



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102164962 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 28

(21) 申请号 200980132087. 5

(22) 申请日 2009. 06. 30

(30) 优先权数据

61/077, 041 2008. 06. 30 US

61/097, 034 2008. 09. 15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 02. 17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/049139 2009. 06. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/002822 EN 2010. 01. 07

(83) 生物保藏信息

PTA-9376 2008. 07. 16

(73) 专利权人 诺福泰克公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 尼古拉斯·C·尼克莱德

菲利普·M·萨斯 路易吉·格拉索

沃尔夫冈·埃贝尔 埃里克·鲁蒂埃

姚俊 周宇虹 佐旬

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 张颖 樊卫民

(51) Int. Cl.

C07K 16/30(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2004055056 A1, 2004. 07. 01,

WO 2008043777 B1, 2008. 06. 19,

WO 9734634 A1, 1997. 09. 25,

IRIE R ET AL. REGRESSION OF CUTANEOUS METASTATIC MELANOMA BY INTRALESIONAL INJECTION WITH HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY TO GANGLIOSIDE GD2. 《PNAS》. 1986, 第 83 卷 (第 22 期), 8694-8698.

审查员 徐莉

权利要求书2页 说明书46页

序列表29页 附图21页

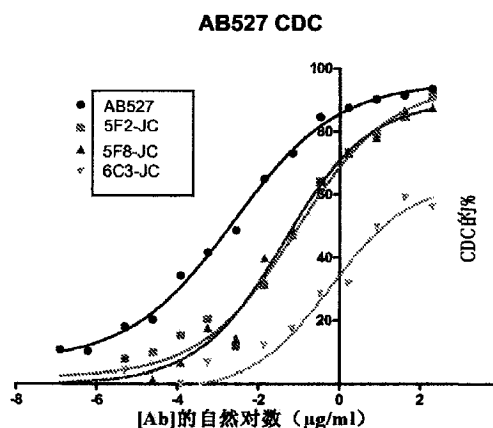
(54) 发明名称

抗 GD2 抗体和方法及其相关应用

(57) 摘要

本发明描述了特异性结合神经节苷脂 GD2 的抗体。还描述了编码这些抗体的核苷酸、表达这些抗体的细胞、使用这些抗体的方法和使用抗体治疗与神经节苷脂 GD2 相关的疾病的方法。此外,描述了组织培养基增补剂以及使用增补剂的方法。本发明描述了白蛋白-神经节苷脂偶联物和生产这些偶联物的相应方法。还描述了纯化或分离抗体的方法。

CN 102164962 B



1. 分离的五聚的 IgM 抗体, 其与人类 GD2 特异性结合, 其中重链 CDR1 由 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列构成, 重链 CDR2 由 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列构成, 重链 CDR3 由 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列构成, 轻链 CDR1 由 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列构成, 轻链 CDR2 由 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列构成, 并且轻链 CDR3 由 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列构成, 其中五聚的抗体不包含 J-链。

2. 权利要求 1 的抗体, 其中抗体是人类抗体。

3. 权利要求 1 的抗体, 其中重链可变结构域由 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列构成。

4. 权利要求 1 的抗体, 其中轻链可变结构域由 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列构成。

5. 权利要求 1 的抗体, 其中重链由 SEQ ID NO:40 的氨基酸序列构成。

6. 权利要求 1 的抗体, 其中轻链由 SEQ ID NO:42 的氨基酸序列构成。

7. 权利要求 1 的抗体, 其介导补体依赖性细胞毒性。

8. 权利要求 1 的抗体, 其中抗体对 GD2 表现出  $4.5 \times 10^{-9}$  摩尔的稳态解离常数 ( $K_D$ )。

9. 一种多核苷酸, 其编码权利要求 1 的抗体。

10. 权利要求 9 的多核苷酸, 其中所述抗体的重链 CDR3 由 SEQ ID NO:4 的核酸序列编码。

11. 权利要求 10 的多核苷酸, 其中所述抗体的重链 CDR1 由 SEQ ID NO:2 的核酸序列编码, 所述抗体的重链 CDR2 由 SEQ ID NO:3 的核酸序列编码, 所述抗体的轻链 CDR1 由 SEQ ID NO:18 的核酸序列编码, 所述抗体的轻链 CDR2 由 SEQ ID NO:19 的核酸序列编码和所述抗体的轻链 CDR3 由 SEQ ID NO:20 的核酸序列编码。

12. 权利要求 9 的多核苷酸, 其中重链可变结构域由 SEQ ID NO:8 的核酸序列编码。

13. 权利要求 9 的多核苷酸, 其中轻链可变结构域由 SEQ ID NO:24 的核酸序列编码。

14. 权利要求 9 的多核苷酸, 其中重链由 SEQ ID NO:39 的核酸序列编码。

15. 权利要求 9 的多核苷酸, 其中轻链由 SEQ ID NO:41 的核酸序列编码。

16. 一种组合物, 其包含权利要求 1 的抗体以及可药用载体。

17. 一种载体, 其包含权利要求 10 的多核苷酸序列。

18. 一种细胞, 其包含权利要求 17 的载体。

19. 权利要求 18 的细胞, 其中细胞是细菌细胞。

20. 权利要求 18 的细胞, 其中细胞是真核细胞。

21. 权利要求 20 的细胞, 其中真核细胞是中华仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

22. 一种细胞, 其表达权利要求 1 的抗体。

23. 权利要求 22 的细胞, 其中细胞是杂交瘤。

24. 权利要求 22 的细胞, 其中细胞是转染瘤。

25. 权利要求 1-6 任一项的抗体在制备用于在对象中治疗或预防 GD2 相关疾病的药物中的应用。

26. 权利要求 25 的应用, 其中 GD2 相关疾病是癌症。

27. 权利要求 26 的应用, 其中 GD2 相关疾病是黑素瘤。

28. 权利要求 25 的应用, 其中对象是哺乳动物。

29. 权利要求 25 的应用, 其中对象是人。

30. 一种制造抗体的方法, 所述方法包含将权利要求 22 的细胞在适合于产生抗体的条

件下培养,以及从细胞培养物回收抗体。

31. 权利要求 1 的抗体在制备用于在对象中检测 GD2 表达细胞的试剂中的应用。
32. 权利要求 31 的应用,其中抗体被可检测地标记。
33. 权利要求 32 的应用,其中可检测标记物是碘 -131。

## 抗 GD2 抗体和方法及其相关应用

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2008 年 6 月 30 日提交的美国临时申请 No. 61/077, 041 和 2008 年 9 月 15 日提交的美国临时申请 No. 61/097, 034 的优先权, 二者在此引为参考。

### 技术领域

[0003] 总的来说, 本发明涉及免疫治疗剂领域。更具体来说, 本发明涉及与神经节苷脂结合的单克隆抗体, 以及使用这样的抗体对需要治疗的对象进行治疗的方法。还提供了将所述抗体用于诊断和治疗目的的方法。此外, 还提供了与培养表达所述抗体的细胞相关的组织培养基组合物和方法, 以及用于纯化或分离所述抗体的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 癌症在美国是死亡的第二大主因。美国国立卫生研究院 (U. S. National Institutes of Health (NIH)) 的国立癌症研究所 (National Cancer Institute (NCI)) 估计, 在 2008 年, 将有超过五十万人死于癌症, 并将有超过一百四十万人被诊断患有癌症。正在进行全球性的研究尝试以开发癌症的治疗方法并增加对如何预防癌症的全面了解, 其中一些国家例如英国、美国等, 将癌症相关的研究作为顶级优先。例如, NIH 已拨出超过 50 亿美元专款用于在 2008 财政年度资助癌症相关研究, 几乎为向其他严重疾病例如 HIV 和心脏病提供的资助量的两倍。

[0006] 有超过 100 种不同类型的癌症。尽管癌症具有广泛多样性, 但大多数与癌症相关的死亡由几种常见癌症引起, 例如肺癌、结肠直肠癌和乳腺癌。NCI 估计, 这三种类型的癌症将在 2008 年引起超过 25 万人死亡。尽管致死性不如前面提到的癌症, 但皮肤癌占到美国所有新诊断癌症的大约一半, 使其成为最常见的癌症类型。在各种不同类型的皮肤癌中, 黑素瘤是最罕见并且致死率最高的。美国癌症学会 (American Cancer Society) 估计, 尽管黑素瘤仅占美国所有诊断到的皮肤癌的 4%, 但它导致 79% 的与皮肤癌相关的死亡。

[0007] 癌症的成功治疗通常归功于早期诊断和治疗。诊断癌症的有力方法是检测已知与癌症相关的肿瘤标志物。肿瘤标志物是由肿瘤细胞产生或由体内其他细胞对癌症做出响应产生的物质, 通常为蛋白。肿瘤标志物可以在血液、尿液、肿瘤细胞的表面上、或其他非癌性细胞和组织上 (或其中) 发现。神经节苷脂已被鉴定为与许多肿瘤相关的一种标志物类型 (Hakomori, 99 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 10718 (2002))。

[0008] 神经节苷脂是具有至少一个糖连接的唾液酸的鞘糖脂。这些化合物是细胞质膜的成分, 据认为在各种生物功能例如细胞生长、细胞分化、细胞信号传导中发挥中心作用, 并作为微生物毒素的受体 (Jacques 等, 40rg. Biomol. Chem. 142 (2006))。已经鉴定到超过 40 种不同的神经节苷脂; 但是, 其中的某一亚组 GM3、GM2、GD3 和 GD2, 通常由肿瘤细胞过表达 (同上)。此外, 据报道神经节苷脂在人类中是高度免疫原性的。高免疫原性和被肿瘤细胞过表达的组, 使神经节苷脂成为癌症治疗的潜在靶。

[0009] 已经开发了神经节苷脂特异性单克隆抗体, 并且在某些病例中检验了在人类中的效力 (一般性论述参见 Azuma 等, 13 Clin. Cancer Res. 2745 (2007); Irie 等,

53 *Cancer Immunol. Immunother.* 110(2004); Irie 和 Morton, 83 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 8694(1986)。与人类 GD2 特异性抗体相关的最早报道之一由 Cahan 等提供 (79 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 7629(1982))。免疫疗法研究显示, 对于使用黑素瘤疫苗预防接种的患者来说, 更高的存活率与神经节苷脂特异性 IgM 而不是 IgG 相关 (Jones 等, 66 *J. Natl. Cancer Inst.* 249(1981))。与该发现一致的是, 与针对神经节苷脂 GD2 和 GD3 的 IgM 抗体相关的人类研究, 已经为使用这些抗体作为黑素瘤的可能疗法提供了鼓励性结果 (Irie 等, 53 *Cancer Immunol. Immunother.* 110; Irie 和 Morton, 83 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 8694(1986))。

[0010] IgM 是五种人类抗体同种型之一, 其他四种是 IgG、IgA、IgE 和 IgD。典型情况下, IgM 是在体液免疫应答中产生的第一种抗体, 这是因为 IgM 重链恒定区基因的位置使其不需同种型转换即可产生 (Charles A. Janeway 等, 《免疫学》(9-12) (第五版) (*Immunobiology* 9-12(5<sup>th</sup>ed. 2001))。因为 IgM 通常在遗传成熟发生之前产生, 因此这类抗体同种型与其他同种型相比典型地对给定抗原具有较低亲和性 (同上)。IgM 通过形成聚合物补偿其低的亲和性, 所述聚合物的形成增加了抗体分子的亲和力 (同上)。聚合的 IgM 通常形成为与 J-链 (~ 15kD 的促进抗体聚合的分子) 相连的五聚体; 但是, 在缺少 J-链的情况下它也可以聚合成五聚体或六聚体 (同上, 在 4-19 中)。在某些情况下, IgM 的聚合状态允许其在病原体存在下介导补体途径的高效活化。例如, 含有 J-链的五聚体 IgM, 除非当与抗原结合时经历结构变化, 否则通常不能有效活化补体 (同上, 在 9-17 中)。相反, 已显示不含 J-链的或六聚体 IgM 活化补体的能力比五聚体 IgM 好高达 100 倍 (Weirisma 等, 160 *J. Immunol.* 5979(1998))。

[0011] 癌症是全球性健康问题。尽管在各种形式癌症的治疗中已取得进展, 但仍需要改进的疗法。免疫疗法被认为对于癌症治疗具有极大潜力。特异性针对癌细胞表达的抗原的 IgM 抗体, 可能被证明是有效的癌症治疗剂。

#### [0012] 发明概述

[0013] 本文描述了与神经节苷脂 GD2 特异性结合的分离的抗体和抗原结合片段。在某些实施方案中, 抗体或抗原结合片段是 IgM。在某些实施方案中, 抗体或抗原结合片段是五聚体或六聚体。尽管抗体或抗原结合片段可以是人类、人源化或嵌合的, 但优选的抗体或抗原结合片段是人类的。抗体或抗原结合片段可以包含具有与 SEQ ID NO:40 基本上相同或一致的氨基酸序列的重链和具有与 SEQ ID NO:42 基本上相同或一致的氨基酸序列的轻链。在某些实施方案中, 抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO:10 基本上相同或一致的重链 CDR1 氨基酸序列。在某些实施方案中, 抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO:11 基本上相同或一致的重链 CDR2 氨基酸序列。在某些实施方案中, 抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO:12 基本上相同或一致的重链 CDR3 氨基酸序列。在某些实施方案中, 抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO:26 基本上相同或一致的轻链 CDR1 氨基酸序列。在某些实施方案中, 抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO:27 基本上相同或一致的轻链 CDR2 氨基酸序列。在某些实施方案中, 抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO:28 基本上相同或一致的轻链 CDR3 氨基酸序列。抗体或抗原结合片段可以包含具有与 SEQ ID NO:10 基本上相同或一致的 CDR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:11 基本上相同或一致的 CDR2 氨基酸序列以及与 SEQ ID NO:12 基本上相同或一致的 CDR3 氨基酸序列的重链。抗体或抗

原结合片段可以包含具有与 SEQ ID NO:26 基本上相同或一致的 CDR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:27 基本上相同或一致的 CDR2 氨基酸序列以及与 SEQ ID NO:28 基本上相同或一致的 CDR3 氨基酸序列的轻链。抗体或抗原结合片段可以包含具有与 SEQ ID NO:10 基本上相同或一致的 CDR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:11 基本上相同或一致的 CDR2 氨基酸序列以及 SEQ ID NO:12 基本上相同或一致的 CDR3 氨基酸序列的重链,并且还包含具有与 SEQ ID NO:26 基本上相同或一致的 CDR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:27 基本上相同或一致的 CDR2 氨基酸序列以及 SEQ ID NO:28 基本上相同或一致的 CDR3 氨基酸序列的轻链。

[0014] 抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO:13 基本上相同或一致的重链 FWR1 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段包含与 SEQ ID NO:14 基本上相同或一致的重链 FWR2 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段包含与 SEQ ID NO:15 基本上相同或一致的重链 FWR3 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段包含与 SEQ ID NO:29 基本上相同或一致的轻链 FWR1 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段包含与 SEQ ID NO:30 基本上相同或一致的轻链 FWR2 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段包含与 SEQ ID NO:31 基本上相同或一致的轻链 FWR3 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段包含具有与 SEQ ID NO:13 基本上相同或一致的 FWR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:14 基本上相同或一致的 FWR2 氨基酸序列以及 SEQ ID NO:15 基本上相同或一致的 FWR3 氨基酸序列的重链。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段包含具有与 SEQ ID NO:29 基本上相同或一致的 FWR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:30 基本上相同或一致的 FWR2 氨基酸序列以及 SEQ ID NO:31 基本上相同或一致的 FWR3 氨基酸序列的轻链。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包含重链和轻链,其中重链包含与 SEQ ID NO:13 基本上相同或一致的 FWR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:14 基本上相同或一致的 FWR2 氨基酸序列以及 SEQ ID NO:15 基本上相同或一致的 FWR3 氨基酸序列,并且轻链包含与 SEQ ID NO:29 基本上相同或一致的 FWR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:30 基本上相同或一致的 FWR2 氨基酸序列以及 SEQ ID NO:31 基本上相同或一致的 FWR3 氨基酸序列。

[0015] 在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段包含具有与 SEQ ID NO:10 基本上相同或一致的 CDR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:11 基本上相同或一致的 CDR2 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:12 基本上相同或一致的 CDR3 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:13 基本上相同或一致的 FWR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:14 基本上相同或一致的 FWR2 氨基酸序列以及 SEQ ID NO:15 基本上相同或一致的 FWR3 氨基酸序列的重链。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段包括具有与 SEQ ID NO:26 基本上相同或一致的 CDR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:27 基本上相同或一致的 CDR2 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:28 基本上相同或一致的 CDR3 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:29 基本上相同或一致的 FWR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:30 基本上相同或一致的 FWR2 氨基酸序列以及 SEQ ID NO:31 基本上相同或一致的 FWR3 氨基酸序列的轻链。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段具有重链和轻链,其中重链具有与 SEQ ID NO:10 基本上相同或一致的 CDR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:11 基本上相同或一致的 CDR2 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:12 基本上相同或一致的 CDR3 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:13 基本上相同或一致的 FWR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:14 基本上相同或一致的 FWR2 氨基酸序列以及 SEQ ID NO:15 基本上相同或一致的 FWR3 氨基酸序列,并且轻链具有与 SEQ ID

NO :26 基本上相同或一致的 CDR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO :27 基本上相同或一致的 CDR2 氨基酸序列、与 SEQ ID NO :28 基本上相同或一致的 CDR3 氨基酸序列、与 SEQ ID NO :29 基本上相同或一致的 FWR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO :30 基本上相同或一致的 FWR2 氨基酸序列以及 SEQ ID NO :31 基本上相同或一致的 FWR3 氨基酸序列。也可以使用抗体样蛋白作为 CDR 支架对 CDR 和 FWR 的抗原结合排列进行工程化。这样的工程化的抗原结合蛋白在本公开的范围之内。

[0016] 所述抗体或抗原结合片段可以包含具有与 SEQ ID NO :40 基本上相同或一致的氨基酸序列的重链。在某些实施方案中,与 SEQ ID NO :39 基本上相同或一致的多核苷酸可以编码该重链氨基酸序列。所述抗体或抗原结合片段可以包含具有与 SEQ ID NO :42 基本上相同或一致的氨基酸序列的轻链。在某些实施方案中,与 SEQ ID NO :41 基本上相同或一致的多核苷酸可以编码该轻链氨基酸序列。所述抗体或抗原结合片段可以包含重链和轻链,其中重链具有与 SEQ ID NO :40 基本上相同或一致的氨基酸序列,并且轻链具有与 SEQ ID NO :42 基本上相同或一致的氨基酸序列。

[0017] 在某些实施方案中,抗体由 2008 年 7 月 16 日保藏在美国典型培养物保藏中心(Amer. Type Cult. Coll. (10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209)) 并已被分配登记号 No. PTA-9376 的抗体产生细胞所产生。在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段具有由保藏的抗体产生细胞所产生的抗体的 GD2 结合亲和性。在某些实施方案中,所公开的抗体或其抗原结合片段包含由保藏的抗体产生细胞所产生的抗体的重链和轻链 CDR。在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含由保藏的抗体产生细胞所产生的抗体的重链和轻链可变区。在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段表现出与保藏的抗体产生细胞所产生的抗体基本上相同或更高的补体依赖性细胞毒性活性。此外,与保藏的细胞所产生的抗体竞争与 GD2 结合的抗体或其抗原结合片段,也被考虑到包含在本文描述的抗体的范围内。例如,如果抗体阻止或阻碍了其他抗体与不存在竞争性抗体的情况下原本能够结合的抗原性位点的结合,那么所述抗体可以与其他抗体或抗原结合片段竞争。

[0018] 还公开了编码与 GD2 特异性结合的抗体或抗原结合片段的多核苷酸。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO :10 基本上相同或一致的重链 CDR1 序列,例如 SEQ ID NO :2。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO :11 基本上相同或一致的重链 CDR2,例如 SEQ ID NO :3。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO :12 基本上相同或一致的重链 CDR3,例如 SEQ ID NO :4。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO :26 基本上相同或一致的轻链 CDR1,例如 SEQ ID NO :18。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO :27 基本上相同或一致的轻链 CDR2,例如 SEQ ID NO :19。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO :28 基本上相同或一致的轻链 CDR3,例如 SEQ ID NO :20。多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段可以具有与 SEQ ID NO :10 基本上相同或一致的重链 CDR1 例如 SEQ ID NO :2、与 SEQ ID NO :11 基本上相同或一致的重链 CDR2 例如 SEQ ID NO :3 以及与 SEQ ID NO :12 基本上相同或一致的重链 CDR3 例如 SEQ ID NO :4。多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段可以具有与 SEQ ID NO :26 基本上相同或一致的轻链 CDR1 例如 SEQ ID NO :18、与 SEQ ID NO :27 基本上相同或一致的 CDR2 例如 SEQ ID NO :19 以及与 SEQ ID NO :28

基本上相同或一致的 CDR3 例如 SEQ ID NO :20。多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段可以具有与 SEQ ID NO :10 基本上相同或一致的重链 CDR1 例如 SEQ ID NO :2、与 SEQ ID NO :11 基本上相同或一致的 CDR2 例如 SEQ ID NO :3, 和与 SEQ ID NO :12 基本上相同或一致的 CDR3 例如 SEQ ID NO :4, 以及与 SEQ ID NO :26 基本上相同或一致的轻链 CDR1 例如 SEQ ID NO :18、与 SEQ ID NO :27 基本上相同或一致的 CDR2 例如 SEQ ID NO :19 和与 SEQ ID NO :28 基本上相同或一致的 CDR3 例如 SEQ ID NO :20。也可以使用抗体样蛋白作为 CDR 支架对 CDR 的抗原结合排列进行工程化。这样的工程化的抗原结合蛋白在本公开的范围內。

[0019] 在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO :13 基本上相同或一致的重链 FWR1, 例如 SEQ ID NO :5。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO :14 基本上相同或一致的重链 FWR2, 例如 SEQ ID NO :6。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO :15 基本上相同或一致的重链 FWR3, 例如 SEQ ID NO :7。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO :29 基本上相同或一致的轻链 FWR1, 例如 SEQ ID NO :21。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO :30 基本上相同或一致的轻链 FWR2, 例如 SEQ ID NO :22。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO :31 基本上相同或一致的轻链 FWR3, 例如 SEQ ID NO :23。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO :13 基本上相同或一致的重链 FWR1 例如 SEQ ID NO :5、与 SEQ ID NO :14 基本上相同或一致的重链 FWR2 例如 SEQ ID NO :6 和与 SEQ ID NO :15 基本上相同或一致的重链 FWR3 例如 SEQ ID NO :7。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO :29 基本上相同或一致的轻链 FWR1 例如 SEQ ID NO :21、与 SEQ ID NO :30 基本上相同或一致的轻链 FWR2 例如 SEQ ID NO :22 和与 SEQ ID NO :31 基本上相同或一致的轻链 FWR3 例如 SEQ ID NO :23。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有重链和轻链,其中重链 FWR1 与 SEQ ID NO :13 基本上相同或一致,例如 SEQ ID NO :5,重链 FWR2 与 SEQ ID NO :14 基本上相同或一致,例如 SEQ ID NO :6,重链 FWR3 与 SEQ ID NO :15 基本上相同或一致,例如 SEQ ID NO :7;并且轻链 FWR1 与 SEQ ID NO :29 基本上相同或一致,例如 SEQ ID NO :21,轻链 FWR2 与 SEQ ID NO :30 基本上相同或一致,例如 SEQ ID NO :22,轻链 FWR3 与 SEQ ID NO :31 基本上相同或一致,例如 SEQ ID NO :23。

