可方便地实现表达。在通过表达产生之后, 可以使用任何合适的技术分离和/或纯化特异性结合成员, 然后酌情使用。

[0107] 用于在多种不同宿主细胞中克隆和表达多肽的系统是众所周知的。合适的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、酵母和杆状病毒系统。本领域可用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾细胞、NS0小鼠黑素瘤细胞和许多其它细胞系。一种常见优选的细菌宿主是大肠杆菌。原核细胞如大肠杆菌中的抗体和抗体片段的表达在本领域中已得到充分证实。有关综述, 请参见Plückthun (1991) [48]。对于本领域技术人员, 在培养的真核细胞中的表达也可用作产生特异性结合成员的选项, 参见最近的综述, 例如Reff (1993) [49]; Trill等, (1995) [50]。

[0108] 合适的载体可以根据需要选择或构建, 含有合适的调节序列, 包括启动子序列、终

止子序列、聚腺苷酸化序列、增强子序列、标志物基因和其它序列。载体可以是质粒，病毒例如噬菌体或噬菌粒。进一步的细节参见例如Sambrook等，(1989) [51]。Ausubel等，(1992) [52]详细描述了用于操作核酸的许多已知技术和方案，例如制备核酸构建体、诱变、测序、将DNA引入细胞和基因表达以及蛋白质分析。

[0109] 因此，本发明的另一方面提供了含有本文公开的核酸的宿主细胞。另一方面提供了一种方法，其包括将这种核酸引入宿主细胞。引入可以采用任何可用的技术。对于真核细胞，合适的技术可以包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染和使用逆转录病毒或其它病毒(例如痘苗病毒或用于昆虫细胞的杆状病毒)的转导。对于细菌细胞，合适的技术可以包括氯化钙转化、电穿孔和使用噬菌体的转染。引入之后可以导致或允许从核酸表达，例如通过在表达基因的条件下培养宿主细胞。

[0110] 在一个实施方式中，本发明的核酸整合到宿主细胞的基因组(例如染色体)中。根据标准技术，可以通过包含促进与基因组重组的序列来促进整合。

[0111] 根据本发明的另一方面，提供了与根据本发明的结合成员竞争结合相同表位的结合成员。竞争性结合成员与本文描述的根据本发明的结合成员具有相同的形式，但具有不同的CDR或可变区序列。

[0112] 本发明还提供了一种方法，其包括在表达系统中使用如上所述的构建体以表达如上的特异性结合成员或多肽。

[0113] 本发明每个方面的优选特征如与其它方面中的每一个准用。本文提及的现有技术文件在法律允许的最大程度上被并入。

附图说明

[0114] 图例

[0115] 图1a:FG129mAb的小鼠IgG1重链的氨基酸和核苷酸序列。数字是指用于抗体序列编号的标准IMGT系统[59]。图1b:FG129mAb的小鼠κ链的氨基酸和核苷酸序列。数字是指用于抗体序列编号的标准IMGT系统[59]。

[0116] 图2:由转染的细胞系产生的FG129mAb(与人恒定区序列连接的原始鼠可变区)的嵌合形式结合靶细胞系(HCT-15)。图2a:FG129mAb的人IgG1重链的氨基酸和核苷酸序列。数字是指用于抗体序列编号的标准IMGT系统[59]。图2b:FG129mAb的人κ链的氨基酸和核苷酸序列。数字是指用于抗体序列编号的标准IMGT系统[59]。

[0117] 图3a:通过CFG在玻片上排列的FG129对超过600个聚糖的ELISA筛选。方形代表葡萄糖胺，圆形代表半乳糖，三角形代表岩藻糖，菱形代表唾液酸。

[0118] 图3b:由mAb FG129和mAb ch129识别的抗原(1μg/ml)的间接Western印迹分析。泳道M:分子标记(红色)；泳道1:Colo205细胞裂解物(1×10^5 个细胞)；泳道2:Colo205TGL(1×10^6 个细胞)；泳道3:HCT-15细胞裂解物(1×10^5 个细胞)；泳道4:HCT-15TGL(1×10^6 个细胞)；泳道5:BxPc3细胞裂解物(1×10^5 个细胞)；泳道6:BxPc3TGL(1×10^6 个细胞)；泳道7:LS180细胞裂解物(1×10^5 个细胞)；泳道8:LS180TGL(1×10^6 个细胞)。阴性对照省略了一级抗体。使用CA19.9作为阳性对照以识别糖脂以及糖蛋白上的唾液酸化路易斯a。

[0119] 图4:FG129和CH129与唾液酸化路易斯a-HSA结合的ELISA分析。使用CA19.9作为阳性对照以识别糖脂以及糖蛋白上的唾液酸化路易斯^a。阴性对照包括不识别唾液酸化路易

斯^a的同种型抗体、HSA包被的孔、省略抗原的未包被孔和省略FG129的孔。误差线代表重复孔的平均值±SD。

[0120] 图5a:通过IHC将FG129 (1μg/ml) 与结直肠、胰腺、胃、卵巢和肺TMA结合。示出了不同染色水平的代表性图像:i) 阴性,ii) 弱,iii) 中等和iv) 强(放大倍数x20)。

[0121] 图5b:用FG129mAb染色的胰腺患者的无病存活的Kaplan-Meier分析。高与低的切断由X-tile决定。

[0122] 图5c:FG129的正常人体组织(AMSBIO)结合,示出了1)胆囊;2)回肠;3)肝脏;4)食道;5)胰腺;6)甲状腺中非常有限的结合(放大倍数x20)。

[0123] 图6a:与肿瘤细胞系的细胞表面结合的FG129和CH129 (5μg/ml) mAb的间接免疫荧光染色和流式细胞术分析。

[0124] 图6b:与HUVEC正常脐带细胞的细胞表面结合的FG129 (5μg/ml) mAb的间接免疫荧光染色和流式细胞术分析。使用抗CD55mAb作为阳性对照,使用抗IgG同种型抗体作为阴性对照。

[0125] 图6c:结合全血的FG129和ch129 (5μg/ml) mAb的间接免疫荧光染色和流式细胞术分析。使用抗HLA mAb w6/32作为阳性对照,使用抗IgG同种型抗体作为阴性对照。

[0126] 图7:结合Colo205 (7a)、HCT-15 (7b)、BxPc3 (7c) 和LS180 (7d) 细胞的细胞表面的FG129mAb和CH129mAb的滴定的间接免疫荧光染色和流式细胞术分析。

[0127] 图8:FG129和CH129对Colo205 (8a) 和HCT-15 (8b) 的ADCC杀伤。爱必妥用作阳性对照,而PBMC和单独的细胞用作阴性对照。使用GraphPad Prism6进行的Anova测试示出了每种浓度与仅由PBMC组成的阴性对照之间的显著差异。

[0128] 图9:FG129和CH129对Colo205的CDC杀伤。爱必妥用作阳性对照,而PBMC和单独的细胞用作阴性对照。使用GraphPad Prism6进行的Anova测试示出了每种浓度与仅由PBMC组成的阴性对照之间的显著差异。

[0129] 图10:在活Colo205、BxPC3和HCT-15中内化的Alexa Fluor 488 (绿色) 标记的FG129 (图10a) 和CH129 (图10b) 的Z-堆叠共焦显微镜示出了与溶酶体共定位。用CellMaskTM Orange (红色/C) 标记质膜,用LysoTracker[®] Deep Red (紫色/D) 标记溶解体以及用Hoechst 33258 (蓝色/A) 标记细胞核(放大倍数为60倍)。

[0130] 图11a:Fab-ZAP-FG129在抗原阳性(HCT15、Colo205、BxPC3、ASPC1) 和阴性(LoVo、LS180) 瘤细胞系中的细胞毒性。用皂草素连接的抗小鼠IgG Fab片段预温育的内化FG129的细胞毒性使用³H-胸苷掺入进行评估。结果表示为仅用一级mAb处理的细胞的增殖百分比。误差线示出了来自四个独立实验的平均值±SD。

[0131] 图11b:Fab-ZAP-IgG同种型内化测定。将给出的结果标准化,仅作为用一级mAb处理的细胞的增殖百分比。误差线示出了来自三个独立实验的平均值±SD。

[0132] 图11c:Fab-ZAP-CH129针对HCT15、Colo205、BxPC3癌症细胞系的细胞毒性。用皂草素连接的抗人IgG Fab片段预温育的内化CH129的细胞毒性使用³H-胸苷掺入进行评估。将给出的结果标准化,仅作为用一级mAb处理的细胞的增殖百分比。误差线示出了来自四个独立实验的平均值±SD。

[0133] 图11d:Fab-ZAP-IgG同种型内化试验。将给出的结果标准化,仅作为用一级mAb处理的细胞的增殖百分比。误差线示出了来自三次独立实验的平均值±SD。

[0134] 图11e:WST8细胞毒性测定示出了CH129-ADC构建体对Colo205的体外功效。所有三种CH129-ADC构建体均给予100%细胞杀伤,其中vcE构建体产生最高功效 ($E_{c50} \sim 10^{-11} M$) ,接着是DM1和DM4构建体显示相似功效 ($E_{c50s} \sim 10^{-10} M$) 。

[0135] 图11f:WST8细胞毒性测定示出了CH129-ADC构建体对HCT-15的体外功效。CH129构建体显示50-60%细胞杀伤。使用利妥昔单抗-ADC构建体作为特异性杀伤的对照。Ritux-vcE和Ritux-DM1不显示细胞杀伤。Ritux-DM4显示与CH129构建体类似的杀伤活性,表明非特异性细胞杀伤。

[0136] 图11g:WST8细胞毒性测定示出了CH129-vcE构建体的旁观者杀伤。

[0137] 图11h:WST8细胞毒性测定示出了CH129-DM4构建体的旁观者杀伤。

[0138] 图11i:WST8细胞毒性测定示出了CH129-DM1构建体的旁观者杀伤。

[0139] 图12a:使用FG129用于检测胰腺癌患者血清中分泌的唾液酸化路易斯a的夹心ELISA。阴性对照由来自健康供体的正常血清样品和单独的2%BSA-PBS组成。使用唾液酸化路易斯^a-HSA作为阳性对照。

[0140] 图12b:竞争FACS测定示出了与来自胰腺TMA组群的患者的血清结合预温育的FG129的HCT-15细胞系。阳性对照由来自5个健康供体的正常血清样品(显示为5个之间的平均值)以及与FG129预温育的2%BSA-PBS组成。阴性对照由与FG129和2%BSA-PBS单独预先温育的唾液酸化路易斯a-HSA组成。

[0141] 图13a:由1)前导序列、2)重链可变区、3)3x GGGGS间隔区、4)轻链可变区、5)聚丙氨酸和用于纯化的6x His标签组成的FG129-scFv的序列。

[0142] 图13b:FG129-scFv和CH129与唾液酸化路易斯a-HSA结合的ELISA分析。误差线代表重复孔的平均值±SD。

[0143] 图13c:FG129-scFv与Colo205细胞表面结合的滴定的间接免疫荧光染色和流式细胞分析。

具体实施方式

[0144] 现在将在下面的非限制性示例和附图中进一步描述本发明。

方法

[0146] 与肿瘤细胞系结合:将 1×10^5 个癌细胞与50μl一级抗体在4°C下温育1小时。用200μl RPMI 10%新生小牛血清(NBCS;Sigma, Poole, UK)洗涤细胞并以1000rpm离心5分钟。丢弃上清液并将50μl FITC缀合的抗小鼠IgG Fc特异性mab(Sigma;1/100在RPMI 10%NBCS中)用作二级抗体。将细胞在4°C下在黑暗中温育1小时,然后用200μl RPMI 10%NBCS洗涤并以1000rpm离心5分钟。丢弃上清液后,使用0.4%甲醛以固定细胞。在Beckman coulter FC-500流式细胞仪(Beckman Coulter, High Wycombe, UK)上分析样品。为了分析和绘制原始数据,使用WinMDI 2.9软件。根据制造商的推荐,使用(Dako UK Ltd)计算FG129(以30μg/ml使用)的细胞抗体结合位点。通过减去同种型对照的非特异性结合获得特异性抗体结合能力(SABC)。

[0147] 与血液结合:将50μl健康供体血液与50μl初次抗体在4°C下温育1小时。用150μl RPMI 10%NBCS洗涤血液并以1000rpm离心5分钟。丢弃上清液,并使用50μl FITC缀合的抗小鼠IgG Fc特异性mAb(1/100在RPMI 10%NBCS中)作为二级抗体。将细胞在4°C下在黑暗中

温育1小时,然后用150 μ l RPMI 10%NBCS洗涤并以1000rpm离心5分钟。丢弃上清液后,使用50 μ l/孔Cal-Lyse (Invitrogen, Paisley, UK),接着500 μ l/孔蒸馏水以裂解红细胞。随后将血液以1000rpm旋转5分钟。丢弃上清液并使用0.4%甲醛以固定细胞。在FC-500流式细胞仪(Beckman Coulter)上分析样品。为了分析和绘制原始数据,使用WinMDI2.9软件。

[0148] 质膜糖脂提取:将Colo205细胞沉淀(5×10^7 个细胞)重悬于500 μ l甘露醇/HEPES缓冲液(50mM甘露醇,5mM HEPES,pH7.2,均为Sigma)中并分别穿过各具有30个脉冲的3个针(23G,25G,27G)。向细胞中加入5 μ l 1M CaCl₂,并如上所述穿过各具有30个脉冲的3个针。将剪切的细胞在冰上温育20分钟,然后在室温下以3000g旋转15分钟。收集上清液并在4℃下以48000g旋转30分钟并弃去上清液。将沉淀物重悬于1ml甲醇中,然后再加入1ml氯仿并在室温下滚动30分钟。然后将样品以1200g旋转10分钟以去除沉淀的蛋白质。收集含有血浆膜糖脂的上清液并储存在-20℃。

[0149] 糖组分析:为进一步阐明FG129mAb的优良特异性,将抗体送到功能性糖组学联合会,在那里它们用≥600个天然和合成的聚糖进行筛选。简言之,将具有氨基连接子的合成和哺乳动物聚糖印刷到N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化的玻璃显微镜载玻片上,形成酰胺键。印刷的载玻片与1 μ g/ml的抗体温育1小时,然后用Alexa488缀合的山羊抗小鼠IgG检测结合。然后将载玻片干燥、扫描并将筛选数据与功能性糖组学联合会的数据库比较。

[0150] 亲和力分析

[0151] 使用表面等离子共振(SPR,Biacore X或3000,GE Healthcare)分析来研究FG129mAb的实时结合动力学。根据制造商的说明,将多价唾液酸化路易斯^a-HSA(Isosep AB,Tullinge,Sweden)偶联到CM5生物传感器芯片上,并以类似的方式处理参考细胞,但省略了唾液酸化路易斯^a缀合物。在HBS-P缓冲液(10mmol/L HEPES,pH7.4,150mmol/L NaCl,0.005%(v/v)表面活性剂P20)中稀释的FG129、CH129和scFv129mAb以50 μ l/min穿过芯片,BIA评估软件4.1用于确定计算亲和力的动力学结合参数。

[0152] 路易斯抗原和唾液夹心ELISA

[0153] 将ELISA板在4℃下用100ng/孔路易斯-HSA抗原(Isosep)包被过夜,用PBS/BSA封闭并与一级mAb温育(直接ELISA)。使用生物素化的二级mAb(Sigma)检测抗体或路易斯抗原结合。与链霉亲和素辣根过氧化物酶(HRPO)缀合物(Invitrogen)温育后,通过Tecan Infinite F50在450nm处读取平板。

[0154] SDS-PAGE和Western印迹分析:简言之,分析 1×10^5 或 10^6 细胞当量的Colo205细胞裂解物、质膜、总脂质提取物、质膜脂质提取物或HCT-15细胞裂解物的FG129结合。用二硫苏糖醇(DTT; Pierce Biotechnology, ThermoFisher, Loughborough, UK)减少肿瘤细胞总数和质膜脂质提取物和细胞裂解物,并使用NOVEX 4%至12% Bis-Tris凝胶(Invitrogen)进行SDS-PAGE,在30V下使用1x转移缓冲液(20x, Invitrogen)和20%(v/v)甲醇转移到Immobilon-FL PVDF膜(Merck Millipore, Watford, UK)1小时。用0.05%(v/v)吐温-PBS中的5%(w/v)脱脂奶粉封闭膜1小时,然后用稀释于吐温-PBS、2%BSA中的一级抗体探测1小时。使用生物素缀合的抗小鼠IgG Fc特异性二级抗体(Sigma; 1/2000稀释在吐温-PBS、2%BSA中)检测一级抗体结合1小时,并使用IRDye 800CW抗生蛋白链菌素(LICOR Biosciences, UK; 1/1000在吐温-PBS 2%BSA中)可视化。

[0155] 鉴定FG129重链和轻链可变区。

[0156] 细胞来源和总RNA制备:从组织培养物中取出大约 5×10^6 个来自杂交瘤细胞FG129的细胞,在PBS中洗涤一次,并用500μl Trizol (Invitrogen) 处理细胞沉淀。将细胞分散在试剂中后,将它们储存在-80°C直到按照制造商的方案制备RNA。通过Nanodrop测定RNA浓度和纯度。在cDNA合成之前,按照制造商的推荐, RNA经DNase I处理以去除基因组DNA污染(DNase I重组体,无RNase, Roche Diagnostics, Burgess Hill, UK)。

[0157] cDNA合成:按照制造商的方案 (Roche Diagnostics), 使用第一链cDNA合成试剂盒和AMV逆转录酶从3μg总RNA制备第一链cDNA。cDNA合成后,逆转录酶活性通过在90°C下温育10分钟而破坏,cDNA在-20°C下保存。

[0158] GAPDH PCR评估cDNA质量:使用PCR来评估cDNA质量;与热启动Taq聚合酶 (AmpliTaq Gold 360, Invitrogen) 一起使用对小鼠GAPDH管家基因 (5' -TTAGCACCCCTGGCCAAGG-3' 和 5' -CTTACTCCCTGGAGGCCATG-3') 特异性的引物进行35个循环 (95°C, 3分钟, 然后94°C/30秒, 55°C/30秒, 72°C/1分钟的35个循环; 72°C下10分钟的最终抛光步骤)。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳进行评估。

[0159] 用于克隆FG129可变区的PCR引物设计:基于PCR产物序列数据设计引物以扩增重链和轻链可变区。设计引物以允许将相关链克隆到hIgG1/kappa双表达载体pDC0rig-hIgG1中的独特限制性内切酶位点。将每个5'引物靶向确定的可变区的起始密码子和前导肽,以及立即在起始密码子的5'处具有Kozak共有序列。每个3'引物被设计为与抗体序列的连接区域互补,以在克隆链后保持读框,并且保留通常在连接区/恒定区连接处发现的氨基酸序列。所有引物均购自Eurofins MWG (Ebersberg, 德国)。

[0160] 重链可变区PCR:免疫球蛋白重链可变区用途使用具有先前发表的一组引物的PCR进行测定[60]。先前使用小鼠mAb同种型测试试剂盒 (Serotec, Oxford, UK) 的结果已经表明FG129都是小鼠IgG3抗体。因此使用适当的恒定区反向引物以从恒定区扩增。用热启动Taq聚合酶对12个小鼠VH区特异性5'引物和对先前确定的抗体亚类特异性的3'引物进行PCR扩增35个循环 (94°C, 5分钟, 随后94°C/1分钟, 60°C/1分钟, 72°C/2分钟的35个循环; 72°C下20分钟的最终抛光步骤)。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳进行评估。为VH4引物产生阳性扩增。

[0161] 轻链(κ)链可变区PCR:免疫球蛋白轻链可变区用途使用具有先前发表的一组引物的PCR进行测定[60]。先前使用小鼠mAb同种异型测试试剂盒的结果表明FG129使用κ轻链。用热启动Taq聚合酶对小鼠Vκ区特异性5'和3'小鼠Cκ特异性引物进行PCR扩增35个循环 (94°C, 5分钟, 随后94°C/1分钟, 60°C/1分钟, 72°C/2分钟的35个循环; 72°C下20分钟的最终抛光步骤)。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳进行评估。使用Vκ1和Vκ2引物为FG129产生阳性扩增。

[0162] PCR产物纯化和测序:使用Qiaquick PCR纯化试剂盒 (Qiagen, Crawley, UK) 纯化PCR产物。通过Nanodrop测定所得DNA的浓度,并通过琼脂糖凝胶电泳评估纯度。使用诺丁汉大学DNA测序设备 (<http://www.nottingham.ac.uk/life-sciences/facilities/dna-sequencing/index.aspx>) 上的起始5'和3'PCR引物对PCR产物进行测序。使用IMGT数据库搜索设备 (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest?livret=0&option=mouseIg) 分析序列 (V区鉴定,连接分析)。测序表明FG129具有来自以下家族的重链和轻链可变区;重链;IGHV6-6*01,IGHJ1*01,轻链;IGKV12-41*01,IGKJ1*01。足够的残基恒定区存在于重链序列中以确认FG129是mIgG1亚类。

[0163] 克隆策略: 使用校正聚合酶(Phusion, New England Biolabs)克隆到TA载体(pCR2.1; Invitrogen)中以产生用于克隆的PCR产物。

[0164] 用于克隆的FG129重/轻链PCR: 使用校正读数聚合酶(Phusion; NEB)和上述使用先前描述的FG129cDNA模板的克隆引物进行PCR扩增35个循环(98°C, 3分钟, 然后98°C/30秒, 58°C/30秒, 72°C/45秒的35个循环; 72°C下3分钟的最终抛光步骤)。通过琼脂糖凝胶电泳证实扩增成功。

[0165] TOPO轻链克隆: 在72°C下用Taq聚合酶(NEB)处理扩增的FG129轻链15分钟以添加与TA克隆兼容的' A'突出端。将处理的PCR产物与TOPO TA载体pCR2.1(Invitrogen)温育, 并根据制造商的说明, 转化到化学感受态的TOP10F'细胞中。将转化的细菌涂布在补充有LB琼脂平板的氨苄青霉素(80μg/ml)上, 然后在37°C下温育过夜。在液体培养物(补充有80μg/ml 氨苄青霉素的LB)和制备的质粒DNA(旋转小量制备试剂盒, Qiagen)中生长菌落。通过用BsiWI和BamHI连续消化和琼脂糖凝胶电泳确认插入物的存在。使用T7和M13rev引物对来自菌落的小量制备的DNA进行测序。来自一个这种菌落的DNA插入物具有预测的FG129轻链序列; 将300ml细菌LB/氨苄青霉素培养物生长过夜, 并用大量制备(maxiprep质粒大量试剂盒, Qiagen)制备质粒DNA。大量制备的DNA插入物通过测序确认。

[0166] TOPO重链克隆: 在72°C下用Taq聚合酶(NEB)处理扩增的FG129重链15分钟以添加' A'突出端。将处理的PCR产物与TOPO TA载体pCR2.1温育, 并如上所述转化到化学感受态的TOP10F'细胞中。将转化的细菌涂布在补充有氨苄青霉素的LB琼脂平板上, 然后在37°C下温育过夜。在液体培养物(LB/氨苄青霉素)和制备的质粒DNA(spin miniprep kit, 旋转小量制备试剂盒)中生长菌落。通过用HindIII和AfeI消化和琼脂糖凝胶电泳确认插入物的存在。使用T7和M13rev引物对来自许多菌落的小量制备的DNA进行测序。来自一个这种菌落的DNA插入物具有预测的FG129重链序列; 300ml细菌LB/氨苄青霉素培养物生长过夜, 并用大量制备(质粒大量试剂盒, Qiagen)制备质粒DNA。大量制备的DNA插入物通过测序确认。

[0167] pDCOrig-hIgG1双表达载体轻链克隆: 通过用BsiWI和BamHI连续消化从TOPO载体pCR2.1消化FG129轻链, 并使用QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen)按照制造商推荐的方法纯化400bp插入物DNA琼脂糖凝胶。将该插入物连接到预先制备的pDCOrig-hIgG1载体(见上文)中并转化到化学感受态的TOP10F'细胞中。将转化物涂布在补充有35μg/ml Zeocin的LB琼脂平板上, 然后在37°C下温育过夜。在液体培养物(补充有35μg/ml Zeocin的LB)和制备的质粒DNA(旋转小量制备试剂盒, Qiagen)中生长菌落。使用位于人κ恒定区中的测序引物对来自所有菌落的小量制备的DNA进行测序。来自其中一个菌落的DNA插入物具有预测的正确插入pDCOrig-hIgG1的FG129轻链序列; 将300ml细菌LB/zeocin培养物生长过夜, 并用大量制备(质粒大量试剂盒, Qiagen)制备质粒DNA。

[0168] pDCOrig-hIgG1双表达载体重链克隆: 通过用HindIII和AfeI消化, 从TOPO载体pCR2.1中消化FG129重链插入物。含有FG129κ轻链(上述制备的)的载体(pDCOrig-hIgG1-129k)也用HindIII和AfeI消化。然后根据制造商的建议(南极磷酸酶, NEB)对载体DNA进行磷酸酶处理。琼脂糖凝胶电泳后, 按照制造商的建议, 使用QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen)分离出6.5kb pDCOrig-hIgG1载体带和400bp FG129H插入带。将插入物连接到pDCOrig-hIgG1载体中并转化到化学感受态的TOP10F'细胞中。将转化物涂布在补充有35μg/ml Zeocin的LB琼脂平板上, 然后在37°C下温育过夜。在液体培养物(补充有35μg/ml

Zeocin的LB) 和制备的质粒DNA(旋转小量制备试剂盒,Qiagen)中生长菌落。通过用HindIII和AfeI消化和琼脂糖凝胶电泳确认插入物的存在。使用位于人IgG1恒定区中的测序引物对来自许多菌落的小量制备DNA进行测序。来自其中一个菌落的DNA插入物具有预测的正确插入pDC0rig-hIgG1的FG129重链序列;将300ml细菌LB/zeocin培养物生长过夜,并用大量制备(质粒大量试剂盒,Qiagen)制备质粒DNA。测序用于确认重链和轻链基因座。

[0169] 嵌合抗体构建体的表达、纯化和表征。

[0170] 用于本发明中描述的嵌合抗体的表达和纯化的方法可以使用本领域公知的方法来实现。简言之,基于标准方案例如Sambrook等[61],通过蛋白A或蛋白G亲和层析从瞬时或随后稳定的转染细胞收集的上清液中纯化抗体。

[0171] FG129-scFv的克隆、表达、纯化和表征

[0172] 将重链和轻链可变区以计算机模拟方式以前导;重链可变结构域;间隔子(3x GGGGS);轻链可变区;间隔子(6x Ala);纯化标签(6x His)的方向整合到单个scFv序列中并合成。在克隆到真核表达载体后,转染Expi293细胞并使其瞬时产生蛋白质(6天)。His标签的scFv使用固定化钴层析(HiTrap Talon1ml柱;GE Healthcare)从Expi-293上清液中纯化。在结合测定中,使用生物素化的抗His标签抗体作为二级抗体(6x-His表位标签抗体,生物素缀合的,克隆HIS.H8;Thermo Fisher)。

[0173] 免疫组织化学评估FG129:为了确定FG129的治疗价值,通过免疫组织化学(IHC)在胰腺癌、肺癌、胃癌、卵巢癌、结直肠癌组织微阵列上筛选。

[0174] 方法学:使用标准抗生物素蛋白-生物素过氧化物酶方法进行免疫组织化学。将石蜡包埋的组织切片置于60°C的热块上以熔化石蜡。组织切片用二甲苯去石蜡并通过梯度醇重新水化。然后将切片浸入500ml柠檬酸盐缓冲液(pH6)中并在微波(Whirlpool)中加热20分钟以检索抗原。通过用内源性过氧化物酶溶液(Dako Ltd,Ely,UK)温育组织切片5分钟以阻断内源性过氧化物酶活性。将正常猪血清(NSS;Vector Labs,CA,USA;1/50PBS)加入每个切片20分钟以阻断非特异性一级抗体结合。将所有切片与抗生物素蛋白D/生物素阻断试剂盒(Vector Lab)温育15分钟以阻断抗生物素蛋白和生物素的非特异性结合。用NSS(1/50PBS)将切片重新封闭5分钟。然后将组织切片与一级抗体在室温下温育1小时。将抗-β-2-微球蛋白(Dako Ltd;1/100在PBS中)mAb和PBS分别单独用作阳性和阴性对照。用PBS洗涤组织切片并在室温下与生物素化的山羊抗小鼠/兔免疫球蛋白(Vector Labs;1/50,在NSS中)温育30分钟。用PBS洗涤组织切片,并与预制的1/50(PBS)链霉抗生物素蛋白-生物素/辣根过氧化物酶复合物(Dako Ltd)在室温下温育30分钟。使用3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)作为底物。每个切片用100μl DAB溶液温育两次5分钟。最后,切片在用梯度醇脱水之前用苏木精(Sigma-Aldrich,Poole Dorset,UK)轻度复染,通过浸入二甲苯并用联苯乙烯、增塑剂、二甲苯(DPX)固定剂(Sigma)固定载玻片以进行清洁。

[0175] 患者组群:研究群体包括以下组群:连续462个存档结直肠癌(29)标本(1994-2000年;中间随访42个月;2003年12月审查;淋巴结阳性患者常规接受5-氟尿嘧啶辅助化疗/亚叶酸),350个卵巢癌(28)样本(1982-1997;中间随访192个月;2005年11月审;II期至IV期患者接受标准辅助化疗,后期基于铂类),142个胃癌(26)样本(2001-2006年;中间随访66个月;2009年1月审查;无化疗),68个胰腺癌和120个胆管/壶腹癌(27)样本(1993-2010年;中间45个月;2012年审查;25-46%患者接受5-氟尿嘧啶/亚叶酸和吉西他滨的辅助化疗),220

个非小细胞肺癌(01/1996-07/2006;中间随访36个月;2013年5月审查;所有患者术前均未接受化疗,但11个患者接受放射治疗,9名患者在术后接受至少1个周期的辅助化疗),这些患者从在诺丁汉或德比大学医院进行选择性手术以切除组织学证实的癌症的患者获得。除非相关的临床病理资料/数据不可用,否则不会排除任何病例。

[0176] 共聚焦显微镜:根据制造商的方案(Invitrogen),用Alexa-488荧光团(A-FG129,A-CH129)标记FG129和CH129mAb。 1.5×10^5 个HCT-15细胞在无菌环形盖玻片(22mm直径,0.16-0.19mm厚)上在6孔板中于37°C在5%CO₂中生长24小时。24小时后,将盖玻片上的细胞在37°C在黑暗中用5μg/ml的mAb处理2小时。2小时后,使用PBS洗去过量/未结合的mAb。然后用0.4%多聚甲醛在黑暗中固定细胞20分钟。用PBS洗去0.4%多聚甲醛。将盖玻片用PBS:甘油(1:1)固定在载玻片上。盖玻片边缘用透明指甲油密封。在共焦显微镜下(Carl Zeiss,Jena,德国)观察A-FG129和A-CH129mAb的定位。

[0177] ADCC和CDC:将细胞(5×10^3)与100μl PBMC,10%自体血清或单独的培养基或与一定浓度范围的mAb共温育。通过分别单独用培养基或用10%TritonX-100培养标记细胞来评估自发和最大释放。温育4小时后,将来自每个孔的50μl上清液转移到96孔透明板中。使板干燥过夜并在Topcount NXT计数器(Perkin Elmer,Cambridge,UK)上计数。根据以下公式计算靶细胞的平均百分比裂解:

$$[0178] \text{ 平均\%裂解} = 100 \times \frac{\text{平均实验计数}-\text{平均自发计数}}{\text{平均最大计数}-\text{平均自发计数}}$$

[0179] ADC测定

[0180] 通过用小鼠Fab-ZAP二级缀合物(Advanced Targeting Systems)测量免疫复合的mAb的细胞毒性来评估ADC(30)。将细胞一式三份接种于96孔板(2000个细胞,90μl/孔)中。在将FG129或CH129mAb与50ng Fab-ZAP缀合物的浓度范围的预先培养(室温30分钟)后,将10μl缀合物或游离mAb加入孔中并温育72小时。对照孔由不含缀合物温育的细胞组成,与不含一级mAb的二级Fab-ZAP温育,并在Fab-ZAP存在下与对照mAb温育。在最后24小时期间通过掺入³H-胸昔来测量细胞存活率。结果表示为与仅含初次mAb相比的与缀合物温育的细胞中掺入³H-胸昔的百分比。

[0181] 为了进一步研究CH129是否会在临床环境中形成有前途的ADC候选物,该mab被化学缀合到临床前和临床验证的不同有效负载/连接子构建体。因此,三个CH129构建体是通过ADC生物技术生产的:一个具有通过可切割二肽缬氨酸-瓜氨酸连接子和对-氨基苄醇(PABA)自消化的间隔子连接的耳他汀MMAE,一个具有通过中间切割位阻二硫键连接子SPDB连接的DM4美登木素,以及一个具有通过不可切割的SMCC连接子连接的DM1美登木素。还使用非靶向mab利妥昔单抗生产了一组匹配的对照ADC构建体,以用于相关的测定对照。

[0182] 通过使用水溶性四唑盐WST-8(Sigma)来评估CH129-ADC构建体的细胞毒性作用,以测量氢化酶的活性,其与活细胞的数量成正比。将细胞以2000个细胞/90μl/孔的密度接种在含有青霉素-链霉素(Sigma)的10%FBS-RPMI中的96孔板中并在37°C,5%CO₂下温育过夜。然后将ADC构建体以不同浓度以10μl/孔的终体积加入细胞中,并将平板与抗体构建体在37°C,5%CO₂下温育72小时。然后加入WST-8(10μl/孔),将平板进一步在37°C,5%CO₂下温育3小时。温育3小时后,通过Tecan Infinite F50在450nm下读取平板。结果表示为对照孔的百分比,其由仅没有任何抗体的细胞组成。在表达靶向的抗原唾液酸化路易斯a的高细

胞表面密度的两个结直肠细胞系Colo205和HCT-15上研究了细胞毒性。

[0183] 实施例1

[0184] FG129mAb的产生和初步表征

[0185] FG129是通过如下方式具有而产生:用掺入脂质体中的LS180细胞(结直肠细胞系)的质膜脂质提取物,以2个月间隔两周对Balb/c小鼠免疫,使用 α -半乳糖苷神经酰胺作为第一、第三和第四次免疫中的佐剂,第二次免疫期间抗CD40mAb作为佐剂。

[0186] 对免疫的抗体反应的分析:通过脂质酶联免疫吸附测定(ELISA)首先监测抗体滴度。使用LS180肿瘤细胞和使用LS180的Western印迹进行流式细胞术分析(FACS)。与出血前血清对照相比,认为具有最佳反应的小鼠在融合前用LS180质膜脂质提取物静脉内(i.v.)加强。融合后8天,收集上清液并通过流式细胞术筛选新鲜的LS180肿瘤细胞。收获使用间接免疫荧光测定证明细胞表面结合的杂交瘤,在完全培养基中洗涤并以每孔0.3个细胞分散在96孔板上以获得克隆。然后筛选阳性孔,并将它们继续培养直至获得足够数量的细胞以第二次以每孔0.3个细胞分散在96孔板上。如果所得菌落数等于~30且所有杂交瘤均为阳性,则杂交瘤被认为是克隆。可以使用本领域技术人员已知的常规技术获得抗体或抗体片段的克隆扩增、批量培养和抗体纯化的方法。

[0187] 实施例2

[0188] FG129的嵌合

[0189] 术语“嵌合抗体”旨在指其中可变区序列来源于一个物种并且恒定区序列来源于另一物种的抗体,例如其中可变区序列来源于小鼠抗体并且恒定区序列来源于人抗体的抗体。基于如上所述制备的鼠mAb的序列可以制备本发明的嵌合(或人源化)抗体。图1中示出了FG129mAb的重链(图1a)和轻链(图1b)的可变区和恒定区的氨基酸和核苷酸序列。数字是指用于编号抗体序列的标准化IMGT系统[49]。表明了CDR1、CDR2和CDR3区。FG129重链属于小鼠重链家族IGHV10-1*02(IGHD1-1*01,IGHJ4*01),与亲本生殖细胞基因相比具有三个突变。FG129轻链属于小鼠 κ 链家族IGKV8-19*01(IGKJ4*01),与亲本生殖细胞基因相比具有两个突变。

[0190] 将FG129重链和轻链可变区克隆到人IgG1表达载体中。将其转染入CHO-S或HEK293细胞中,并在蛋白G上纯化人抗体。嵌合mAb CH129结合于结直肠细胞系Colo205。人ch129mAb的重链和轻链的氨基酸和核苷酸序列分别示于图2a和2b中。

[0191] 实施例3

[0192] 定义由FG129和CH129mAb识别的表位

[0193] MAb FG129是通过用来自结直肠细胞系LS180的糖脂提取物对Balb/c小鼠免疫而产生的小鼠IgG1k同种型。CFG对≥600种天然和合成聚糖进行的聚糖谱分析示出了FG129结合唾液酸化二路易斯^a(100%)和唾液酸化路易斯^{a-x}(89%)的高特异性。它也可以与单唾液酸化路易斯^a(89%)结合,但只有在长载体(sp8)上而不是在短载体上(sp0)时,表明了需要至少4个碳水化合物或足够的空间以允许三个碳水化合物残基插入以正确结合构象存在的抗体序列中(图3a)。

[0194] 为了分析这些聚糖是否在来自肿瘤细胞系的糖蛋白或糖脂上表达,通过Western印迹评估FG129结合(图3b)。用FG129、CH129mAb、单独的二级抗体或CA19.9(抗唾液酸化路易斯^aMab)印迹来自结直肠(Colo205HCT-15和LS180)和胰腺细胞系(BxPc3)的肿瘤裂解物

或肿瘤糖脂提取物。FG129和CH129与Colo205和HCT-15裂解物中的多种糖蛋白以及BxPc3和LS180裂解物中较少量的糖蛋白结合。FG129未能结合任何肿瘤糖脂提取物。相反,CA19.9显示与BxPc3、Colo205和LS180中的更多种糖蛋白以及来自BxPc3和HCT-15细胞的糖脂结合。这些结果表明FG129倾向于结合六个碳水化合物残基并且倾向于主要在蛋白质上表达的唾液酸化二路易斯a。相比之下,CA19.9更倾向于3个碳水化合物残基聚糖(唾液酸化路易斯a)结合脂质和蛋白质。

[0195] 由于mAb需要强烈的亲和力以在肿瘤内定位,因此通过Biacore和ELISA评估FG129mAb的亲和力。使用SPR(Biacore X或3000)在唾液酸化路易斯a(如唾液酸化二路易斯a不可用)耦合芯片上的亲和力测量揭示了两种可能的功能亲和力,其中主要的一个($K_d \sim 10^{-7} M$)占群体的80%,以及另一种非常高的亲和力($K_d \sim 10^{-13} M$),具有快速结合($\sim 10^4 1/Ms$)和非常缓慢的解离速率($K_d \sim 10^{-8} 1/s$)(表1a)。特别地,亲和力测量揭示了对FG129的亚纳摩尔功能亲和力和对CH129的纳摩尔亲和力,两者都示出了对唾液酸化路易斯a结合的相对快速的结合速率和缓慢的解离速率(表1b)。scFv129的单价结合亲和力较低($10^{-7} M$),具有较慢的结合速率但解离速率相似,表明FG129和CH129在芯片上的二价结合。

[0196] 表1a.通过SPR测定动力学唾液酸化路易斯a结合参数

| [0197] | 平衡解离常数 | 结合速率 | 解离速率 |
|--------|--|--------------------------------|-----------------------------------|
| | $K_d (M)$ | $k_a (1/Ms)$ | $k_d (1/s)$ |
| | 主要 K_{d1} (80%) $\sim 1.3 \times 10^{-7}$ | $k_{a1} \sim 1.97 \times 10^4$ | $k_{d1} \sim 2.57 \times 10^{-3}$ |
| | 次要 K_{d2} (20%) $\sim 1.4 \times 10^{-13}$ | $k_{a2} \sim 8.85 \times 10^4$ | $k_{d2} \sim 1.35 \times 10^{-8}$ |

[0198] 表1b.通过SPR测定动力学唾液酸化路易斯a结合参数

| [0199] | SPR | | | |
|--------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | 实时唾液酸化路易斯 a-HAS 结合 | | | |
| | mAb | 结合速率 | 解离速率 | 解离常数(M) |
| | | k_{on} (结合) (1/Ms) | k_{off} (解离) (1/s) | K_d |
| | FG129 | 6.2×10^5 | 1.1×10^{-4} | 0.2×10^{-9} |
| | CH129 | 1.3×10^5 | 2.6×10^{-4} | 2.1×10^{-9} |
| | FG129-scFv | 3.0×10^3 | 5.0×10^{-4} | 1.7×10^{-7} |

[0200] 此外,抗原结合通过使用唾液酸化路易斯^a-HSA的ELISA来评估,其揭示了FG129和CH129剂量依赖性反应,证实了具有亚纳摩尔级 E_{c50} ($\sim 10^{-10} M$)的特异性唾液酸化路易斯^a结

合并且也显示不与HSA和塑料结合(图4)。

[0201] 实施例4

[0202] FG129和CH129mAb的免疫组织化学评估。

[0203] 为了确定FG129的治疗价值,通过免疫组织化学(IHC)对结直肠、胃、胰腺、肺和卵巢肿瘤组织微阵列(TMA)进行筛选。

[0204] 通过IHC在肿瘤TMA上评估FG129的肿瘤组织结合。mAb结合至74% (135/182) 的胰腺肿瘤,50% (46/92) 的胃肿瘤,36% (100/281) 的结直肠肿瘤,27% (89/327) 的卵巢和21% (42/201) 的NSCLC肿瘤(表1)。

[0205] 表2.通过染色强度通过IHC使FG129 (1 μ g/ml) 与胃、结直肠、胰腺、卵巢和肺TMA结合

| 染色 | 胃 | | 结直肠 | | 胰腺+胆管/ 壶腹 | | 卵巢 | | 肺 (腺癌) | |
|----|----|----|-----|----|--------------|----|-----|----|--------|----|
| | 数量 | % | 数量 | % | 数量 | % | 数量 | % | 数量 | % |
| 阴性 | 46 | 50 | 181 | 64 | 45 | 25 | 238 | 73 | 159 | 79 |
| 弱 | 25 | 27 | 72 | 26 | 37 | 21 | 63 | 19 | 21 | 10 |
| 中度 | 10 | 11 | 25 | 9 | 61 | 34 | 21 | 6 | 9 | 4 |
| 强 | 11 | 12 | 3 | 1 | 37 | 21 | 5 | 2 | 12 | 6 |

[0206] [0207] 图5a中示出了具有FG129的肿瘤组织的不同染色水平的代表。在胰腺癌组群中,胰腺患者的无病存活的Kaplan-Meier分析揭示了,与较低FG129结合组(平均存活期:90个月(n=82))相比,在高FG129结合组(平均存活期:30个月(n=94))中具有显著较低的平均存活时间,p=0.004,对数秩检验。在使用Cox回归的多变量分析中,胰腺癌中高FG129抗原表达是不良预后的标志物,其不依赖于神经周围侵入(p=0.003)(图5b)。

[0208] 在正常组织中,FG129具有非常有限的结合模式,并且不结合大多数正常组织,如心脏、脑、胃和肾(表1)。在胆囊(弱)、回肠(1%)、肝脏(1%)、食道(5%)、胰腺(10%)和甲状腺(弱)中观察到非常有限的结合(图5c)。与CA19.9mAb形成鲜明对比,CA19.9mAb识别脂质和蛋白两者上的唾液酸化路易斯^a蛋白。它与食管、胆囊和肝脏强结合(3+),与乳腺中度结合(2+),与直肠弱结合(1+)。FG129显示出具有低正常组织反应性的与肿瘤组织强结合,并且与胰腺癌患者的不良预后相关。

[0209] 表3.使用石蜡固定切片结合一组正常组织的FG129和CA19.9的总结。染色强度显示为0、1、2或3,涉及阴性、弱、中度或强结合。

| 组织类型 | FG129 | CA19.9 |
|------|-------|--------|
| 食管 | 0 | 3 |
| 食管 | 1 | 3 |
| 直肠 | 0 | 1 |
| 直肠 | 0 | 1 |
| 胆囊 | 1 | 3 |
| 胆囊 | 1 | 1 |
| 皮肤 | 0 | 0 |
| 皮肤 | 0 | 0 |
| 脂肪 | 0 | 0 |
| 脂肪 | 0 | 0 |
| 心脏 | 0 | 0 |
| 心脏 | 0 | 0 |
| 骨骼 | 0 | 0 |
| 骨骼 | 0 | 0 |
| 膀胱 | 0 | 0 |
| 膀胱 | 0 | 0 |
| 回肠 | 1 | 0 |
| 回肠 | 1 | 0 |
| 脾脏 | 0 | 0 |
| 脾脏 | 0 | 0 |
| 大脑 | 0 | 0 |
| 大脑 | 0 | 0 |
| 空肠 | 0 | 0 |
| 空肠 | 0 | 0 |
| 胃 | 0 | 0 |
| 胃 | 0 | 0 |
| 乳房 | 0 | 2 |
| 乳房 | 0 | 2 |
| 肾脏 | 0 | 0 |
| 肾脏 | 0 | 0 |
| 睾丸 | 0 | 0 |
| 睾丸 | 0 | 0 |
| 小脑 | 0 | 0 |

[0210]

| | | | |
|--------|------|-----------|---|
| [0211] | 小脑 | 0 | 0 |
| | 肝脏 | 在 1 处为 3% | 3 |
| | 肝脏 | 在 1 处为 3% | 3 |
| | 胸腺 | 0 | 1 |
| | 胸腺 | 0 | 2 |
| | 宫颈 | 0 | 0 |
| | 宫颈 | 0 | 0 |
| | 肺 | 0 | 0 |
| | 肺 | 0 | 0 |
| | 平滑肌 | 0 | 0 |
| | 平滑肌 | 0 | 0 |
| | 结肠 | 0 | 2 |
| | 结肠 | 0 | 1 |
| | 子房 | 0 | 0 |
| | 子房 | 0 | 0 |
| | 扁桃体 | 0 | 1 |
| | 扁桃体 | 0 | 0 |
| | 横隔膜 | 0 | 0 |
| | 横隔膜 | 0 | 0 |
| | 胰腺 | 1 | 3 |
| | 胰腺 | 1 | 2 |
| | 子宫 | 0 | 0 |
| | 子宫 | 0 | 0 |
| | 十二指肠 | 0 | 0 |
| | 十二指肠 | 0 | 0 |
| | 甲状腺 | 1 | 0 |
| | 甲状腺 | 1 | 0 |

[0212] 在正常组织中,CH129具有非常有限的结合模式,并且不结合大多数正常组织,如心脏、脑、胃和肾(表1)。在胆囊(弱)、回肠(1%)、肝脏(1%)、食道(5%)、胰腺(10%)和甲状腺(弱)中观察到非常有限的结合(图5a)。