[0020] 在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO :10 基本上相同或一致的重链 CDR1 例如 SEQ ID NO :2、与 SEQ ID NO :11 基本上相同或一致的重链 CDR2 例如 SEQ ID NO :3、与 SEQ ID NO :12 基本上相同或一致的重链 CDR3 例如 SEQ ID NO :4、与 SEQ ID NO :13 基本上相同或一致的重链 FWR1 例如 SEQ ID NO :5、与 SEQ ID NO :14 基本上相同或一致的重链 FWR2 例如 SEQ ID NO :6 以及与 SEQ ID NO :15 基本上相同或一致的重链 FWR3 例如 SEQ ID NO :7。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO :26 基本上相同或一致的轻链 CDR1 例如 SEQ ID NO :18、与 SEQ ID NO :27 基本上相同或一致的轻链 CDR2 例如 SEQ ID NO :19、与 SEQ ID NO :28 基本上相同或一致的轻链 CDR3 例如 SEQ ID NO :20、与 SEQ ID NO :29 基本上相同或一致的轻链 FWR1 例如 SEQ ID NO :21、与 SEQ ID NO :30 基本上相同或一致的轻链 FWR2 例如 SEQ ID NO :22 以及 SEQ ID NO :31 基本上相同或一致的轻链 FWR3 例如 SEQ ID NO :23。

[0021] 在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有重链和轻链,其中多核苷酸编码与 SEQ ID NO:10 基本上相同或一致的重链 CDR1 例如 SEQ ID NO:2、与 SEQ ID NO:11 基本上相同或一致的重链 CDR2 例如 SEQ ID NO:3、与 SEQ ID NO:12 基本上相同或一致的重链 CDR3 例如 SEQ ID NO:4、与 SEQ ID NO:13 基本上相同或一致的重链 FWR1 例如 SEQ ID NO:5、与 SEQ ID NO:14 基本上相同或一致的重链 FWR2 例如 SEQ ID NO:6、与 SEQ ID NO:15 基本上相同或一致的重链 FWR3 例如 SEQ ID NO:7、以及与 SEQ ID NO:26 基本上相同或一致的轻链 CDR1 例如 SEQ ID NO:18、与 SEQ ID NO:27 基本上相同或一致的轻链 CDR2 例如 SEQ ID NO:19、与 SEQ ID NO:28 基本上相同或一致的轻链 CDR3 例如 SEQ ID NO:20、与 SEQ ID NO:29 基本上相同或一致的轻链 FWR1 例如 SEQ ID NO:21、与 SEQ ID NO:30 基本上相同或一致的轻链 FWR2 例如 SEQ ID NO:22 和与 SEQ ID NO:31 基本上相同或一致的轻链 FWR3 例如 SEQ ID NO:23。编码工程化的抗原结合蛋白的多核苷酸也在本公开的范围之内。

[0022] 提供了包含编码抗体和抗原结合片段的多核苷酸的载体,以及表达与 GD2 特异性结合的抗体或抗原结合片段的细胞。

[0023] 本文描述了用于在需要治疗的对象中治疗或预防 GD2 相关疾病的方法。在某些实施方案中, GD2 相关疾病是癌症。在某些实施方案中, GD2 相关疾病是黑素瘤。方法包含以有效治疗或预防 GD2 相关疾病的量向对象给药与 GD2 特异性结合的抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,方法包含给药包括抗体或其抗原结合片段和可药用载体的药物组合物。在某些情况下,抗体或其抗原结合片段是 IgM 抗体或抗原结合片段。在某些实施方案中,所述在对象中治疗或预防 GD2 相关疾病的方法,可以使用与本文描述的 GD2 特异性抗体竞争结合的抗体或抗原结合片段来进行。

[0024] 本文描述了用于在体内或体外检测 GD2 表达细胞的方法。方法可以包括向对象给药本文描述的与 GD2 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,以允许在对象中进行检测或定位。在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以被可检测地标记。这样的可检测标记物可以包括荧光标记物、放射性标记物、生物素等。可选地,在某些实施方案中, GD2 特异性抗体或抗原结合片段没有被标记,而是通过被可检测地标记的第二抗体进行检测。在某些实施方案中,所述检测方法可以使用与本文描述的 GD2 特异性抗体和抗原结合片段竞争结合的抗体或抗原结合片段来进行。

[0025] 本文描述了制造和纯化或分离 IgM 抗体或其抗原结合片段的方法。方法包括将宿主细胞在适合于生产抗体或抗原结合片段的条件下培养,从细胞培养物回收抗体或抗原结合片段,以及纯化或分离回收到的抗体或抗原结合片段。还描述了纯化或分离 IgM 抗体或抗原结合片段的方法,包括任选地使用去污剂清洗抗体或抗原结合片段,将包含抗体或抗原结合片段的溶液施加于亲和层析柱,将来自于亲和层析柱的洗脱液施加于阳离子交换层析柱,以及将来自于阳离子交换层析柱的洗脱液施加于羟基磷灰石层析柱,并回收来自于羟基磷灰石层析柱的洗脱液。

[0026] 其他方法包括通过用包含氨基酸、糖和维生素的组合物补充细胞培养基以增加培养的真核细胞的生活力。在某些实施方案中,组合物可以包含葡萄糖、谷氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、组氨酸、苏氨酸、精氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、脯氨酸、烟酰胺、盐酸吡哆辛、叶酸、维生素 B12、核黄素和盐酸硫胺

素。本文还描述了通过被修饰以产生蛋白的细胞增加蛋白产量的方法。在一种情况下,这些方法包括给细胞生长培养基添加戊酸。

[0027] 本文描述了白蛋白、例如牛血清白蛋白 (BSA) 与神经节苷脂的蛋白偶联物,以及用于生产这种蛋白偶联物的方法。在一个实施方案中,被偶联的神经节苷脂可以是 GD2。在一个实施方案中,被偶联的神经节苷脂可以是 GM2。在一个实施方案中,被偶联的神经节苷脂可以是 GM3。在一个实施方案中,通过还原胺化将白蛋白偶联到神经节苷脂的糖部分的还原末端。在一个实施方案中,还原胺化由氰基硼氢钠催化。

#### [0028] 附图简述

[0029] 图 1 显示了通过 ELISA 测定的在用 Epstein-Barr 病毒转化的人类淋巴瘤细胞合并物 (HLP) 的上清液中存在的抗体的可变的抗原特异性。图 1A 证实了来自第 2 (浓缩 8.1X) 或第 4 次细胞传代的 HLP 的浓缩细胞培养上清液含有特异性针对 GD2 的 IgM 抗体。图 1B 证实了来自 HLP 的细胞培养上清液含有与神经节苷脂 GD1a、GD2、GM2 和 GM3 结合的 IgM 抗体。

[0030] 图 2 显示了正如通过荧光活化的细胞分拣 (FACS) 所分析的由 HLP 细胞培养物产生的 IgM 抗体在表达 GD2 的 1205LU 黑素瘤细胞上的结合水平。图 2A 用作阴性对照,显示了在不存在 GD2 特异性第一抗体下的结合。图 2B 和 2C 显示了从分别浓缩到 8.1X 或 14.2X 的细胞培养上清液获得的 HLP 产生的 IgM 的结合。图 2D 显示了由鼠类杂交瘤 HB-8568™ (ATCC#HB 8568™) 产生并用作阳性对照的鼠类 GD2 特异性 IgM 抗体的结合。

[0031] 图 3 显示了使用了来自自由 HLP 衍生的杂交瘤产生的杂交瘤克隆的耗尽的培养基的抗原特异性 ELISA。图 3A 显示了在杂交瘤 3B2、5D7 和 10B4 的培养基中包含的 IgM 抗体对神经节苷脂 GD2、GD1a、GM2 和 GM3 的结合特性。图 3B 显示了在 1470 杂交瘤亚克隆的培养基中包含的 IgM 抗体对神经节苷脂 GD2、GD1a、GM2 和 GM3 的结合特性。

[0032] 图 4 显示了通过 FACS 进行分析的由杂交瘤 3B2 和 1470 细胞培养物产生的 IgM 抗体在表达 GD2 的 1205LU 黑素瘤细胞上的结合水平。图 4A 用作阴性对照,显示了在不存在 GD2 特异性第一抗体抗体的情况下缺乏结合。图 4B 用作阳性对照,显示了由 HB-8568™ 细胞产生的鼠类 GD2 特异性 IgM 抗体的结合。图 4C 和 D 分别显示了由 3B2 和 1470 杂交瘤细胞产生的 IgM 的结合。

[0033] 图 5 显示了由从杂交瘤 3B2 组织培养上清液获得的 IgM 或非 GD2 特异性人类 IgM (nhIgM) 介导的补体依赖性细胞毒性 (CDC) 所引起的细胞死亡。

[0034] 图 6 提供了对 AB527 抗体重链和轻链区段进行克隆的示意图。

[0035] 图 7 提供了 AB527 表达载体的示意图。

[0036] 图 8 图示了通过表面等离子体共振测量的 AB527 对神经节苷脂 GD2、GM2 和 GD3 的结合活性。

[0037] 图 9 提供了通过表面等离子体共振测量的 AB527 结合平衡的图形显示,用于区分与 GD2 结合的抗体的浓度。

[0038] 图 10 显示了通过薄层层析分离的各种不同神经节苷脂的染色图样。地衣酚染色显示了非特异性神经节苷脂染色,其为与 AB527 染色进行比较提供了基础。

[0039] 图 11 显示了 AB527 与在细胞表面上表达 GD2 (细胞系: M14、M0023、M101、M18、M10-Vac、PM0496) 或缺少 GD2 表达 (GD2 阴性细胞系: M21、M238、IMCD0023、MG1055) 的人类

黑素瘤细胞系的结合的流式细胞术（第 I 和 II 列）和比较性的光学显微术和免疫荧光显微术照片（第 II 和 IV 列）。

[0040] 图 12 提供了饱和结合曲线和相应的 Scatchard 图的图形显示,用于 AB527 与 EL4 细胞结合的性质研究。

[0041] 图 13 显示了 GD2 阳性 (M14) 和阴性 (MG1055、RPMI7951 和 JS0592) 黑素瘤细胞系的 AB527 染色。免疫组织化学分析使用生物素酰化的 AB527 (图 13A) 或生物素酰化的非 GD2 特异性的对照 IgM (图 13B) 进行。

[0042] 图 14 显示了 M14 肿瘤切片与生物素酰化的 hIgM 不具有免疫反应性 (14a),但是与生物素酰化的 AB527 显示出免疫反应性 (14b)。

[0043] 图 15 显示了由从杂交瘤 AB527-HYB-3B2-3C9 获得的 IgM 或 AB527IgM 所介导的 GD2 阳性或 GD2 阴性细胞的补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的比较。

[0044] 图 16 是在存在或不存在补体的情况下 AB527 介导的对表达 GD2 (M14) 或不表达 GD2 (1205LU) 的人类肿瘤细胞的 CDC 的图形显示。

[0045] 图 17 显示了非特异性人类 IgM AB527、非特异性 hIgG 和具有 IgG1 恒定区的同种型转换后的 AB527 的 CDC 活性的相对程度。

[0046] 图 18 显示了带有或不带有 J-链 (JC) 的 AB527 抗体的 CDC 活性的相对程度。

[0047] 图 19 显示了施加到蛋白 A 亲和层析柱的去污剂处理的调制过的培养上清液 (CCS) (上样) 和从 3M MgCl<sub>2</sub> 洗脱后的合并级份收集的材料 (洗脱液) 的还原性 SDS-PAGE 凝胶。箭头指向 IgM 重链 (~70kD) 和轻链 (~25kD)。

[0048] 图 20 显示了被不同量的 MacroCap™ SP 阳离子交换树脂捕获的 AB527 的还原性 SDS-PAGE 凝胶。箭头指向 IgM 重链 (~70kD) 和轻链 (~25kD)。

[0049] 图 21 显示了在将不同体积的 AB527 中间体施加到 MacroCap™ SP 阳离子交换树脂后的流过液 (图 21A) 或洗脱液 (图 21B) 中不同形式的 AB527IgM 的相对量。

[0050] 图 22 显示了来自孔径排阻 HPLC 的层析图,验证了在来自 MacroCap™ SP 柱的流过液 (图 22A) 和洗脱液 (图 22B) 中存在的物质的尺寸分布。

[0051] 图 23 提供了 AB527 与 GD2-BSA 偶联物结合的图形显示。

[0052] 图 24 提供了对 AB527 与 GD2-BSA、GM2-BSA 和 GM3-BSA 偶联物的结合进行比较的图形显示。

[0053] 图 25 显示了在含有 (培养基增补剂 (CMS)) 和不含 (CD CHO 对照) 添加的 CMS 的实施方案的培养基中培养的表达 AB527 的细胞的活细胞密度随时间变化的比较。

[0054] 图 26 显示了在含有 (CMS) 和不含 (CD CHO 对照) 添加的 CMS 的实施方案的培养基中培养的表达 AB527 的细胞的活细胞随时间变化的相对百分率。

[0055] 图 27 显示了在含有 (CMS) 和不含 (CD CHO 对照) 添加的 CMS 的实施方案的培养基中培养的表达 AB527 的细胞的积分活细胞密度 (IVC) 随时间的变化。

[0056] 图 28 显示了在含有 (CMS) 和不含 (CD CHO 对照) 添加的 CMS 的实施方案的培养基中培养的表达 AB527 的细胞,在培养 14 天后的总抗体产量。

[0057] 说明性实施方案的详细描述

[0058] 在整个说明书和权利要求书中使用了与本说明书的情况相关的各种不同术语。除非另有指明,否则这些术语将具有它们在本技术领域中的常见意义。其他具体定义的术语

应该以与本文提供的定义相一致的方式进行解释。

[0059] 当在本说明书和随附的权利要求书中使用时,单数形式的冠词包括复数指称,除非内容明确陈述不是这样。因此,例如指称“细胞”包括两个或多个细胞的组合等。

[0060] 本文中使用的术语“约”在指称可测量的值例如量、时间长度等时,打算涵盖与指定值偏离最多  $\pm 20\%$ ,只要这样的偏离适合于执行所公开的方法。除非另有指明,否则所有在本说明书和权利要求书中使用的表示成分的量、性质例如分子量、反应条件等的数值,应该被理解为在所有情况下被术语“约”修饰。因此,除非指明不是这样,否则在下面的说明书和随附的权利要求书中提出的数值参数都是近似值,其可以随着试图通过本发明获得的所需性质而变化。至少、并且不是试图将等价物的应用限于权利要求书的范围,每个数值参数应该至少根据所报道的有效数字的数量并通过使用常规的四舍五入技术来解释。

[0061] 尽管阐述了本发明的广泛范围的数值范围和参数是近似值,但在具体实例中提出的数值被报道得尽可能准确。但是,任何数值内在地包含在其相应测试测量值中发现的标准偏差所必然引起的某些误差。