[0213] 实施例5

[0214] FG129和CH129mAb结合研究

[0215] 为了确定是否有任何细胞系是表达唾液酸化二路易斯^a的肿瘤的良好模型,筛选一组细胞系和正常细胞用于FG129的细胞表面结合。FG129和CH129对肿瘤细胞系HCT-15、Colo205表现出强结合(几何平均值(Gm) $\geqslant 1000$),对BxPc3、ASPC1、LS180、DLD1和DMS79具有中度结合(Gm ~ 100),并且不与AGS、SW480、EKVX、MCF-7、LoVo、DU4475、OVCAR3、OVCAR4和OVCA433结合。这表明HCT-15、Colo205、ASPC1、BxPc3、LS180、DLD1和DMS79是评估具有不同细胞密度的唾液酸化路易斯^a的肿瘤细胞对FG129治疗敏感性的良好模型(图6a)。FG129未能结合正常的HUVEC细胞(图6b)。为了比较,使用抗CD55mAb作为阳性对照,使用抗IgG同种型抗体作为阴性对照。重要的是,FG129和CH129不与多种健康供体的PBMC结合(图6c)。这些结果鉴定了几种细胞系作为用于体外研究的人肿瘤模型,并示出了FG129不与正常血液或

内皮细胞结合,表明它们不会阻止肿瘤内的FG129定位。

[0216] 计算出HCT-15和COL0205的抗原密度(SABC)分别为985813和1570563。中度结合的细胞包括BxPc3和LS180(SABC:分别为300036和469272)。

[0217] 为了评估结合对肿瘤细胞系的亲和力,将不同浓度的FG129和CH129mAb加入到Colo205、HCT-15、BxPC3和LS180中,通过间接免疫荧光分析和流式细胞术分析检测结合(图7)。FG129和CH129都以6-20nM的Kd与高表达细胞系结合,并以30-50nM的Kd与低表达细胞系结合。这比与唾液酸化路易斯^a-HSA的结合更高,并且可能反映了细胞表面上聚糖扩增的复杂性。

[0218] 计算出HCT-15和COL0205的抗原密度(SABC)分别为985813和1570563。中度结合的细胞包括BxPc3和LS180(SABC:分别为300036和469272)。

[0219] 实施例6

[0220] FG129和CH129的体外抗肿瘤活性

[0221] 研究了FG129和CH129通过ADCC在人PBMC的存在下诱导Colo205和HCT-15肿瘤细胞死亡的能力。小鼠FG129和嵌合CH129mAb均以浓度依赖性方式诱导两种细胞系的有效细胞裂解。与小鼠mAb相比,CH129的杀伤增加2-4倍,EC₅₀值约为10⁻¹⁰M(图8)。研究了FG129和CH129通过CDC在补体的存在下诱导Colo205肿瘤细胞死亡的能力。嵌合但不是小鼠mab示出了良好的CDC(图9)。

[0222] 实施例7

[0223] 内化和ADC(抗体依赖性药物细胞毒性)

[0224] 为了进一步确定FG129和CH129的治疗能力,通过内化和递送药物至溶酶体来筛选mAb作为药物载体的能力。通过共聚焦显微镜评估细胞内化,其示出了129个mAb在90分钟内的内化和在溶酶体内的共定位。细胞核染成蓝色,质膜成红色,溶酶体隔室成紫色,129个抗体成绿色。在高细胞表面抗原密度结直肠细胞系Colo205和HCT-15以及胰腺细胞系BxPC3上看到内化(图10a和b)。

[0225] 通过使用Fab-ZAP的ADC测定证实内化,该Fab-ZAP是与核糖体失活蛋白皂草素连接的抗小鼠IgG或抗人IgG,其杀死使Fab-ZAP-FG129/CH129免疫复合物内化的细胞,但留下没有内化不受影响的细胞。Fab-ZAP-FG129或CH129的内化导致高结合细胞Colo205和HCT-15而不是BxPc3或ASPC1上的细胞存活率(Ic50~10⁻¹²M)的剂量依赖性降低(图11a和11c)。没有观察到低表达细胞系LS180或抗原阴性细胞系LoVo的杀伤(图11a)。针对未由细胞表达的抗原,单独Fab-ZAP或Fab-ZAP与同种型匹配的IgG1抗体预温育不杀死细胞(图11b和11d)。

[0226] 此外,为了研究CH129是否会在临床环境中形成有前途的ADC候选物,该mab被化学缀合至临床前和临床验证的不同有效负载/连接子构建体。因此,三个CH129构建体是通过ADC生物技术生产的:一个具有通过可切割二肽缬氨酸-瓜氨酸连接子和对-氨基苄醇(PABA)自消化的间隔子(CH129-vcE)连接的耳他汀MMAE,一个具有通过中间切割位阻二硫键连接子SPDB连接的DM4美登木素,以及一个具有通过不可切割的SMCC连接子连接的DM1美登木素。还使用非靶向mab利妥昔单抗生产了一组匹配的对照ADC构建体,以用于相关的测定对照。对表达靶向的抗原唾液酸化路易斯^a的高细胞表面密度的两个结直肠细胞系Colo205和HCT-15研究了细胞毒性。

[0227] CH129-ADC构建体提供了高的体外靶标依赖功效。结果示出了与两个细胞系抗体浓度降低直接相关的细胞死亡的剂量依赖性降低。细胞杀伤也是靶标依赖性的,与HCT-15相比,在更高的抗原表达细胞系Colo205上看到更高的杀伤。在Colo205上(图11e),所有三种CH129-ADC构建体均给予100%细胞杀伤,其中vcE构建体产生最高功效($E_{c50} \sim 10^{-11} M$),接着是DM1和DM4构建体显示相似功效($E_{c50} \sim 10^{-10} M$)。

[0228] 在HCT-15上(图11f),仅50-60%的细胞在最高浓度下被杀死,CH129-DM4产生 $2 \times 10^{-9} M$ 的最佳 E_{c50} ,而DM1产生 $6 \times 10^{-9} M$ 的 E_{c50} ,并且vcE产生 $10^{-8} M$ 的 E_{c50} 。使用不与细胞系结合的匹配的利妥昔单抗-ADC构建体作为对照以评估杀伤的特异性。vcE和DM1利妥昔单抗构建体的活性的缺乏表明用靶向构建体观察到的活性是特异性的,而不是由于游离药物的全身释放。然而,利妥昔单抗-DM4显示与CH129构建体类似的活性,表明非特异性杀伤。

[0229] 为了确定具有可切割连接子的ADC是否会从抗原阳性细胞的周围杀死抗原阴性细胞,在抗原阳性和抗原阴性细胞的混合物上以及具有异质肿瘤抗原表达的细胞系上测试ADC构建体。

[0230] 与不可切割连接子相比,具有可切割连接子的ADC产生旁观者杀伤。

[0231] 对高肿瘤抗原表达细胞Colo205与不表达抗原AGS的细胞的不同细胞比例混合物评估了ADC构建体的旁观者杀伤效应。将细胞以AGS与Colo205为2:1、5:1和10:1的比例混合。仅Colo205和仅AGS分别用作阳性和阴性对照。由于AGS是抗原阴性细胞系,因此在该细胞系上发现的杀伤是非特异性的,因此在评估旁观者杀伤时不考虑在AGS上观察到杀伤的浓度。在图11g、11h和11i中显示了矩形突出显示的特异性杀伤。DM1在这方面最稳定,因为它在高于10nM的浓度下表现出杀伤,而3nM的DM4和vcE不太稳定,从1nM显示出非特异性杀伤。

[0232] 由于DM1与不可切割的连接子连接,它构成了旁观者杀伤的阴性对照。DM1和DM4/vcE在圆圈浓度下造成杀伤的差异可能是由于旁观者杀伤。因此,DM4产生约90%细胞的特异性杀伤,vcE产生约50-80%,而DM1产生约~20%。

[0233] 实施例8

[0234] 唾液酸化路易斯A在癌症患者血清中分泌的抗原上的表达

[0235] 通过夹心ELISA研究胰腺患者血清中分泌的FG129抗原的存在,其显示FG129结合33%(7/21)的血清(图12a)。当来自这些患者的肿瘤通过IHC分析肿瘤细胞上或基质内的唾液酸化路易斯^a的结合时,除一个肿瘤外都是阳性的,但只有6个肿瘤显示出基质染色。分泌抗原的存在与从这些患者切除的肿瘤的基质组织染色显著相关($p=0.023$,相关系数=0.621),表明切除肿瘤的染色可以预测血清中存在抗原的患者(表4)。

[0236] 表4.通过IHC的肿瘤和基质H评分和通过FG129的夹心ELISA的胰腺血清结合

[0237]

| | 肿瘤H评分 | 基质H评分 | 夹心ELSA胰腺血清结合FG129的OD值 |
|-----|-------|-------|-----------------------|
| P4 | 200 | 100 | 0.2 |
| P5 | 180 | 0 | 0.05 |
| P9 | 285 | 150 | 0.11 |
| P10 | 120 | 0 | 0.07 |
| P11 | 60 | 0 | 0.05 |
| P12 | 150 | 100 | 0.06 |

| | | | |
|-----|-----|----|------|
| P18 | 250 | 40 | 0.13 |
| P20 | 0 | 0 | 0.05 |
| P23 | 260 | 0 | 0.06 |
| P32 | 110 | 0 | 0.05 |
| P36 | 120 | 0 | 0.06 |
| P40 | 280 | 25 | 0.06 |
| P41 | 130 | 70 | 0.13 |

[0238] 为了模拟体内环境,研究了在37°C下FG129是否优先结合分泌的抗原或肿瘤细胞表面。在37°C下在HCT-15细胞的竞争性FACS分析中分析FG129与分泌的抗原或肿瘤细胞的结合。所有血清均降低与HCT-15细胞的结合,但与分泌的唾液酸化路易斯^a抗原不相关,表明血清粘度降低了mAb结合的动力学。来自不具有分泌的唾液酸化路易斯a抗原的正常供体的血清也显示与HCT-15细胞的结合减少(Gm x至1200)。如抗原阴性患者血清(Gm 650-1500)一样,抗原阳性患者血清也降低了结合(Gm 600-1000)。尽管FG129与胰腺血清预温育,但mAb显示出强烈与细胞结合而不与血清分泌的抗原结合的偏向(图12b)。这表明分泌的抗原不应该阻止FG129在肿瘤内定位。

[0239] 实施例9

[0240] FG129-scFv的克隆、表达、纯化和表征

[0241] 由于其正常组织结合有限和肿瘤组织结合非常高,FG129抗体在嵌合抗原受体(CAR)的背景下作为scFv使用,以诱导抗肿瘤T细胞反应,使其成为有吸引力的候选物。

[0242] 为了确定scFv是否会维持FG129完全抗体的结合特征,将重链和轻链可变区以计算机模拟方式以前导;重链可变结构域;间隔子(3x GGGGS);轻链可变区;间隔子(6x Ala);纯化标签(6x His)的方向整合到单个scFv序列中并合成(图13a)。在克隆到真核表达载体后,转染Expi293细胞并使其瞬时产生蛋白质(6天)。His标签的scFv使用固定的钴层析从Expi-293上清液中纯化。然后以scFv与唾液酸化路易斯a抗原或表达抗原的细胞的结合特性来表征scFv。

[0243] 通过SPR和通过ELISA对唾液酸化路易斯a测定FG129-scFv的抗原结合亲和力。在通过ELISA进行的抗原结合测定中,FG129-scFv显示特定的唾液酸化路易斯a结合,其随着scFv浓度的降低($E_{50}=10^{-6}M$)而下降(图13b)。还通过SPR测量了抗原结合亲和力,其产生 $10^{-7}M$ 的Kd(表1)。在细胞结合测定中,在Colo205上,FG129-scFv显示高结合(Gm~400),并且以亚微摩尔Kd($10^{-7}M$)给予剂量依赖性反应(图13c)。因此,FG129-scFv保持了与完整抗体的结合相当的高特异性结合,并且尽管仅具有完整FG129mab的一个结合臂而不是两个结合臂,但仍显示出高结合亲和力($Kd \sim 10^{-7}M$)。

[0244] 序列

[0245] 小鼠FG129/29IgG1重链。

atg ctg ttg ggg

ctg aag tgg gtt ttc ttt gtt tat caa ggt gtg cat tgt
 gag gtg cag ctt gtt gag tct ggt gga ... gga ttg gtg cag cct
 aaa ggg tca ttg aaa ctc tca tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc
 aat acc tac gcc atg aac tgg gtc cgc cag gct
 cca gga aag ggt ttg gaa tgg gtt gct cgc ata aga agt aaa agt
 aat aat tat gca aca tat tat gcc gat tca gtg aaa ... gac agg
 ttc acc ata tcc aga gat gat tca caa agc atg ctc tat ctg caa
 atg aac aac ttg aaa aag gag gac aca gcc atg tat tac tgt gta
 ggg tac ggt agt ggg gga aac tac tgg ggt caa gga
 acc tca gtc acc gtc tcc tca gcc aaa acg aca ccc cca tct gtc
 tat cca ctg gcc cct gga tct gct gcc caa act aac tcc atg gtg
 acc ctg gga tgc ctg gtc aag ggc tat ttc cct gag cca gtg aca
 gtg acc tgg aac tct gga tcc ctg tcc agc ggt gtg cac acc ttc
 cca gct gtc ctg gag tct gac ctc tac act ctg agc agc tca gtg
 act gtc ccc tcc agc cct cgg ccc agc gag acc gtc acc tgc aac
 gtt gcc cac ccg gcc agc acc aag gtg gac aag aaa att gtg
 ccc agg gat tgt ggt tgt aag cct tgc ata tgt aca gtc cca gaa
 gta tca tct gtc ttc atc ttc ccc cca aag ccc aag gat gtg ctc
 acc att act ctg act cct aag gtc acg tgt gtt gtg gta gac atc
 agc aag gat gat ccc gag gtc cag ttc agc tgg ttt gta gat gat
 gtg gag gtg cac aca gct cag acg caa ccc egg gag gag cag ttc
 aac agc act ttc cgc tca gtc agt gaa ctt ccc atc atg cac cag
 gac tgg ctc aat ggc aag gag ttc aaa tgc agg gtc aac agt gca
 gct ttc cct gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa acc aaa ggc
 aga ccg aag gct cca cag gtg tac acc att cca cct ccc aag gag
 cag atg gcc aag gat aaa gtc agt ctg acc tgc atg ata aca gac
 ttc ttc cct gaa gac att act gtg gag tgg cag tgg aat ggg cag
 cca gcg gag aac tac aag aac act cag ccc atc atg aac agc aat
 ggc tct tac ttc gtc tac agc aag ctc aat gtg cag aag agc aac
 tgg gag gca gga aat act ttc acc tgc tct gtg tta cat gag ggc
 ctg cac aac cac cat act gag aag agc ctc tcc cac tct cct ggt
 aaa

[0247]

小鼠FG129/29k链。

[0248]

atg gaa tca cag

act cag gtc ctc atg tcc ctg ctg ttc tgg gta tct acc tgt ggg
gac att gtg atg aca cag tct cca tcc tcc ctg act gtg aca gca
gga gag aag gtc act atg agc tgc aag tcc agt cag agt ctg tta
aac agt gga aat caa aag aac tac ttg acc tgg tac cag cag aaa
cca ggg cag cct cct aaa gtg ttg atc tac tgg gca
... tcc act agg gaa tct ggg gtc cct ... gat cgc
ttc aca ggc agt gga tct gga aca gat ttc act ctc acc
atc agc agt gtg cag gct gaa gac ctg gca gtt tat tac tgt cag
aat gat tat agt tct cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg
gaa ata aaa cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca
cca tcc agt gag cag tta aca tct gga ggt gcc tca gtc gtg tgc
ttc ttg aac aac ttc tac ccc aaa gac atc aat gtc aag tgg aag
att gat ggc agt gaa cga caa aat ggc gtc ctg aac agt tgg act
gat cag gac agc aaa gac agc acc tac agc atg agc agc acc ctc
acg ttg acc aag gac gag tat gaa cga cat aac agc tat acc tgt
gag gcc act cac aag aca tca act tca ccc att gtc aag agc ttc
aac agg aat gag tgt

[0249]

[0250] 嵌合到hIgG1恒定区的小鼠FG129/29重链

atg ctg ttg ggg

ctg aag tgg gtt ttc ttt gtt tat caa ggt gtg cat tgt
gag gtg cag ctt gtt gag tct ggt gga ... gga ttg gtg cag cct
aaa ggg tca ttg aaa ctc tca tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc
... aat acc tac gcc atg aac tgg gtc cgc cag gct
cca gga aag ggt ttg gaa tgg gtt gct cgc ata aga agt aaa agt
aat aat tat gca aca tat tat gcc gat tca gtg aaa ... gac agg
ttc acc ata tcc aga gat gat tca caa agc atg ctc tat ctg caa
atg aac aac ttg aaa aag gag gac aca gcc atg tat tac tgt gta
ggg tac ggt agt ggg gga aac tac tgg ggt caa gga
acc tca gtc acc gtc tcc agc gtc tcc acc aag ggc cca tcg gtc
ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg
gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg
gtg tgc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc
ccg gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg
gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt
gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca
gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca
aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca
tgc gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc
aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag
ccg ccg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag
tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc
atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc
ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg
acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag
tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct
ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc
acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc
tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc
ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa

[0252] 嵌合到hIgk恒定区的小鼠FG129/29k链

[0253] atg gaa tca cag

act cag gtc ctc atg tcc ctg ctg ttc tgg gta tct acc tgt ggg
 gac att gtg atg aca cag tct cca tcc tcc ctg act gtg aca gca
 gga gag aag gtc act atg agc tgc aag tcc agt cag agt ctg tta
 aac agt gga aat caa aag aac tac ttg acc tgg tac cag cag aaa
 cca ggg cag cct cct aaa gtg ttg atc tac tgg gca
 tcc act agg gaa tct ggg gtc cct ... gat cgc
 ttc aca ggc agt gga tct gga aca gat ttc act ctc acc
 atc agc agt gtg cag gct gaa gac ctg gca gtt tat tac tgt cag
 [0254] aat gat tat agt tct cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg
 gaa ata aaa cgt acg gta gcg gcc cca tct gtc ttc atc ttc ccg
 cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc
 ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag
 gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca
 gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg
 acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc
 gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc
 aac agg gga gag tgt

[0255] 图1a: 小鼠FG129/29IgG1重链的完整氨基酸序列。

-19 ·MLLGLKWWFFVVFYQGVHC

1 EVQLVESGG GLVQPKGSLKLSCAASGFTF
 31 NTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKS
 61 NNYATYYADSVK DRFTISRDDSQSMLYLQ
 91 MNNLKEDTAMYCVGYGSGGNYWGQG
 121 TSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMV
 151 TLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTF
 181 PAVLESIDLVTLSSVTVPSSPRPSETVTCN
 [0256] 211 VAHPASSTKVDDKIVPRDCGCKPCICTVPE
 241 VSSVFIFPPKPKDVLТИLTPKVTCVVVDI
 271 SKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQQTQPREEQF
 301 NSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSA
 331 AFPAPIEKTKGRPKAPQVYTIPPPKE
 361 QMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQ
 391 PAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLNQVQKSN
 421 WEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPG
 451 K

[0257] 图1b: 小鼠FG129/29IgG1κ链的完整氨基酸序列。

-19 MESQTQVLMSSLFWVSTCG
 1 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLL
 31 NSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKVLIYWA
 61 STRESGVP DRFTGSG SGTDFLT
 [0258] 91 ISSVQAEDLAVYYCQNDYSSPFTFGSGTKL
 121 EIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVC
 151 FLNNFYPK DINVKWKIDG SERQNGVLNSWT
 181 DQDSKDSTYSMSSTLT LT KDEYERHNSYTC
 211 EATHKTSTSPIVKS FNRNEC

[0259] 图2a: 嵌合到人IgG1重链恒定区的小鼠FG129/29重链可变区的完整氨基酸序列。

-19 ·MLLGLKWVFFVVVFYQGVHC·
 1 EVQLVESGG GLVQPKGSLKLSCAASGFTF
 31 NTYAMNW VRQAPGKG LEWVARIRSKS
 61 NNYATYYADSVK DRFTISR DDSQSMLYLQ
 91 MNNLK KEDTAMY YCVGYGS GGNYWGQG
 121 TSVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTA
 151 ALGCLV KDYF PEPV TVSWN SGALT SGVHTF
 181 PAVLQSSGLYSLSSV VTVPSS SLGT QTYIC
 [0260] 211 NVNH KPSNTK VDKK VEPKSCDKT HTPPCP
 241 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 271 CVVVDV SHEDPEV KFNWYV DGVEV HNAKTK
 301 PREEQYNSTYRVV SVLTV LHQDWL NGKEYK
 331 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVY
 361 LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 391 WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
 421 TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
 451 LSLS PGK

[0261] 图2b: 嵌合到人κ链恒定区的小鼠FG129/29κ链可变区的完整氨基酸序列。

-19 MESQTQVLMSSLFWVSTCG
 1 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLL
 31 NSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKVLIYWA
 [0262] 61 STRESGVP DRFTGSG SGTDFLT
 91 ISSVQAEDLAVYYCQNDYSSPFTFGSGTKL
 121 EIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVC
 151 LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT

- [0263] 181 EQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYAC
211 EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0264] 说明书中引用的参考文献
- [0265] 1.Hakomori S.Glycosylation defining cancer malignancy:new wine in an old bottle.Proc Natl Acad Sci U S A.2002;99:10231-3.
- [0266] 2.Fuster MM,Esko JD.The sweet and sour of cancer:glycans as novel therapeutic targets.Nat Rev Cancer.2005;5:526-42.
- [0267] 3.Varki A,Kannagi R,Toole BP.Glycosylation Changes in Cancer.In:Varki A,Cummings RD,Esko JD,et al.,editors.Essentials of Glycobiology.2010/03/20ed:Cold Spring Harbor (NY) ;2009.
- [0268] 4.Pour PM,Temporo MM,Takasaki H,Uchida E,Takiyama Y,Burnett DA,et al.Expression of blood group-related antigens ABH,Lewis A,Lewis B,Lewis X,Lewis Y, and CA 19-9 in pancreatic cancer cells in comparison with the patient's blood group type.Cancer Res.1988;48:5422-6.
- [0269] 5.Rabu C,McIntosh R,Jurasova Z,Durrant L.Glycans as targets for therapeutic antitumor antibodies.Future Oncol.2012;8:943-60.
- [0270] 6.Tang H,Singh S,Partyka K,Kletter D,Hsueh P,Yadav J,et al.Glycan motif profiling reveals plasma sialyl-lewis x elevations in pancreatic cancers that are negative for sialyl-lewis a.Molecular&cellular proteomics:MCP.2015;14:1323-33.7.Inagaki H,Sakamoto J,Nakazato H,Bishop AE,Yura J.Expression of Lewis(a),Lewis(b),and sialated Lewis(a)antigens in early and advanced human gastric cancers.J Surg Oncol.1990;44:208-13.
- [0271] 8.Sakamoto J,Furukawa K,Cordon-Cardo C,Yin BW,Rettig WJ,Oettgen HF,et al.Expression of Lewisa,Lewisb,X, and Y blood group antigens in human colonic tumors and normal tissue and in human tumor-derived cell lines.Cancer Res.1986;46:1553-61.
- [0272] 9.Hakomori S,Andrews HD.Sphingoglycolipids with Leb activity, and the co-presence of Lea-,Leb-glycolipids in human tumor tissue.Biochim Biophys Acta.1970;202:225-8.
- [0273] 10.Koprowski H,Steplewski Z,Mitchell K,Herlyn M,Herlyn D,Fuhrer P.Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies.Somatic cell genetics.1979;5:957-71.
- [0274] 11.Stanley P,Cummings RD.Structures Common to Different Glycans.In:Varki A,Cummings RD,Esko JD,et al.,editors.Essentials of Glycobiology.2010/03/20ed:Cold Spring Harbor (NY) ;2009.
- [0275] 12.Kannagi R.Carbohydrate antigen sialyl Lewis a - its pathophysiological significance and induction mechanism in cancer progression.Chang Gung medical journal.2007;30:189-209.
- [0276] 13.Kishimoto T,Ishikura H,Kimura C,Takahashi T,Kato H,Yoshiki

T.Phenotypes correlating to metastatic properties of pancreas adenocarcinoma in vivo:the importance of surface sialyl Lewis(a) antigen. International journal of cancer Journal international du cancer.1996;69:290-4.