[0062] 当在本文中使用时,术语“细胞毒性”或“细胞抑制”剂是指抑制细胞的生物过程或降低细胞的生存力或增殖潜力的药剂。细胞毒性或细胞抑制剂可以各种不同方式起作用,例如但不限于通过诱导 DNA 损伤、诱导细胞周期停止、抑制 DNA 合成、抑制转录、抑制翻译或蛋白质合成、抑制细胞分裂或诱导凋亡。当在本文中使用时,术语“化疗药剂”是指细胞毒性、细胞抑制和抗肿瘤剂,其优选杀死肿瘤细胞、抑制其生长或抑制其转移,或破坏快速增殖细胞的细胞周期。化疗药剂包括但不限于合成化合物、天然和重组细菌毒素、天然和重组真菌毒素、天然和重组植物毒素、可裂变核素和反射性核素。化疗药剂的具体实例包括但不限于商陆 (pokeweed) 抗病毒蛋白、红豆毒素、蓖麻毒素以及它们每个的 A 链、木鳖子素、皂草素、异株泻根毒蛋白 1、bouganin、花白树毒蛋白、白喉毒素、假单胞菌外毒素、志贺氏菌毒素、加里刹霉素、类美登醇、铅 -212、铋 -212、碲 -211、碘 -131、钷 -47、铯 -137、铯 -138、铯 -139、铯 -140、铯 -141、铯 -142、铯 -143、铯 -144、铯 -145、铯 -146、铯 -147、铯 -148、铯 -149、铯 -150、铯 -151、铯 -152、铯 -153、铯 -154、铯 -155、铯 -156、铯 -157、铯 -158、铯 -159、铯 -160、铯 -161、铯 -162、铯 -163、铯 -164、铯 -165、铯 -166、铯 -167、铯 -168、铯 -169、铯 -170、铯 -171、铯 -172、铯 -173、铯 -174、铯 -175、铯 -176、铯 -177、铯 -178、铯 -179、铯 -180、铯 -181、铯 -182、铯 -183、铯 -184、铯 -185、铯 -186、铯 -187、铯 -188、铯 -189、铯 -190、铯 -191、铯 -192、铯 -193、铯 -194、铯 -195、铯 -196、铯 -197、铯 -198、铯 -199、铯 -200、铯 -201、铯 -202、铯 -203、铯 -204、铯 -205、铯 -206、铯 -207、铯 -208、铯 -209、铯 -210、铯 -211、铯 -212、铯 -213、铯 -214、铯 -215、铯 -216、铯 -217、铯 -218、铯 -219、铯 -220、铯 -221、铯 -222、铯 -223、铯 -224、铯 -225、铯 -226、铯 -227、铯 -228、铯 -229、铯 -230、铯 -231、铯 -232、铯 -233、铯 -234、铯 -235、铯 -236、铯 -237、铯 -238、铯 -239、铯 -240、铯 -241、铯 -242、铯 -243、铯 -244、铯 -245、铯 -246、铯 -247、铯 -248、铯 -249、铯 -250、铯 -251、铯 -252、铯 -253、铯 -254、铯 -255、铯 -256、铯 -257、铯 -258、铯 -259、铯 -260、铯 -261、铯 -262、铯 -263、铯 -264、铯 -265、铯 -266、铯 -267、铯 -268、铯 -269、铯 -270、铯 -271、铯 -272、铯 -273、铯 -274、铯 -275、铯 -276、铯 -277、铯 -278、铯 -279、铯 -280、铯 -281、铯 -282、铯 -283、铯 -284、铯 -285、铯 -286、铯 -287、铯 -288、铯 -289、铯 -290、铯 -291、铯 -292、铯 -293、铯 -294、铯 -295、铯 -296、铯 -297、铯 -298、铯 -299、铯 -300、铯 -301、铯 -302、铯 -303、铯 -304、铯 -305、铯 -306、铯 -307、铯 -308、铯 -309、铯 -310、铯 -311、铯 -312、铯 -313、铯 -314、铯 -315、铯 -316、铯 -317、铯 -318、铯 -319、铯 -320、铯 -321、铯 -322、铯 -323、铯 -324、铯 -325、铯 -326、铯 -327、铯 -328、铯 -329、铯 -330、铯 -331、铯 -332、铯 -333、铯 -334、铯 -335、铯 -336、铯 -337、铯 -338、铯 -339、铯 -340、铯 -341、铯 -342、铯 -343、铯 -344、铯 -345、铯 -346、铯 -347、铯 -348、铯 -349、铯 -350、铯 -351、铯 -352、铯 -353、铯 -354、铯 -355、铯 -356、铯 -357、铯 -358、铯 -359、铯 -360、铯 -361、铯 -362、铯 -363、铯 -364、铯 -365、铯 -366、铯 -367、铯 -368、铯 -369、铯 -370、铯 -371、铯 -372、铯 -373、铯 -374、铯 -375、铯 -376、铯 -377、铯 -378、铯 -379、铯 -380、铯 -381、铯 -382、铯 -383、铯 -384、铯 -385、铯 -386、铯 -387、铯 -388、铯 -389、铯 -390、铯 -391、铯 -392、铯 -393、铯 -394、铯 -395、铯 -396、铯 -397、铯 -398、铯 -399、铯 -400、铯 -401、铯 -402、铯 -403、铯 -404、铯 -405、铯 -406、铯 -407、铯 -408、铯 -409、铯 -410、铯 -411、铯 -412、铯 -413、铯 -414、铯 -415、铯 -416、铯 -417、铯 -418、铯 -419、铯 -420、铯 -421、铯 -422、铯 -423、铯 -424、铯 -425、铯 -426、铯 -427、铯 -428、铯 -429、铯 -430、铯 -431、铯 -432、铯 -433、铯 -434、铯 -435、铯 -436、铯 -437、铯 -438、铯 -439、铯 -440、铯 -441、铯 -442、铯 -443、铯 -444、铯 -445、铯 -446、铯 -447、铯 -448、铯 -449、铯 -450、铯 -451、铯 -452、铯 -453、铯 -454、铯 -455、铯 -456、铯 -457、铯 -458、铯 -459、铯 -460、铯 -461、铯 -462、铯 -463、铯 -464、铯 -465、铯 -466、铯 -467、铯 -468、铯 -469、铯 -470、铯 -471、铯 -472、铯 -473、铯 -474、铯 -475、铯 -476、铯 -477、铯 -478、铯 -479、铯 -480、铯 -481、铯 -482、铯 -483、铯 -484、铯 -485、铯 -486、铯 -487、铯 -488、铯 -489、铯 -490、铯 -491、铯 -492、铯 -493、铯 -494、铯 -495、铯 -496、铯 -497、铯 -498、铯 -499、铯 -500、铯 -501、铯 -502、铯 -503、铯 -504、铯 -505、铯 -506、铯 -507、铯 -508、铯 -509、铯 -510、铯 -511、铯 -512、铯 -513、铯 -514、铯 -515、铯 -516、铯 -517、铯 -518、铯 -519、铯 -520、铯 -521、铯 -522、铯 -523、铯 -524、铯 -525、铯 -526、铯 -527、铯 -528、铯 -529、铯 -530、铯 -531、铯 -532、铯 -533、铯 -534、铯 -535、铯 -536、铯 -537、铯 -538、铯 -539、铯 -540、铯 -541、铯 -542、铯 -543、铯 -544、铯 -545、铯 -546、铯 -547、铯 -548、铯 -549、铯 -550、铯 -551、铯 -552、铯 -553、铯 -554、铯 -555、铯 -556、铯 -557、铯 -558、铯 -559、铯 -560、铯 -561、铯 -562、铯 -563、铯 -564、铯 -565、铯 -566、铯 -567、铯 -568、铯 -569、铯 -570、铯 -571、铯 -572、铯 -573、铯 -574、铯 -575、铯 -576、铯 -577、铯 -578、铯 -579、铯 -580、铯 -581、铯 -582、铯 -583、铯 -584、铯 -585、铯 -586、铯 -587、铯 -588、铯 -589、铯 -590、铯 -591、铯 -592、铯 -593、铯 -594、铯 -595、铯 -596、铯 -597、铯 -598、铯 -599、铯 -600、铯 -601、铯 -602、铯 -603、铯 -604、铯 -605、铯 -606、铯 -607、铯 -608、铯 -609、铯 -610、铯 -611、铯 -612、铯 -613、铯 -614、铯 -615、铯 -616、铯 -617、铯 -618、铯 -619、铯 -620、铯 -621、铯 -622、铯 -623、铯 -624、铯 -625、铯 -626、铯 -627、铯 -628、铯 -629、铯 -630、铯 -631、铯 -632、铯 -633、铯 -634、铯 -635、铯 -636、铯 -637、铯 -638、铯 -639、铯 -640、铯 -641、铯 -642、铯 -643、铯 -644、铯 -645、铯 -646、铯 -647、铯 -648、铯 -649、铯 -650、铯 -651、铯 -652、铯 -653、铯 -654、铯 -655、铯 -656、铯 -657、铯 -658、铯 -659、铯 -660、铯 -661、铯 -662、铯 -663、铯 -664、铯 -665、铯 -666、铯 -667、铯 -668、铯 -669、铯 -670、铯 -671、铯 -672、铯 -673、铯 -674、铯 -675、铯 -676、铯 -677、铯 -678、铯 -679、铯 -680、铯 -681、铯 -682、铯 -683、铯 -684、铯 -685、铯 -686、铯 -687、铯 -688、铯 -689、铯 -690、铯 -691、铯 -692、铯 -693、铯 -694、铯 -695、铯 -696、铯 -697、铯 -698、铯 -699、铯 -700、铯 -701、铯 -702、铯 -703、铯 -704、铯 -705、铯 -706、铯 -707、铯 -708、铯 -709、铯 -710、铯 -711、铯 -712、铯 -713、铯 -714、铯 -715、铯 -716、铯 -717、铯 -718、铯 -719、铯 -720、铯 -721、铯 -722、铯 -723、铯 -724、铯 -725、铯 -726、铯 -727、铯 -728、铯 -729、铯 -730、铯 -731、铯 -732、铯 -733、铯 -734、铯 -735、铯 -736、铯 -737、铯 -738、铯 -739、铯 -740、铯 -741、铯 -742、铯 -743、铯 -744、铯 -745、铯 -746、铯 -747、铯 -748、铯 -749、铯 -750、铯 -751、铯 -752、铯 -753、铯 -754、铯 -755、铯 -756、铯 -757、铯 -758、铯 -759、铯 -760、铯 -761、铯 -762、铯 -763、铯 -764、铯 -765、铯 -766、铯 -767、铯 -768、铯 -769、铯 -770、铯 -771、铯 -772、铯 -773、铯 -774、铯 -775、铯 -776、铯 -777、铯 -778、铯 -779、铯 -780、铯 -781、铯 -782、铯 -783、铯 -784、铯 -785、铯 -786、铯 -787、铯 -788、铯 -789、铯 -790、铯 -791、铯 -792、铯 -793、铯 -794、铯 -795、铯 -796、铯 -797、铯 -798、铯 -799、铯 -800、铯 -801、铯 -802、铯 -803、铯 -804、铯 -805、铯 -806、铯 -807、铯 -808、铯 -809、铯 -810、铯 -811、铯 -812、铯 -813、铯 -814、铯 -815、铯 -816、铯 -817、铯 -818、铯 -819、铯 -820、铯 -821、铯 -822、铯 -823、铯 -824、铯 -825、铯 -826、铯 -827、铯 -828、铯 -829、铯 -830、铯 -831、铯 -832、铯 -833、铯 -834、铯 -835、铯 -836、铯 -837、铯 -838、铯 -839、铯 -840、铯 -841、铯 -842、铯 -843、铯 -844、铯 -845、铯 -846、铯 -847、铯 -848、铯 -849、铯 -850、铯 -851、铯 -852、铯 -853、铯 -854、铯 -855、铯 -856、铯 -857、铯 -858、铯 -859、铯 -860、铯 -861、铯 -862、铯 -863、铯 -864、铯 -865、铯 -866、铯 -867、铯 -868、铯 -869、铯 -870、铯 -871、铯 -872、铯 -873、铯 -874、铯 -875、铯 -876、铯 -877、铯 -878、铯 -879、铯 -880、铯 -881、铯 -882、铯 -883、铯 -884、铯 -885、铯 -886、铯 -887、铯 -888、铯 -889、铯 -890、铯 -891、铯 -892、铯 -893、铯 -894、铯 -895、铯 -896、铯 -897、铯 -898、铯 -899、铯 -900、铯 -901、铯 -902、铯 -903、铯 -904、铯 -905、铯 -906、铯 -907、铯 -908、铯 -909、铯 -910、铯 -911、铯 -912、铯 -913、铯 -914、铯 -915、铯 -916、铯 -917、铯 -918、铯 -919、铯 -920、铯 -921、铯 -922、铯 -923、铯 -924、铯 -925、铯 -926、铯 -927、铯 -928、铯 -929、铯 -930、铯 -931、铯 -932、铯 -933、铯 -934、铯 -935、铯 -936、铯 -937、铯 -938、铯 -939、铯 -940、铯 -941、铯 -942、铯 -943、铯 -944、铯 -945、铯 -946、铯 -947、铯 -948、铯 -949、铯 -950、铯 -951、铯 -952、铯 -953、铯 -954、铯 -955、铯 -956、铯 -957、铯 -958、铯 -959、铯 -960、铯 -961、铯 -962、铯 -963、铯 -964、铯 -965、铯 -966、铯 -967、铯 -968、铯 -969、铯 -970、铯 -971、铯 -972、铯 -973、铯 -974、铯 -975、铯 -976、铯 -977、铯 -978、铯 -979、铯 -980、铯 -981、铯 -982、铯 -983、铯 -984、铯 -985、铯 -986、铯 -987、铯 -988、铯 -989、铯 -990、铯 -991、铯 -992、铯 -993、铯 -994、铯 -995、铯 -996、铯 -997、铯 -998、铯 -999、铯 -1000、铯 -1001、铯 -1002、铯 -1003、铯 -1004、铯 -1005、铯 -1006、铯 -1007、铯 -1008、铯 -1009、铯 -1010、铯 -1011、铯 -1012、铯 -1013、铯 -1014、铯 -1015、铯 -1016、铯 -1017、铯 -1018、铯 -1019、铯 -1020、铯 -1021、铯 -1022、铯 -1023、铯 -1024、铯 -1025、铯 -1026、铯 -1027、铯 -1028、铯 -1029、铯 -1030、铯 -1031、铯 -1032、铯 -1033、铯 -1034、铯 -1035、铯 -1036、铯 -1037、铯 -1038、铯 -1039、铯 -1040、铯 -1041、铯 -1042、铯 -1043、铯 -1044、铯 -1045、铯 -1046、铯 -1047、铯 -1048、铯 -1049、铯 -1050、铯 -1051、铯 -1052、铯 -1053、铯 -1054、铯 -1055、铯 -1056、铯 -1057、铯 -1058、铯 -1059、铯 -1060、铯 -1061、铯 -1062、铯 -1063、铯 -1064、铯 -1065、铯 -1066、铯 -1067、铯 -1068、铯 -1069、铯 -1070、铯 -1071、铯 -1072、铯 -1073、铯 -1074、铯 -1075、铯 -1076、铯 -1077、铯 -1078、铯 -1079、铯 -1080、铯 -1081、铯 -1082、铯 -1083、铯 -1084、铯 -1085、铯 -1086、铯 -1087、铯 -1088、铯 -1089、铯 -1090、铯 -1091、铯 -1092、铯 -1093、铯 -1094、铯 -1095、铯 -1096、铯 -1097、铯 -1098、铯 -1099、铯 -1100、铯 -1101、铯 -1102、铯 -1103、铯 -1104、铯 -1105、铯 -1106、铯 -1107、铯 -1108、铯 -1109、铯 -1110、铯 -1111、铯 -1112、铯 -1113、铯 -1114、铯 -1115、铯 -1116、铯 -1117、铯 -1118、铯 -1119、铯 -1120、铯 -1121、铯 -1122、铯 -1123、铯 -1124、铯 -1125、铯 -1126、铯 -1127、铯 -1128、铯 -1129、铯 -1130、铯 -1131、铯 -1132、铯 -1133、铯 -1134、铯 -1135、铯 -1136、铯 -1137、铯 -1138、铯 -1139、铯 -1140、铯 -1141、铯 -1142、铯 -1143、铯 -1144、铯 -1145、铯 -1146、铯 -1147、铯 -1148、铯 -1149、铯 -1150、铯 -1151、铯 -1152、铯 -1153、铯 -1154、铯 -1155、铯 -1156、铯 -1157、铯 -1158、铯 -1159、铯 -1160、铯 -1161、铯 -1162、铯 -1163、铯 -1164、铯 -1165、铯 -1166、铯 -1167、铯 -1168、铯 -1169、铯 -1170、铯 -1171、铯 -1172、铯 -1173、铯 -1174、铯 -1175、铯 -1176、铯 -1177、铯 -1178、铯 -1179、铯 -1180、铯 -1181、铯 -1182、铯 -1183、铯 -1184、铯 -1185、铯 -1186、铯 -1187、铯 -1188、铯 -1189、铯 -1190、铯 -1191、铯 -1192、铯 -1193、铯 -1194、铯 -1195、铯 -1196、铯 -1197、铯 -1198、铯 -1199、铯 -1200、铯 -1201、铯 -1202、铯 -1203、铯 -1204、铯 -1205、铯 -1206、铯 -1207、铯 -1208、铯 -1209、铯 -1210、铯 -1211、铯 -1212、铯 -1213、铯 -1214、铯 -1215、铯 -1216、铯 -1217、铯 -1218、铯 -1219、铯 -1220、铯 -1221、铯 -1222、铯 -1223、铯 -1224、铯 -1225、铯 -1226、铯 -1227、铯 -1228、铯 -1229、铯 -1230、铯 -1231、铯 -1232、铯 -1233、铯 -1234、铯 -1235、铯 -1236、铯 -1237、铯 -1238、铯 -1239、铯 -1240、铯 -1241、铯 -1242、铯 -1243、铯 -1244、铯 -1245、铯 -1246、铯 -1247、铯 -1248、铯 -1249、铯 -1250、铯 -1251、铯 -1252、铯 -1253、铯 -1254、铯 -1255、铯 -1256、铯 -1257、铯 -1258、铯 -1259、铯 -1260、铯 -1261、铯 -1262、铯 -1263、铯 -1264、铯 -1265、铯 -1266、铯 -1267、铯 -1268、铯 -1269、铯 -1270、铯 -1271、铯 -1272、铯 -1273、铯 -1274、铯 -1275、铯 -1276、铯 -1277、铯 -1278、铯 -1279、铯 -1280、铯 -1281、铯 -1282、铯 -1283、铯 -1284、铯 -1285、铯 -1286、铯 -1287、铯 -1288、铯 -1289、铯 -1290、铯 -1291、铯 -1292、铯 -1293、铯 -1294、铯 -1295、铯 -1296、铯 -1297、铯 -1298、铯 -1299、铯 -1300、铯 -1301、铯 -1302、铯 -1303、铯 -1304、铯 -1305、铯 -1306、铯 -1307、铯 -1308、铯 -1309、铯 -1310、铯 -1311、铯 -1312、铯 -1313、铯 -1314、铯 -1315、铯 -1316、铯 -1317、铯 -1318、铯 -1319、铯 -1320、铯 -1321、铯 -1322、铯 -1323、铯 -1324、铯 -1325、铯 -1326、铯 -1327、铯 -1328、铯 -1329、铯 -1330、铯 -1331、铯 -1332、铯 -1333、铯 -1334、铯 -1335、铯 -1336、铯 -1337、铯 -1338、铯 -1339、铯 -1340、铯 -1341、铯 -1342、铯 -1343、铯 -1344、铯 -1345、铯 -1346、铯 -1347、铯 -1348、铯 -1349、铯 -1350、铯 -1351、铯 -1352、铯 -1353、铯 -1354、铯 -1355、铯 -1356、铯 -1357、铯 -1358、铯 -1359、铯 -1360、铯 -1361、铯 -1362、铯 -1363、铯 -1364、铯 -1365、铯 -1366、铯 -1367、铯 -1368、铯 -1369、铯 -1370、铯 -1371、铯 -1372、铯 -1373、铯 -1374、铯 -1375、铯 -1376、铯 -1377、铯 -1378、铯 -1379、铯 -1380、铯 -1381、铯 -1382、铯 -1383、铯 -1384、铯 -1385、铯 -1386、铯 -1387、铯 -1388、铯 -1389、铯 -1390、铯 -1391、铯 -1392、铯 -1393、铯 -1394、铯 -1395、铯 -1396、铯 -1397、铯 -1398、铯 -1399、铯 -1400、铯 -1401、铯 -1402、铯 -1403、铯 -1404、铯 -1405、铯 -1406、铯 -1407、铯 -1408、铯 -1409、铯 -1410、铯 -1411、铯 -1412、铯 -1413、铯 -1414、铯 -1415、铯 -1416、铯 -1417、铯 -1418、铯 -1419、铯 -1420、铯 -1421、铯 -1422、铯 -1423、铯 -1424、铯 -1425、铯 -1426、铯 -1427、铯 -1428、铯 -1429、铯 -1430、铯 -1431、铯 -1432、铯 -1433、铯 -1434、铯 -1435、铯 -1436、铯 -1437、铯 -1438、铯 -1439、铯 -1440、铯 -1441、铯 -1442、铯 -1443、铯 -1444、铯 -1445、铯 -1446、铯 -1447、铯 -1448、铯 -1449、铯 -1450、铯 -1451、铯 -1452、铯 -1453、铯 -1454、铯 -1455、铯 -1456、铯 -1457、铯 -1458、铯 -1459、铯 -1460、铯 -1461、铯 -1462、铯 -1463、铯 -1464、铯 -1465、铯 -1466、铯 -1467、铯 -1468、铯 -1469、铯 -1470、铯 -1471、铯 -1472、铯 -1473、铯 -1474、铯 -1475、铯 -1476、铯 -1477、铯 -1478、铯 -1479、铯 -1480、铯 -1481、铯 -1482、铯 -1483、铯 -1484、铯 -1485、铯 -1486、铯 -1487、铯 -1488、铯 -1489、铯 -1490、铯 -1491、铯 -1492、铯 -1493、铯 -1494、铯 -1495、铯 -1496、铯 -1497、铯 -1498、铯 -1499、铯 -1500、铯 -1501、铯 -1502、铯 -1503、铯 -1504、铯 -1505、铯 -1506、铯 -1507、铯 -1508、铯 -1509、铯 -1510、铯 -1511、铯 -1512、铯 -1513、铯 -1514、铯 -1515、铯 -1516、铯 -1517、铯 -1518、铯 -1519、铯 -1520、铯 -1521、铯 -1522、铯 -1523、铯 -1524、铯 -1525、铯 -1526、铯 -1527、铯 -1528、铯 -1529、铯 -1530、铯 -1531、铯 -1532、铯 -1533、铯 -1534、铯 -1535、铯 -1536、铯 -1537、铯 -1538、铯 -1539、铯 -1540、铯 -1541、铯 -1542、铯 -1543、铯 -1544、铯 -1545、铯 -1546、铯 -1547、铯 -1548、铯 -1549、铯 -1550、铯 -1551、铯 -1552、铯 -1553、铯 -1554、铯 -1555、铯 -1556、铯 -1557、铯 -1558、铯 -1559、铯 -1560、铯 -1561、铯 -1562、铯 -1563、铯 -1564、铯 -1565、铯 -1566、铯 -1567、铯 -1568、铯 -1569、铯 -1570、铯 -1571、铯 -1572、铯 -1573、铯 -1574、铯 -1575、铯 -1576、铯 -1577、铯 -1578、铯 -1579、铯 -1580、铯 -1581、铯 -1582、铯 -1583、铯 -1584、铯 -1585、铯 -1586、铯 -1587、铯 -1588、铯 -1589、铯 -1590、铯 -1591、铯 -1592、铯 -1593、铯 -1594、铯 -1595、铯 -1596、铯 -1597、铯 -1598、铯 -1599、铯 -1600、铯 -1601、铯 -1602、铯 -1603、铯 -1604、铯 -1605、铯 -1606、铯 -1607、铯 -1608、铯 -1609、铯 -1610、铯 -1611、铯 -1612、铯 -1613、铯 -1614、铯 -1615、铯 -1616、铯 -1617、铯 -1618、铯 -1619、铯 -1620、铯 -1621、铯 -1622、铯 -1623、铯 -1624、铯 -1625、铯 -1626、铯 -1627、铯 -1628、铯 -1629、铯 -1630、铯 -1631、铯 -1632、铯 -1633、铯 -1634、铯 -1635、铯 -1636、铯 -1637、铯 -1638、铯 -1639、铯 -1640、铯 -1641、铯 -1642、铯 -1643、铯 -1644、铯 -1645、铯 -1646、铯 -1647、铯 -1648、铯 -1649、铯 -1650、铯 -1651、铯 -1652、铯 -1653、铯 -1654、铯 -1655、铯 -1656、铯 -1657、铯 -1658、铯 -1659、铯 -1660、铯 -1661、铯 -1662、铯 -1663、铯 -1664、铯 -1665、铯 -1666、铯 -1667、铯 -1668、铯 -1669、铯 -1670、铯 -1671、铯 -1672、铯 -1673、铯 -1674、铯 -1675、铯 -1676、铯 -1677、铯 -1678、铯 -1679、铯 -1680、铯 -1681、铯 -1682、铯 -1683、铯 -1684、铯 -1685、铯 -1686、铯 -1687、铯 -1688、铯 -1689、铯 -1690、铯 -1

有修饰骨架的 DNA 或 RNA。“修饰”碱基包括例如三苯甲基碱基和不常用碱基例如次黄苷。可以对 DNA 和 RNA 进行各种不同修饰；因此，“多核苷酸”包含在自然界中典型地发现的化学、酶或代谢修饰的多核苷酸形式，以及病毒和细胞特征性的 DNA 和 RNA 的化学形式。“多核苷酸”也包含相对短的核酸链，其通常被称为寡核苷酸。

[0065] “基本上相同的”对于核酸或氨基酸序列来说，是指两个或多个序列之间至少 65% 的同源性。优选情况下，该术语是指两个或多个序列之间至少 70% 的同源性、更优选至少 75% 的同源性、更优选至少 80% 的同源性、更优选至少 85% 的同源性、更优选至少 90% 的同源性、更优选至少 91% 的同源性、更优选至少 92% 的同源性、更优选至少 93% 的同源性、更优选至少 94% 的同源性、更优选至少 95% 的同源性、更优选至少 96% 的同源性、更优选至少 97% 的同源性、更优选至少 98% 的同源性以及更优选至少 99% 或以上的同源性。这样的同源性可以使用 mBLAST 算法确定 (Altschul 等, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA87 : 2264-8 ;Karlin 和 Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA90 :5873-7)。

[0066] “载体”是复制子，例如质粒、噬菌体、粘粒或病毒，其中可以可操作地插入另一个核酸区段以便引起区段的复制或表达。

[0067] 术语“可操作连接”或“可操作插入”是指将编码序列表达所需的调控序列置于核酸分子中相对于编码序列的适合位置，以便能够表达编码序列。例如，当启动子能够控制编码序列的转录或表达时，启动子与该编码序列可操作连接。编码序列可以在正义或反义方向中与启动子或调控序列可操作连接。术语“可操作连接”有时应用于表达载体中其他转录控制元件（例如增强子）的排列。

[0068] 当外源或异源核酸例如 DNA 已被导入细胞时，细胞已被“转化”。转化 DNA 可以是或者可以不整合（共价连接）到细胞的基因组中。例如在原核生物、酵母和哺乳动物细胞中，转化 DNA 可以维持在游离体元件例如质粒中。对于真核细胞来说，稳定转化的细胞或“稳定细胞”，通过真核细胞建立由含有转化 DNA 的子细胞群所构成的细胞系或克隆的能力来证明。“克隆”是由单一细胞或共同祖先通过有丝分裂产生的细胞群。“细胞系”是原始细胞能够在体外稳定生长许多代的克隆。在本文提供的一些实例中，通过用 DNA 转染细胞来转化细胞。

[0069] “多肽”是指任何包含两个或两个以上氨基酸的肽或蛋白，其中氨基酸由肽键或修饰的肽键、即肽等排体彼此相连。“多肽”是指通常被称为肽、寡肽或寡聚物的短链多肽，以及通常称为蛋白的较长链多肽。多肽可以包含 20 种基因编码的氨基酸之外的氨基酸。“多肽”包括通过自然过程例如翻译后加工、或通过本技术领域公知的化学修饰技术修饰的氨基酸序列。这样的修饰已在基础教科书、单行本和研究文献中详细描述。修饰可以发生在多肽中的任何位置，包括肽骨架、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。同一类型的修饰可以相同或不同程度存在于给定多肽中的几个位点处。此外，给定多肽可以包含许多类型的修饰。多肽可以由于遍在蛋白化而分支，并且它们可以是环状的，带有或不带有分支。环状、分支和分支环状多肽可以产生自天然的翻译后加工，或可以通过合成方法制造。修饰包括乙酰化、酰基化、ADP-核糖基化、酰胺化、共价连接核黄素、共价连接血红素部分、共价连接核苷酸或核苷酸衍生物、共价连接脂或脂衍生物、共价连接磷脂酰肌醇、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、形成共价交联、形成胱氨酸、形成焦谷氨酸、甲酰化、 $\gamma$ -羧化、糖基化、GPI 锚形成、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰化、氧化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊二烯化、消旋化、

硒化、硫化、转运 RNA 介导的向蛋白添加氨基酸例如精氨酰化和遍在蛋白化（参见例如《蛋白质——结构与分子性质》（第二版）(Proteins-Structure and Molecular Properties, 2nd Ed.), T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993 和 Wold, F., 《翻译后蛋白修饰：前景与远景》(Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects) 的第 1-12 页, 在“蛋白质的翻译后共价修饰” (Posttranslational Covalent Modification of Proteins) 中, B. C. Johnson 主编, Academic Press, New York, 1983; Seifter 等, “蛋白修饰和无蛋白辅因子的分析” (Analysis for Protein Modifications and Nonprotein Cofactors), Meth Enzymol (1990) 182 :626-646 和 Rattan 等, “蛋白质合成：翻译后修饰和老化” (Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging), Ann NY Acad Sci (1992) 663 :48-62)。

[0070] “生物分子”包括蛋白质、多肽、核酸、脂类、单糖、多糖及其所有片段、类似物、同系物、偶联物及其衍生物。

[0071] 术语“表达”和“生产”在本文中同义使用, 是指基因产物的生物合成。这些术语包含基因转录成 RNA。这些术语也包含 RNA 翻译成一个或多个多肽, 并进一步包含所有天然发生的转录后和翻译后修饰。抗体或其抗原结合片段的表达或生产可以在细胞的细胞质中, 或在细胞外环境例如细胞培养物的生长培养基中。

[0072] 术语“治疗 (treating)”或“治疗 (treatment)”是指损伤、疾病或病症的减弱或改善的任何成功或成功的迹象, 包括任何主观或客观参数, 例如症状的抑制、减退、减轻或使损伤、疾病或病症更能被患者耐受, 减慢退化或衰弱的速率, 使退化的终点更强、改善对象的生理或心理健康、或延长存活时间。治疗可以通过主观或客观参数进行评估, 其包括身体检查、神经学检查或精神评估的结果。

[0073] “有效量”和“治疗有效量”在本文中可互换使用, 是指本文描述的抗体、抗原结合片段或抗体组合物的能够有效实现特定生物或治疗结果、例如但不限于本文中公开、描述或示例的生物或治疗结果的量。抗体或其抗原结合片段的治疗有效量可以随着各种因素而变, 例如个体的疾病状态、年龄、性别和体重, 以及抗体或其抗原结合片段在个体中引发所需应答的能力。这样的结果可以包括但不限于癌症的治疗, 正如通过本技术领域任何适合的手段所确定的。

[0074] “可药用的”是指从药理学 / 毒理学观点来看可以为患者所接受、并且在组合物、制剂、稳定性、患者接受性和生物可利用性方面从物理 / 化学的观点来看可以为制造药物化学家所接受的性质和物质。