[0277] 14.Sato M,Narita T,Kimura N,Zenita K,Hashimoto T,Manabe T,et al.The association of sialyl Lewis(a) antigen with the metastatic potential of human colon cancer cells.Anticancer research.1997;17:3505-11.

[0278] 15.Matsui T,Kojima H,Suzuki H,Hamajima H,Nakazato H,Ito K,et al.Sialyl Lewisa expression as a predictor of the prognosis of colon carcinoma patients in a prospective randomized clinical trial.Japanese journal of clinical oncology.2004;34:588-93.

[0279] 16.Nakayama T,Watanabe M,Katsumata T,Teramoto T,Kitajima M.Expression of sialyl Lewis(a) as a new prognostic factor for patients with advanced colorectal carcinoma.Cancer.1995;75:2051-6.

[0280] 17.O'Brien DP,Sandanayake NS,Jenkinson C,Gentry-Maharaj A,Apostolidou S,Fourkala EO,et al.Serum CA19-9 is significantly upregulated up to 2 years before diagnosis with pancreatic cancer:implications for early disease detection.Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research.2015;21:622-31.

[0281] 18.Sawada R,Sun SM,Wu X,Hong F,Ragupathi G,Livingston PO,et al.Human monoclonal antibodies to sialyl-Lewis(CA19.9) with potent CDC,ADCC, and antitumor activity.Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research.2011;17:1024-32.

[0282] 19.Huehls AM,Coupet TA,Sentman CL.Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy.Immunology and cell biology.2015;93:290-6.

[0283] 20.Kontermann RE.Dual targeting strategies with bispecific antibodies.mAbs.2012;4:182-97.

[0284] 21.Ward ES,Gussow D,Griffiths AD,Jones PT,Winter G.Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli.Nature.1989;341:544-6.

[0285] 22.Bird RE,Hardman KD,Jacobson JW,Johnson S,Kaufman BM,Lee SM,et al.Single-chain antigen-binding proteins.Science.1988;242:423-6.

[0286] 23.Huston JS,Levinson D,Mudgett-Hunter M,Tai MS,Novotny J,Margolies MN,et al.Protein engineering of antibody binding sites:recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli.Proc Natl Acad Sci U S A.1988;85:5879-83.

[0287] 24.Holliger P,Prospero T,Winter G."Diabodies":small bivalent and bispecific antibody frgments.Proc Natl Acad Sci U S A.1993;90:6444-8.

[0288] 25.Holliger P,Winter G.Engineering bispecific antibodies.Current opinion in biotechnology.1993;4:446-9.

- [0289] 26.Traunecker A,Lanzavecchia A,Karjalainen K.Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells.The EMBO journal.1991;10:3655-9.
- [0290] 27.Karlin S,Altschul SF.Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes.Proc Natl Acad Sci U S A.1990;87:2264-8.
- [0291] 28.Karlin S,Altschul SF.Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences.Proc Natl Acad Sci U S A.1993;90:5873-7.
- [0292] 29.Altschul SF,Gish W,Miller W,Myers EW,Lipman DJ.Basic local alignment search tool.Journal of molecular biology.1990;215:403-10.
- [0293] 30.Altschul SF,Madden TL,Schaffer AA,Zhang J,Zhang Z,Miller W,et al.Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs.Nucleic acids research.1997;25:3389-402.
- [0294] 31.Myers EW,Miller W.Approximate matching of regular expressions.Bulletin of mathematical biology.1989;51:5-37.
- [0295] 32.Torelli A,Robotti CA.ADVANCE and ADAM:two algorithms for the analysis of global similarity between homologous informational sequences.Computer applications in the biosciences:CABIOS.1994;10:3-5.
- [0296] 33.Pearson WR,Lipman DJ.Improved tools for biological sequence comparison.Proc Natl Acad Sci U S A.1988;85:2444-8.
- [0297] 34.Marks JD,Griffiths AD,Malmqvist M,Clackson TP,Bye JM,Winter G.By-passing immunization:building high affinity human antibodies by chain shuffling.Bio/technology.1992;10:779-83.
- [0298] 35.Stemmer WP.Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling.Nature.1994;370:389-91.
- [0299] 36.Gram H,Marconi LA,Barbas CF,3rd,Collet TA,Lerner RA,Kang AS.In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library.Proc Natl Acad Sci U S A.1992;89:3576-80.
- [0300] 37.Barbas CF,3rd,Hu D,Dunlop N,Sawyer L,Cababa D,Hendry RM,et al.In vitro evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity.Proc Natl Acad Sci U S A.1994;91:3809-13.
- [0301] 38.Schier R,McCall A,Adams GP,Marshall KW,Merritt H,Yim M,et al.Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site.Journal of molecular biology.1996;263:551-67.
- [0302] 39.Sidman KR,Steber WD,Schweppe AD,Schnaper GR.Controlled release of

macromolecules and pharmaceuticals from synthetic polypeptides based on glutamic acid. *Biopolymers*. 1983; 22: 547-56.

[0303] 40. Langer R, Brem H, Tapper D. Biocompatibility of polymeric delivery systems for macromolecules. *Journal of biomedical materials research*. 1981; 15: 267-77.

[0304] 41. R.P.R. Remington's *Pharmaceutical Sciences*. 16th ed: Mack Pub. Co; 1980.

[0305] 42. Stewart JM. *Solid Phase Peptide Synthesis*. 2nd ed: Pierce Chemical Co; 1984.

[0306] 43. Miklos Bodanszky AB, Barry M. Trost *The Practice of Peptide Synthesis* 1984.

[0307] 44. Pluckthun A. Antibody engineering: advances from the use of *Escherichia coli* expression systems. *Bio/technology*. 1991; 9: 545-51.

[0308] 45. Reff ME. High-level production of recombinant immunoglobulins in mammalian cells. *Current opinion in biotechnology*. 1993; 4: 573-6.

[0309] 46. Trill JJ, Shatzman AR, Ganguly S. Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells. *Current opinion in biotechnology*. 1995; 6: 553-60.

[0310] 47. Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed; 1989.

[0311] 48. Ausubel FM. *Short Protocols in Molecular Biology*; 1992.

[0312] 49. Lefranc MP, Giudicelli V, Ginestoux C, Jabado-Michaloud J, Folch G, Bellahcene F, et al. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Nucleic acids research*. 2009; 37:D1006-12.

[0313] 50. Jones ST, Bendig MM. Rapid PCR-cloning of full-length mouse immunoglobulin variable regions. *Bio/technology*. 1991; 9: 579.

[0314] 51. Simpson JA, Al-Attar A, Watson NF, Scholefield JH, Ilyas M, Durrant LG. Intratumoral T cell infiltration, MHC class I and STAT1 as biomarkers of good prognosis in colorectal cancer. *Gut*. 2010; 59: 926-33.

[0315] 52. Duncan TJ, Rolland P, Deen S, Scott IV, Liu DT, Spendlove I, et al. Loss of IFN gamma receptor is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007; 13: 4139-45.

[0316] 53. Abdel-Fatah T, Arora A, Gorguc I, Abbotts R, Beebejaun S, Storr S, et al. Are DNA repair factors promising biomarkers for personalized therapy in gastric cancer? *Antioxidants&redox signaling*. 2013; 18: 2392-8.

[0317] 54. Storr SJ, Zaitoun AM, Arora A, Durrant LG, Lobo DN, Madhusudan S, et al. Calpain system protein expression in carcinomas of the pancreas, bile duct and ampulla. *BMC cancer*. 2012; 12: 511.

[0318] 55. Kohls MD, Lappi DA. Mab-ZAP: a tool for evaluating antibody efficacy for use in an immunotoxin. *BioTechniques*. 2000; 28: 162-5.

- [0001] 序列表
[0002] <110> 诺丁汉大学
[0003] <120> 作为功能性癌症靶标的、不在糖脂而在糖蛋白上表达的唾液酸化二路易斯A及其抗体
[0004] <130> JDM79371P.WOP
[0005] <140> PCT/GB2016/052647
[0006] <141> 2016-08-25
[0007] <150> GB 1515094.9
[0008] <151> 2015-08-25
[0009] <160> 17
[0010] <170> PatentIn version 3.5
[0011] <210> 1
[0012] <211> 8
[0013] <212> PRT
[0014] <213> 小家鼠
[0015] <400> 1
[0016] Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala
[0017] 1 5
[0018] <210> 2
[0019] <211> 10
[0020] <212> PRT
[0021] <213> 小家鼠
[0022] <400> 2
[0023] Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr
[0024] 1 5 10
[0025] <210> 3
[0026] <211> 9
[0027] <212> PRT
[0028] <213> 小家鼠
[0029] <400> 3
[0030] Val Gly Tyr Gly Ser Gly Gly Asn Tyr
[0031] 1 5
[0032] <210> 4
[0033] <211> 117
[0034] <212> PRT
[0035] <213> 小家鼠
[0036] <400> 4
[0037] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
[0038] 1 5 10 15
[0039] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
[0040] 20 25 30

[0041] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0042] 35 40 45
[0043] Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[0044] 50 55 60
[0045] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
[0046] 65 70 75 80
[0047] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Lys Glu Asp Thr Ala Met Tyr
[0048] 85 90 95
[0049] Tyr Cys Val Gly Tyr Gly Ser Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[0050] 100 105 110
[0051] Ser Val Thr Val Ser
[0052] 115
[0053] <210> 5
[0054] <211> 12
[0055] <212> PRT
[0056] <213> 小家鼠
[0057] <400> 5
[0058] Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr
[0059] 1 5 10
[0060] <210> 6
[0061] <211> 9
[0062] <212> PRT
[0063] <213> 小家鼠
[0064] <400> 6
[0065] Gln Asn Asp Tyr Ser Ser Pro Phe Thr
[0066] 1 5
[0067] <210> 7
[0068] <211> 114
[0069] <212> PRT
[0070] <213> 小家鼠
[0071] <400> 7
[0072] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
[0073] 1 5 10 15
[0074] Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[0075] 20 25 30
[0076] Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0077] 35 40 45
[0078] Pro Pro Lys Val Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[0079] 50 55 60
[0080] Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0081] 65 70 75 80
[0082] Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn

| | | | |
|--------|--|-----|-----|
| [0083] | 85 | 90 | 95 |
| [0084] | Asp Tyr Ser Ser Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile | | |
| [0085] | 100 | 105 | 110 |
| [0086] | Lys Arg | | |
| [0087] | <210> 8 | | |
| [0088] | <211> 1383 | | |
| [0089] | <212> DNA | | |
| [0090] | <213> 小家鼠 | | |
| [0091] | <400> 8 | | |
| [0092] | atgctgttgg ggctgaagt ggtttcttt gttgttttt atcaaggtgt gcattgttag 60 | | |
| [0093] | gtgcagctt ttagtctgg tggaggattt gtgcagccata aagggtcatt gaaactctca 120 | | |
| [0094] | tgtcagcct ctggatttac cttcaatacc tacgccatga actgggtccg ccaggctcca 180 | | |
| [0095] | ggaaagggtt tggaatgggt tgctcgata agaagtaaaa gtaataatta tgcaacatat 240 | | |
| [0096] | tatgccgatt cagtgaaaga cagtttacc atatccagag atgattcaca aagcatgctc 300 | | |
| [0097] | tatctgcaaa tgaacaactt gaaaaaggag gacacagcca tgtattactg tgtagggtac 360 | | |
| [0098] | ggtagtgggg gaaactactg gggtaagga acctcagtca ccgttcctc agccaaaacg 420 | | |
| [0099] | acaccccat ctgtctatcc actggcccgtt gatatctgtc cccaaactaa ctccatgggt 480 | | |
| [0100] | accctggat gcctggtaa gggctatttc cctgagccag tgacagtgac ctggaaactct 540 | | |
| [0101] | ggatccctgt ccagcggtgt gcacaccttc ccagctgtcc tggagtctga cctctacact 600 | | |
| [0102] | ctgagcagct cagtgactgt cccctccagc cctcgccccca gcgagaccgt cacctgcaac 660 | | |
| [0103] | gttgcccacc cggccagcag caccaagggtg gacaagaaaa ttgtgcccag ggattgtgg 720 | | |
| [0104] | tgttaaggctt gcatatgtac agtcccagaa gtatcatctg tcttcatttt ccccccaaag 780 | | |
| [0105] | cccaaggatg tgctcaccat tactctgact cctaagggtca cgtgtgttgt ggtagacatc 840 | | |
| [0106] | agcaaggatg atcccgaggt ccagttcagc tggttgttag atgatgtgga ggtgcacaca 900 | | |
| [0107] | gctcagacgc aaccccgaaa ggagcagttt aacagcactt tccgctcgt cagtgaactt 960 | | |
| [0108] | cccatcatgc accaggactg gctcaatggc aaggagttca aatgcagggt caacagtgca 1020 | | |
| [0109] | gtttccctg ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aaggcagacc gaaggctcca 1080 | | |
| [0110] | caggtgtaca ccattccacc tcccaaggag cagatggcca aggataaagt cagtctgacc 1140 | | |
| [0111] | tgcataataa cagacttctt ccctgaagac attactgtgg agtggcagtg gaatggcag 1200 | | |
| [0112] | ccagcggaga actacaagaa cactcagccc atcatgaaca cgaatggctc ttacttcgtc 1260 | | |
| [0113] | tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac tgggaggcag gaaatacttt cacctgctct 1320 | | |
| [0114] | gtgttacatg agggcctgca caaccaccat actgagaaga gcctctccca ctctcctgg 1380 | | |
| [0115] | aaa 1383 | | |
| [0116] | <210> 9 | | |
| [0117] | <211> 717 | | |
| [0118] | <212> DNA | | |
| [0119] | <213> 小家鼠 | | |
| [0120] | <400> 9 | | |
| [0121] | atgaaatcac agactcaggt cctcatgtcc ctgctgttct gggatctac ctgtggggac 60 | | |
| [0122] | attgtatga cacagtctcc atccctccctg actgtgacag caggagagaa ggtcactatg 120 | | |
| [0123] | agctgcaagt ccagtcagag tctgttaaac agtggaaatc aaaagaacta cttgacactgg 180 | | |
| [0124] | taccagcaga aaccaggcga gcctcctaaa gtgttgatct actggcactc cactagggaa 240 | | |

- [0125] tctggggtcc ctgatcgctt cacaggcagt ggatctggaa cagatttcac tctcaccatc 300
[0126] agcagtgtgc aggctgaaga cctggcagtt tattactgtc agaatgatta tagttctcca 360
[0127] ttcacgttgc gctcgggac aaagttggaa ataaaaacggg ctgatgctgc accaactgta 420
[0128] tccatcttcc caccatccag tgagcagttt acatctggag gtgcctcagt cgtgtgcttc 480
[0129] ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtgg aagttgatgg cagtgaacga 540
[0130] caaaaatggcg tcctgaacag ttggactgtat caggacagca aagacagcac ctacagcatg 600
[0131] agcagcaccc tcacgttgc caaggacgag tatgaacgac ataacagcta tacctgtgag 660
[0132] gccactcaca agacatcaac ttcacccatt gtcaagagct tcaacaggaa tgagtgt 717
[0133] <210> 10
[0134] <211> 1401
[0135] <212> DNA
[0136] <213> 小家鼠
[0137] <400> 10
[0138] atgctgttgg ggctgaagtgg gttttctttt gttttttttt atcaagggtgt gcattgttag 60
[0139] gtgcagcttg ttgagtctgg tggaggattt gtgcagccta aagggtcatt gaaactctca 120
[0140] tgtgcagcct ctgattcac cttcaatacc tacgccatga actgggtccg ccaggctcca 180
[0141] gaaaaagggtt tgaaatgggt tgctcgata agaagtaaaa gtaataatta tgcaacatat 240
[0142] tatgccgatt cagtgaaaga caggttccacc atatccagag atgattcaca aagcatgctc 300
[0143] tatctgaaa tgaacaactt gaaaaaggag gacacagcca tgtattactg tgttagggtac 360
[0144] ggttagtgggg gaaactactg gggtaagga acctcagtca ccgtctccag cgcttccacc 420
[0145] aaggcccattt cggctttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
[0146] gcccctggct gcctggtaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaaactca 540
[0147] ggcgcctgatcc ccagcggcgt gcacacccctt ccggctgtcc tacagtccctc aggactctac 600
[0148] tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 660
[0149] aacgtgaatc acaagccccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720
[0150] gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctaaca tcctgggggg accgtcagtc 780
[0151] ttccctttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840
[0152] tgcgtgggtt tggacgttag ccacgaagac ccttaggtca agttcaactg gtacgtggac 900
[0153] ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960
[0154] cgtgtggtaa gcgtccctcac cgtccctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
[0155] tgcaagggtctt ccaacaaagc cctccctgacccat cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080
[0156] gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccggatga gctgaccaag 1140
[0157] aaccaggtaa gcctgacccctt cctggtaaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
[0158] tgggagagca atggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt gctggactcc 1260
[0159] gacggctcctt tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtt gcagcagggg 1320
[0160] aacgtttctt catgctccgtt gatgtatgat gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
[0161] ctctccctgtt ctccggtaa a 1401
[0162] <210> 11
[0163] <211> 717
[0164] <212> DNA
[0165] <213> 小家鼠
[0166] <400> 11

[0167] atggaatcac agactcaggt cctcatgtcc ctgctgttct gggtatctac ctgtggggac 60
 [0168] attgtatga cacagtctcc atcccccctg actgtgacag caggagagaa ggtcactatg 120
 [0169] agctcaagt ccagtcagag tctttaaac agtggaaatc aaaagaacta cttgacctgg 180
 [0170] taccaggaga aaccaggca gcctcctaaa gtgttgatct actgggcatt cactagggaa 240
 [0171] tctgggtcc ctgatcgctt cacaggcagt ggatctggaa cagattcac tctcaccatc 300
 [0172] agcagtgtgc aggctgaaga cctggcagtt tattactgtc agaatgatta tagttctcca 360
 [0173] ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaacgta cggttagcggc cccatctgtc 420
 [0174] ttcatcttcc cgccatctga tgagcagtt aatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480
 [0175] ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgcctccaa 540
 [0176] tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
 [0177] agcagcaccc tgacgcttag caaaggcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 660
 [0178] gtcacccatc agggccttag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 717
 [0179] <210> 12
 [0180] <211> 461
 [0181] <212> PRT
 [0182] <213> 小家鼠
 [0183] <400> 12
 [0184] Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Val Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly
 [0185] 1 5 10 15
 [0186] Val His Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln
 [0187] 20 25 30
 [0188] Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 [0189] 35 40 45
 [0190] Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 [0191] 50 55 60
 [0192] Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
 [0193] 65 70 75 80
 [0194] Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 [0195] 85 90 95
 [0196] Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Lys Glu Asp Thr
 [0197] 100 105 110
 [0198] Ala Met Tyr Tyr Cys Val Gly Tyr Gly Ser Gly Gly Asn Tyr Trp Gly
 [0199] 115 120 125
 [0200] Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
 [0201] 130 135 140
 [0202] Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
 [0203] 145 150 155 160
 [0204] Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 [0205] 165 170 175
 [0206] Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 [0207] 180 185 190
 [0208] Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro

| | | | |
|--------|---|-----|-----|
| [0209] | 195 | 200 | 205 |
| [0210] | Ser Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro | | |
| [0211] | 210 | 215 | 220 |
| [0212] | Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly | | |
| [0213] | 225 | 230 | 235 |
| [0214] | Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile | | |
| [0215] | 245 | 250 | 255 |
| [0216] | Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys | | |
| [0217] | 260 | 265 | 270 |
| [0218] | Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln | | |
| [0219] | 275 | 280 | 285 |
| [0220] | Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln | | |
| [0221] | 290 | 295 | 300 |
| [0222] | Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu | | |
| [0223] | 305 | 310 | 315 |
| [0224] | Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg | | |
| [0225] | 325 | 330 | 335 |
| [0226] | Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys | | |
| [0227] | 340 | 345 | 350 |
| [0228] | Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro | | |
| [0229] | 355 | 360 | 365 |
| [0230] | Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr | | |
| [0231] | 370 | 375 | 380 |
| [0232] | Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln | | |
| [0233] | 385 | 390 | 395 |
| [0234] | 400 | 405 | 410 |
| [0235] | 410 | 415 | |
| [0236] | Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly | | |
| [0237] | 420 | 425 | 430 |
| [0238] | Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu | | |
| [0239] | 430 | 435 | 440 |
| [0240] | 440 | 445 | |
| [0241] | His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys | | |
| [0242] | 450 | 455 | 460 |
| [0243] | <210> 13 | | |
| [0244] | <211> 239 | | |
| [0245] | <212> PRT | | |
| [0246] | <213> 小家鼠 | | |
| [0247] | <400> 13 | | |
| [0248] | Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser | | |
| [0249] | 1 | 5 | 10 |
| [0250] | 10 | 20 | 15 |
| [0249] | Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val | | |
| [0250] | 25 | 30 | |

| | | | | |
|--------|---|-----|-----|-----|
| [0251] | Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu | | | |
| [0252] | 35 | 40 | 45 | |
| [0253] | Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys | | | |
| [0254] | 50 | 55 | 60 | |
| [0255] | Pro Gly Gln Pro Pro Lys Val Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu | | | |
| [0256] | 65 | 70 | 75 | 80 |
| [0257] | Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe | | | |
| [0258] | 85 | 90 | 95 | |
| [0259] | Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr | | | |
| [0260] | 100 | 105 | 110 | |
| [0261] | Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Ser Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys | | | |
| [0262] | 115 | 120 | 125 | |
| [0263] | Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro | | | |
| [0264] | 130 | 135 | 140 | |
| [0265] | Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe | | | |
| [0266] | 145 | 150 | 155 | 160 |
| [0267] | Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp | | | |
| [0268] | 165 | 170 | 175 | |
| [0269] | Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp | | | |
| [0270] | 180 | 185 | 190 | |
| [0271] | Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys | | | |
| [0272] | 195 | 200 | 205 | |
| [0273] | Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys | | | |
| [0274] | 210 | 215 | 220 | |
| [0275] | Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys | | | |
| [0276] | 225 | 230 | 235 | |
| [0277] | <210> 14 | | | |
| [0278] | <211> 467 | | | |
| [0279] | <212> PRT | | | |
| [0280] | <213> 小家鼠 | | | |
| [0281] | <400> 14 | | | |
| [0282] | Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Val Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly | | | |
| [0283] | 1 | 5 | 10 | 15 |
| [0284] | Val His Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln | | | |
| [0285] | 20 | 25 | 30 | |
| [0286] | Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe | | | |
| [0287] | 35 | 40 | 45 | |
| [0288] | Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu | | | |
| [0289] | 50 | 55 | 60 | |
| [0290] | Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr | | | |
| [0291] | 65 | 70 | 75 | 80 |
| [0292] | Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser | | | |

| | | | |
|--------|---|-----|-----|
| [0293] | 85 | 90 | 95 |
| [0294] | Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Lys Glu Asp Thr | | |
| [0295] | 100 | 105 | 110 |
| [0296] | Ala Met Tyr Tyr Cys Val Gly Tyr Gly Ser Gly Gly Asn Tyr Trp Gly | | |
| [0297] | 115 | 120 | 125 |
| [0298] | Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser | | |
| [0299] | 130 | 135 | 140 |
| [0300] | Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala | | |
| [0301] | 145 | 150 | 155 |
| [0302] | Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val | | |
| [0303] | 165 | 170 | 175 |
| [0304] | Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala | | |
| [0305] | 180 | 185 | 190 |
| [0306] | Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val | | |
| [0307] | 195 | 200 | 205 |
| [0308] | Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His | | |
| [0309] | 210 | 215 | 220 |
| [0310] | Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys | | |
| [0311] | 225 | 230 | 235 |
| [0312] | Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly | | |
| [0313] | 245 | 250 | 255 |
| [0314] | Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met | | |
| [0315] | 260 | 265 | 270 |
| [0316] | Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His | | |
| [0317] | 275 | 280 | 285 |
| [0318] | Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val | | |
| [0319] | 290 | 295 | 300 |
| [0320] | His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr | | |
| [0321] | 305 | 310 | 315 |
| [0322] | Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly | | |
| [0323] | 325 | 330 | 335 |
| [0324] | Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile | | |
| [0325] | 340 | 345 | 350 |
| [0326] | Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val | | |
| [0327] | 355 | 360 | 365 |
| [0328] | Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser | | |
| [0329] | 370 | 375 | 380 |
| [0330] | Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu | | |
| [0331] | 385 | 390 | 395 |
| [0332] | Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro | | |
| [0333] | 405 | 410 | 415 |
| [0334] | Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val | | |

| | | | |
|--------|---|-----|-----|
| [0335] | 420 | 425 | 430 |
| [0336] | Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met | | |
| [0337] | 435 | 440 | 445 |
| [0338] | His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser | | |
| [0339] | 450 | 455 | 460 |
| [0340] | Pro Gly Lys | | |
| [0341] | 465 | | |
| [0342] | <210> 15 | | |
| [0343] | <211> 239 | | |
| [0344] | <212> PRT | | |
| [0345] | <213> 小家鼠 | | |
| [0346] | <400> 15 | | |
| [0347] | Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser | | |
| [0348] | 1 5 10 15 | | |
| [0349] | Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val | | |
| [0350] | 20 25 30 | | |
| [0351] | Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu | | |
| [0352] | 35 40 45 | | |
| [0353] | Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys | | |
| [0354] | 50 55 60 | | |
| [0355] | Pro Gly Gln Pro Pro Lys Val Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu | | |
| [0356] | 65 70 75 80 | | |
| [0357] | Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe | | |
| [0358] | 85 90 95 | | |
| [0359] | Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr | | |
| [0360] | 100 105 110 | | |
| [0361] | Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Ser Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys | | |
| [0362] | 115 120 125 | | |
| [0363] | Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro | | |
| [0364] | 130 135 140 | | |
| [0365] | Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu | | |
| [0366] | 145 150 155 160 | | |
| [0367] | Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp | | |
| [0368] | 165 170 175 | | |
| [0369] | Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp | | |
| [0370] | 180 185 190 | | |
| [0371] | Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys | | |
| [0372] | 195 200 205 | | |
| [0373] | Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln | | |
| [0374] | 210 215 220 | | |
| [0375] | Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys | | |
| [0376] | 225 230 235 | | |