[0075] “可药用载体”是指不干扰活性成分的生物活性有效性并对它所给药的宿主无毒性的介质。

[0076] 除非另有指明, 否则“抗体”是指免疫球蛋白的所有同种型 (IgG、IgA、IgE、IgM、IgD 和 IgY), 包括每种同种型的各种不同单体和聚合形式。

[0077] 抗原结合片段是对特定抗原表现出结合亲和性的蛋白质的结构。某些抗原结合片段由完整抗体的保留了亲本抗体分子的抗原结合特异性的部分构成。例如, 抗原结合片段可以包含已知与特定抗原结合的抗体的至少一个可变区 (重链或轻链可变区) 或一个或多个 CDR。适合的抗原结合片段的实例包括但不限于双链抗体和单链分子以及 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fc、Fabc 和 Fv 分子、单链 (Sc) 抗体、单个抗体轻链、单个抗体重链、抗体链或 CDR 与其他蛋

白、蛋白支架或分子之间的嵌合融合物、重链单体或二体、轻链单体或二体、由一个重链和一个轻链构成的二体等。所有抗体同种型可用于生产抗原结合片段。此外，抗原结合片段可以包括非抗体的蛋白质的架构，其可以成功地掺入多肽区段，掺入的方向赋予对给定目标抗原，例如蛋白支架的亲合性。抗原结合片段可以重组生产或通过完整抗体的酶或化学切割来生产。词组“抗体或其抗原结合片段”可用于表示给定的抗原结合片段包含在词组中指称的抗体的一个或多个氨基酸区段。

[0078] “抗体组合物”是指与至少一种可药用载体、化疗药剂或诊断部分例如  $^{111}\text{In}$ -1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸 ( $^{111}\text{In}$ -DOTA) 相结合的抗体或其结合片段。

[0079] “特异性结合”是指抗体或抗原结合片段以与它结合其他生物分子的亲合性相比更高的亲合性与特定生物分子结合的能力。

[0080] 本文描述的实施方案不限于具体方法、反应试剂、化合物、组合物或生物系统，它们当然能够变化。此外，本文中使用的术语仅仅是出于描述具体的抗体或抗原结合片段的目的，而不打算是限制性的。

[0081] GD2 特异性抗体

[0082] 本文描述了与神经节苷脂 GD2 特异性结合的分离的抗体或抗原结合片段。在一个实施方案中，抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体或抗原结合片段；但是，其他实施方案包括了 GD2 特异性单克隆抗体以及抗体的保留了对 GD2 的特异性的衍生物或片段。抗体分子的通用结构包括含有重链和轻链的抗原结合结构域，以及用于各种不同功能、包括补体结合的 Fc 结构域。在某些实施方案中，抗体或抗原结合片段介导补体依赖性细胞毒性。

[0083] 存在 5 种类型的免疫球蛋白，其中 FC 区域中重链的一级结构决定了免疫球蛋白类型。具体来说， $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$  和  $\mu$  链分别对应于 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM 同种型。所描述的抗体或抗原结合片段包括所有同种型和四链免疫球蛋白结构的合成的多体。所描述的抗体或抗原结合片段还包括通常在母鸡或火鸡血清和母鸡或火鸡蛋黄中发现的 IgY 同种型。抗体或抗原结合片段与抗原非共价、特异性并可逆地结合。

[0084] 所公开的主题内容的抗体或抗原结合片段可以源自于任何物种。例如，抗体或抗原结合片段可以是小鼠、大鼠、山羊、马、猪、牛、鸡、兔、驴、人类等的。为了在人类治疗中使用，非人类来源的抗体或抗原结合片段可以在遗传或结构上改变，以在给药于人类患者后具有较低抗原性。

[0085] 在某些实施方案中，抗体或抗原结合片段是嵌合的。当在本文中使用时，术语“嵌合”抗体或抗原结合片段是指这样的抗体或其抗原结合片段，其具有来自于非人类哺乳动物、啮齿动物或爬行类的抗体氨基酸序列的至少一个可变结构域的至少某些部分，同时抗体或其抗原结合片段的剩余部分源自于人类。例如，嵌合抗体可以包含小鼠的抗原结合结构域与人类的 Fc 或其他这样的结构性结构域。

[0086] 在某些实施方案中，抗体是人源化抗体。人源化抗体可以是包含源自于非人类免疫球蛋白的最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段（例如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 或抗体的其他抗原结合子序列）。对于其大部分来说，人源化抗体是人类免疫球蛋白（受体抗体），其中来自受体的互补性决定区（CDR）的残基被来自具有所需特异性、亲合性和能力的非人类物种（供体抗体），诸如小鼠，大鼠或兔的 CDR 的残基取代。在某些情

况下,人类免疫球蛋白的 Fv 构架区 (FWR) 残基被相应的非人类残基取代。此外,人源化抗体可以包含在受体抗体和输入的 CDR 或构架序列中都未发现的残基。进行这些修饰是为了进一步精炼和优化抗体的性能。一般来说,人源化抗体将包含基本上全部的至少一个、典型为两个可变结构域,其中所有或基本上所有 CDR 区对应于非人类免疫球蛋白的序列,并且所有或基本上所有 FWR 区是人类免疫球蛋白序列。最适情况下,人源化抗体还将包含免疫球蛋白恒定区 (Fc)、典型为人类免疫球蛋白的恒定区的至少一部分。对于进一步的详细情况,参见 Jones 等,321 Nature 522-5(1986);Reichmann 等,332 Nature 323-9(1988) 和 Presta,2 Curr. Op. Struct. Biol. 593-6(1992)。

[0087] 在某些情况下,所描述的抗体是人类抗体或其抗原结合片段。当在本文中使用时,术语“人类抗体”是指抗体完全是人类来源的,或抗体中的可变和恒定结构域序列是人类序列。该术语包含了具有源自于(即利用)人类基因的序列、但是其已被改变以例如降低可能的免疫原性、增加亲和性、消除可能引起不想要的折叠的半胱氨酸等的抗体。该术语包含在非人类细胞中重组生产的这样的抗体,其可以被赋予在人类细胞中典型不存在的糖基化。

[0088] 本文描述的抗体或抗原结合片段可以被标记或与各种不同化学或生物分子部分偶联,以例如用于治疗或诊断应用。部分可以是细胞毒性的,例如细菌毒素、病毒毒素、放射性同位素等。部分可以是可检测标记物,例如荧光标记物、放射性标记物、生物素等,例如  $^{111}\text{In}$ -DOTA、 $^{111}\text{In}$ -二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA),或放射性核素例如但不限于铅-212、铋-212、碲-211、碘-131、钷-47、铈-186、铈-188、钷-90、碘-123、碘-124、碘-125、溴-77、铟-111 和可裂变核素例如硼-10 或锶系元素。

[0089] 在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段与一种或多种化疗药剂偶联,所述化疗药剂例如但不限于放射性核素、毒素和细胞毒性和细胞抑制剂。在其他实施方案中,抗体或抗原结合片段与一种或多种化疗药剂组合使用。本文描述的抗体或抗原结合片段可以单独使用,或与(例如共给药或偶联)生物分子或化疗药剂例如细胞毒性或细胞抑制剂一起使用。在某些实施方案中,化疗药剂是放射性核素,包括但不限于铅-212、铋-212、碲-211、碘-131、钷-47、铈-186、铈-188、钷-90、碘-123、碘-124、碘-125、溴-77、铟-111 和可裂变核素例如硼-10 或锶系元素。在其他实施方案中,化疗药剂是毒素或细胞毒性药物、商陆抗病毒蛋白、红豆毒素、蓖麻毒素以及它们每个的 A 链、木鳖子素、皂草素、异株泻根毒蛋白 1、bouganin、花白树毒蛋白、白喉毒素、假单胞菌外毒素、志贺氏菌毒素、加里刹霉素、类美登醇、六甲蜜胺、放线菌素 D、普卡霉素、嘌呤霉素、短杆菌肽 D、多柔比星、秋水仙碱、细胞松弛素 B、环磷酰胺、依米丁、美登木素、安吡啶、顺铂、依托泊苷、依托泊苷邻醌物质、替尼泊苷、柔红霉素、吉西他滨、多柔比星、米托恩醌、比生群、博来霉素、甲氨蝶呤、培美曲塞、顺铂、长春地辛、阿霉素、长春新碱、长春碱、BCNU、紫杉烷类(例如 Taxol™)、它赛瓦、阿瓦斯丁、丝裂霉素、5-氟尿嘧啶、环磷酰胺、某些细胞因子例如 TNF- $\alpha$  和 TNF- $\beta$  等。将抗体或抗原结合片段与这些药剂偶联的方法在文献中是已知的。

[0090] 抗体特异性主要由 6 个 CDR 区、特别是 H 链 CDR3 决定(Kala 等,132 J. Biochem. 535-41(2002);Morea 等,275 J. Mol. Biol. 269-94(1998); 和 Chothia 等,196 J. Mol. Biol. 901-17(1987))。但是,抗体构架区可能在抗原-抗体相互作用中发挥作用(Panka 等,85 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 3080-4(1988)),特别是影响 CDR 环的构象(Foote 等,224 J. Mol. Biol. 487-99(1992))。因此,所描述的抗体或抗原结合片段可以包

含任何赋予对 GD2 的特异性的 H 或 L 链 CDR 或 FWR 区的组合。本技术领域常用的结构域改组实验 (Jirholt 等, 215 Gene 471-6(1998) ; **Söderlind** 等, 18 Nature Biotechnology 852-6(2000)), 可用于产生以本文中描述和示例的规格与 GD2 特异性结合的抗体。通过这样的结构域改组实验产生的抗体或抗原结合片段在本文描述的抗体或抗原结合片段的范围内。此外, 也可以通过对抗体样蛋白进行工程化以用作 CDR 支架, 将 CDR 排列以与给定抗原结合 (Nicaise 等, 13 Protein Sci. 1882(2004))。这样的抗原结合蛋白在本文描述的抗体的范围之内。

[0091] 本文描述的抗体或抗原结合片段可以各种不同的形式出现, 但是将包括表 1 中显示的一种或多种抗体区段。

[0092] 表 1、描述的抗体及其抗原结合片段的抗体区段 (“Lc”表示轻链以及“Hc”表示重链)。

[0093]

AB527 抗体区段	氨基酸 SEQ ID NO.	DNA SEQ ID NO.
Lc CDR1	26	18
Lc CDR2	27	19
Lc CDR3	28	20
Lc FWR1	29	21
Lc FWR2	30	22
Lc FWR3	31	23
Lc 可变结构域	32	24
轻链	42	41
Hc CDR1	10	2
Hc CDR2	11	3
Hc CDR3	12	4
Hc FWR1	13	5
Hc FWR2	14	6
Hc FWR3	15	7
Hc 可变结构域	16	8
重链	40	39

[0094] 在某些实施方案中, 抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO :10 基本上相同或

一致的重链 CDR1 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO :11 基本上相同或一致的重链 CDR2 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO :12 基本上相同或一致的重链 CDR3 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO :26 基本上相同或一致的轻链 CDR1 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO :27 基本上相同或一致的轻链 CDR2 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO :28 基本上相同或一致的轻链 CDR3 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO :10 基本上相同或一致的重链 CDR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO :11 基本上相同或一致的 CDR2 氨基酸序列和与 SEQ ID NO :12 基本上相同或一致的 CDR3 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO :26 基本上相同或一致的轻链 CDR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO :27 基本上相同或一致的 CDR2 氨基酸序列和与 SEQ ID NO :28 基本上相同或一致的 CDR3 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包含重链和轻链,其中重链具有与 SEQ ID NO :10 基本上相同或一致的 CDR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO :11 基本上相同或一致的 CDR2 氨基酸序列和与 SEQ ID NO :12 基本上相同或一致的 CDR3 氨基酸序列;并且轻链具有与 SEQ ID NO :26 基本上相同或一致的 CDR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO :27 基本上相同或一致的 CDR2 氨基酸序列和与 SEQ ID NO :28 基本上相同或一致的 CDR3 氨基酸序列。也可以使用抗体样蛋白作为 CDR 支架对 CDR 的抗原结合排列进行工程化。这样的工程化的抗原结合蛋白在本公开的范围內。

[0095] 在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO :13 基本上相同或一致的重链 FWR1 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO :14 基本上相同或一致的重链 FWR2 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO :15 基本上相同或一致的重链 FWR3 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO :29 基本上相同或一致的轻链 FWR1 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO :30 基本上相同或一致的轻链 FWR2 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包含与 SEQ ID NO :31 基本上相同或一致的轻链 FWR3 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包含重链,其具有与 SEQ ID NO :13 基本上相同或一致的 FWR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO :14 基本上相同或一致的 FWR2 氨基酸序列和与 SEQ ID NO :15 基本上相同或一致的 FWR3 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包含轻链,其具有与 SEQ ID NO :29 基本上相同或一致的 FWR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO :30 基本上相同或一致的 FWR2 氨基酸序列和与 SEQ ID NO :31 基本上相同或一致的 FWR3 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括重链和轻链,其中重链包括与 SEQ ID NO :13 基本上相同或一致的 FWR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO :14 基本上相同或一致的 FWR2 氨基酸序列和与 SEQ ID NO :15 基本上相同或一致的 FWR3 氨基酸序列;并且轻链包括与 SEQ ID NO :29 基本上相同或一致的 FWR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO :30 基本上相同或一致的 FWR2 氨基酸序列和与 SEQ ID NO :31 基本上相同或一致的 FWR3 氨基酸序列。

[0096] 在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包括重链,其具有与 SEQ ID NO :10 基本上相同或一致的 CDR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO :11 基本上相同或一致的 CDR2 氨基酸序列和与 SEQ ID NO :12 基本上相同或一致的 CDR3 氨基酸序列,以及与 SEQ ID NO :13 基

基本上相同或一致的 FWR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:14 基本上相同或一致的 FWR2 氨基酸序列和与 SEQ ID NO:15 基本上相同或一致的 FWR3 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段包括轻链,其具有与 SEQ ID NO:26 基本上相同或一致的 CDR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:27 基本上相同或一致的 CDR2 氨基酸序列和与 SEQ ID NO:28 基本上相同或一致的 CDR3 氨基酸序列,以及与 SEQ ID NO:29 基本上相同或一致的 FWR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:30 基本上相同或一致的 FWR2 氨基酸序列和与 SEQ ID NO:31 基本上相同或一致的 FWR3 氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段包括重链和轻链,其中重链包括与 SEQ ID NO:10 基本上相同或一致的 CDR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:11 基本上相同或一致的 CDR2 氨基酸序列和与 SEQ ID NO:12 基本上相同或一致的 CDR3 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:13 基本上相同或一致的 FWR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:14 基本上相同或一致的 FWR2 氨基酸序列和与 SEQ ID NO:15 基本上相同或一致的 FWR3 氨基酸序列;并且轻链包含与 SEQ ID NO:26 基本上相同或一致的 CDR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:27 基本上相同或一致的 CDR2 氨基酸序列和与 SEQ ID NO:28 基本上相同或一致的 CDR3 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:29 基本上相同或一致的 FWR1 氨基酸序列、与 SEQ ID NO:30 基本上相同或一致的 FWR2 氨基酸序列和与 SEQ ID NO:31 基本上相同或一致的 FWR3 氨基酸序列。也可以使用抗体样蛋白作为 CDR 支架对 CDR 和 FWR 的抗原结合排列进行工程化。这样的工程化的抗原结合蛋白在本公开的范围內。

[0097] 在某些实施方案中,本文描述的抗体或抗原结合片段具有包括与 SEQ ID NO:40 基本上相同或一致的氨基酸序列的重链。在某些实施方案中,本文描述的抗体或抗原结合片段具有包括与 SEQ ID NO:42 基本上相同或一致的氨基酸序列的轻链。所描述的抗体或抗原结合片段可以具有重链和轻链,其中重链包括与 SEQ ID NO:40 基本上相同或一致的氨基酸序列,并且轻链包括与 SEQ ID NO:42 基本上相同或一致的氨基酸序列。

[0098] 还描述了编码与 GD2 特异性结合的抗体或抗原结合片段的多核苷酸。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO:10 基本上相同或一致的重链 CDR1 序列,例如 SEQ ID NO:2。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO:11 基本上相同或一致的重链 CDR2,例如 SEQ ID NO:3。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO:12 基本上相同或一致的重链 CDR3,例如 SEQ ID NO:4。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO:26 基本上相同或一致的轻链 CDR1,例如 SEQ ID NO:18。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO:27 基本上相同或一致的轻链 CDR2,例如 SEQ ID NO:19。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与 SEQ ID NO:28 基本上相同或一致的轻链 CDR3,例如 SEQ ID NO:20。多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段可以具有重链,其带有与 SEQ ID NO:10 基本上相同或一致的 CDR1 例如 SEQ ID NO:2、与 SEQ ID NO:11 基本上相同或一致的 CDR2 例如 SEQ ID NO:3 以及与 SEQ ID NO:12 基本上相同或一致的 CDR3 例如 SEQ ID NO:4。多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段可以具有轻链,其带有与 SEQ ID NO:26 基本上相同或一致的 CDR1 例如 SEQ ID NO:18、与 SEQ ID NO:27 基本上相同或一致的 CDR2 例如 SEQ ID NO:19 以及与 SEQ ID NO:28 基本上相同或一致的 CDR3 例如 SEQ ID NO:20。多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段可以具有与 SEQ ID NO:10 基本上相同或一致的重链 CDR1 例如 SEQ ID NO:2、由与 SEQ

ID NO :11基本上相同或一致核苷酸序列编码的CDR2例如SEQ ID NO :3和由与SEQ ID NO :12基本上相同或一致的核苷酸序列编码的CDR3例如SEQ ID NO :4,以及与SEQ ID NO :26基本上相同或一致的轻链CDR1例如SEQ ID NO :18、与SEQ ID NO :27基本上相同或一致的CDR2例如SEQ ID NO :19和与SEQ ID NO :28基本上相同或一致的CDR3例如SEQ ID NO :20。

[0099] 在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO :13基本上相同或一致的重链FWR1,例如SEQ ID NO :5。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO :14基本上相同或一致的重链FWR2,例如SEQ ID NO :6。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO :15基本上相同或一致的重链FWR3,例如SEQ ID NO :7。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO :29基本上相同或一致的轻链FWR1,例如SEQ ID NO :21。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO :30基本上相同或一致的轻链FWR2,例如SEQ ID NO :22。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO :31基本上相同或一致的轻链FWR3,例如SEQ ID NO :23。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO :13基本上相同或一致的重链FWR1例如SEQ ID NO :5、与SEQ ID NO :14基本上相同或一致的FWR2例如SEQ ID NO :6和与SEQ ID NO :15基本上相同或一致的FWR3例如SEQ ID NO :7。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO :29基本上相同或一致的轻链FWR1例如SEQ ID NO :21、与SEQ ID NO :30基本上相同或一致的FWR2例如SEQ ID NO :22和与SEQ ID NO :31基本上相同或一致的FWR3例如SEQ ID NO :23。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有重链和轻链,其中重链FWR1与SEQ ID NO :13基本上相同或一致,例如SEQ ID NO :5,重链FWR2与SEQ ID NO :14基本上相同或一致,例如SEQ ID NO :6,重链FWR3与SEQ ID NO :15基本上相同或一致,例如SEQ ID NO :7;并且轻链FWR1与SEQ ID NO :29基本上相同或一致,例如SEQ ID NO :21,轻链FWR2与SEQ ID NO :30基本上相同或一致,例如SEQ ID NO :22,轻链FWR3与SEQ ID NO :31基本上相同或一致,例如SEQ ID NO :23。

[0100] 在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO :10基本上相同或一致的重链CDR1例如SEQ ID NO :2、与SEQ ID NO :11基本上相同或一致的重链CDR2例如SEQ ID NO :3、与SEQ ID NO :12基本上相同或一致的重链CDR3例如SEQ ID NO :4、与SEQ ID NO :13基本上相同或一致的重链FWR1例如SEQ ID NO :5、与SEQ ID NO :14基本上相同或一致的重链FWR2例如SEQ ID NO :6以及与SEQ ID NO :15基本上相同或一致的重链FWR3例如SEQ ID NO :7。在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO :26基本上相同或一致的轻链CDR1例如SEQ ID NO :18、与SEQ ID NO :27基本上相同或一致的轻链CDR2例如SEQ ID NO :19、与SEQ ID NO :28基本上相同或一致的轻链CDR3例如SEQ ID NO :20、与SEQ ID NO :29基本上相同或一致的轻链FWR1例如SEQ ID NO :21、与SEQ ID NO :30基本上相同或一致的轻链FWR2例如SEQ ID NO :22以及与SEQ ID NO :31基本上相同或一致的轻链FWR3例如SEQ ID NO :23。

[0101] 在某些实施方案中,多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段具有重链和轻链,其中多核苷酸编码与SEQ ID NO :10基本上相同或一致的重链CDR1例如SEQ ID NO :2、与SEQ

ID NO :11 基本上相同或一致的重链 CDR2 例如 SEQ ID NO :3、与 SEQ ID NO :12 基本上相同或一致的重链 CDR3 例如 SEQ ID NO :4、与 SEQ ID NO :13 基本上相同或一致的重链 FWR1 例如 SEQ ID NO :5、与 SEQ ID NO :14 基本上相同或一致的重链 FWR2 例如 SEQ ID NO :6、与 SEQ ID NO :15 基本上相同或一致的重链 FWR3 例如 SEQ ID NO :7、以及与 SEQ ID NO :26 基本上相同或一致的轻链 CDR1 例如 SEQ ID NO :18、与 SEQ ID NO :27 基本上相同或一致的轻链 CDR2 例如 SEQ ID NO :19、与 SEQ ID NO :28 基本上相同或一致的轻链 CDR3 例如 SEQ ID NO :20、与 SEQ ID NO :29 基本上相同或一致的轻链 FWR1 例如 SEQ ID NO :21、与 SEQ ID NO :30 基本上相同或一致的轻链 FWR2 例如 SEQ ID NO :22 和与 SEQ ID NO :31 基本上相同或一致的轻链 FWR3 例如 SEQ ID NO :23。

[0102] 编码工程化的抗原结合蛋白的多核苷酸也在本公开的范围內。

[0103] 在某些实施方案中,所描述的多核苷酸(以及它们编码的肽)包含前导序列。可以使用本技术领域已知的任何前导序列。前导序列可以包括但不限于限制性位点或翻译起始位点。在某些实施方案中,前导序列具有核酸序列 ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGT AGCAACAGCTACAGGTGTACACAGC(SEQ ID NO :43)。在某些实施方案中,前导序列编码氨基酸序列 MGWSCIILFLVATATGVHS(SEQ ID NO :44)。

[0104] 因为在重链和轻链以及编码它们的基因中可能存在天然序列变异,因此人们预计将在编码本文描述的抗体或抗原结合片段的氨基酸序列或编码基因中发现一定水平的变异,其对它们的独特结合性质(例如特异性和亲和性)具有很少或没有影响。这种预期部分是由于遗传密码的简并性,以及保守氨基酸序列变异的进化成功,其不显著改变被编码的蛋白的性质。因此,某些实施方案包括了与本文的抗体或抗原结合片段具有 90%、95%、96%、97%、98%或 99%同源性的抗体或抗原结合片段。其他实施方案包括 GD-2 特异性抗体或抗原结合片段,其所具有的构架、支架或其他非结合区与本文描述的抗体和抗原结合片段不具有显著的同源性,但是掺入了一个或多个提供结合所需的 CDR 或其他序列,其与本文描述的这种序列 90%、95%、96%、97%、98%或 99%同源。