- [0377] <210> 16
- [0378] <211> 19
- [0379] <212> DNA
- [0380] <213> 小家鼠
- [0381] <400> 16
- [0382] ttagcacccc tggccaagg 19
- [0383] <210> 17
- [0384] <211> 21
- [0385] <212> DNA
- [0386] <213> 小家鼠
- [0387] <400> 17
- [0388] cttaactccct tggaggccat g 21

FG129_29H

前导

| | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| -19 | M. | L. | L. | G. | |
| | atg | ctg | ttg | ggg | |
| | | | | | |
| | L. | K. | W. | V. | F. |
| | ctg | aag | tgg | gtt | ttc |
| | | | | | |
| | E | V | Q | L | V |
| | gag | gtg | cag | ctt | gtt |
| | | | | | |
| | K | G | S | L | K |
| | aaa | ggg | tca | ttg | aaa |
| | | | | | |
| | ... | ... | ... | ... | ... |
| | N | T | Y | A | |
| | aat | acc | tac | gcc | atg |
| | | | | | |
| | P | G | K | G | L |
| | cca | gga | aag | ggt | ttg |
| | | | | | |
| | ... | ... | ... | ... | ... |
| | N | N | Y | A | T |
| | aat | aat | tat | gca | aca |
| | | | | | |
| | | | | | |

图1a

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-----|------|--------|-----|
| FG129_29H | 76 | F | T | I | S | R | D | D | S | Q | S | M | L | V | L | Q |
| | tac | acc | ata | tcc | aga | gat | gtt | tca | caa | agc | atg | ctc | tat | ctg | caa | |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | FR3 | - | TMGT | -----> | |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | FR3 | - | TMGT | -----> | |
| FG129_29H | 91 | W | W | W | L | K | K | E | D | T | A | M | Y | Y | C | V |
| | atg | sac | aac | ttg | aaa | aag | gag | gac | aca | gcc | atg | tat | tac | tgt | gtt | |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | CDR3 | - | TMGT | -----> | |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 106 | G | Y | W | G |
| FG129_29H | | ggg | tac | ggg | tgt | agg | ggg | ggg | aaa | tac | tgg | ggg | caa | ggg | ... | ... |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 121 | T | S | V | T |
| FG129_29H | | acc | tca | gtc | acc | gtc | tcc | tca | ggc | aaa | agg | aca | ccc | cca | tct | gtc |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 136 | Y | P | L | A |
| FG129_29H | | tat | cca | c当地 | c当地 | c当地 | ggg | tat | tct | gtt | gcc | caa | act | aac | tcc | atg |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 151 | T | L | C | L |
| FG129_29H | | acc | c当地 | ggg | tgc | gtc | gtc | aag | ggc | tat | tcc | c当地 | ggg | cca | gtg | aca |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 166 | V | T | W | H |
| FG129_29H | | gtg | acc | tgg | acc | tcc | tcc | ggg | tcc | tcc | agg | gtt | gtt | acc | acc | tcc |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 181 | P | A | V | L |
| FG129_29H | | cca | gtt | gtc | ctg | gag | tct | gac | ctc | tac | act | ctg | agg | agg | tca | gtg |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 196 | T | V | P | S |
| FG129_29H | | act | gttc | ccc | tcc | agg | ccc | ctt | cggt | ccc | agg | acc | gtt | acc | tgc | aac |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 211 | V | A | H | P |
| FG129_29H | | gtt | gcc | cac | ccg | ggc | agg | acc | agg | gtt | gac | aag | aaa | att | gtg | |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 226 | P | R | D | C |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | C | T | V | B |

图1a(续)

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| FG129_29H | ccc | agg | aat | tgt | ggg | tgt | aag | cct | tgc | ata | tgt | aca | gtc | cca | aaa |
| FG129_29H | 241 | V | S | S | V | F | I | F | P | P | K | P | K | D | V |
| FG129_29H | | gtt | a | tca | tct | gtc | ttc | atc | ttc | ccc | cca | aag | ccc | aay | gtt |
| FG129_29H | 256 | T | I | T | L | T | P | K | V | T | C | V | V | D | I |
| FG129_29H | | acc | att | act | ctg | act | oct | aag | gtc | acg | tgt | gtt | gtg | gtt | gac |
| FG129_29H | 271 | S | K | D | D | P | E | V | Q | F | S | W | F | V | D |
| FG129_29H | | agg | aag | aat | gat | ccc | gag | gtc | cag | ttc | agc | tgg | ttt | gtt | gat |
| FG129_29H | 286 | V | E | V | H | T | A | Q | Y | Q | P | R | E | Q | F |
| FG129_29H | | gtt | gag | gtt | gag | gtt | gac | aca | gtt | cag | acg | caa | ccc | cgg | gag |
| FG129_29H | 301 | N | S | T | F | R | S | V | S | E | L | P | I | M | Q |
| FG129_29H | | aac | agc | act | ttc | cgc | tca | gtc | agt | gaa | ctt | ccc | atc | atg | cac |
| FG129_29H | 316 | D | W | L | N | G | K | E | F | K | C | R | V | N | S |
| FG129_29H | | gac | tgg | ctc | aat | ggc | aag | gag | ttc | aaa | tgc | agg | gtc | aaa | gtt |
| FG129_29H | 331 | A | E | P | A | P | I | E | K | T | I | S | K | T | K |
| FG129_29H | | gct | ttc | cct | gcc | ccc | atc | gag | aaa | acc | atc | tcc | aaa | acc | aaa |
| FG129_29H | 346 | R | P | K | A | P | Q | V | Y | T | I | P | P | K | E |
| FG129_29H | | aya | cog | aag | gct | cca | cag | gtg | tac | acc | att | cca | cct | ccc | aag |
| FG129_29H | 361 | Q | M | A | K | D | K | V | S | L | P | C | M | I | T |
| FG129_29H | | cag | atg | ggc | aag | gat | aaa | gtc | agt | ctg | acc | tgc | atg | ata | aca |
| FG129_29H | 376 | F | F | P | E | D | I | T | V | E | W | O | W | N | Q |
| FG129_29H | | ttc | ttc | cct | gaa | gac | att | act | gtg | gag | tgg | cag | tgg | aat | ggg |
| | 391 | P | A | E | N | Y | K | N | T | Q | P | I | M | N | T |

图1a(续)

| | |
|-----------|---|
| FG129_29H | ccg gag aac tac aag aac act cag ccc atc atg aac aac aat |
| 406 | G S Y F V Y S K L W V Q K S N |
| FG129_29H | ggc tct tac ttc gtc tac agc aag ctc aat gtg cag aag agc aac |
| 421 | W E A G N T F T C S V L H E G |
| FG129_29H | tgg gag gca gga aat act ttc acc tgg tct gtc tta cat gag ggc |
| 436 | L H N H H T E K S L S H S P G |
| FG129_29H | ctg cac aac cac cat act gag aag agc ctc tcc cac tct cct ggt |
| 451 | K |
| FG129_29H | aaa |

图1a(续)

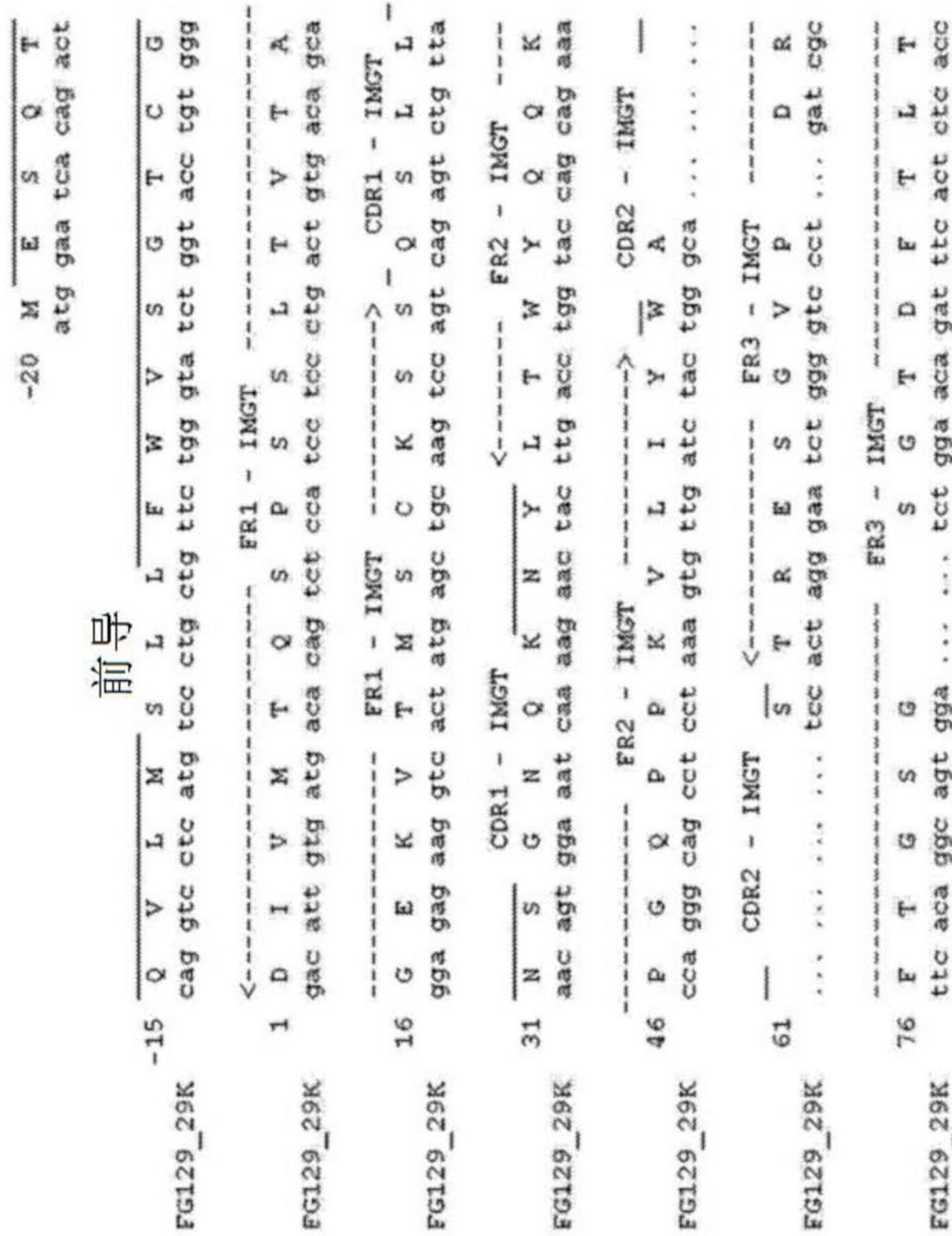


图1b

| | | FR3 - IMGT | | | | | | | | | | | | < /> | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----|------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|---|---|------|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CDR3 - | | | | | | IMGT | | | | | | CDR3 - | | | | | | IMGT | | | | | | | |
| | | W | D | Y | S | S | P | F | T | G | G | S | G | T | K | L | Q | A | E | D | I | A | V | Y | Y | C | C |
| FG129_29K | 91 | I | S | S | V | Q | A | E | D | I | A | V | Y | Y | C | C | | | | | | | | | | | |
| | | atc | agg | agt | gtg | cag | gtt | gaa | gac | ctg | gca | gtt | tat | tac | tgt | cag | | | | | | | | | | | |
| FG129_29K | 106 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | aat | gat | tat | agt | tat | gtt | ttc | acc | ttc | ggc | tcg | ggg | aca | aag | tgt | | | | | | | | | | | |
| FG129_29K | 121 | E | I | K | R | A | D | A | A | P | T | V | S | I | F | P | | | | | | | | | | | |
| | | gaa | ata | aaa | ogg | gtt | aat | gtt | gca | cca | act | gtt | tcc | atc | tcc | cca | | | | | | | | | | | |
| FG129_29K | 136 | P | S | S | E | Q | L | T | S | G | G | A | S | V | V | C | | | | | | | | | | | |
| | | ccg | tcc | tgt | gag | cag | tta | aca | tct | gga | gtt | gcc | tca | gtc | gtg | tgc | | | | | | | | | | | |
| FG129_29K | 151 | F | L | N | N | F | Y | P | K | D | I | H | V | K | W | K | | | | | | | | | | | |
| | | tto | tgt | aac | aac | ttc | ttc | tac | ccc | aaa | gac | atc | aat | gtc | aag | tgt | aag | | | | | | | | | | |
| FG129_29K | 166 | I | D | G | S | E | R | Q | N | G | V | L | W | S | W | T | | | | | | | | | | | |
| | | att | gat | ggc | agt | gaa | cga | cga | caa | aat | ggc | gtc | ctg | aat | agt | tgt | act | | | | | | | | | | |
| FG129_29K | 181 | D | Q | D | S | K | D | S | T | Y | S | M | S | S | T | L | | | | | | | | | | | |
| | | gat | cag | gac | gac | aaa | gac | agc | acc | tac | acc | atg | agc | acc | acc | ctc | | | | | | | | | | | |
| FG129_29K | 196 | T | L | T | K | D | E | Y | E | R | H | N | S | Y | T | C | | | | | | | | | | | |
| | | acc | tgt | acc | aag | gac | gag | tat | gaa | cga | cgt | atc | acc | acc | acc | tgt | | | | | | | | | | | |
| FG129_29K | 211 | E | A | T | H | K | T | S | T | S | P | I | V | K | S | F | | | | | | | | | | | |
| | | gag | gcc | act | cac | aag | aca | tca | acc | ttt | gtc | agg | agg | tcc | tcc | tcc | | | | | | | | | | | |
| FG129_29K | 226 | H | R | N | E | C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | aac | agg | aat | gag | tgt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

图1b(续)

ch129_29H

前导

图2a

ch129_29H 76 T I S R D S Q S M L Y L Q
 ttc acc ata tcc aqa gat tca caa aqc atg ctc tat ctg caa
 ----- ER3 - IMGT ----->
 91 W N N L K K E D T A W Y Y C V
 atg aac aac ttg aaa aag gag gac aca gcc atg tat tac tgt gta

ch129_29H 106 G Y G S C G N Y W G Q G
 ggg tac ggt agt ggg gga aac tac tgg ggt caa gga
 ----- CDR3 - IMGT ----->

ch129_29H 121 T S V T Y S S A S T K G P S V
 acc tca gtc acc gtc tcc agc gnt tcc acc aag ggc cca tgg gtc

ch129_29H 136 P D L A P S S K S T S G G T A
 ttc ccc ctc ctg gca ccc tcc tcc aag agg acc tct ggg ggc aca gcg

ch129_29H 151 A L G C L V K D Y F P E P V T
 ggc ctg ggc tgg ctg gtc aag gag tac ttc ccc gaa cgg gtg acc

ch129_29H 166 V S W H S G A L T S G V H T F
 atg tgg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agg ggc gtg cac acc ttc

ch129_29H 181 P A V L O S S G L Y S L S S V
 ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg

ch129_29H 196 V T V P S S L G T Q T Y I C
 gtg acc ctg ccc tcc agc agc tgg ggc acc cag acc tac atc tgc

ch129_29H 211 N V H K P S N T K V D K K V
 aac gtt aat cac aag ccc agg aac acc aag gtt gao aag aca gtt

226 E D K T H T C E P C P

图2a(续)

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| ch129_29H | gag | ccc | aaa | tct | tgt | gac | aaa | act | cac | aca | tgc | cca | cgg | tgc | cca |
| 241 | A | P | E | L | R | G | G | P | S | V | F | L | G | P | P |
| ch129_29H | gca | cct | gaa | ctc | ctg | ggg | ggg | ccg | tca | gtc | ttc | ctc | ttc | ccc | cca |
| 256 | K | P | K | D | T | L | M | I | S | R | T | P | E | V | T |
| ch129_29H | aaa | ccc | aag | gac | acc | ctc | atg | atc | tcc | cgg | acc | cct | gag | gtc | aca |
| 271 | C | V | V | V | D | V | S | H | E | D | P | E | V | K | F |
| ch129_29H | tgc | gtg | gtg | gtg | gtg | gac | gtg | agc | caa | gac | cct | gag | gtc | aag | ttc |
| 286 | W | W | Y | V | D | G | V | E | V | H | N | A | K | T | K |
| ch129_29H | aac | tgg | tac | gtg | gac | ggc | gtg | gag | gtg | cat | aat | gcc | aag | aca | aag |
| 301 | P | R | E | E | Q | Y | N | S | T | Y | R | V | S | V | V |
| ch129_29H | ccg | cgg | gag | gag | cag | cag | aac | agg | acg | tac | cgt | gtg | gtc | agg | gtc |
| 316 | L | T | V | L | H | Q | D | W | L | N | G | K | E | Y | K |
| ch129_29H | ctc | acc | gtc | ctg | cac | cag | gac | tgg | ctg | aat | ggc | aag | gag | tac | aag |
| 331 | C | K | V | S | N | K | A | L | P | A | P | I | E | K | T |
| ch129_29H | tgc | aag | gtc | tcc | aaa | goc | ctc | oca | gca | ccc | atc | gag | aaa | acc | acc |
| 346 | I | S | K | A | K | G | Q | P | R | E | P | Q | V | Y | T |
| ch129_29H | atc | tcc | aaa | gcc | aaa | ggg | cag | ccc | cga | gaa | cca | cag | gtg | tac | acc |
| 361 | L | P | P | S | R | D | E | L | T | K | N | Q | V | S | L |
| ch129_29H | ctg | ccc | cca | tcc | egg | gat | gag | ctg | acc | aag | aac | cag | gtc | aggc | ctg |
| 376 | T | C | L | V | K | G | F | Y | P | S | D | I | A | V | E |
| ch129_29H | acc | tgc | ctg | gtc | aaa | ggc | ttc | tat | ccc | agg | atc | gcc | gtg | gag | gag |
| 391 | W | E | S | N | G | Q | P | E | N | W | Y | K | T | P | P |

图2a(续)

| | | | | |
|-----------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| ch129_29H | tgg gag agc aat | ggg cag ccg gag | aac tac aag acc acg | cct |
| 406 | P V L D S | D G S P F | L Y S K | L |
| ch129_29H | ccc gtc ctg gac | tcc gac ggc tcc | ttc ctc tac agc | aag ctc |
| 421 | T V D K S | R W Q Q G N | V F S C | |
| ch129_29H | acc gtc gac aag | agg aac tgg cag | ggg aac gtc ttc | tca tgc |
| 436 | S V M H E | A L H N H | Y T Q K S | |
| ch129_29H | tcc gtc atg cat | gag gct | ctg cac aac tac | cag aag aac agg |
| 451 | L S I S P | G K | | |
| ch129_29H | ctc tcc ctg tct | ccg ggt | aaa | |

图2a(续)

图2b

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ch129_29K | 76 | F | T | G | S | G | S | G | T | D | F | T | L | T |
| | tcc | aca | ggc | agt | gga | ... | ... | tct | gga | aca | gat | tcc | act | ctc |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ER3 - IMGT | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ch129_29K | 91 | I | S | S | V | Q | A | E | D | L | A | V | Y | C |
| | atc | agc | agt | gtg | cag | gct | gaa | gac | ctg | gca | gtt | tat | tac | tgt |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | CDR3 - IMGT | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ch129_29K | 106 | W | D | Y | S | P | F | T | F | G | S | G | T | K |
| | aat | aat | gat | tat | agt | tct | cca | ttc | acg | tcc | ggc | tcg | ggg | aca |
| ch129_29K | 121 | E | I | K | R | T | V | A | A | P | S | V | F | P |
| | gaa | ata | aaa | cgt | acg | gtt | gcg | gcc | cca | tct | gtc | tcc | atc | ttc |
| ch129_29K | 136 | P | S | D | E | Q | L | K | S | G | T | A | S | V |
| | cca | tct | gat | gag | cag | ttg | aaa | tct | gga | act | gcc | tct | gtt | gtg |
| ch129_29K | 151 | L | L | N | N | F | Y | P | R | E | A | K | V | W |
| | ctg | ctg | aat | aac | tcc | tat | ccc | aga | gag | gcc | aaa | gtt | cag | tgg |
| ch129_29K | 166 | V | D | W | A | H | Q | S | G | N | S | Q | E | S |
| | gtg | gtg | aat | ggc | ccc | caa | tct | ggt | aat | ttc | cag | gag | agt | gtc |
| ch129_29K | 181 | E | Q | D | S | K | D | S | T | Y | S | L | S | T |
| | gag | cag | gac | agg | gac | acc | acc | tac | agg | ctc | agg | acc | acc | ctg |
| ch129_29K | 196 | R | L | S | K | A | D | Y | E | K | H | V | Y | A |
| | acg | ctg | agc | aaa | gca | gac | tac | gag | aaa | cac | aaa | gtc | tac | gcc |
| ch129_29K | 211 | E | V | T | H | Q | G | L | S | S | P | V | T | K |
| | gaa | gtc | acc | cat | cag | ggc | ctg | agc | tcc | ccc | gtc | aca | aag | gtc |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | CDR3 - IMGT | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| | 226 | N | R | G | E | C | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |

图2b(续)

FG129与糖组阵列的结合

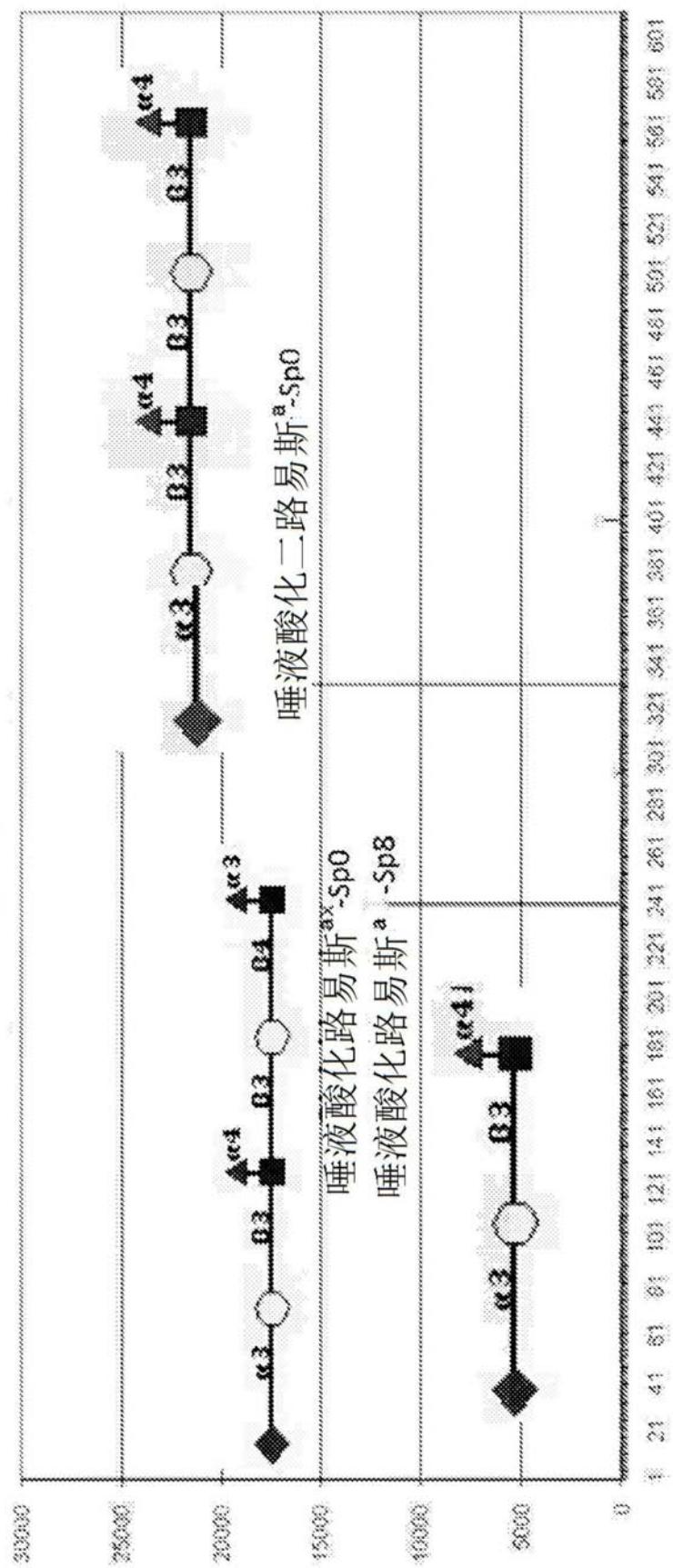


图3a

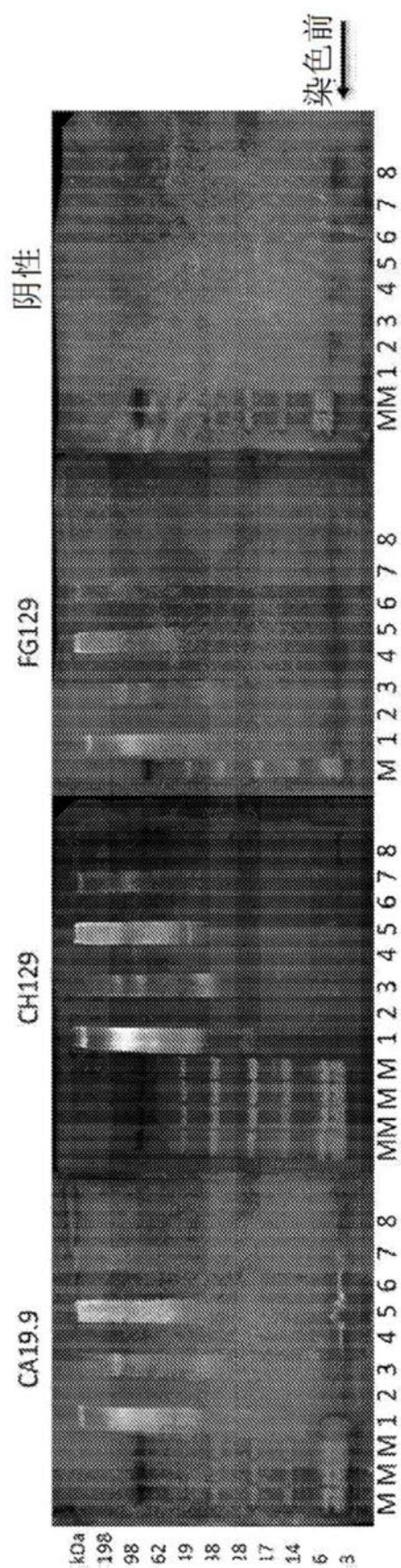


图3b

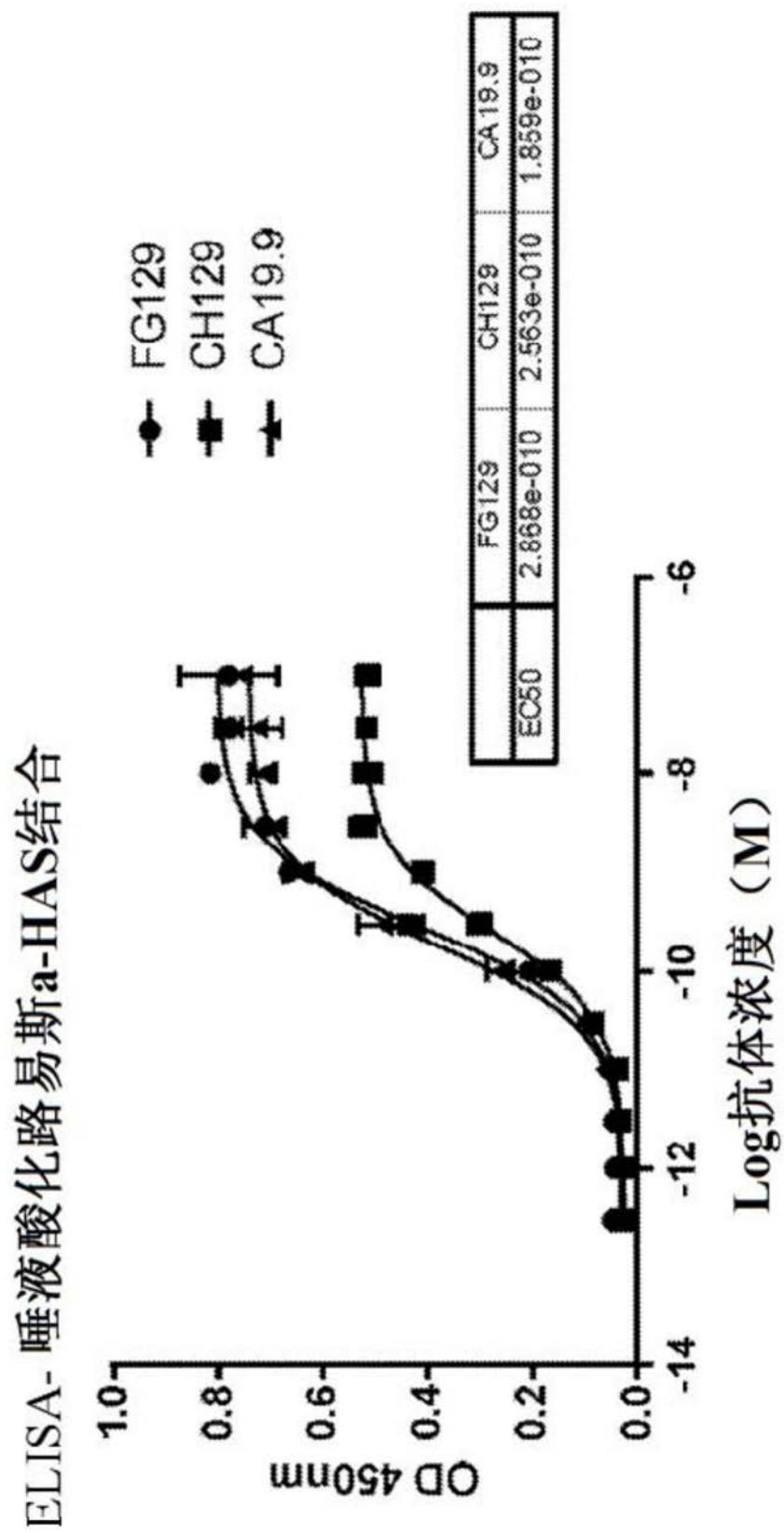


图4

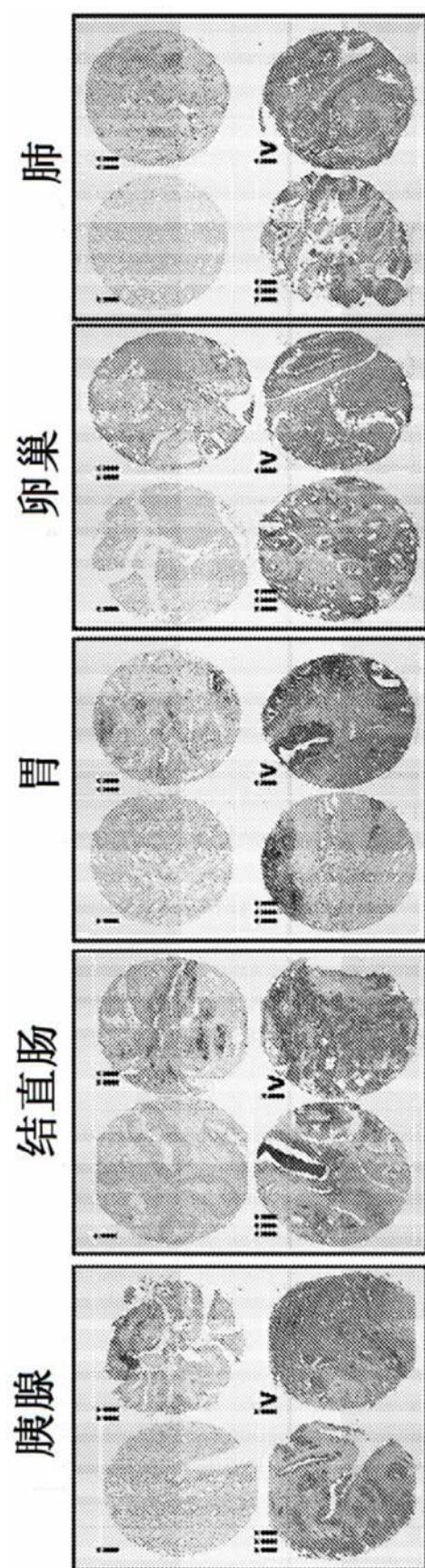


图5a

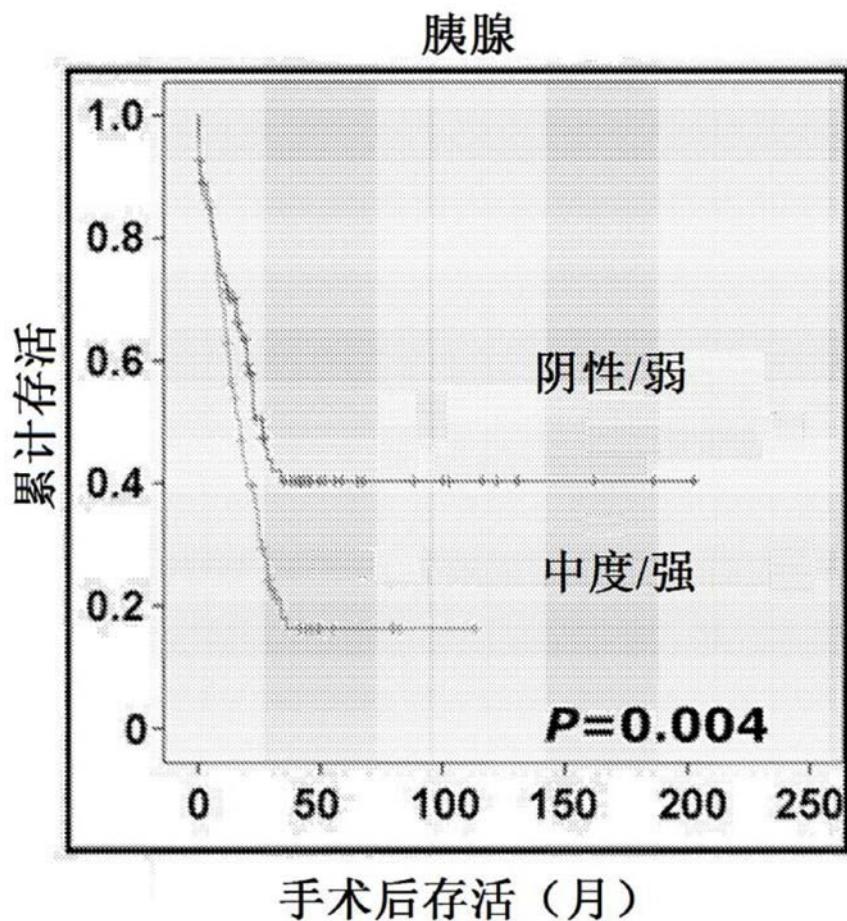


图5b

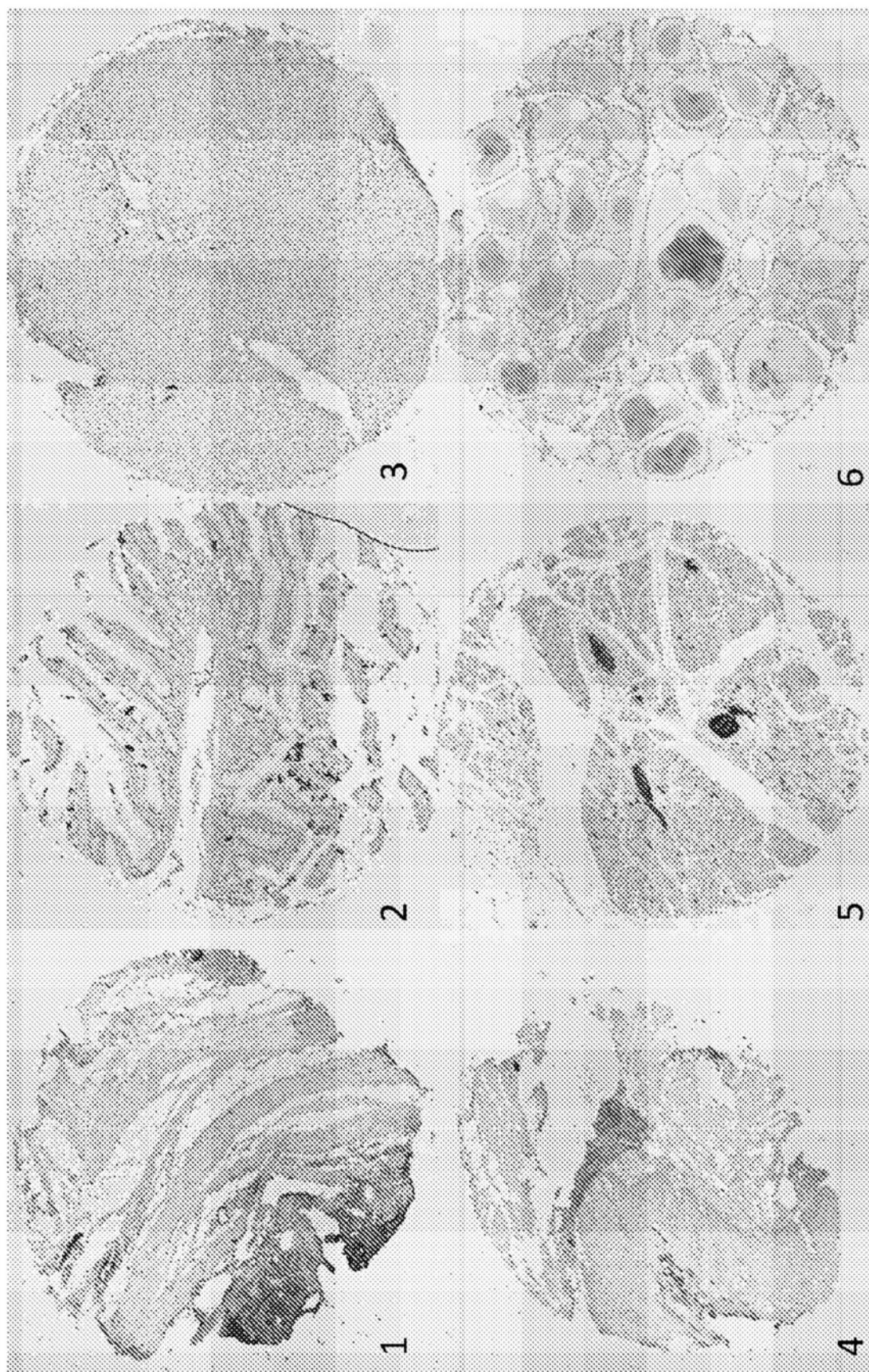


图5c

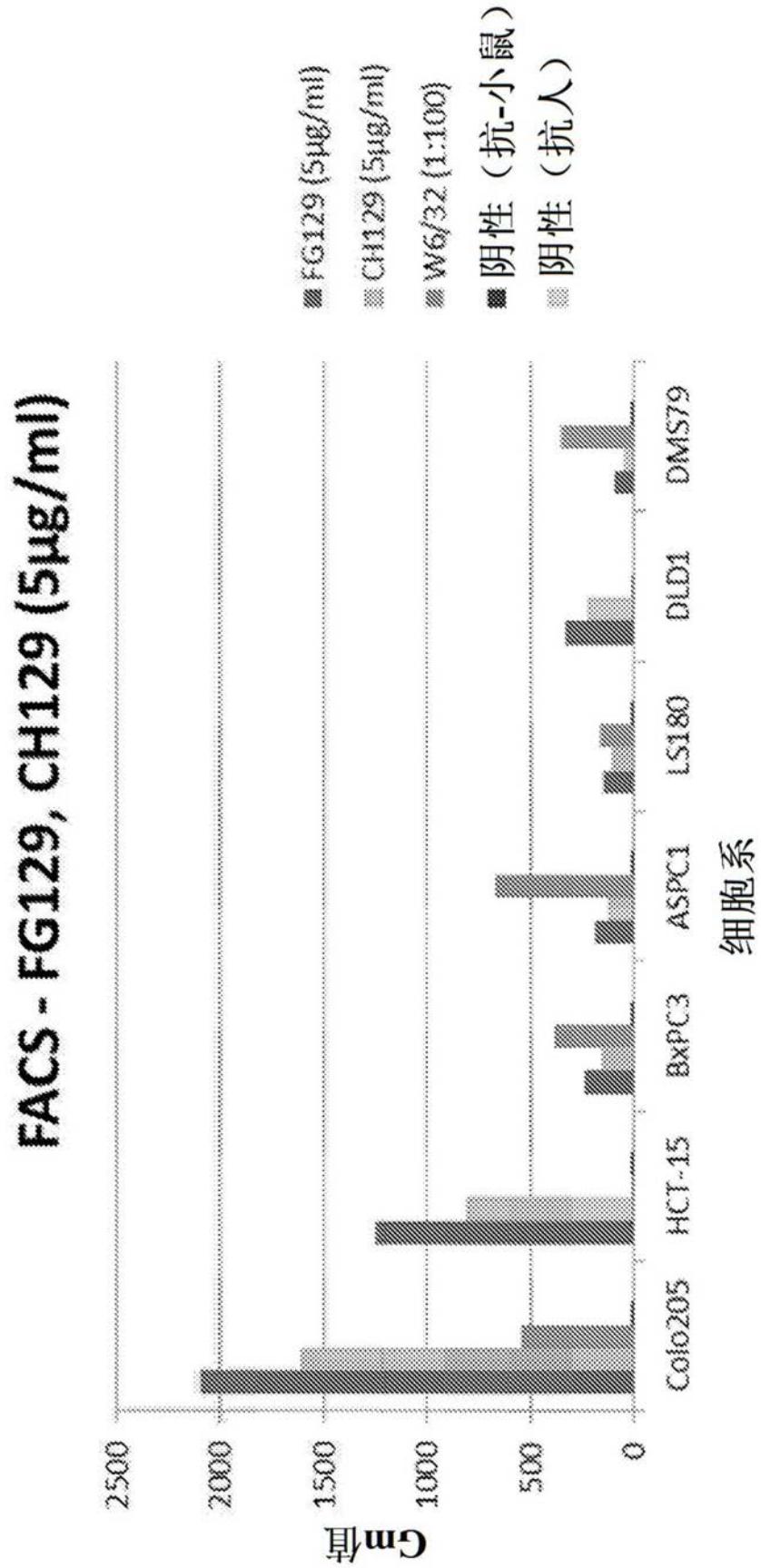


图6a

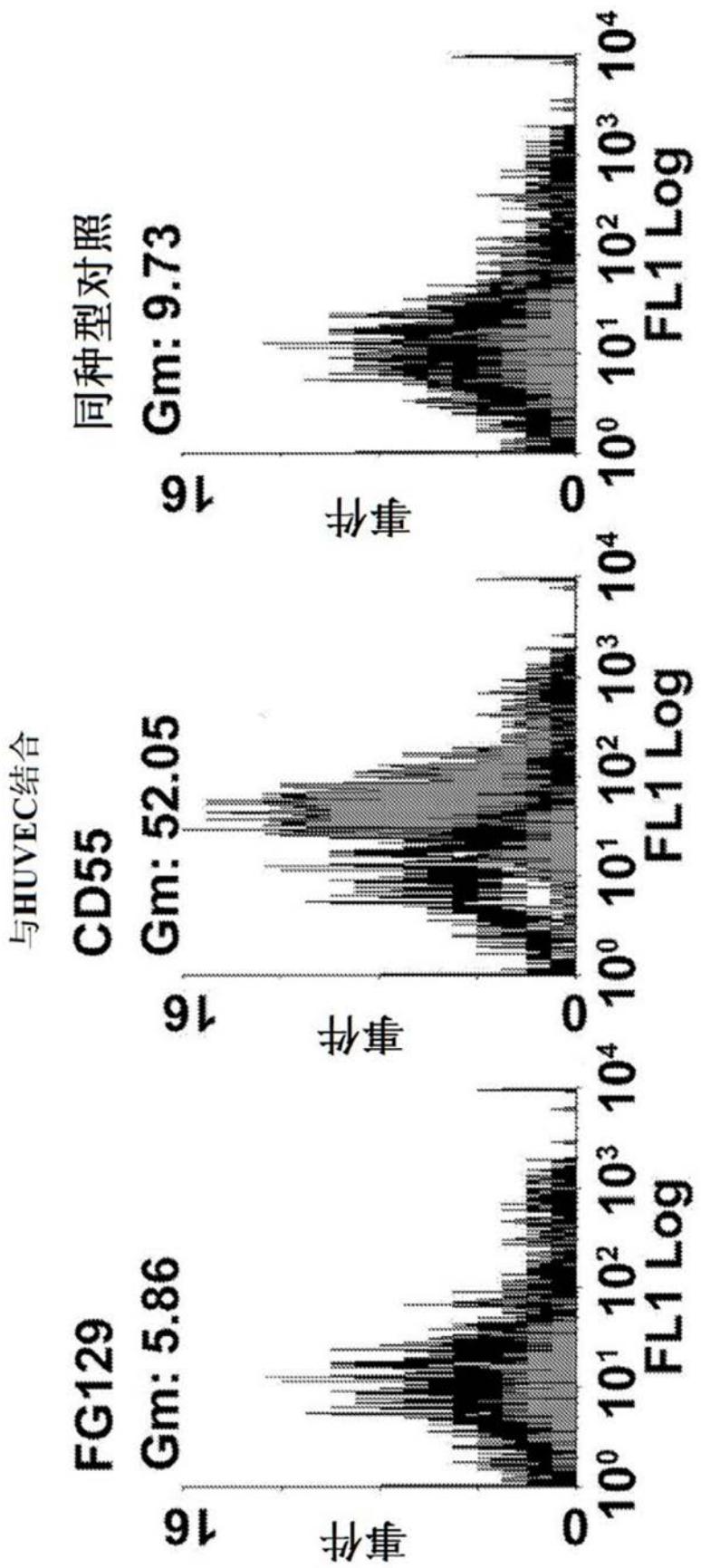


图6b

与来自正常人供体的血结合

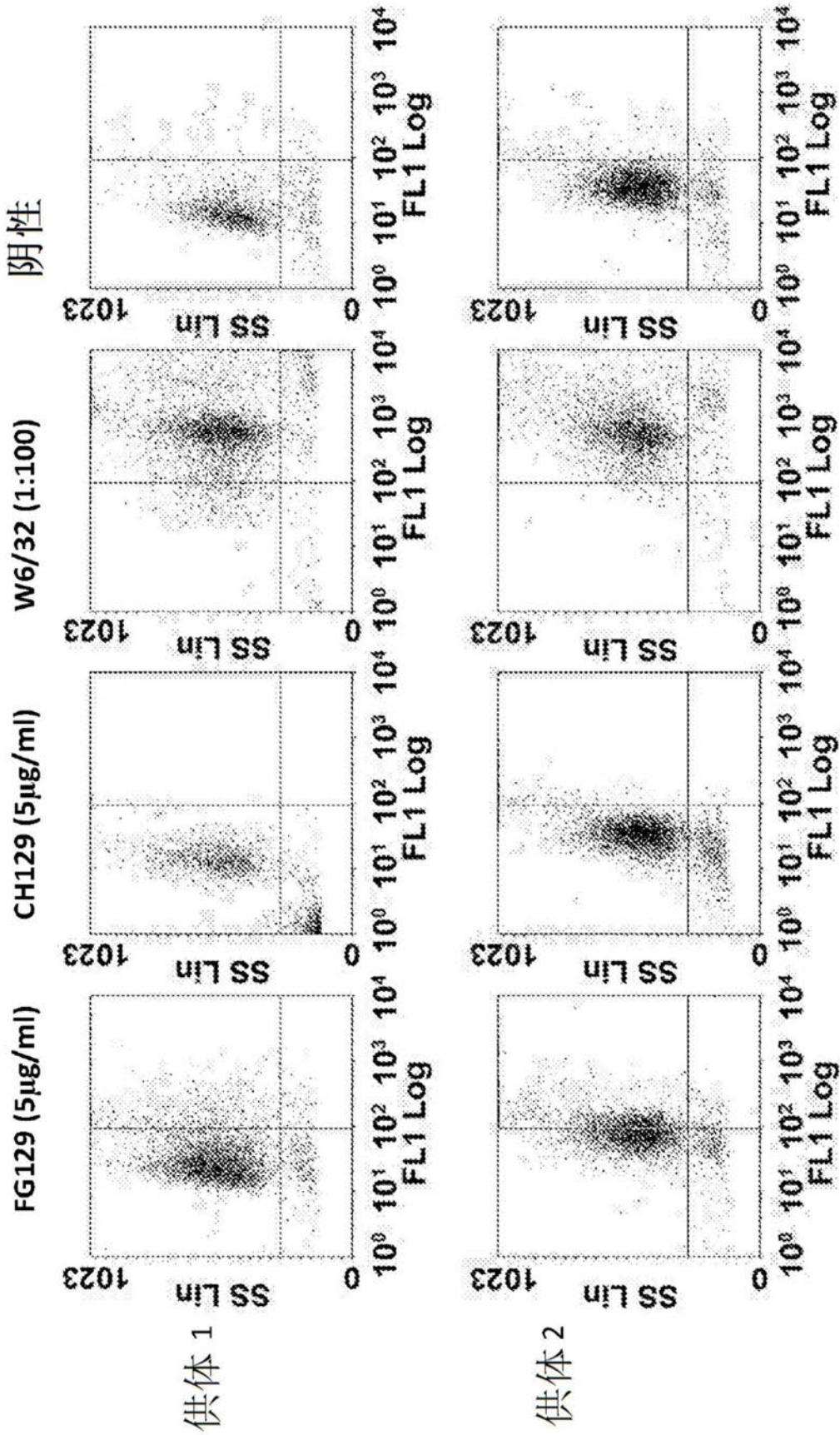


图6c

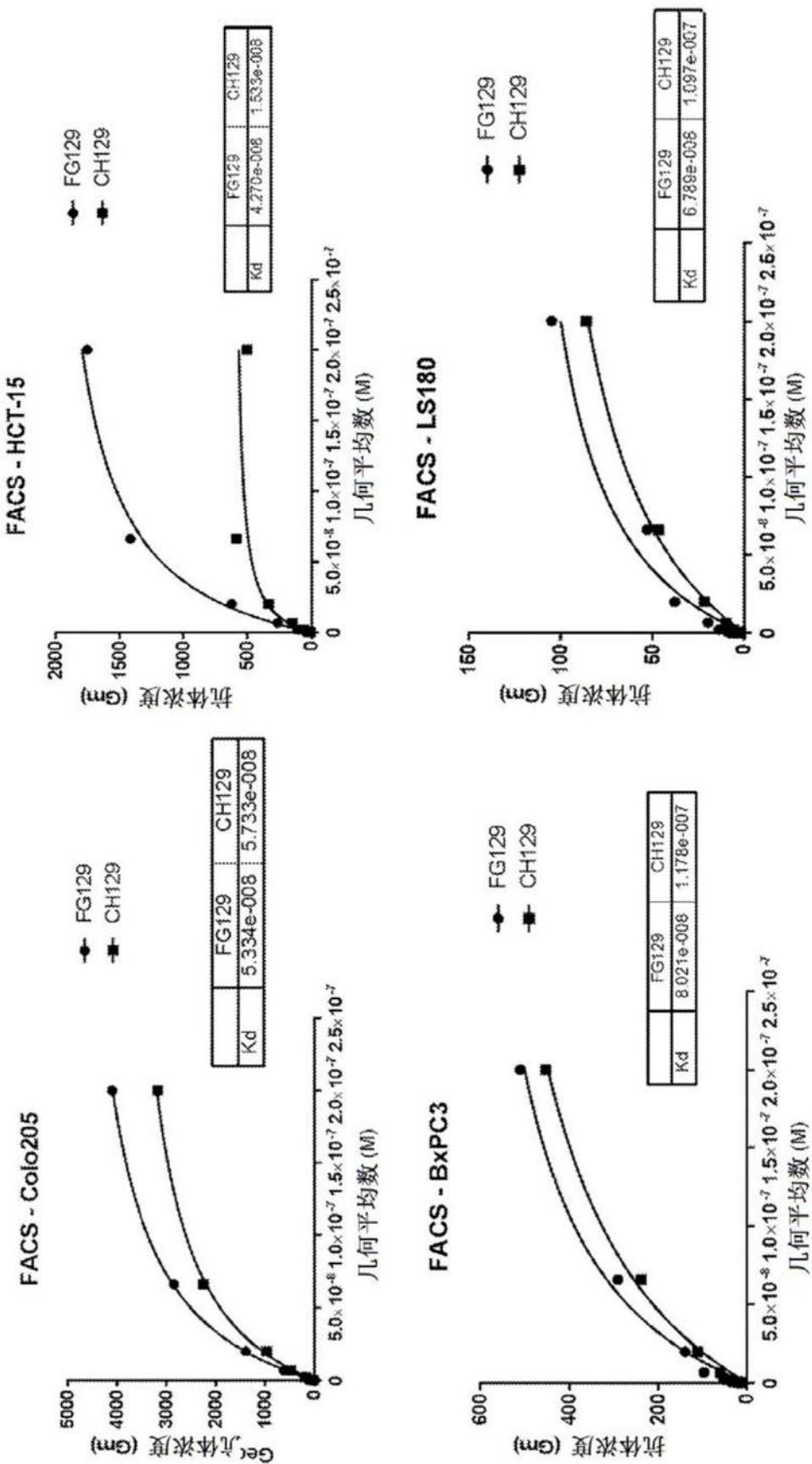


图7

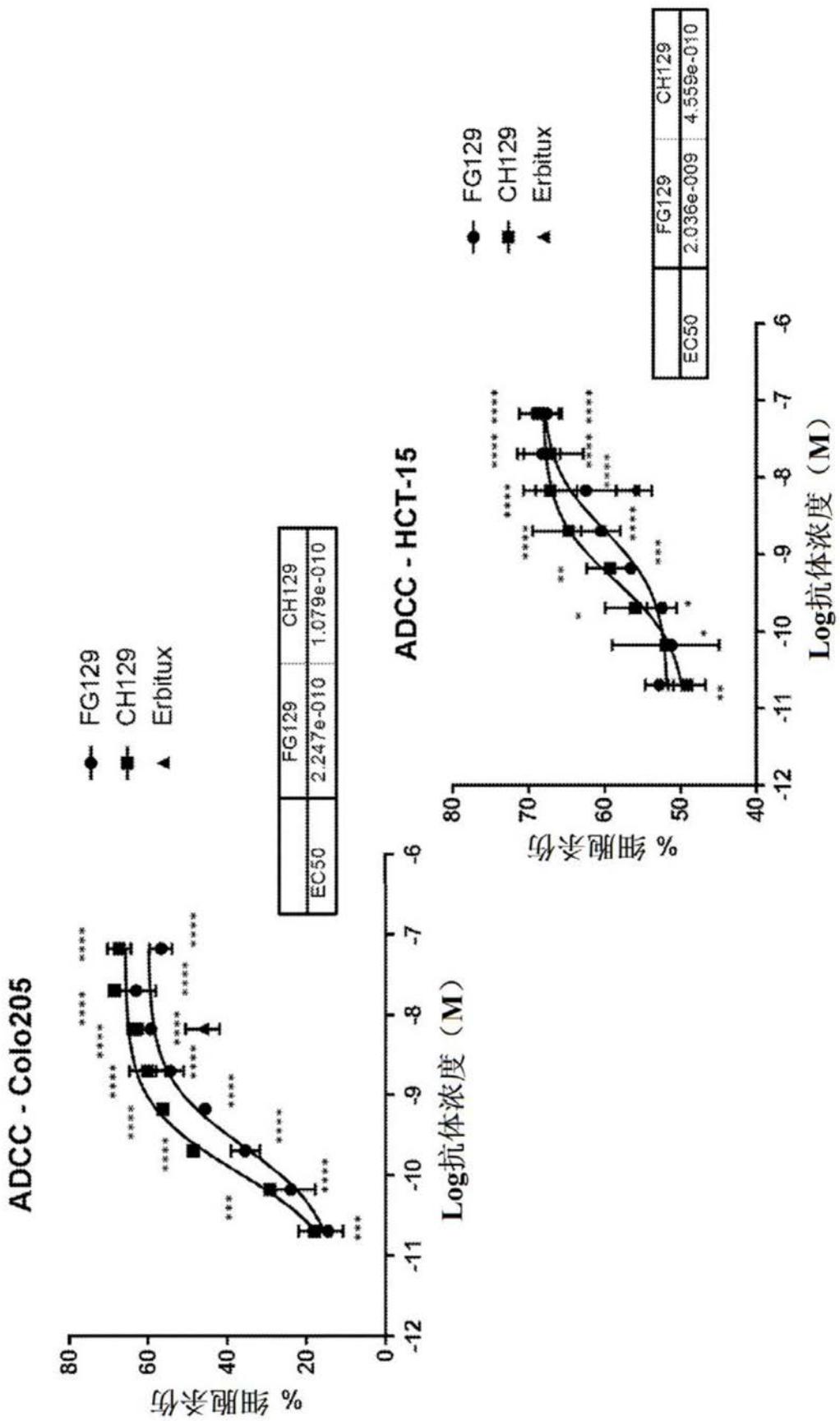


图8

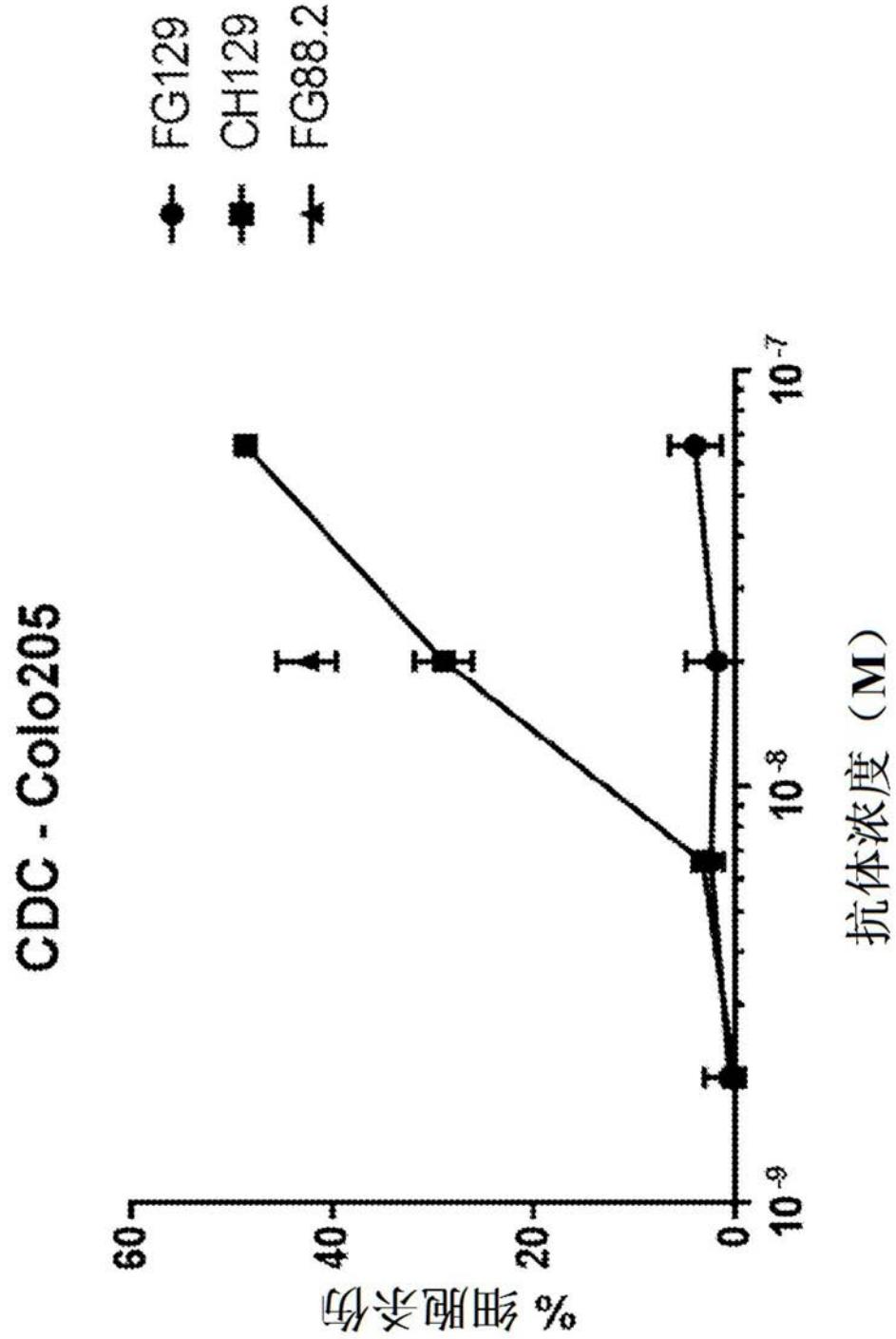


图9

图 10a

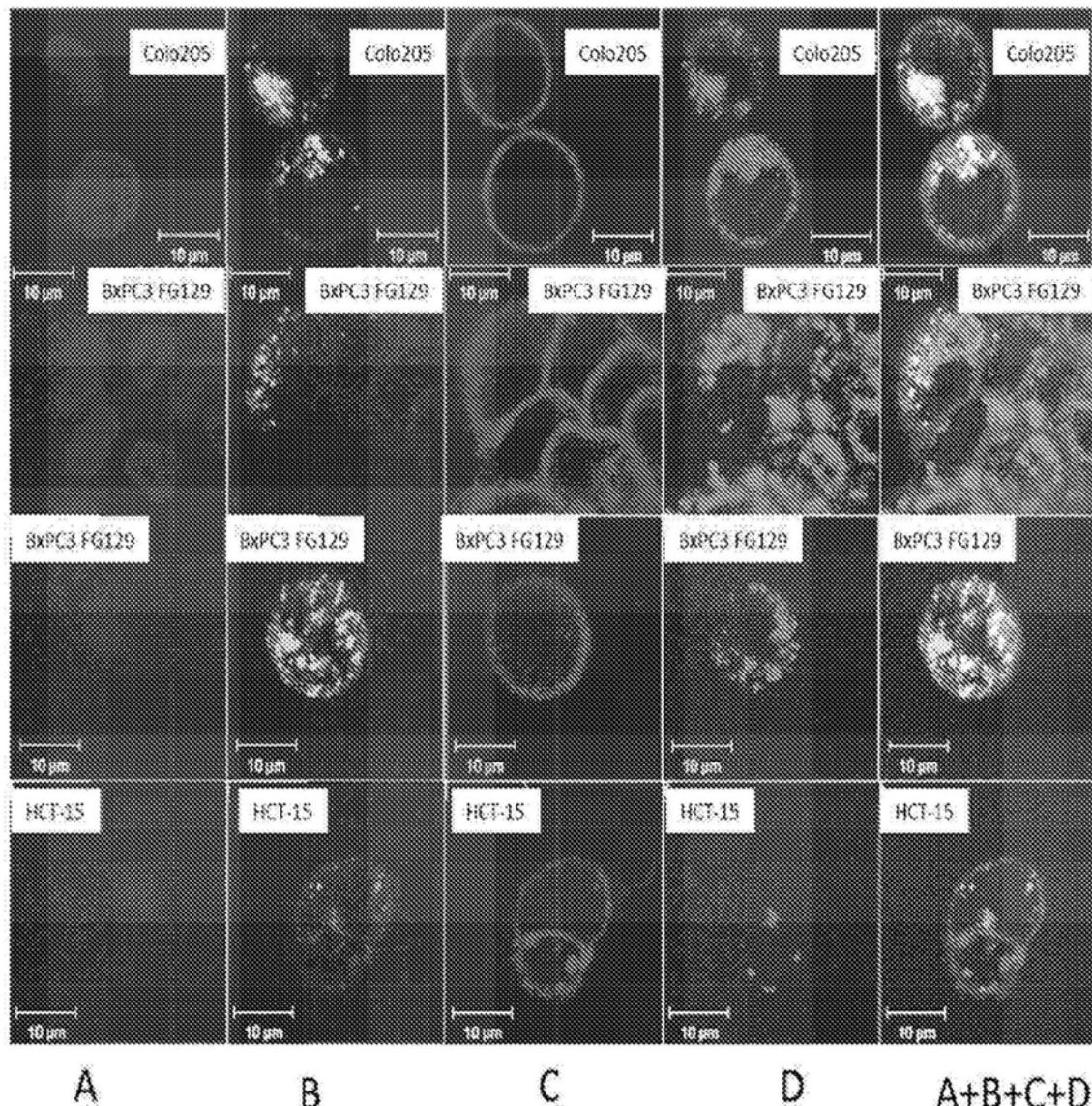
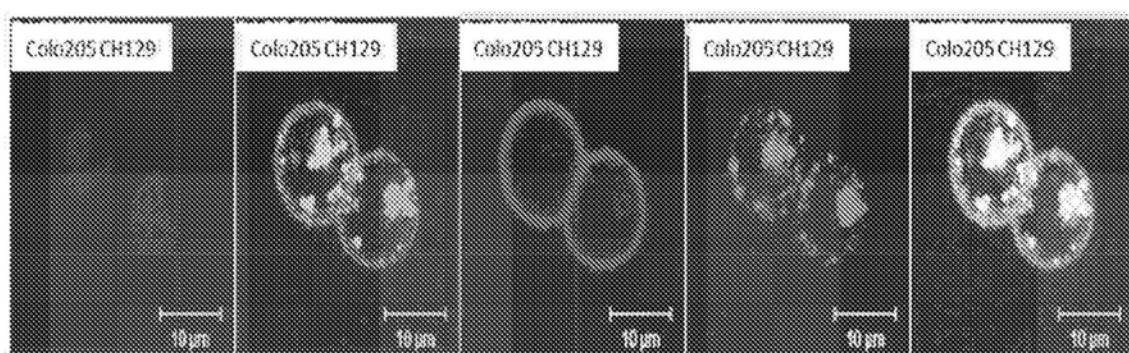