[0105] 本文描述的抗体或抗原结合片段包括具有单个或多个氨基酸取代、缺失或添加、但保留了所描述的抗体或抗原结合片段的生物学性质(例如结合亲和性或免疫效应子活性)的变体。专业技术人员可以产生具有单个或多个氨基酸取代、缺失或添加的变体。这些变体可以包括:(a) 其中一个或多个氨基酸残基被保守或非保守氨基酸取代的变体,(b) 其中一个或多个氨基酸被添加到多肽中或从多肽中缺失的变体,(c) 其中一个或多个氨基酸包含取代基团的变体,以及(d) 其中多肽与另一个肽或多肽例如融合配偶体、蛋白标签或其他可以赋予多肽以有用性质的化学部分例如抗体的表位、多聚组氨酸序列、生物素部分等融合的变体。本文描述的抗体或抗原结合片段可以包含其中来自一个物种的在保守或非保守位置处的氨基酸被另一个物种中的相应残基取代的变体。在另一个实施方案中,非保守位置处的氨基酸残基被保守或非保守残基取代。用于获得这些变体的技术、包括遗传(抑制、缺失、突变等)、化学和酶学技术,对于本技术领域的普通专业人员来说是已知的。

[0106] 本文描述的抗体或抗原结合片段可以包含几种抗体同种型,例如 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。抗体或其抗原结合片段的特异性主要由氨基酸序列以及 CDR 的排列决定。因此,一个同种型的 CDR 可以转移到另一个同种型上而不改变抗原特异性。可替代地,已经建立了导致杂交瘤从产生一种抗体同种型转换成产生另一种同种型(同种型转换)而不改变

抗原特异性的技术。因此,这样的抗体同种型在所描述的抗体或抗原结合片段的范围内。

[0107] 改变抗体的同种型对于将抗体恒定区所赋予的不同效应子功能与抗原特异性相组合,可能是有用的。例如,IgG以单体形式产生,有效活化补体,并通常发现在血浆和身体的细胞内区室中。IgA作为单体和J-链连接的二体产生。IgA最通常发现在身体的腔体空间和乳汁中,因为二体形式可以穿过上皮细胞屏障运输。与IgA相似,IgM也可以形成聚合物,但是它倾向于当与J-链连接时形成五聚体,不与J-链连接时形成五聚体和六聚体。这些高度聚合的抗体通过增加亲合力而不降低亲和性来增加总体抗原结合能力。IgM的两种聚合形式都能有效活化补体,其能够引起补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0108] 在某些实施方案中,本文描述的抗体或抗原结合片段是聚合的IgM抗体或抗原结合片段。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段是与J-链相连的五聚体IgM抗体或抗原结合片段。在其他实施方案中,抗体或抗原结合片段是不与J-链相连的六聚体IgM抗体或抗原结合片段。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段是与J-链相连的五聚体IgM抗体或抗原结合片段。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段是与J-链相连的六聚体IgM抗体或抗原结合片段。

[0109] 本文描述的抗体或抗原结合片段所具有的对GD2的结合亲和性(单位为M)包括小于 $1 \times 10^{-2}$ 的解离常数( $K_D$ )。在某些实施方案中, $K_D$ 小于 $1 \times 10^{-3}$ 。在其他实施方案中, $K_D$ 小于 $1 \times 10^{-4}$ 。在某些实施方案中, $K_D$ 小于 $1 \times 10^{-5}$ 。在其他实施方案中, $K_D$ 小于 $1 \times 10^{-6}$ 、 $2 \times 10^{-6}$ 、 $3 \times 10^{-6}$ 、 $4 \times 10^{-6}$ 、 $5 \times 10^{-6}$ 、 $6 \times 10^{-6}$ 、 $7 \times 10^{-6}$ 、 $8 \times 10^{-6}$ 或 $9 \times 10^{-6}$ 。在其他实施方案中, $K_D$ 小于 $1 \times 10^{-7}$ 、 $2 \times 10^{-7}$ 或 $3 \times 10^{-7}$ 、 $2 \times 10^{-7}$ 、 $3 \times 10^{-7}$ 、 $4 \times 10^{-7}$ 、 $5 \times 10^{-7}$ 、 $6 \times 10^{-7}$ 、 $7 \times 10^{-7}$ 、 $8 \times 10^{-7}$ 或 $9 \times 10^{-7}$ 。在其他实施方案中, $K_D$ 小于 $1 \times 10^{-8}$ 、 $2 \times 10^{-8}$ 、 $3 \times 10^{-8}$ 、 $4 \times 10^{-8}$ 、 $5 \times 10^{-8}$ 、 $6 \times 10^{-8}$ 、 $7 \times 10^{-8}$ 、 $8 \times 10^{-8}$ 或 $9 \times 10^{-8}$ 。在其他实施方案中, $K_D$ 小于 $1 \times 10^{-9}$ 、 $2 \times 10^{-9}$ 、 $3 \times 10^{-9}$ 、 $4 \times 10^{-9}$ 、 $5 \times 10^{-9}$ 、 $6 \times 10^{-9}$ 、 $7 \times 10^{-9}$ 、 $8 \times 10^{-9}$ 或 $9 \times 10^{-9}$ 。在其他实施方案中, $K_D$ 小于 $1 \times 10^{-10}$ 、 $2 \times 10^{-10}$ 、 $3 \times 10^{-10}$ 、 $2 \times 10^{-10}$ 、 $3 \times 10^{-10}$ 、 $4 \times 10^{-10}$ 、 $5 \times 10^{-10}$ 、 $6 \times 10^{-10}$ 、 $7 \times 10^{-10}$ 、 $8 \times 10^{-10}$ 或 $9 \times 10^{-10}$ 。在其他实施方案中, $K_D$ 小于 $1 \times 10^{-11}$ 、 $2 \times 10^{-11}$ 、 $3 \times 10^{-11}$ 、 $4 \times 10^{-11}$ 、 $5 \times 10^{-11}$ 、 $6 \times 10^{-11}$ 、 $7 \times 10^{-11}$ 、 $8 \times 10^{-11}$ 或 $9 \times 10^{-11}$ 。在某些实施方案中, $K_D$ 小于 $1 \times 10^{-12}$ 。在其他实施方案中, $K_D$ 小于 $1 \times 10^{-13}$ 。在其他实施方案中, $K_D$ 小于 $1 \times 10^{-14}$ 。在其他实施方案中, $K_D$ 小于 $1 \times 10^{-15}$ 。在优选实施方案中, $K_D$ 为 $4.5 \times 10^{-9}$ 或以下。

[0110] 在某些实施方案中,本文描述的抗体或抗原结合片段对于GD2具有与GD1a、GM2或GM3每个形成对比的特异性结合亲和性。在某些实施方案中,对GD2的 $K_D$ 与对GD1a、GM2或GM3每个的 $K_D$ 的差异为至少3倍,优选为10倍。

[0111] 本文描述的抗体或抗原结合片段可以被修饰,例如通过向抗体或其抗原结合片段共价结合任何类型的分子,使得共价结合不阻止抗体或其抗原结合片段与其表位的结合。适合的修饰的实例包括但不限于糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化等。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段本身可以通过已知的保护/阻断基团、蛋白水解切割、与细胞配体或其他蛋白连接等进行衍生。抗体或抗原结合片段可以具有增加抗体或其抗原结合片段的活性或稳定性的翻译后部分。这些部分包括硫、甲基、糖类、磷以及其他通常在免疫球蛋白分子上发现的化学基团。此外,抗体或抗原结合片段可以包括一个或多个非典型氨基酸。

[0112] 本文描述的抗体或抗原结合片段可以用毒性或非毒性部分标记或与其偶联。毒性部分包括例如细菌毒素、病毒毒素、植物毒素、真菌毒素、放射性同位素等。抗体或抗原结合

片段可以被标记用于生物测定中（例如放射性同位素标记物、荧光标记物），以帮助检测抗体或抗原结合片段。抗体或抗原结合片段也可以出于诊断或治疗目的进行标记或偶联，例如使用直接向所需位点递送辐射的放射性同位素以应用于例如放射免疫治疗（Garmestani 等, 28 Nucl. Med. Biol. 409 (2001)）、成像技术和放射免疫引导的手术，或允许体内成像或检测特异性抗体 / 抗原复合物的标记物。抗体或抗原结合片段也可以与毒素偶联以提供免疫毒素（参见 Kreitman, R. J., 31 Adv. Drug Del. Rev. 53 (1998)）。

[0113] 本文描述了包含至少一种所述抗体或其抗原结合片段和可药用载体的组合物。这样的组合物可用于例如向患者给药以治疗癌症，例如在本文中所描述和示例的。组合物可以配制成本技术领域已知并且适合的任何各种不同制剂，包括在本文中描述的示例的。在某些实施方案中，组合物是水性制剂。水性溶液可以通过将抗体或抗原结合片段在水或适合的生理缓冲液中混合，并按照规定任选地添加适合的着色剂、香料、防腐剂、稳定剂和增稠剂等来制备。水性悬液也可以通过将抗体或抗原结合片段在水或生理缓冲液中，与粘性物质例如天然或合成胶质、树脂、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和其他公知的悬浮剂一起分散来制造。

[0114] 还包括液体制剂以及打算就在使用前转变成液体制剂的固体形式的制剂。这样的液体包括溶液、悬液、糖浆、浆液和乳液。液体制剂可以通过常规手段使用可药用添加剂来制备，所述添加剂例如悬浮剂（例如山梨糖醇糖浆、纤维素衍生物或氢化可食用脂肪或油）、乳化剂（例如卵磷脂或阿拉伯树胶）、非水性介质（例如杏仁油、油的酯或分馏的植物油）以及防腐剂（例如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯或山梨酸）。这些制剂除了活性药剂之外，可以包含着色剂、香料、稳定剂、缓冲剂、人造和天然甜味剂、分散剂、增稠剂、增溶剂等。组合物可以采用粉末或冷冻干燥的形式，用于在使用前用适合的介质例如无菌水、生理缓冲液、盐水溶液或醇配制。

[0115] 组合物可以配制成用于在对象中注射。对于注射来说，本文描述的组合物可以配制在水性溶液例如水或醇中，或配制在生理相容的缓冲液例如 Hanks' s 溶液、Ringer' s 溶液或生理盐水缓冲液中。溶液可以包含一种或多种配制用剂例如悬浮用剂、稳定用剂或分散用剂。注射制剂也可以制备成固体形式制剂，其打算就在使用前转变成适合于注射的液体形式制剂，例如通过在使用前用适合的介质例如无菌水、盐水溶液或醇配制。

[0116] 组合物可以配制在持续释放介质或储库型 (depot) 制剂中。这样的长效剂型可以通过植入（例如皮下或肌肉内）或通过肌肉内注射给药。因此，例如，组合物可以用适合的聚合或疏水材料（例如作为在可接受的油中的乳液）或离子交换树脂配制，或作为微溶的衍生物例如作为微溶的盐。脂质体和乳液是适合用作疏水药物载体的递送介质的众所周知的实例。

[0117] 本文公开了使用本文描述的抗体或抗原结合片段在体内或体外检测表达 GD-2 的细胞的方法。某些实施方案利用了与可检测标记物例如荧光标记物、放射性标记物、生物素、酶等偶联的本公开的抗体或抗原结合片段，这些标记物例如为  $^{111}\text{In}$ -DOTA、 $^{111}\text{In}$ -DTPA 或放射性核素，包括但不限于铅 -212、铋 -212、碲 -211、碘 -131、钷 -47、镱 -186、镱 -188、钷 -90、碘 -123、碘 -124、碘 -125、溴 -77、铟 -111 和可裂变核素例如硼 -10 或铀系元素。例如，可检测标记的抗体或抗原结合片段可以给药于对象，以检测和定位对象中表达 GD2 的细胞。这样的方法也能用于检测对象中相对于其他细胞或组织来说 GD2 表达高的细胞或组

织。或者,所公开的用于检测 GD-2 表达细胞方法的一个实施方案可以包括使用本文描述的可检测标记的抗体或抗原结合片段,来检测或定量从对象获得的细胞、例如从血样或组织活检样品获得的细胞的 GD2 表达。

[0118] 或者,所描述的使用所描述抗体或抗原结合片段检测 GD-2 表达细胞的方法,可以使用未标记的 GD2 特异性抗体来进行。例如,在一个实施方案中,可以通过首先向对象给药本文描述的 GD2 特异性抗体或抗原结合片段,然后给药能够与最初给药的 GD2 特异性抗体或抗原结合片段结合的可检测标记的第二抗体,来检测对象中的 GD-2 表达细胞。类似的方法可用于在体内检测 GD-2 表达细胞。

[0119] 本文还描述了用于在需要治疗或预防的对象中治疗或预防疾病的方法。在某些情况下,方法可以包括鉴定需要治疗或预防 GD2 相关疾病例如癌症例如黑素瘤的对象。其他实施方案包括用于诊断目的标记或偶联的抗体或其抗原结合片段,例如用向所需位点直接递送辐射的放射活性同位素,例如成像技术或特异性抗体 / 抗原复合物的检测。在一个实施方案中,方法包含以有效治疗或预防疾病的量向对象给药 GD2 特异性抗体或抗原结合片段,例如重组人类 GD2 特异性 IgM 抗体。在一种情况下,方法包括以有效治疗或预防疾病的量向对象给药组合物,例如本文中描述和示例的组合物,所述组合物包含可药用载体和至少一种与 GD2 特异性结合的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方案中,方法包括以有效治疗或预防疾病的量向对象给药至少一种抗体或抗原结合片段,例如本文中描述和示例的与 GD2 特异性结合的抗体或抗原结合片段。在一个实施方案中,方法包含向对象给药至少一种用本文示例的毒性或非毒性部分标记或与其偶联的 GD2 特异性抗体或其抗原结合片段。

[0120] 本文描述的抗体或抗原结合片段可以任何可接受的剂型例如胶囊、片剂、水性悬液、溶液等口服给药。抗体或抗原结合片段也可以肠胃外给药,包括但不限于:皮下、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鼻内、表面、鞘内、肝内、病灶内和颅内注射或灌注技术。可替代地,抗体或抗原结合片段将例如通过注射静脉内或腹膜内给药。

[0121] 对象可以是任何动物,优选为哺乳动物例如小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、猫、狗、猴、驴、奶牛、马、猪等。最优选情况下,哺乳动物是人类。在某些实施方案中,对象可以给药至少一种抗 GD2 抗体或其抗原结合片段,其每日剂量范围为每 kg 对象体重 0.01  $\mu$ g 到 500mg 抗体或其抗原结合片段。向对象给药的剂量也可以根据每天给药的至少一种抗 GD2 抗体或其抗原结合片段的总量来计算。在某些实施方案中,对象被每天给药 5 到 5000 毫克至少一种抗 GD2 抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,对象被每天给药多达 10 毫克至少一种抗 GD2 抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,对象被每天给药多达 100 毫克至少一种抗 GD2 抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,对象被每天给药多达 250 毫克至少一种抗 GD2 抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,对象被每天给药多达 500 毫克至少一种抗 GD2 抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,对象被每天给药多达 750 毫克至少一种抗 GD2 抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,对象被每天给药多达 1000 毫克至少一种抗 GD2 抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,对象被每天给药多达 1500 毫克至少一种抗 GD2 抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,对象被每天给药多达 2000 毫克至少一种抗 GD2 抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,对象被每天给药多达 2500 毫克至少一种抗 GD2 抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,对象被每天给

药多达 3000 毫克至少一种抗 GD2 抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,对象被每天给药多达 3500 毫克至少一种抗 GD2 抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,对象被每天给药多达 4000 毫克至少一种抗 GD2 抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,对象被每天给药多达 4500 毫克至少一种抗 GD2 抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,对象被每天给药多达 5000 毫克至少一种抗 GD2 抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段每周或每两周向对象给药。

[0122] 治疗可以使用比至少一种抗 GD2 抗体或抗原结合片段的最适剂量低的较小剂量开始,然后随着治疗的过程增加剂量,直到达到该环境下的最适效果。如果需要,可以将每日总剂量分开,并在一天中分部分给药。

[0123] 为了有效治疗 GD2 相关疾病,本技术领域的专业人员可以推荐对被治疗对象来说足够的用药日程表和剂量。只要需要,给药可以每天进行 1 到 4 次或以上。如果组合物被配制在持续释放介质中,可以较低频率进行给药。给药日程表也可以随着活性药物的浓度而变,活性药物浓度取决于对象的需要。

[0124] 还提供了包含本文描述的多核苷酸的载体。载体可以是表达载体。因此提供了含有目标多肽的编码序列的重组表达载体。表达载体可以包含一个或多个附加的序列,例如但不限于调控序列(例如启动子、增强子)、选择性标志物和多聚腺苷化信号。用于转化广泛不同宿主细胞的载体是众所周知的,并包括但不限于质粒、噬粒、粘粒、杆状病毒、杆粒、细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)以及其他细菌、酵母和病毒载体。

[0125] 本说明书范围内的重组表达载体包括合成的、基因组来源或 cDNA 来源的编码至少一个重组蛋白的核酸片段,其与适合的调控元件可操作连接。这样的调控元件可以包括转录启动子、编码适合的 mRNA 核糖体结合位点的序列,以及控制转录和翻译的终止的序列。表达载体、特别是哺乳动物表达载体,也可以包括一个或多个不转录的元件,例如复制原点、与待表达基因相连的适合的启动子和增强子、其他 5' 或 3' 侧翼的非转录序列、5' 或 3' 非翻译序列(例如必需的核糖体结合位点)、多聚腺苷化位点、剪接供体和受体位点或转录终止序列。也可以包含赋予在宿主中的复制能力的复制原点。

[0126] 在转化脊椎动物细胞中使用的表达载体中的转录和翻译控制序列,可以通过病毒来源提供。示例性载体可以按照 Okayama 和 Berg, 3Mol. Cell. Biol. 280 (1983) 的描述进行构建。

[0127] 在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段的编码序列置于强有力的组成型启动子控制之下,例如下列基因的启动子控制下:次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)、腺苷脱氨酶、丙酮酸激酶、 $\beta$ -肌动蛋白、人类肌球蛋白、人类血红蛋白、人类肌酸激酶等。此外,许多病毒启动子在真核细胞中组成性起作用,并适合用于所描述的实施方案。这样的病毒启动子包括但不限于细胞肥大病毒(CMV)立即早期启动子、SV40 的早期和晚期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、Maloney 白血病病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、Epstein Barr 病毒(EBV)、Rous 肉瘤病毒(RSV)和其他反转录病毒的长末端重复(LTR),以及单纯性疱疹病毒的胸苷激酶启动子。在一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段编码序列置于可诱导启动子,例如金属硫蛋白启动子、四环素可诱导启动子、强力霉素可诱导启动子、包含一个或多个干扰素刺激的响应元件(ISRE)例如蛋白激酶 R 2', 5' -寡腺苷酸合成酶、Mx 基因、ADAR1 等的启动子控制之下。

[0128] 本文描述的载体可以含有一个或多个内部核糖体进入位点 (IRES)。在融合载体中包含 IRES 序列,对于增加某些蛋白的表达可能是有益的。在某些实施方案中,载体系统将包括一个或多个多聚腺苷化位点(例如 SV40),其可以位于任何上面提到的核酸序列的上游或下游。载体成分可以连续相连,或排列成为基因产物的表达提供最适间距的方式(例如通过在 ORF 之间导入“间隔物”核苷酸)、或以另一种方式定位。也可以排列调控元件例如 IRES 基序以提供表达的最适间距。

[0129] 载体可以包含本技术领域中公知的选择性标志物。选择性标志物包括阳性和阴性选择性标志物,例如抗生素抗性基因(例如新霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、卡那霉素抗性基因、四环素抗性基因、青霉素抗性基因)、谷氨酰胺合成酶基因、HSV-TK、用于更昔洛韦筛选的 HSV-TK 衍生物或用于 6-甲基嘌呤筛选的细菌嘌呤核苷磷酸化酶基因(Gadi 等,7 Gene Ther. 1738-1743(2000))。编码选择性标志物的核酸序列或克隆位点可以在编码目标多肽的核酸序列或克隆位点的上游或下游。

[0130] 本文描述的载体可用于将编码所描述的抗体或抗原结合片段的基因转化各种细胞。例如,载体可用于产生抗体或抗原结合片段生产细胞。因此,另一方面描述了转化有载体的宿主细胞,所述载体包含与 GD2 特异性结合的抗体或其抗原结合片段、例如本文描述和示例的抗体或抗原结合片段的编码核酸序列。

[0131] 在本技术领域已知有大量用于将外来基因导入细胞的技术,它们可用于构建根据本文描述和示例的各种不同实施方案,用于执行本文描述的方法的重组体细胞。所使用的技术将为宿主细胞提供异源基因序列的稳定转移,使得异源基因序列可以被细胞后代继承并表达,并使受体细胞必需的发育和生理功能不被破坏。可以使用的技术包括但不限于染色体转移(例如细胞融合、染色体介导的基因转移、微细胞介导的基因转移)、物理方法(例如转染、原生质球融合、微注射、电穿孔、脂质体载体)、病毒载体转移(例如重组 DNA 病毒、重组 RNA 病毒)等(描述在 Cline, 29 Pharmac. Ther. 69-92(1985) 中)。磷酸钙沉淀和聚乙二醇(PEG)诱导的细菌原生质体与哺乳动物细胞的融合,也可用于转化细胞。

[0132] 适合用于本文描述的抗体或抗原结合片段的表达的细胞优选为真核细胞,更优选为植物、啮齿动物或人类来源的细胞,例如但不限于 NS0、CHO、perC. 6、Tk-ts13、BHK、HEK293 细胞、COS-7、T98G、CV-1/EBNA、L 细胞、C127、3T3、HeLa、NS1、Sp2/0 骨髓瘤细胞和 BHK 细胞系等。此外,抗体的表达可以使用杂交瘤细胞来实现。用于生产杂交瘤的方法在本技术领域是成熟的。

[0133] 可以对转化有本文描述的表达载体的细胞进行本文描述的抗体或抗原结合片段的重组表达的选择或筛选。将重组的阳性细胞扩增,并筛选表现出所需表型的亚克隆,所述表型例如高水平表达、生长性质改进或由于蛋白修饰或翻译后修饰的改变而产生具有所需生物化学特性的蛋白的能力。这些表型可能是由于给定亚克隆的固有性质或由于突变。突变可以通过使用化学物质、UV 波长光、辐射、病毒、插入诱变剂、DNA 错配修复的抑制或这些方法的组合来执行。

[0134] 一旦鉴定到表达所需蛋白的细胞后,可以对其进行扩增和选择。被转化的细胞可以多种方式进行选择。例如,可以筛选细胞的目标多肽的表达。转化有包含可选择标志物、例如产生荧光蛋白的载体的细胞,可以针对标志物的表达进行阳性筛选。在其他实施方案中,含有具有药物抗性基因的载体的细胞,可以针对在选择性条件下生长的能力进行阳性

筛选。

#### [0135] 试剂盒

[0136] 提供了用于在患者中抑制或减少癌细胞生长的试剂盒。还提供了用于在体外或体内鉴定发育异常的细胞的存在的方法的试剂盒。

[0137] 本文描述的试剂盒可以包含本文描述的抗体、其抗原结合片段或抗体组合物,以及用于在患者中抑制或降低肿瘤细胞生长的方法或在例如生物学样品中鉴定发育异常的细胞的存在的方法中使用试剂盒的说明书。试剂盒可以包含至少一种化疗或细胞毒性药剂。试剂盒可以包含抗叶酸化合物。试剂盒可以包含至少一种诊断试剂。诊断试剂的实例是可检测标记物,例如但不限于放射活性、荧光或发色试剂(例如<sup>111</sup>In-DOTA)。可检测标记物可以包括酶。试剂盒可以包含用于例如通过注射给药抗体或抗体组合物的说明书和手段。