图 10b



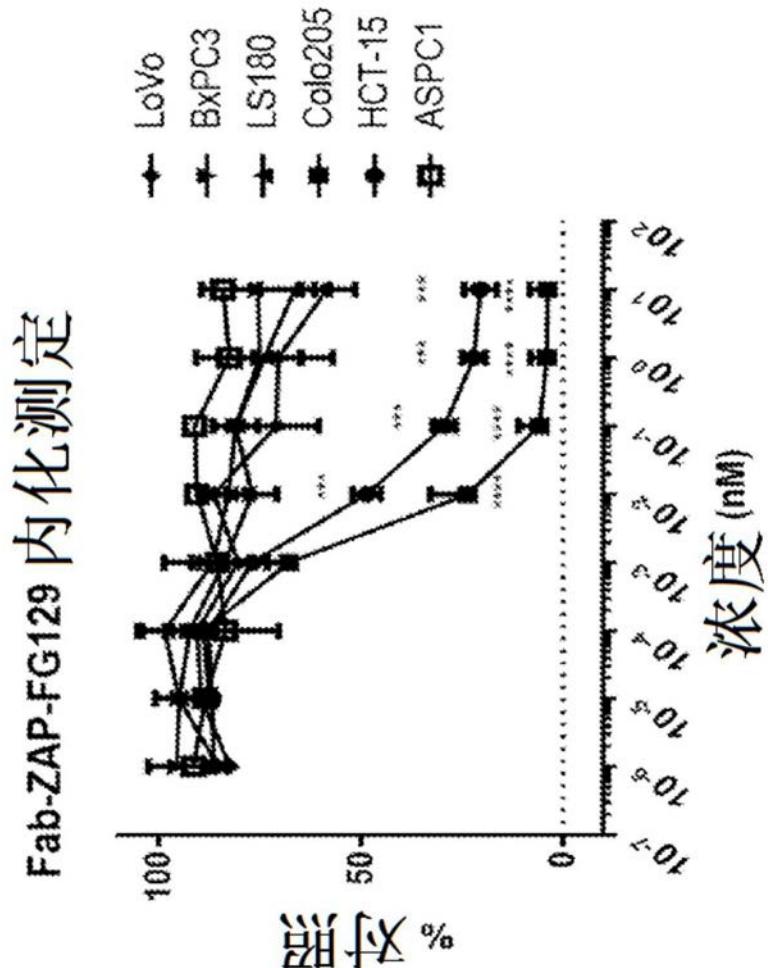


图11a

Fab-ZAP-|同种型对照内化

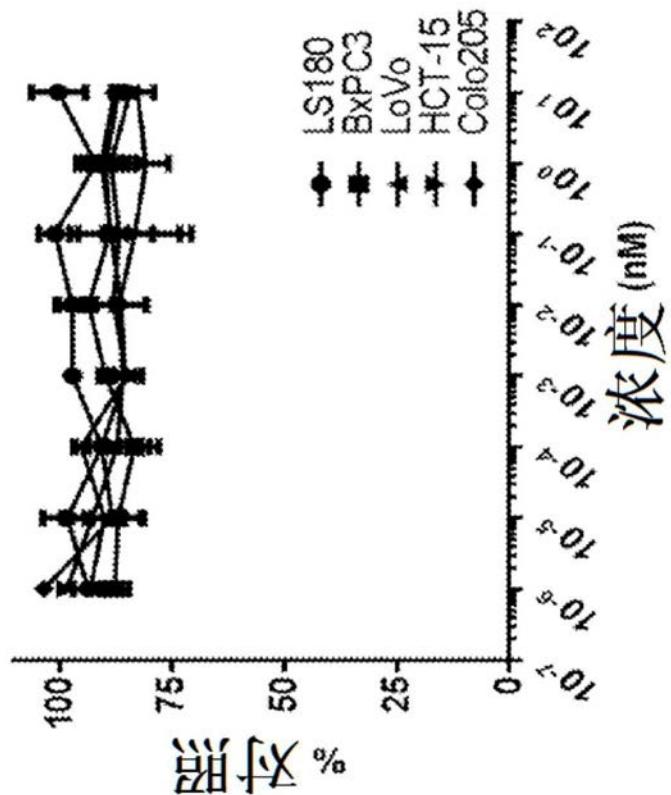


图11b

Fab-ZAP-CH129 内化测定

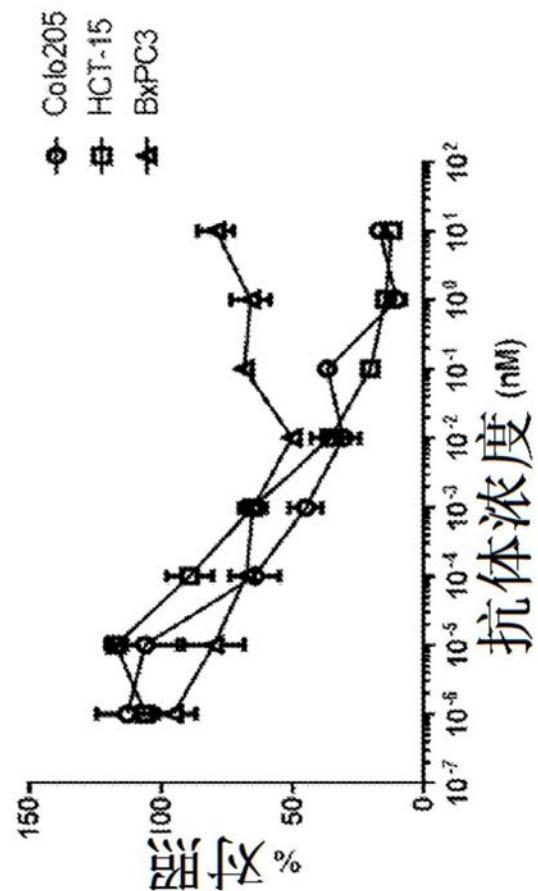


图11c

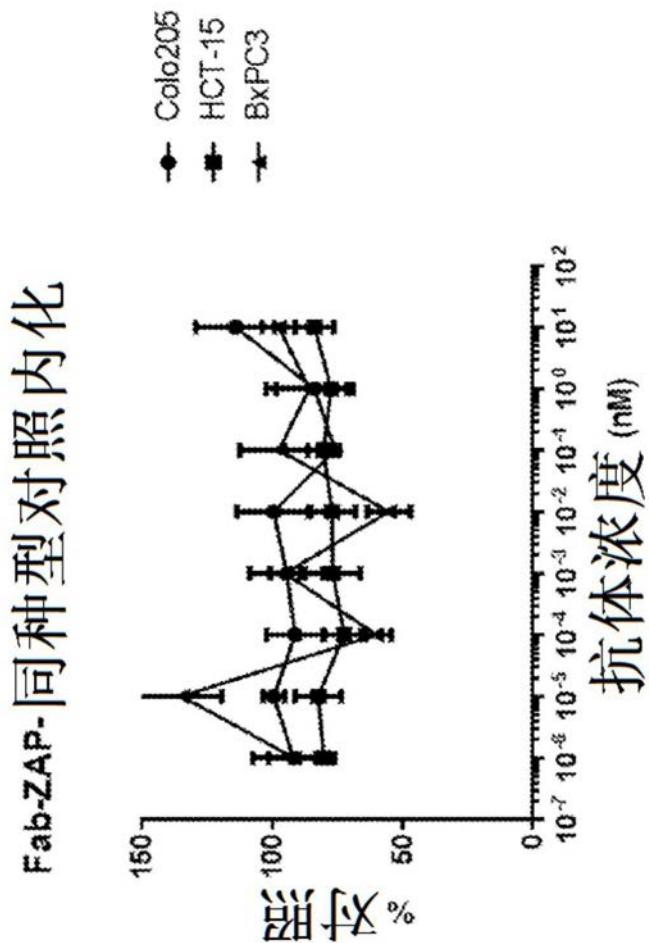


图11d

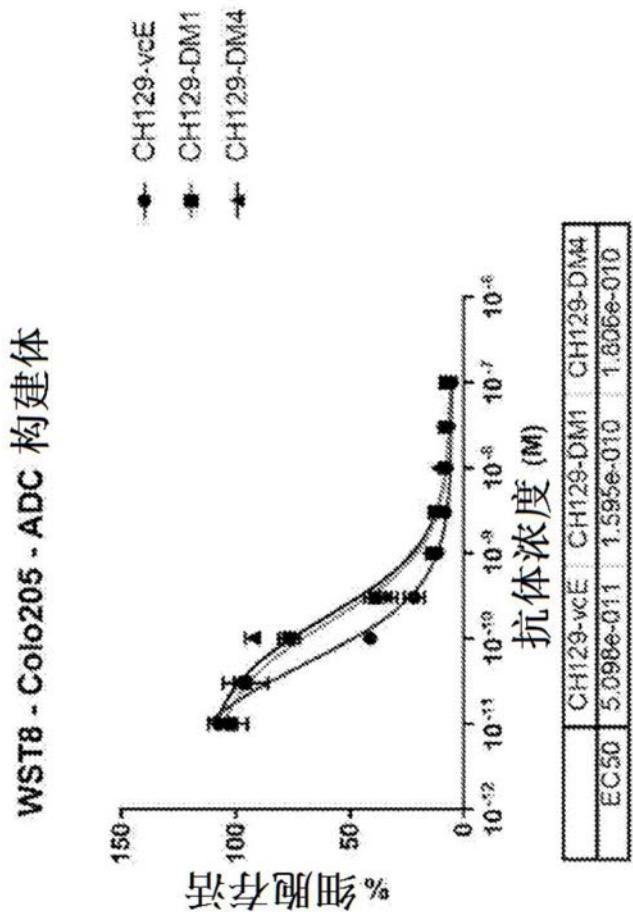


图11e

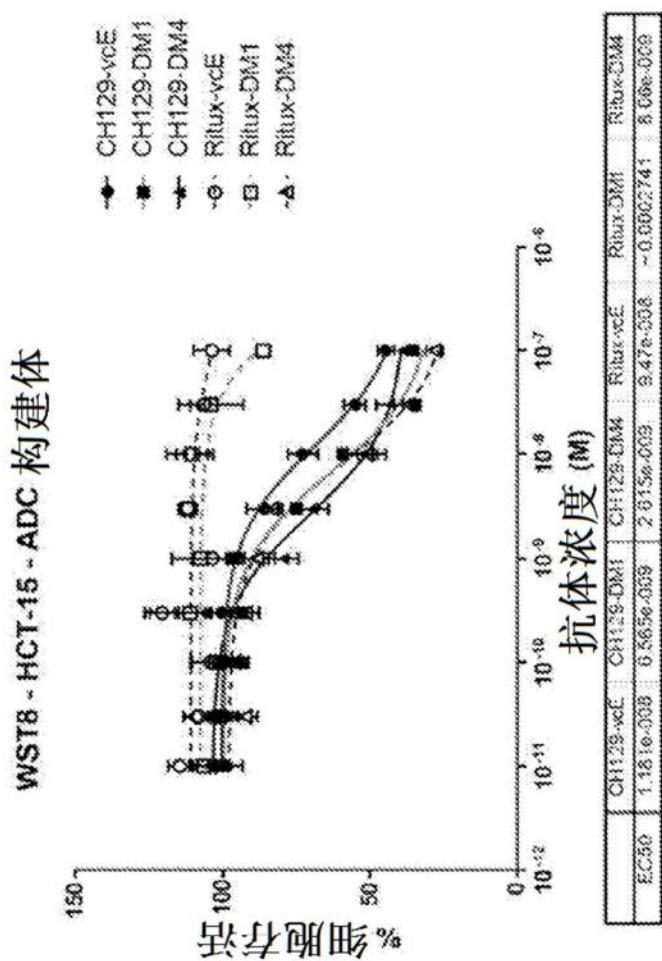


图11f

WST8 - 细胞混合物 - vCE 旁观者杀伤

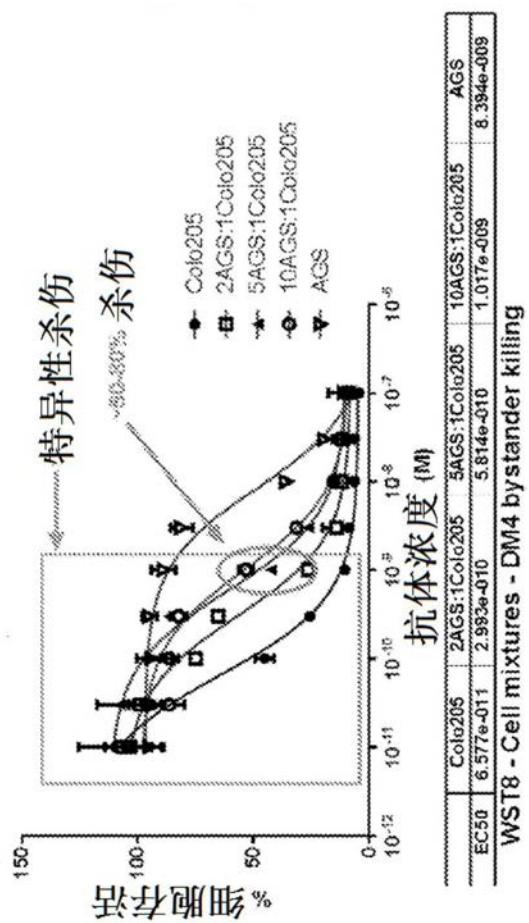


图11g

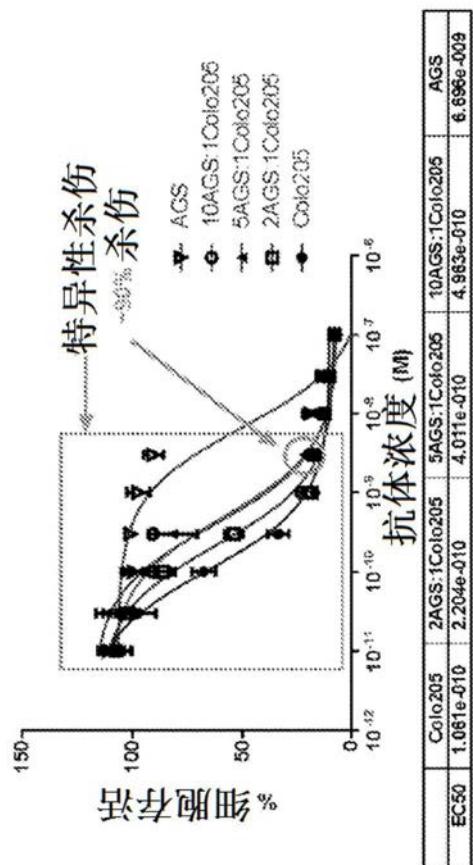


图11h

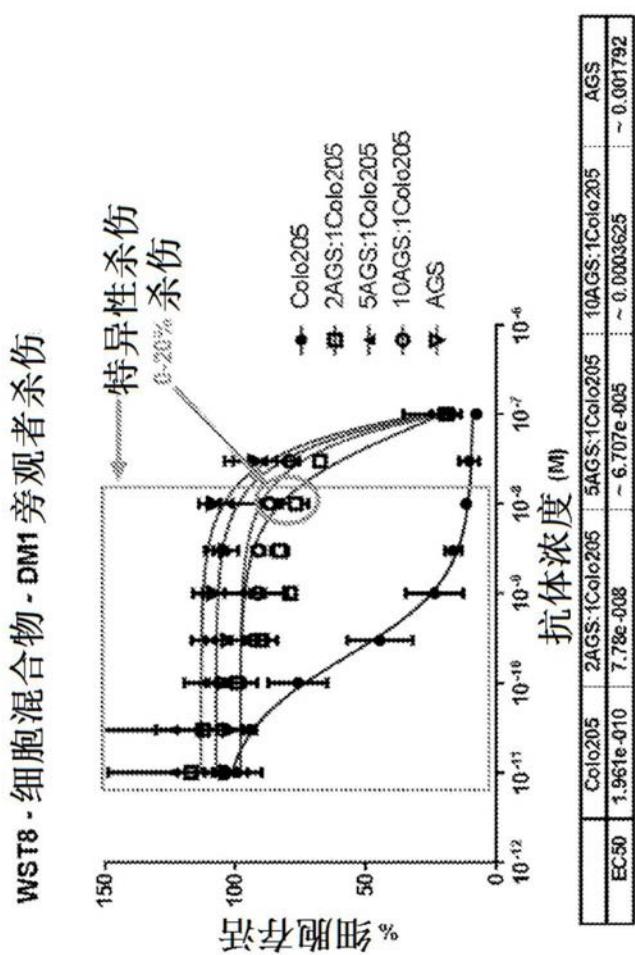


图11i

FG129通过夹心ELISA与胰腺血清中分泌的抗原结合

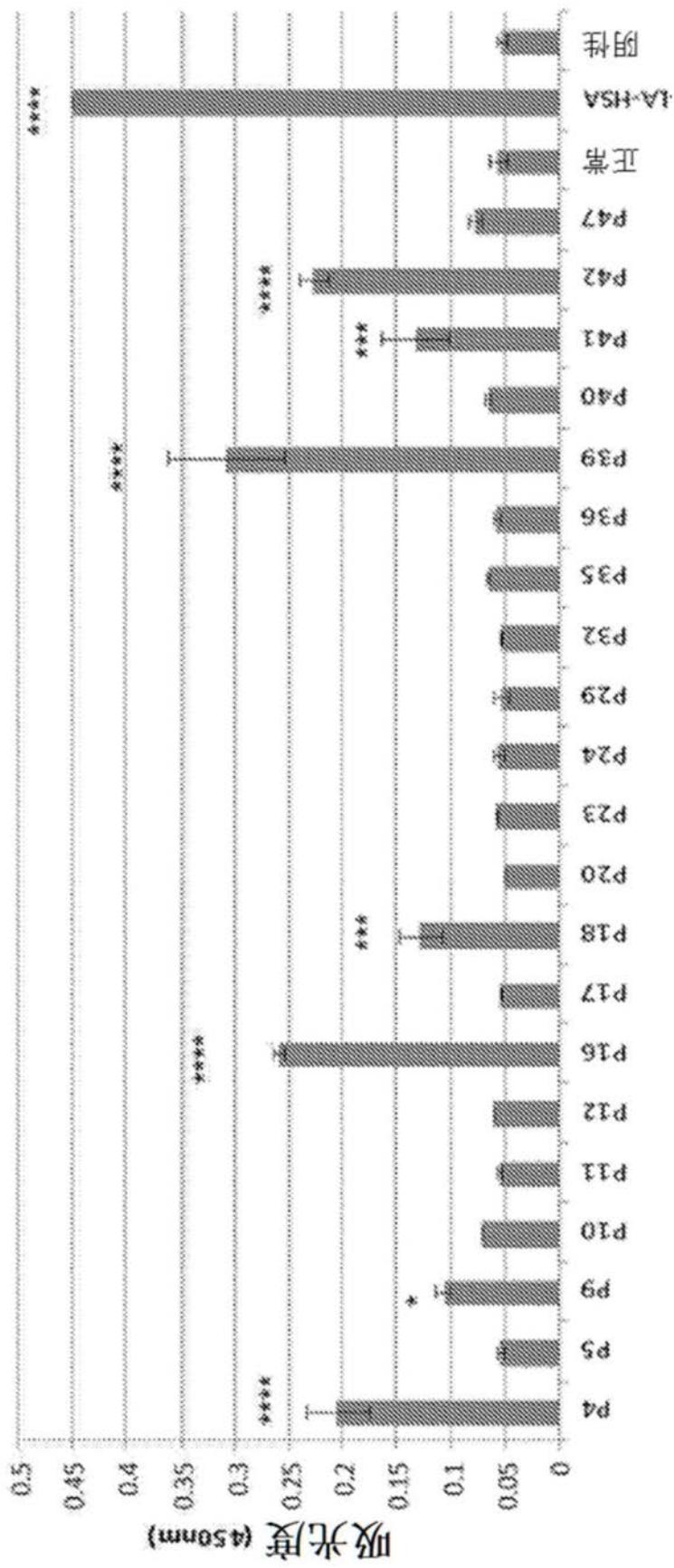


图12a

用FG129预温育的胰腺血清通过竞争性FACS与HCT-15结合

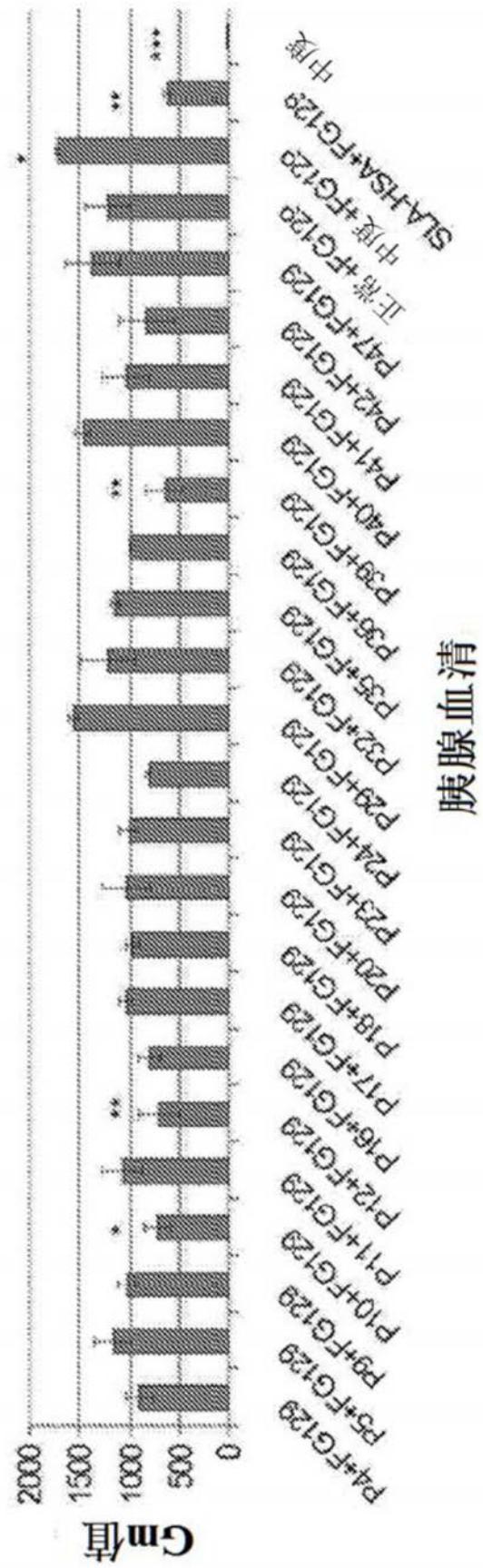


图12b

图13a

图13a(续)

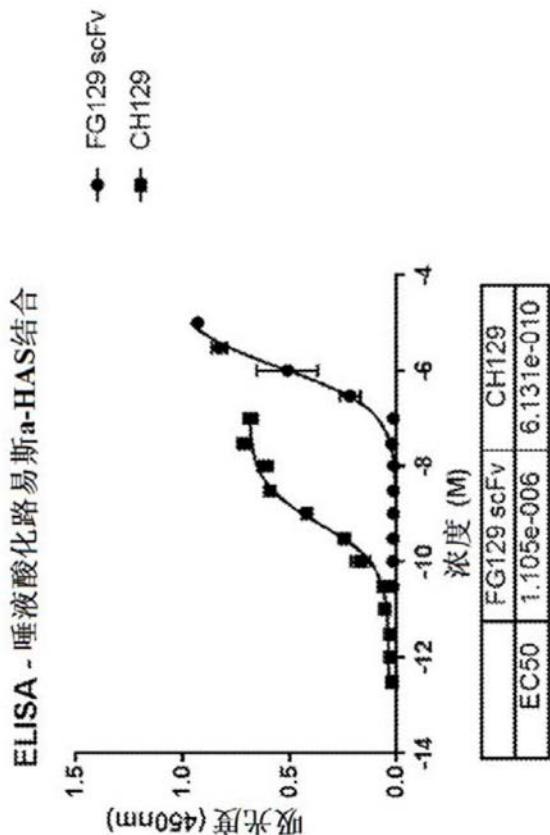


图13b

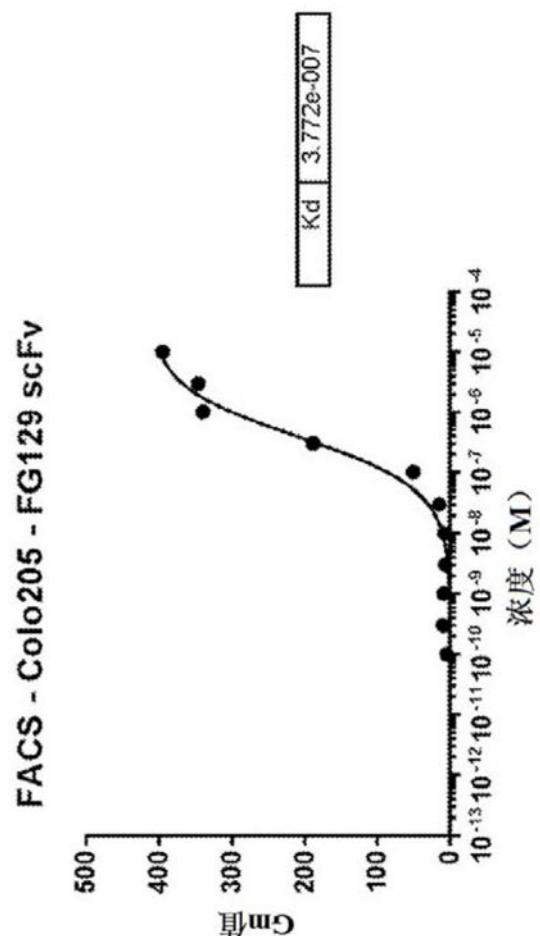


图13c