#### [0138] BSA-神经节苷脂偶联物的应用和制造方法

[0139] 本文描述了白蛋白-神经节苷脂偶联物和用于生产这种偶联物的方法。为了确定目标抗体或抗原结合片段是否有效介导与给定抗原的结合,人们必须对抗体结合进行表征。由大量方法对抗体结合进行表征,例如斑点印迹、western 印迹、免疫沉淀测定法、ELISA、FACS 分析/流式细胞术和结合抗体的免疫荧光检测。尽管有各种不同的测定法可用于测试抗体结合,但对所用的具体测定法的选择必须着眼于对抗体目的的了解。例如,如果抗体或其抗原结合片段打算用于临床情况下,它应该通过以最类似于体内所发现的形式呈递目标抗原的测定法来进行表征。在这种情况下,以及在细胞表面蛋白的情况下,流式细胞术可能是有用的测定方法,因为它允许在天然抗原的背景下评估抗体或其抗原结合片段的相互作用。

[0140] 鉴定包含编码抗原特异性结合蛋白的载体的细胞的一种方法,是使用利用目标抗原的酶联免疫吸附分析(ELISA)。执行 ELISA 可以使用两种主要途径:间接 ELISA 和夹心 ELISA。为了执行间接 ELISA,将目标抗原吸附或固定到微量滴定板的表面上,然后向微量滴定板添加目标抗体或其抗原结合片段以检测抗原。相反,夹心 ELISA 除了待表征的抗体之外,还利用了已知对目标抗原特异的抗体。使用已知抗体包被微量滴定板,使得它能够在目标抗原被加到微量滴定板时结合或捕获目标抗原。一旦目标抗原被捕获后,向微量滴定板加入目标抗体或其抗原结合片段,以评估它对抗原的结合特性。在任一种情况下,结合的抗体或其抗原结合片段典型地通过对目标抗体或其抗原结合片段特异的酶偶联的第二抗体来检测。

[0141] 可用于定性神经节苷脂特异性抗体或抗原结合片段的 ELISA,可用于确定这些抗体或抗原结合片段的潜在应用。但是,使用神经节苷脂作为 ELISA 抗原,由于游离的神经节苷脂免疫原性很低这一事实而变得复杂(Jacques 等,4 Org. Biomol. Chem. 142-154(2006))。

#### [0142] 神经节苷脂偶联物

[0143] 本文公开的神经节苷脂-白蛋白偶联物不仅保留了偶联的神经节苷脂的抗原性,而且增加了神经节苷脂的稳定性,并允许更好地附着于 ELISA 微量滴定板。通过神经节苷脂在氰基硼氢钠存在下被白蛋白中的伯胺还原胺化,使神经节苷脂与白蛋白偶联。偶联通过在神经节苷脂上糖部分的还原末端形成希夫碱,然后被氰基硼氢钠还原来进行。因此,本

文中描述的某些实施方案包括通过神经节苷脂上糖部分的还原末端与载体蛋白偶联的神经节苷脂。某些实施方案包含与载体蛋白偶联的神经节苷脂,其中载体是 BSA。在某些实施方案中,神经节苷脂是 GD2。在某些实施方案中,神经节苷脂是 GM3。在某些实施方案中,神经节苷脂是 GM2。在另一个实施方案中, GD2 与 BSA 偶联。在某些实施方案中,神经节苷脂的还原胺化由氰基硼氢钠催化。

[0144] 在某些实施方案中,神经节苷脂-白蛋白偶联物保留了神经节苷脂的抗原性,使得神经节苷脂特异性单克隆抗体或其抗原结合片段能结合偶联物。在某些实施方案中, GD2-BSA 偶联物保留了 GD2 的抗原性,使得 GD2 特异性单克隆抗体或其抗原结合片段能够结合偶联物。在某些实施方案中, GM2-BSA 偶联物保留了 GM2 的抗原性,使得 GM2 特异性单克隆抗体或其抗原结合片段能够结合偶联物。在某些实施方案中, GM3-BSA 偶联物保留了 GM3 的抗原性,使得 GM3 特异性单克隆抗体或其抗原结合片段能够结合偶联物。

[0145] 本文描述的白蛋白-神经节苷脂偶联物可以用在 ELISA 中,以表征抗体或其抗原结合片段对特定神经节苷脂的特异性。在一种情况下,所描述的白蛋白-神经节苷脂偶联物提供了偶联的神经节苷脂与未偶联的神经节苷脂相比增强的吸附于 ELISA 板上的能力。一旦吸收后,偶联物可以在直接 ELISA 中用作神经节苷脂抗原,用于表征神经节苷脂特异性抗体或抗原结合片段的结合特点。在一个实施方案中,白蛋白-神经节苷脂偶联物可以是 BSA-GD2 偶联物。在一个实施方案中, BSA-神经节苷脂偶联物可以是 BSA-GM2 偶联物。在一个实施方案中, BSA-神经节苷脂偶联物可以是 BSA-GM3 偶联物。其他这样的神经节苷脂可以使用所描述的方法与 BSA 偶联,然后用于本文描述的目的。这样的偶联物及其应用在本公开的范围之内。

[0146] 蛋白偶联物的实施方案包括下列。

[0147] 实施方案 A1 提供了包含白蛋白和神经节苷脂的蛋白偶联物。

[0148] 实施方案 A2 提供了实施方案 A1 的偶联物,其中白蛋白是牛血清白蛋白。

[0149] 实施方案 A3 提供了实施方案 A1 的偶联物,其中神经节苷脂通过神经节苷脂上糖部分的还原末端与白蛋白偶联。

[0150] 实施方案 A4 提供了实施方案 A3 的偶联物,其中自蛋白是牛血清白蛋白。

[0151] 实施方案 A5 提供了实施方案 A3 的偶联物,其中神经节苷脂是 GD2。

[0152] 实施方案 A6 提供了实施方案 A1 的偶联物,其中偶联物与 GD2 特异性抗体具有免疫反应性。

[0153] 实施方案 A7 提供了实施方案 A1 的偶联物,其中神经节苷脂是 GM2。

[0154] 实施方案 A8 提供了实施方案 A7 的偶联物,其中偶联物与 GM2 特异性抗体具有免疫反应性。

[0155] 实施方案 A9 提供了实施方案 A1 的偶联物,其中神经节苷脂是 GM3。

[0156] 实施方案 A10 提供了实施方案 A9 的偶联物,其中偶联物与 GM3 特异性抗体具有免疫反应性。

[0157] 实施方案 A11 提供了将神经节苷脂与白蛋白偶联的方法,所述方法包含对神经节苷脂上糖部分的还原末端进行还原胺化。

[0158] 实施方案 A12 提供了实施方案 A11 的方法,其中白蛋白是牛血清白蛋白。

[0159] 实施方案 A13 提供了实施方案 A11 的方法,其中还原胺化由氰基硼氢钠催化。

[0160] 实施方案 A14 提供了实施方案 A13 的方法,其中神经节苷脂是 GD2。

[0161] 实施方案 A15 提供了实施方案 A13 的方法,其中神经节苷脂是 GM2。

[0162] 实施方案 A16 提供了实施方案 A13 的方法,其中神经节苷脂是 GM3。

[0163] 细胞培养组合物和方法

[0164] 本文描述了用于培养真核细胞的组合物和方法。细胞可以是任何类型的真核细胞,但是在一个实施方案中优选为哺乳动物来源的。在某些实施方案中,细胞是中华仓鼠卵巢(CHO)细胞。在某些实施方案中,真核细胞被遗传修饰以产生 IgM 抗体或抗原结合片段。真核细胞可以是临床分离物、用外来 DNA 或 RNA 转化的、永生化的、病毒感染的或用过其他公知的生物或化学手段修饰过的。真核细胞可以生长在单层或悬浮培养中,其可以在细胞培养温箱、生物反应器、摇瓶或其他类似的组织培养装置中进行。此外,真核细胞可以在高于 32°C 并低于 50°C 的温度下、在 2% 到 8% 之间的 CO<sub>2</sub> 下、振摇或不振摇培养。在一个实施方案中,细胞可以在 37°C 的温度下、5% CO<sub>2</sub> 中、以 120rpm 振摇培养。真核细胞可以在组织培养基、例如 GIBCO-CD-CHO 完全培养基(1L GIBCO-CD-CHO 培养基 +25 μ M MSX) 或类似的完全培养基中,与本文公开的组合物和方法组合进行培养。培养的真核细胞可以被工程化以产生外来蛋白,本文所描述的组合物和方法可以但不是必需增强这种生产。

[0165] 本文公开了适合用于真核细胞培养基的组合物。组合物包括但不限于各种必需和非必需氨基酸例如丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸;糖类例如葡萄糖、果糖、甘露糖和半乳糖;以及可能影响培养的真核细胞的生长特性的维生素例如叶酸、维生素 B-12、维生素 D 和核黄素。在实施方案 B1 中,组合物包括葡萄糖、谷氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、组氨酸、苏氨酸、精氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、脯氨酸、烟酰胺、盐酸吡哆素、叶酸、维生素 B-12、核黄素和盐酸硫胺素。

[0166] 在实施方案 B2 中,组合物包含实施方案 B1 的细胞培养物,其中葡萄糖的浓度是 50g/L,谷氨酸的浓度为 2.5 到 3.75g/L,天冬氨酸的浓度为 1.5 到 2.0g/L,丝氨酸的浓度为 0.3 到 0.5g/L,组氨酸的浓度为 1.1 到 1.5g/L,苏氨酸的浓度为 2.0 到 3.0g/L,精氨酸的浓度为 1.0 到 1.5g/L,酪氨酸的浓度为 1.8 到 2.2g/L,半胱氨酸的浓度为 0.9 到 1.1g/L,缬氨酸的浓度为 1.0 到 3.0,甲硫氨酸的浓度为 0.8 到 1.2g/L,色氨酸的浓度为 0.5 到 0.8g/L,苯丙氨酸的浓度为 1.3 到 1.7g/L,异亮氨酸的浓度为 0.8 到 2.4g/L,亮氨酸的浓度为 1.5 到 4.5g/L,赖氨酸的浓度为 3.5 到 5.0g/L,脯氨酸的浓度为 0.5 到 0.7g/L,烟酰胺的浓度为 30 到 40mg/L,盐酸吡哆素的浓度为 200 到 250mg/L,叶酸的浓度为 100 到 130mg/L,维生素 B-12 的浓度为 20 到 40mg/L,核黄素的浓度为 20 到 40mg/L,并且盐酸硫胺素的浓度为 100 到 150mg/L。

[0167] 本文还公开了用于培养真核细胞的方法,其中在前一段落中描述的组合物可用于增加真核细胞的存活性。例如,组合物可以添加到培养的 CHO 细胞和培养的产 IgM 真核(例如 CHO)细胞中。通过在将生长培养基施加于真核细胞之前或之后将组合物添加到生长培养基中作为培养基增补剂,组合物可用于增加真核组织培养细胞的存活性。可替代地,可以将生长培养基成分添加到组合物中,以产生含有组合物的生长培养基。

[0168] 实施方案 B3 提供了培养真核细胞的方法,其包含向细胞添加主要组织培养基,然

后用细胞培养组合物增补主要组织培养基,所述细胞培养组合物包含葡萄糖、谷氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、组氨酸、苏氨酸、精氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、脯氨酸、烟酰胺、盐酸吡哆素、叶酸、维生素 B-12、核黄素和盐酸硫胺素。

[0169] 实施方案 B4 提供了实施方案 B3 的方法,其中添加到主要组织培养基中的细胞培养组合物的体积为主要组织培养基的体积的 1.0%到 20%之间。

[0170] 实施方案 B5 提供了实施方案 B3 的方法,其中在添加主要组织培养基后第三天以后,才向主要组织培养基添加细胞培养组合物。

[0171] 实施方案 B6 提供了实施方案 B3 的方法,其中真核细胞已被转化以生产一种或多种蛋白。

[0172] 实施方案 B7 提供了实施方案 B6 的方法,其中一种或多种蛋白是抗体或其抗原结合片段。

[0173] 实施方案 B8 提供了实施方案 B7 的方法,其中抗体是 IgM。

[0174] 实施方案 B9 提供了实施方案 B3 的方法,其中细胞培养组合物在连续的天中添加到主要组织培养基中。

[0175] 在另一个实施方案中,组合物可用于增加被遗传修饰以产生重组蛋白的真核细胞所生产的蛋白的量。例如,组合物可以添加到被工程化以表达重组人类抗体或其抗原结合片段的培养细胞中(例如被修饰以表达 IgM 的细胞,更具体为被修饰以表达 IgM 的 CHO 细胞)。通过在向真核细胞施加生长培养基之前或之后向生长培养基添加组合物作为培养基增补剂,组合物可用于增加重组蛋白的表达。可替代地,生长培养基组分可以添加到组合物中以产生含有组合物的生长培养基。

[0176] 组合物可用作生长培养基或作为生长培养基的增补剂。作为增补剂时,组合物可以在培养基加入到组织培养容器之前或之后添加到细胞培养基中。本文描述的组合物可用于增补到真核细胞培养基中至总浓度为 1.5%到 2.5%。这些相同的浓度可用于产生已含有组合物的细胞培养基。

[0177] 还描述了通过向细胞培养基添加戊酸来增加由遗传修饰以产生重组蛋白的真核细胞所产生的蛋白的量的方法。例如,戊酸可以添加到用于培养的工程化以表达重组人类抗体或抗原结合片段的 CHO、杂交瘤和 NS0 细胞的培养基中。在一个实施方案中,可以向细胞培养基添加戊酸至终浓度为 0.1mM 到 10mM。在一个实施方案中,可以在细胞生长期的特定时间点添加戊酸,例如可以在细胞储存物复苏或细胞培养物分拆后特定的天向培养基添加戊酸。

[0178] 实施方案 B10 提供了增加细胞的蛋白生产的方法,包含用戊酸增补细胞的生长培养基。

[0179] 实施方案 B11 提供了实施方案 B10 的方法,其中细胞是抗体产生细胞。

[0180] 实施方案 B12 提供了实施方案 B10 的方法,其中生长培养基被增补有浓度为 0.1mM 到 10mM 的戊酸。

[0181] 抗体分离或纯化

[0182] 本文描述的抗体或抗原结合片段可以与它们从其中回收的细胞生长培养基的主要部分分离,以得到更纯化或分离形式的抗体或抗原结合片段。本文描述了从溶液例如

条件培养上清液 (CCS) 纯化或分离抗体或抗原结合片段、例如人类 IgM 抗体或抗原结合片段的方法。增加含有抗体或抗原结合片段的溶液的纯度可以通过各种方式来实现,包括但不限于透析、孔径排阻层析、离心、离子交换层析、梯度离心、使用孔径排阻过滤器过滤、亲和层析、免疫亲和层析和高效液相色谱。所描述的抗体或抗原结合片段可以被遗传或化学修饰以包含亲和标签、例如聚组氨酸,其可用于通过亲和纯化技术增加抗体或其抗原结合片段的纯度。

[0183] 因此,某些实施方案包括通过亲和层析与溶液分离开的抗体或其抗原结合片段。某些实施方案包含通过亲和层析与溶液基本上分离开的抗体或其抗原结合片段,其中对抗体或其抗原结合片段的亲和由蛋白 A 介导。某些实施方案包含通过离子交换层析与溶液基本上分离的抗体或其抗原结合片段。某些实施方案包含通过阳离子交换层析与溶液基本上分离的抗体或其抗原结合片段,其中阳离子交换层析柱包含丙烯酰胺-葡聚糖共聚物树脂。某些实施方案包含通过羟基磷灰石层析与溶液基本上分离的抗体或其抗原结合片段。某些实施方案包含通过羟基磷灰石层析与溶液基本上分离的抗体或其抗原结合片段,其中羟基磷灰石层析柱包含陶瓷磷酸钙树脂。

[0184] 可用于纯化或分离所描述的抗体或抗原结合片段的方法可以不同,因为对得到的抗体或其抗原结合片段的要求可能随着抗体或抗原结合片段将要使用的应用而变。例如,用于药物组合物的抗体或抗原结合片段需要严格的纯化,而用于体外诊断分析的抗体或抗原结合片段可以纯化到较低程度。因此,某些实施方案包括将含有抗体或抗原结合片段的样品与蛋白 A 基质相接触。某些实施方案包括将含有抗体或抗原结合片段的样品与离子交换基质相接触。在一个实施方案中,离子交换基质可以是阳离子交换基质。在更优选实施方案中,阳离子交换基质可以包括丙烯酰胺-葡聚糖共聚物树脂。某些实施方案包括将含有抗体或抗原结合片段的样品与羟基磷灰石基质相接触。在一个实施方案中,羟基磷灰石基质可以包括磷酸钙树脂。

[0185] 连续亲和层析是产生分离或纯化的蛋白的方法。方法可以使用两轮或多轮不同亲和层析技术来生产纯化或分离的目标蛋白 (Friedrichs 和 Grose, 49 J. Virol. 992(1984))。因此,在某些实施方案中,含有抗体或抗原结合片段的样品可以与蛋白 A 基质在促进抗体或抗原结合片段与基质结合的条件下相接触;可以对基质进行清洗以除去未结合的蛋白;被蛋白 A 基质结合的物质可以被洗脱;被洗脱的物质可以与阳离子交换层析基质在促进抗体或抗原结合片段与基质结合的条件下相接触;可以对基质进行清洗以除去未结合的蛋白;被阳离子交换层析基质结合的物质可以被洗脱;被洗脱的物质可以与羟基磷灰石树脂在促进抗体或抗原结合片段与基质结合的条件下相接触;可以对基质进行清洗以除去未结合的蛋白;并可以对结合的物质进行洗脱。此外,可以在该方法中的各个不同点添加任选步骤,以允许抗体或其抗原结合片段的更严格的纯化。例如,含有抗体或抗原结合片段的溶液可以增补有去污剂例如 Triton<sup>®</sup>-X 100 或 Tween<sup>®</sup> 80,以失活微生物例如细菌、病毒和寄生虫。

[0186] 蛋白的基于亲和的层析是多步骤过程,其一般包括平衡层析柱、将样品溶液与柱的基质相接触、洗去柱中的未结合物质以及洗脱所需物质。如果需要,这种通用过程可以在各种不同条件下重复一次或多次,以增加样品的纯度。在某些实施方案中,蛋白 A 基质可用于与待纯化样品相接触。在一个实施方案中,蛋白 A 基质可以是多孔的,具有直径从 1000

到 5000 埃的孔。在另一个实施方案中,蛋白 A 基质具有平均直径为 3000 埃的孔。

[0187] 在某些实施方案中,在使用前对亲和基质进行清洗和平衡。例如,可以用纯水清洗亲和基质以除去任何污染物。在某些实施方案中,亲和基质可以用 3 到 10 倍柱体积的纯水清洗。在另一个实施方案中,亲和基质用 5 倍柱体积的纯水清洗。在某些实施方案中,亲和基质可以用至少一种酸性缓冲液清洗。例如,亲和基质可以用 1 到 5 倍柱体积的 pH 1.5 的 20mM 清洗。在另一个实施方案中,亲和基质用 3 倍柱体积的 pH 1.5 的 20mM 清洗。

[0188] 此外,亲和基质可以用至少一种附加的缓冲液例如 6M 盐酸胍清洗。在将亲和基质与样品接触之前,可以将基质用微碱性或中性 pH 的缓冲液平衡。在一个实施方案中,亲和基质可以用 2 到 8 倍柱体积的 pH 7.5 的缓冲液平衡。在另一个实施方案中,亲和基质可以用 5 倍柱体积的含有 200mM NaCl 和 0.01% Tween<sup>®</sup>-80 的 pH 7.5 的 10mM 磷酸钠缓冲液平衡。本文描述的磷酸钠缓冲液可以从磷酸二氢钠和氢二钠的混合物制备。以正确的比率混合后,这些溶液可以产生 pH 4 到 pH 10 范围内的磷酸盐缓冲液。

[0189] 通过与亲和基质相接触进行纯化或分离的样品应该基本上不含大的颗粒物质。这样的颗粒物质可以通过各种不同方式移除,例如通过离心或过滤。在另一个实施方案中,本文描述的条件培养上清液 (CCS) 在与亲和基质接触前被制成基本上不含大的颗粒物质。在另一个实施方案中,CCS 被过滤以除去颗粒物质。可以使用具有适合孔径的滤器,例如,孔的平均直径为 1  $\mu\text{m}$  的滤器、或孔的平均直径为 0.75  $\mu\text{m}$  的滤器、或孔的平均直径为 0.5  $\mu\text{m}$  的滤器、或孔的平均直径为 0.22  $\mu\text{m}$  的滤器或孔的平均直径为 0.1  $\mu\text{m}$  的滤器。

[0190] 在将亲和基质与含有待纯化或分离样品的溶液接触之前,可以将溶液用去污剂处理以失活至少一种微生物污染物,例如细菌、病毒和寄生虫。在一个实施方案中,CCS 被增补有去污剂以失活至少一种微生物污染物。在一个实施方案中,去污剂是 Triton<sup>®</sup> X-100。添加到含有待纯化或分离样品的溶液中的去污剂的浓度可以变化,以满足具体应用方案的需要。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 10% 去污剂。在另一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 7% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 5% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 3% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 2% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 1% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 0.5% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 0.1% 去污剂。

[0191] 在施加到亲和基质后,样品可以例如便于样品的处理或结合的所需流速进行处理。尽管可以使用任何流速,但常用的流速在 1 到 200cm/h 之间。在某些实施方案中,样品的流速可以是 1cm/h。在其他实施方案中,样品的流速可以是 10cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 25cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 50cm/h。在另一个实施方案中,样品的流速可以是 76cm/h。在另一个实施方案中,样品的流速可以是 100cm/h。在某些实施方案中,样品的流速可以是 125cm/h。在另一个实施方案中,样品的流速可以是 150cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 175cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 200cm/h。

[0192] 在亲和基质已与样品物质接触后,可以通过使用缓冲液清洗来除去未结合的样品物质。在一个实施方案中,可以用具有酸性 pH 的缓冲液清洗亲和基质。在一个实施方案

中,可以用具有中性 pH 的缓冲液清洗亲和基质。在一个实施方案中,可以用具有碱性 pH 的缓冲液清洗亲和基质。在另一个实施方案中,可以用 5 到 15 倍柱体积的含有 200mM NaCl 和 0.01% Tween<sup>®</sup>-80、pH 7.5 的 10mM 磷酸钠缓冲液清洗亲和基质。

[0193] 在通过清洗从亲和基质上去除未结合蛋白后,可以通过用洗脱缓冲液洗涤亲和基质来洗脱与亲和基质结合的蛋白。应该仔细选择洗脱缓冲液,以确保它将破坏目标蛋白例如人类 IgM 抗体与基质之间的相互作用,但不会使目标蛋白变性或使其状态变坏。在一个实施方案中,可以用具有酸性 pH 的缓冲液洗涤亲和基质以洗脱目标蛋白。在一个实施方案中,可以用具有中性 pH 的缓冲液洗涤亲和基质以洗脱目标蛋白。在一个实施方案中,可以用具有碱性 pH 的缓冲液洗涤亲和基质以洗脱目标蛋白。某些实施方案包括了具有磷酸钠和氯化镁的缓冲液用来洗脱与层析柱结合的物质,其中使用了多达 10 倍柱体积的该缓冲液以从柱上洗脱结合的物质。在某些实施方案中,可以使用具有 5 到 10mM 之间的磷酸钠和 1 到 5M 之间的氯化镁的缓冲液来洗脱与亲和基质结合的物质。另一个实施方案包括 3 倍柱体积的含有 5mM 磷酸钠和 3M 氯化镁的缓冲液来洗脱与亲和基质结合的物质。在某些实施方案中,可以使用增补有 3M MgCl<sub>2</sub> 的 5mM pH 6.8 的磷酸钠缓冲液将 IgM 从蛋白 A 基质上洗脱下来。

[0194] 本文公开了使用离子交换层析纯化或分离蛋白例如 IgM 抗体或抗原结合片段的方法。蛋白的离子交换层析是多步骤的过程,一般包含平衡层析柱、将样品溶液与柱的基质相接触、洗掉柱中未结合的物质以及洗脱所需物质。如果需要,这种通用步骤可以在不同条件下重复一次或多次,以增加样品的纯度。在某些实施方案中,阳离子交换层析介质可以是丙烯酰胺-葡聚糖共聚物树脂。在一个实施方案中,阳离子交换层析基质可以是 MacroCap<sup>™</sup> SP 树脂。

[0195] 在某些实施方案中,在使用前对离子交换基质进行清洗和平衡。例如,可以用纯水清洗离子交换基质以除去任何污染物。在一个实施方案中,离子交换基质可以用 1 到 10 倍柱体积的纯水清洗。在一个实施方案中,离子交换基质可以用 2 倍柱体积的纯水清洗。在某些实施方案中,离子交换基质可以用至少一种缓冲液清洗。例如,离子交换基质可以用 1 到 5 倍柱体积的具有 0.5M NaOH 的缓冲液清洗。在另一个实施方案中,离子交换基质用 3 倍柱体积的具有 0.5M NaOH 的缓冲液清洗。在某些实施方案中,离子交换基质用 3 倍柱体积的具有 2M NaCl 的缓冲液清洗。在将离子交换基质与样品接触之前,基质可以用酸性、碱性或中性 pH 的缓冲液平衡。在一个实施方案中,离子交换基质可以用 2 到 8 倍柱体积的 pH6.8 的缓冲液平衡。在一个实施方案中,离子交换基质可以用 5 倍柱体积的含有 75mM NaCl 和 0.01% Tween<sup>®</sup>-80 的 pH 6.8 的 10mM 磷酸钠缓冲液平衡。

[0196] 通过与离子交换基质相接触进行纯化或分离的样品应该基本上不含大的颗粒物质。这样的颗粒物质可以通过各种不同方式移除,例如通过离心或过滤。在某些实施方案中,本文描述的条件培养上清液 (CCS) 在与离子交换基质接触前被制成基本上不含大的颗粒物质。在另一个实施方案中,CCS 被过滤以除去颗粒物质。可以使用具有任何孔径的滤器,例如,孔的平均直径为 1 μm 的滤器、或孔的平均直径为 0.75 μm 的滤器、或孔的平均直径为 0.5 μm 的滤器、或孔的平均直径为 0.22 μm 的滤器或孔的平均直径为 0.1 μm 的滤器。

[0197] 在将离子交换基质与含有待纯化样品的溶液接触之前,可以将溶液用去污剂处理以失活至少一种微生物污染物例如细菌、病毒和寄生虫,或帮助将靶蛋白维持在溶解状态。

在某些实施方案中,样品被增补有去污剂以失活至少一种微生物污染物或帮助将靶蛋白维持在溶解状态。在一个实施方案中,去污剂是 Triton® X-100。在一个实施方案中,去污剂是 Tween® -80。添加到含有待纯化或分离样品的溶液中的去污剂的浓度可以变化,以满足具体应用方案的需要。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 10% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 7% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 5% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 3% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 2% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 1% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 0.5% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 0.1% 去污剂。

[0198] 在施加到离子交换基质后,样品可以例如便于样品的处理或结合的所需流速进行处理。尽管可以使用任何流速,但常用的流速在 1 到 200cm/h 之间。在一个实施方案中,样品的流速可以是 1cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 10cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 25cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 50cm/h。在另一个实施方案中,样品的流速可以是 76cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 100cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 125cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 150cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 175cm/h。在另一个实施方案中,样品的流速可以是 200cm/h。

[0199] 在离子交换基质已与样品物质接触后,可以通过使用缓冲液清洗来除去未结合的样品物质。在一个实施方案中,可以用具有酸性 pH 的缓冲液清洗离子交换基质。在一个实施方案中,可以用具有中性 pH 的缓冲液清洗离子交换基质。在一个实施方案中,可以用具有碱性 pH 的缓冲液清洗离子交换基质。在另一个实施方案中,可以用 5 到 15 倍柱体积的含有 10mM 磷酸钠、75mM NaCl 和 0.01% Tween® -80 的 pH 6.8 的缓冲液清洗离子交换基质。

[0200] 在通过清洗从离子交换基质上除去未结合蛋白后,可以通过用洗脱缓冲液洗涤离子交换基质来洗脱与离子交换基质结合的蛋白。应该仔细选择洗脱缓冲液,以确保它将破坏目标蛋白例如人类 IgM 抗体与基质之间的相互作用,但不会使目标蛋白变性或使其状态变坏。在一个实施方案中,可以用具有酸性 pH 的缓冲液洗涤离子交换基质以洗脱目标蛋白。在一个实施方案中,可以用具有中性 pH 的缓冲液洗涤离子交换基质以洗脱目标蛋白。在一个实施方案中,可以用具有碱性 pH 的缓冲液洗涤离子交换基质以洗脱目标蛋白。某些实施方案包括了具有磷酸钠和氯化钠的缓冲液用来洗脱与层析柱结合的物质,其中使用了多达 10 倍柱体积的该缓冲液以从柱上洗脱结合的物质。在某些实施方案中,可以使用具有 5 到 10mM 之间的磷酸钠和 150 到 500mM 之间的氯化钠的缓冲液来洗脱与离子交换基质结合的物质。另一个实施方案包括 4 倍柱体积的含有 200mM NaCl 的 10mM 磷酸钠缓冲液来洗脱与离子交换基质结合的物质。在某些实施方案中,可以使用含有 200mM NaCl 和 0.01% Tween® -80 的 10mM pH 6.8 的磷酸钠缓冲液将 IgM 从 MacroCap™ SP 基质上洗脱下来。

[0201] 本文公开了使用羟基磷灰石层析纯化或分离蛋白例如 IgM 抗体或抗原结合片段的方法。蛋白的羟基磷灰石层析是多步骤的过程,一般包含平衡层析柱、将样品溶液与柱的基质相接触、洗掉柱中未结合的物质以及洗脱所需物质。如果需要,这种通用步骤可以在不

同条件下重复一次或多次,以增加样品的纯度。在某些实施方案中,羟基磷灰石层析基质可以是磷酸钙基质。在一个实施方案中,羟基磷灰石层析基质可以是珠子尺寸为  $80\ \mu\text{m}$  的 CHT<sup>®</sup> II 陶瓷羟基磷灰石。

[0202] 在某些实施方案中,羟基磷灰石基质在使用前水合。在一个实施方案中,使用具有 200mM 磷酸钾、pH 9.0 的溶液对羟基磷灰石基质进行水合,对于每 mL 所需柱床体积来说使用 0.54g 干基质。在将羟基磷灰石基质与样品接触前,可以将基质用酸性、碱性或中性 pH 缓冲液平衡。在一个实施方案中,羟基磷灰石基质可以用 2 到 8 倍柱体积的 pH6.8 的缓冲液平衡。在另一个实施方案中,羟基磷灰石基质可以用 5 倍柱体积的含有 10mM 磷酸钠、100mM NaCl 和 0.01% Tween<sup>®</sup>-80 的 pH6.8 的缓冲液平衡。

[0203] 通过与羟基磷灰石基质相接触进行纯化或分离的样品应该基本上不含大的颗粒物质。这样的颗粒物质可以通过各种不同方式,例如通过离心或过滤移除。在一个实施方案中,本文描述的条件培养上清液 (CCS) 在与羟基磷灰石基质接触前被制成基本上不含大的颗粒物质。在一个实施方案中,CCS 被过滤以除去颗粒物质。可以使用具有任何孔径的滤器,例如,孔的平均直径为  $1\ \mu\text{m}$  的滤器、或孔的平均直径为  $0.75\ \mu\text{m}$  的滤器、或孔的平均直径为  $0.5\ \mu\text{m}$  的滤器、或孔的平均直径为  $0.22\ \mu\text{m}$  的滤器或孔的平均直径为  $0.1\ \mu\text{m}$  的滤器。

[0204] 在将羟基磷灰石基质与含有待纯化样品的溶液接触之前,可以将溶液用去污剂处理以失活至少一种微生物污染物例如细菌、病毒和寄生虫,或帮助将靶蛋白维持在溶解状态。在某些实施方案中,样品被增补有去污剂以失活至少一种微生物污染物或帮助将靶蛋白维持在溶解状态。在一个实施方案中,去污剂是 Triton<sup>®</sup> X-100。在一个实施方案中,去污剂是 Tween<sup>®</sup>-80。添加到含有待纯化或分离样品的溶液中的去污剂的浓度可以变化,以满足具体应用方案的需要。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 10% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 7% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 5% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 3% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 2% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 1% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 0.5% 去污剂。在一个实施方案中,含有待纯化或分离样品的溶液可以具有 0.1% 去污剂。

[0205] 在施加到羟基磷灰石基质后,样品可以例如便于样品的处理或结合的所需流速进行处理。尽管可以使用任何流速,但常用的流速在 1 到 200cm/h 之间。在一个实施方案中,样品的流速可以是 1cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 10cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 25cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 50cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 76cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 100cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 125cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 150cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 175cm/h。在一个实施方案中,样品的流速可以是 200cm/h。

[0206] 在羟基磷灰石基质已与样品物质接触后,可以通过使用缓冲液清洗来除去未结合的样品物质。在一个实施方案中,可以用具有酸性 pH 的缓冲液清洗羟基磷灰石基质。在一个实施方案中,可以用具有中性 pH 的缓冲液清洗羟基磷灰石基质。在一个实施方案中,可

以用具有碱性 pH 的缓冲液清洗羟基磷灰石基质。在另一个实施方案中,可以用 5 到 15 倍柱体积的含有 10mM 磷酸钠、100mM NaCl 和 0.01% Tween<sup>®</sup>-80 的 pH 6.8 的缓冲液清洗羟基磷灰石基质。

[0207] 在通过清洗从羟基磷灰石基质上除去未结合蛋白后,可以通过用洗脱缓冲液洗涤羟基磷灰石基质来洗脱与羟基磷灰石基质结合的蛋白。应该仔细选择洗脱缓冲液,以确保它将破坏目标蛋白例如人类 IgM 抗体与基质之间的相互作用,但不会使目标蛋白变性或使其状态变坏。在一个实施方案中,可以用具有酸性 pH 的缓冲液洗涤羟基磷灰石基质以洗脱目标蛋白。在一个实施方案中,可以用具有中性 pH 的缓冲液洗涤羟基磷灰石基质以洗脱目标蛋白。在一个实施方案中,可以用具有碱性 pH 的缓冲液洗涤羟基磷灰石基质以洗脱目标蛋白。某些实施方案包括了具有磷酸钠和氯化钠的缓冲液用来洗脱与羟基磷灰石柱结合的物质,其中使用了多达 10 倍柱体积的该缓冲液以从柱上洗脱结合的物质。在某些实施方案中,可以使用具有 150 到 500mM 之间的磷酸钠和 50 到 200mM 之间的氯化钠的缓冲液来洗脱与羟基磷灰石基质结合的物质。在一个实施方案中,可以使用 4 倍柱体积的含有 100mM NaCl 的 175mM 磷酸钠缓冲液来洗脱与羟基磷灰石基质结合的物质。在另一个实施方案中,可以使用含有 175mM 磷酸钠、100mM NaCl 和 0.01% Tween<sup>®</sup>-80 的 pH 6.8 的缓冲液将 IgM 从 CHT<sup>®</sup> II 陶瓷羟基磷灰石基质上洗脱下来。

[0208] 在使用的盐、盐的浓度、使用的去污剂、去污剂浓度、pH 等方面不同组合的缓冲液,可用于基本上执行本文描述的方法。因此,考虑到了将这些变化包含在所提供的公开内容的范围之内,它们不打算排他性或限制性的。

[0209] 实施方案 C1 提供了纯化或分离蛋白的方法,所述方法包含将含有蛋白的溶液施加到亲和层析柱、将来自亲和层析柱的洗脱液施加到阳离子交换层析柱、将来自阳离子交换层析柱的洗脱液施加到羟基磷灰石层析柱,以及从羟基磷灰石层析柱获得洗脱液。

[0210] 实施方案 C2 提供了实施方案 C1 的方法,其中亲和层析柱包含至少一种用蛋白 A 包被的基质。

[0211] 实施方案 C3 提供了实施方案 C2 的方法,其中至少一种用蛋白 A 包被的基质是多孔的。

[0212] 实施方案 C4 提供了实施方案 C3 的方法,其中多孔基质包含 3000 埃的孔。

[0213] 实施方案 C5 提供了实施方案 C1 的方法,其中至少一种用蛋白 A 包被的基质结合蛋白。

[0214] 实施方案 C6 提供了实施方案 C5 的方法,其中被至少一种用蛋白 A 包被的基质所结合的蛋白用包含氯化镁的溶液洗脱。

[0215] 实施方案 C7 提供了实施方案 C6 的方法,其中包含氯化镁的溶液是 1M 到 5M 氯化镁溶液。

[0216] 实施方案 C8 提供了实施方案 C6 的方法,其中包含氯化镁的溶液是 3M 氯化镁溶液。

[0217] 实施方案 C9 提供了实施方案 C5 的方法,其中被至少一种用蛋白 A 包被的基质所结合的蛋白是抗体。

[0218] 实施方案 C10 提供了实施方案 C9 的方法,其中抗体是 IgM。

[0219] 实施方案 C11 提供了实施方案 C1 的方法,其中阳离子交换层析柱包含丙烯酰

胺-葡聚糖共聚物树脂。

[0220] 实施方案 C12 提供了实施方案 C11 的方法,其中丙烯酰胺-葡聚糖共聚物树脂结合蛋白。

[0221] 实施方案 C13 提供了实施方案 C12 的方法,其中被丙烯酰胺-葡聚糖共聚物树脂结合的蛋白用含有 10mM 磷酸钠、200mM 氯化钠和 0.01% 聚山梨酸酯 80 的溶液洗脱。

[0222] 实施方案 C14 提供了实施方案 C13 的方法,其中被丙烯酰胺-葡聚糖共聚物树脂结合的蛋白是抗体。

[0223] 实施方案 C15 提供了实施方案 C14 的方法,其中抗体是 IgM。

[0224] 实施方案 C16 提供了实施方案 C1 的方法,其中羟基磷灰石层析柱包含磷酸钙树脂。

[0225] 实施方案 C17 提供了实施方案 C16 的方法,其中磷酸钙树脂与蛋白结合。

[0226] 实施方案 C18 提供了实施方案 C17 的方法,其中被磷酸钙树脂结合的蛋白用包含 175mM 磷酸钠、100mM 氯化钠和 0.01% 聚山梨酸酯 80 的溶液洗脱。

[0227] 实施方案 C19 提供了实施方案 C18 的方法,其中被磷酸钙树脂结合的蛋白是抗体。

[0228] 实施方案 C20 提供了实施方案 C19 的方法,其中抗体是 IgM。

[0229] 实施方案 C21 提供了纯化或分离蛋白的方法,其包含

[0230] a. 将含有蛋白的溶液施加到包含至少一种用蛋白 A 包被的基质的亲和层析柱,并使用含有 3M 氯化镁的溶液洗脱任何被至少一种用蛋白 A 包被的物质结合的蛋白;

[0231] b. 将来自亲和层析柱的洗脱液施加到包含丙烯酰胺-葡聚糖共聚物树脂的阳离子交换层析柱,并使用含有 10mM 磷酸钠、200mM 氯化钠和 0.01% 聚山梨酸酯 80 的溶液洗脱任何被丙烯酰胺-葡聚糖共聚物树脂结合的蛋白;

[0232] c. 将来自阳离子交换层析柱的洗脱液施加到包含磷酸钙树脂的羟基磷灰石,并使用包含 175mM 磷酸钠、100mM 氯化钠和 0.01% 聚山梨酸酯 80 的溶液洗脱任何被磷酸钙树脂结合的蛋白。。

[0233] 提供了下面的实施例以为本文描述的实施方案提供更详细的描述。它们的目的是说明而不是限制实施方案。

[0234] 实施例 1

[0235] CV-3 衍生的 IgM 的 GD-2 特异性

[0236] 测试了用 Epstein-Barr 病毒 (HLP) 转化的人类淋巴母细胞合并物 (Cahan 等) 生产 GD2 特异性 IgM 抗体的能力。细胞在 RPMI 完全培养基 (10% 热失活的 FBS, 1% L-Glu, 1% 抗生素 (Sigma)) 中培养。在第二次到第四次传代时收集用过的生长培养基,并测定 IgM 浓度和与 GD2 的反应性。在  $2-5 \times 10^5$  个细胞 /mL 的培养物生长 3 天后, HLP 产生 6-8  $\mu$ g/mL IgM (通过 ELISA 定量)。

[0237] 为了确定由 HLP 产生的 IgM 是否对 GD2 特异,通过 ELISA 对来自每个培养物的用过的培养基进行分析。简单来说,通过蒸发 200  $\mu$ l 含有 25ng GD2、GD1a、GM2 或 GM3 的乙醇,将神经节苷脂包被到 ELISA 板上。然后将板阻断,并按照常规 ELISA 步骤评估含有 IgM 的细胞培养基或人类 IgM 的结合。来自 HLP 的用过的培养基 (浓缩 8.1 倍或 14.2 倍) 含有 GD2 反应性 IgM (图 1A);但是,抗体也识别神经节苷脂 GD1a、GM2 和 GM3 (图 1B)。这些数据表明,由 HLP 产生的 IgM 是多反应性的。

[0238] 进行了 FACS 分析以确定由 HLP 产生的 IgM 是否能够结合表达在黑素瘤细胞表面上。简单来说,将在其表面上表达 GD2 的人黑素瘤细胞系 1205LU 细胞与来自 HLP 培养物的用过的培养基温育、清洗,然后用第二抗体 FITC- 山羊抗人类 Ig 抗体 (Jackson Laboratories) 标记。如图 2 中所示,只有来自非常早的 HLP 代 (第二次传代) 的培养基才产生能够识别细胞表面 GD2 的 IgM (图 2B)。但是,这种活性在 HLP 传代培养几周后很快丧失 (图 2C)。这些结果表明,产生特异性 GD2 反应性 IgM 的细胞在 HLP 中生长缓慢,很快在数量上被非生产细胞或非特异性抗体产生细胞超过,或这种 IgM 的生产不稳定。鼠类抗 GD2 IgM 抗体 MAb-126 (ATCC#HB-8568<sup>TM</sup>) 被用作阳性对照,并被证实具有强的 GD2 特异性结合 (图 2D)。

#### [0239] 实施例 2

#### [0240] 源自 HLP 的杂交瘤产生的 GD-2 特异性 IgM 介导对 GD-2 阳性细胞的 CDC 活性

[0241] 为了产生生产抗 GD-2 特异性 IgM 的无 EBV 杂交瘤细胞系,将来自早期传代的 HLP 的细胞与融合配偶体 A6 (ATCC CRL-8192) 或 K6H6/B5 (ATCC CRL-1823) 融合,以形成杂交瘤。由于 HLP 中 GD2 特异性亚克隆的明显低的丰度,通过 GD2 特异性 ELISA 筛选了 80,000 个克隆。来自这些杂交瘤株系的约 5-10% 的抗体制备物显示出阳性 GD2 反应性。但是,当使用一组神经节苷脂 (GD1、GM2 和 GM3) 对特异性进行筛选时,超过 90% 的 GD2 阳性克隆显示出对多种神经节苷脂的反应性 (图 3A- 克隆 5D7 和 10B4)。此外,大多数多反应性抗体与一组不相关的对照蛋白交叉反应 (数据未显示)。这些结果表明,在 HLP 中产生 GD2 特异性 IgM 的淋巴母细胞是罕见的。

[0242] 亚克隆和筛选努力导致分离到产 GD2 特异性 IgM 的杂交瘤细胞系。分离到两个 GD2 特异性杂交瘤株系 3B2 和 1470。将两种细胞系的培养物以  $0.3-0.4 \times 10^6$  个细胞 /mL 的接种密度接种,并每 3 到 4 天拆分,其在用过的培养基中产生了  $3-8 \mu\text{g/mL}$  的 IgM。神经节苷脂特异性 ELISA 显示出只与 GD2 具有阳性反应性,对三种对照神经节苷脂 (GD1a、GM2 和 GM3) 没有反应性 (图 3A 和 B),表明这些细胞产生 GD2 特异性抗体。此外,FACS 分析显示出 1205LU 人类黑素瘤细胞系被 3B2 和 1470 抗体的阳性染色,表明这些抗体能够识别细胞表面上的 GD2 (图 4)。对克隆 3B2 和 1470 进行了分子分析以确定克隆起源。轻链特异性 ELISA 显示两个克隆都分泌含有  $\kappa$  轻链的 IgM (数据未显示)。来自这些细胞的 cDNA 的序列分析显示出一致的重链和轻链序列,表明这两个克隆源自于相同的 HLP 淋巴母细胞克隆 (数据未显示)。

[0243] 来自 3B2 培养物的部分纯化的抗体被用于评估该抗体介导对表达 GD2 的黑素瘤细胞系的补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的能力,因为这种活性主要依赖于抗体在与其抗原结合时采用的构象 (Janeway 等,《免疫学》(Immunobiology)9-12 (第五版,2001))。将黑素瘤靶细胞系 (GD2 阳性细胞系 LF0023 和 M14,以及 GD2 阴性细胞系 PM0496 和 JS0592) 培养在添加有 10% FBS、2mM L- 谷氨酰胺、非必需氨基酸和  $6 \mu\text{M}$  HEPES 的 RPMI1640 中,并在使用前用胰蛋白酶收获。将靶细胞用含有 3B2 IgM 的上清液在 20% 人类血清的存在下温育。在  $37^\circ\text{C}$  下温育 1 小时后,用 Cell Titer Glo<sup>®</sup> 反应试剂 (Promega Corp., Madison, WI) 鉴定活细胞。杀死百分率被测定为来自处理与未处理细胞的信号的比率。图 5 中的数据表明,由 3B2 克隆产生的 IgM 能够对某些 GD2 阳性黑素瘤细胞系引发强 CDC 反应。

[0244] 进行了分子分析以确定克隆 3B2 和 1470 是否感染有 EBV。设计了 6 对 PCR 引物

对 (EBNA2-1141f (SEQ ID NO :45) 和 EBNA2-1440r (SEQ ID NO :46) ;EBV2001f (SEQ ID NO :47) 和 EBV2622r (SEQ ID NO :48) ;EBV1901F (SEQ ID NO :49) 和 EBV2822R (SEQ ID NO :50) ;EBV169461f (SEQ ID NO :51) 和 EBV170100r (SEQ ID NO :52) ;EBV169480f (SEQ ID NO :53) 和 EBV170080r (SEQ ID NO :54) ;EBV8491F (SEQ ID NO :55) 和 EBV9020r (SEQ ID NO :56)), 以验证 EBV 基因组的存在和完整性。一个引物对扩增开放阅读框 EBNA-2 ;两个交叠组各自扩增 EBV 基因组的 5' 和 3' 末端 ;一个引物对扩增复制原点。开始时,3B2 和 1470 克隆都是 EBV 阳性的,正如通过基因组 PCR 所证实的 (数据未显示)。但是,通过以每个孔少于一个细胞的有限稀释铺板进一步亚克隆,产生了通过 EBV 特异性 PCR 分析所确定的不含 EBV 基因组的 3B2 和 1470 细胞系的亚克隆 (数据未显示)。

[0245] EBV 阴性 3B2 亚克隆 (AB527-HYB-3B2-EBVnull) 已在 2008 年 7 月 16 日放置在美国典型培养物保藏中心 (Amer.Type Cult.Coll.(10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209)), 并已被分配登记号 PTA-9376。对 AB527-HYB-3B2-EBVnull 亚克隆进行了第二轮亚克隆以鉴定产生单一形式免疫球蛋白 J-链的克隆,因为原始杂交瘤可以产生人类或小鼠 J-链。为了鉴定具有单一形式 J-链的克隆或无 J-链的克隆,使用特异性针对人类 J-链 (hu-285F (SEQ ID NO :57) 和 hu-418R (SEQ ID NO :58))、或小鼠 J-链 (m-230F (SEQ ID NO :59) 和 m-370R (SEQ ID NO :60)) 的引物进行 RT-PCR。结果表明,3B2 亚克隆 AB527-HYB-3B2-3C9 是不含 EBV、不含人类 J-链、鼠类 J-链阳性的,并在静态培养中分泌约 30mg/L 单克隆的 GD2 特异性 IgM。

[0246] 实施例 3

[0247] 表达 GD2 特异性 IgM 的转染瘤细胞系的产生

[0248] 将从 AB527-HYB-3B2-3C9、不含 EBV、不含人类 J-链、鼠类 J-链阳性杂交瘤分离的总 RNA 反转录成 cDNA 并用作模板,使用对应于 SEQ ID NO :33 和 35 的引物进行 IgM 重链的 PCR 扩增,使用对应于 SEQ ID NO :36 和 38 的引物进行轻链的 PCR 扩增。从 AB527-HYB-3B2-3C9 扩增的重链核苷酸序列编码具有 SEQ ID NO :40 的氨基酸序列的多肽,从 AB527-HYB-3B2-3C9 扩增的轻链核苷酸序列编码具有 SEQ ID NO :42 的氨基酸序列的多肽。进行第二轮 PCR 扩增添加人类前导序列,并引入 5' 和 3' 限制性核酸内切酶识别位点,以便于将扩增子克隆到 pEE6.4 (重链) 和 pEE14.4 (轻链) 中,两种载体都作为 Lonza Biologics 谷氨酰胺合成酶表达系统 (GS 系统) 的一部分提供。使用对应于 SEQ ID NO :34 和 35 的引物进行 IgM 重链的第二轮 PCR 扩增,而轻链扩增使用对应于 SEQ ID NO :37 和 38 的引物。

[0249] 将 PCR 扩增的轻链 cDNA 用 HindIII 和 EcoRI 消化,并连接到类似切开的 pEE14.4 中,而重链 cDNA 用 HindIII 和 MfeI 消化,并连接到用 HindIII 和 EcoRI 消化的 pEE6.4 中 (MfeI 和 EcoRI 留下相容的“粘性”末端)。在验证过重链和轻链的核苷酸序列后,将重链表达盒作为 NotI/PvuI 片段导入到 pEE14.4-AB527-LC 中,以构建最终表达载体 pEE14.4-AB527-LC-HC (p0311) (图 6)。pEE14.4 是含有谷氨酰胺合酶小基因的 10Kb 载体,允许在 GS 抑制剂 L-甲硫氨酸磺基脲 (MSX) 的存在下选择稳定的转染子。该载体中 cDNA 插入片段的转录受到人类 CMV 立即早期启动子的控制,cDNA 插入片段的上游是 hCMV-MIE5' 非翻译区、包括内含子 1,cDNA 插入片段的下游是 SV40 多聚腺苷化信号,允许转录本的有效多聚腺苷化 (图 7)。

[0250] 通过电穿孔将CHO细胞用线性化的双基因载体p0311转染,以允许表达重组的GD2特异性IgM。在转染后,将细胞铺板在96孔板中,使用含有透析过的胎牛血清(dFBS)和谷氨酰胺合酶增补剂的非选择性培养基。第二天向每个孔添加含有dFBS、谷氨酰胺合酶增补剂和MSX(10 μM终浓度)的选择培养基,其能够选择含有表达载体的细胞。只获取被发现在来自于单一被转染细胞的克隆。

[0251] 通过ELISA筛选存在人类IgM的转染子。将集落在含血清的选择培养基中扩增,并对存活的集落通过定量的第二级测定进行检查,以鉴定最高产的集落。使最高产的转染子适应于化学确定培养基IS-CHO-CD™(Irvine Scientific,Santa Ana,CA),并以2,500个细胞/孔的密度接种于平底96孔板(80个板)中含有10 μM MSX的培养基中。通过ELISA分析药物抗性集落的IgM生产。将IgM生产阳性的集落放大规模,并在随后的第二级(6孔板)和第三级(20mL摇瓶)测定中分析抗体生产能力。这导致鉴定到产IgM的CHO-K1SV转染瘤克隆127C8。127C8克隆不表达J-链,因此由该细胞系产生的重组AB527IgM是J-链缺陷的。AB527的重链和轻链的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:40和42显示。

[0252] 实施例4

[0253] AB527在体外与GD2特异性结合

[0254] 进行了几个实验以确定重组AB527是否能够在体外与纯化的GD2结合。开始时,进行了表面等离子体共振实验,以不仅确定重组AB527是否与GD2结合,而且确定它是否对GM2或GD3表现出亲和性(图8)。该实验如下进行:使用BIAcore 3000设备,将40 μL 0.3mg/mL的GD2(BioDesign)、GD3(HyTest)和GM2(USBiological)在10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA(HBS-E)中并含有30%乙醇的溶液,以5 μL/分钟的流速分别注射到CM5芯片的流动池2、3和4上。在每种神经节苷脂固定化后进行5次重复的20 μL 10mM NaOH注射,直到获得稳定的基线。接下来,将80 μL的200nM重组AB527在HBS-E缓冲液中的溶液以20 μL/分钟的流速注射到所有4个流动池上(流动池1用作参比流动池)。对重组AB527的解离跟踪6分钟。将芯片表面用50 μL 10mM NaOH再生。

[0255] 为了对AB527的结合动力学进行更好的表征,使用连续稀释的AB527和固定化在BIAcore CM5芯片上的GD2进行了附加的表面等离子体共振实验。简单来说,将从800nM开始的AB527在HBS-E缓冲液中的两倍连续稀释液,如上所述以20 μL/分钟的流速注射到含有GD2的CM5芯片上。在每个循环之间用50 μL 10mM NaOH再生芯片表面。对于每种测试的浓度,在BIAevaluation软件中确定每个浓度下的平衡结合( $R_{eq}$ ),然后将 $R_{eq}$ 对浓度进行作图。使用GraphPad Prizm®软件将得到的数据拟合于非线性稳态结合模型。当 $R_{eq}$ 作为AB527浓度的函数进行作图时,可以确定稳态 $K_D$ 或达到一半最大结合时AB527的浓度(图9)。对于AB527与GD2的结合来说,稳态 $K_D$ 值是 $4.5 \times 10^{-9}M$ 。

[0256] 还通过对薄层层析(TLC)分离的各种不同神经节苷脂进行免疫染色,测试了重组AB527的特异性。在immunoTLC分析中使用了下列神经节苷脂:GM混合物(Matreya, 0.5mg/mL在乙醇中,含有GM1、GM2和GM3)、GD混合物(Matreya, 0.5mg/mL在乙醇中,含有GD1a、GD1b和GD3)、GM4(Matreya, 1mg/mL在乙醇中)、GD2(BioDesign, 1mg/mL在乙醇中)和GM3(USBiological, 1mg/mL在乙醇中)。将总共2 μL各种神经节苷脂点样在5x10cm二氧化硅TLC板(EMD Chemicals, Inc.)上,并在具有比例为58:37:8的 $CHCl_3$ 、MeOH和0.1M  $CaCl_2$ 的溶液中展开。通过喷洒0.1%地衣酚在1.36N  $H_2SO_4$ 中的溶液并在100°C下

加热,对 TLC 板的总神经节苷脂进行染色。对于 immunoTLC 分析来说,将展开的板首先用 0.1% 聚甲基丙烯酸异丁基酯的水溶液处理,然后干燥。然后将板用 1x 磷酸盐缓冲的盐水 (PBS) 中的 1% BSA 阻断 1 小时。然后将阻断过的板在含有 1% BSA 的 1x PBS 的 2  $\mu$ g/mL AB527 中,在 4 $^{\circ}$ C 下温育过夜。随后将板用 1x PBS 清洗,然后用在含 1% BSA 的 PBS 中稀释 4000 倍的山羊抗人类 IgG/IgM 抗体-辣根过氧化物酶偶联物温育。将板清洗,并通过将板在 0.3mg/mL 4-氯 1-萘酚和 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中温育来检测结合的抗体。比较性的染色结果显示在图 10 中。

[0257] 实施例 5

[0258] AB527 标记 GD-2 表达细胞

[0259] 评估了 AB527 特异性标记表达 GD2 的黑素瘤细胞系的能力。将 GD2 阳性细胞系: M14、M0023、M101、M18、M10-Vac 和 PM0496,以及 GD2 阴性细胞系: M21、M238、IMCD0023、MG1055 分别培养在补充有 10% FBS、2mM L-谷氨酰胺、非必需氨基酸和 6  $\mu$ M HEPES 的 RPMI1640 中,并使用胰蛋白酶收获。将胰蛋白酶处理过的细胞与 10  $\mu$ g/mL 对照 IgM (人类 IgM, Pierce cat#31146) (第 I 列) 或 10  $\mu$ g/mL AB527 (第 II 列) 在冰上温育 1 小时。在用 1x PBS 清洗三次后,将细胞用 10  $\mu$ g/mL FITC 标记的山羊抗人类 Ig (H+L) 抗体 (Southern Biotech, Birmingham, AL) 在冰上温育 1 小时,然后通过流式细胞术 (分别为第 I 和 II 列) 或光学显微术和免疫荧光显微术 (分别为第 III 和 IV 列) 进行分析。正如图 11 中所示, AB527 标记的细胞在其表面上表达 GD2 (第 II 列)。相反,所研究的细胞系都不显示出与非 GD2 特异性人类 IgM 的染色 (第 I 列)。免疫荧光研究显示了与流式细胞术数据 (第 IV 列) 的直接关联性,出于比较目的也显示了光学显微照片 (第 III 列)。

[0260] 进行了基于细胞的 ELISA 以评估 AB527 与 GD-2 表达细胞系 M14、LLC-MK2、EL4 细胞和 CHO-K1 细胞 (阴性对照) 的结合,其提供了执行相应 Scatchard 分析的数据。图 12 提供了 EL4 细胞的代表性 Scatchard 数据组。AB527 与 M14 和 LLC-MK2 细胞的结合被确定为是几乎相同的 (分别为  $0.13 \pm 0.02$ nM 和  $0.15 \pm 0.04$ nM)。与 EL4 细胞的结合略微低些 ( $0.93 \pm 0.16$ nM)。这种差异可能是由于在 EL4 细胞上相对于 M14 和 LLC-MK2 观察到的明显较低的 GD2 表达 (数据未显示)。对于这些实验来说, M14、LLC-MK2、EL4 和 CHO-K1 细胞从美国典型培养物保藏中心 (American Tissue Type Collection (ATCC, Manassas, VA)) 获得。将 M14、EL4 和 CHO-K1 细胞培养在补充有 10% 胎牛血清的 RPMI 中。将 LLC-MK2 细胞培养在补充有 1% 马血清的 199 培养基中。将细胞悬浮在 1X PBS 中,并以  $2.5 \times 10^6$  个细胞 / 孔的浓度添加到黑色、U 型底的微量滴定板中 (Grenier cat. #665209),然后在室温下以 1500rpm 离心 5 分钟。舍弃上清液,并将细胞重新悬浮在含有 AB527 的溶液中,该溶液从 20  $\mu$ g/mL 开始以 1 : 2 在含有 2% BSA 的 PBS 中连续稀释。将细胞与抗体在室温下温育 1 小时。将细胞用 200  $\mu$ L 含有 2% BSA 和 0.05% Tween  $\text{\textcircled{R}}$ -20 的 PBS 清洗三次,在清洗步骤之间以 1500rpm 离心 5 分钟以收集细胞。然后将细胞在含有 1  $\mu$ g/mL 辣根过氧化物酶偶联的山羊抗人类 IgG/IgM 抗体 (Jackson Immunoresearch) 和 2% BSA 的 PBS 中,在室温下温育 1 小时。细胞按照上述进行清洗。结合的 AB527 使用 QuantaBlu<sup>TM</sup> 荧光底物 (Pierce),使用 324nm/420nm 的激发 / 发射波长,在 SpectraMax  $\text{\textcircled{R}}$  M5 多峰读板器 (Molecular Devices) 中检测。原始数据在 SoftMax Pro  $\text{\textcircled{R}}$  (ver. 5.2) 中作图,并拟合于 4 参数模型。数据分析在 GraphPad Prizm  $\text{\textcircled{R}}$  软件 (ver. 4.03) 中进行。首先减去非特异性背景 (与 CHO-K1 细胞的结

合),然后通过 Scatchard 分析对数据进行分析。

[0261] 进行了免疫组织化学 (IHC) 实验以确定 AB527 对不表达 GD2 的黑素瘤细胞是否表现出交叉反应性。使用 NHS 酯偶联化学,以 50 : 1 的生物素酰化反应试剂 (EZ-Link™ 磺基 -NHS-LC- 生物素, Pierce cat#21335) 在磷酸盐缓冲盐水中的摩尔比例,按照所提供的说明书,将纯化的 AB527 以及非特异性人类 IgM (Pierce cat#31146) 进行生物素标记,并用于染色各种 GD2 阳性 (M14) 或 GD2 阴性 (MG1055、RPMI7951 和 JS0592) 细胞系。简单来说,将每个黑素瘤细胞系接种在腔室玻片上,并在补充有 10% FBS、2mM L- 谷氨酰胺、非必需氨基酸和 6 μ M HEPES 的 RPMI1640 中培养过夜。将细胞用 1x PBS 清洗一次并用福尔马林固定。将固定的细胞与 1 μ g/mL 生物素酰化的 AB527 或生物素酰化的非特异性人类 IgM (阴性对照) 温育过夜,并使用 BioGenex Super Sensitive™ 连接 - 标记 IHC 检测系统检测标记的细胞。如图 13A 中所示,AB527 与 GD2 阳性细胞特异性结合,并与 GD2 阴性细胞具有最小的交叉反应性,而非特异性同种型对照抗体不染色任一细胞类型 (图 13B)。

[0262] 还使用了肿瘤和正常组织样品评估了 AB527 的结合特性。AB527 和非特异性正常人类 IgM (hIgM) 在 Covance Research Products 进行生物素酰化,并在 Charles River Laboratories 用于 IHC 研究。将人类黑素瘤细胞 M14 移植到裸鼠中以建立异体移植肿瘤,然后将其用作 GD2 阳性对照组织用于 IHC 方法的开发。使用直接的亲和素 - 生物素 - 过氧化物酶复合物 (ABC) 步骤的初步研究得到 M14 肿瘤切片与生物素酰化的 AB527 的阳性染色 (图 14(b)),但是不与生物素酰化的 hIgM 阳性染色 (图 14(a))。正如所预计的,正常人类脾脏的冷冻切片中的淋巴细胞不用任一抗体染色。在抗体滴定后,被选择用于 GLP 人类组织交叉反应性研究的生物素酰化的 AB527 和生物素酰化的 hIgM 的染色浓度被设定在 3 和 15 μ g/mL。使用这种方法,进行了研究以确定 35 种正常人类组织 (3 个样品 / 供体每种组织) 中的 AB527 结合。正如预期,可以在 M14 肿瘤切片中检测到高亲和性的膜染色 (在较低 AB527 浓度 -3 μ g/mL 下的阳性细胞膜染色)。正如在表 2 中所示,只能在食管 (3 个样品中的 2 个)、输卵管 (3 个样品中的 1 个) 和输尿管 (3 个样品中的 1 个) 的上皮细胞中,以及胎盘的蜕膜细胞 (3 个样品中的 3 个) 和胸腺的网织细胞 (3 个样品中的 2 个) 中发现高亲和性的膜染色。所有其他组织都不显示高亲和性膜染色 (表 2)。

[0263] 表 2 :正常人类组织中的 AB527 免疫组织化学

[0264]

组织	阳性/总数 (细胞类型)	组织	阳性/总数 (细胞类型)	组织	阳性/总数 (细胞类型)
肾上腺	阴性	肝脏	阴性	皮肤	阴性
血液细胞	阴性	肺脏	阴性	脊髓	阴性
血管	阴性	淋巴结	阴性	脾脏	阴性
骨髓	阴性	卵巢	阴性	横纹肌	阴性
脑(皮层)	阴性	输卵管	1/3 (上皮)	睾丸	阴性
脑(小脑)	阴性	胰腺	阴性	胸腺	2/3 (网织细胞)
乳腺	阴性	甲状旁腺	阴性	甲状腺	阴性
眼	阴性	外周神经	阴性	扁桃体	阴性
食管	2/3 上皮	垂体	阴性	输尿管	1/3 (上皮)
胃肠道	阴性	胎盘	3/3 (蜕膜细胞)	膀胱	阴性
心脏	阴性	前列腺	阴性	子宫(体)	阴性
肾脏	阴性	唾液腺	阴性	子宫(颈)	阴性

[0265] 实施例 6

[0266] AB527 促进表达 GD2 的细胞的补体依赖性细胞毒性

[0267] 为了确定 AB527 是否介导 CDC, 将上面描述的图 11 的黑素瘤细胞系与来自 AB527-HYB-3B2-3C9 克隆或 AB527 的部分纯化抗体进行温育。将靶细胞培养在补充有 10% FBS、2mM L-谷氨酰胺、非必需氨基酸和 6 μM HEPES 的 RPMI1640 中, 并在使用前用胰蛋白酶收获。将靶细胞与 10 μg/mL AB527 或 AB527-HYB-3B2-3C9 克隆 IgM 在 20% 人类血清存在下温育。在 37°C 下温育 1 小时后, 使用 Cell Titer Glo<sup>®</sup> 反应试剂 (Promega Corp., Madison, WI) 鉴定活细胞。杀死百分率被确定为来自处理过与未处理细胞的信号的比率。图 15 中的数据显示, 两种抗体能够对某些黑素瘤细胞系引发强 CDC 反应, 其中 AB527 一致地引起较高级别的 CDC。在本实施例中描述的使用 AB527 实验的结果概述在表 3 中。

[0268] 表 3: 用 AB527 处理的人类黑素瘤细胞系的 FACS、免疫荧光显微术和 CDC 分析的比较

[0269]

细胞系	AB527 FACS 染色	AB527 IHC	AB527 介导的 CDC 杀死
M14	+	+	+
LF0023	+	+	+
M101	+	+	+
M18	+	+	+
M10VAC	+	+	+
M21	+/-	-	-
M238	-	-	-
PM0496	+	+	-
IMCD0023	+/-	-	-
MG1055	-	-	-

[0270] 进行了其他工作以显示 AB527 在补体存在下只促进表达 GD2 的细胞的 CDC。如图 16 中所示,只有在存在补体和 GD-2 表达细胞例如 M14 细胞的情况下,才发现明显水平的 AB527 介导的 CDC 活性,而在不表达 GD2 的人类肿瘤细胞 1205LU 细胞的情况下则没有。

[0271] 为了评估 IgG1 同种型转换的 AB527 诱导 CDC 的体外能力,将 AB527 的 HindIII/BamHI 可变区 DNA 片段符合阅读框地克隆到 HindIII/BamHI 消化的含有 IgG1 恒定区的 pEE6.4 载体中。与 AB527 轻链的共表达引起 IgG1 版本的 AB527 的产生。对这种抗体与 IgM 版本的 AB527 在 1-100  $\mu$ g/mL 浓度下介导 M14 细胞的 CDC 的能力进行了比较,如图 17 中所示。

[0272] 还进行了研究以评估 J-链在 AB527 介导的 CDC 中可能发挥的作用。为了产生具有 J-链的 AB527 IgM 分子,将编码 J-链的质粒 p0362 转染到 CHOK1-SV 细胞中,并产生了稳定的、表达 J-链的克隆细胞系。然后将 AB527 表达质粒导入该细胞系,以产生表达 AB527 和 J-链的克隆。分离到了三个克隆,名为 5.F2-JC、5.F8-JC 和 6.C3-JC。对抗体进行平行的纯化以比较它们相对于不含 J-链的 AB527 版本的相对 CDC 活性。剂量响应曲线显示在图 18 中。对于 AB527、5.F2-JC、5.F8-JC 和 6.C3-JC 来说,计算的 90%有效剂量 (ED90) 分别为 1.21、4.35、2.52 和 6.81  $\mu$ g/mL。含有 J-链的 IgM (5.F2-JC、5.F8-C 和 6.C3-JC) 与不含 J-链的 AB527 相比,在介导 CDC 方面似乎效率低些。

[0273] 实施例 7

[0274] 通过蛋白 A 亲和层析从条件培养上清液捕获 IgM

[0275] 在柱子中装入 CPG3000A-蛋白 A 树脂 (Millipore)。根据 1mL 树脂在 76cm/h 流速下结合约 8mg IgM 的知识 (表 4) 估算用于捕获 IgM 的树脂的体积。一旦柱子装入所需量树脂后,将其与 FPLC 装置相连,并用 5 倍柱体积的纯水、3 倍柱体积的 pH 1.5 的 20mM HCl (缓

冲液 A2) 和 3 倍柱体积的 6M 盐酸胍 (缓冲液 A3) 清洗。在上样之前,将柱子用 5 倍柱体积的 pH 7.5 的含有 200mM NaCl 和 0.01% Tween<sup>®</sup>-80 的 10mM 磷酸钠缓冲液 (缓冲液 A1) 平衡。

[0276] 通过 0.22 μm 膜过滤器进行过滤,使条件培养上清液 (CCS) 澄清。向过滤过的 CCS 加入去污剂,以产生含有 1% Triton<sup>®</sup> X-100 和 0.1% TNBP 的溶液,并在 4℃ 下温育 2 小时以上。将去污剂处理过的 CCS 施加到平衡过的 CPG3000A 蛋白 A 柱,并以 76cm/h 的流速处理。在用 10 倍柱体积的缓冲液 A1 洗掉未结合的蛋白后,使用补充有 3M MgCl<sub>2</sub> 的 pH 6.8 的 5mM 磷酸钠缓冲液 (缓冲液 B) 洗脱 IgM。通过施加 3 倍柱体积的缓冲液 A2 和 3 倍柱体积的缓冲液 A3,从柱子中除去残留的结合蛋白。为了评估纯度,进行了还原性 SDS-PAGE 凝胶电泳以比较施加到蛋白 A 柱的去污剂处理过的 CCS (上样液) 和洗脱后从合并的级份收集到的 AB527 (洗脱液) (图 19- 箭头指出 IgM μ 链 (~70kD) 和轻链 (~25kD))。蛋白 A 亲和层析允许回收 ≥ 90% 的输入的 IgM,其基本上不含污染物。

[0277] 表 4-CPG3000A 蛋白 A 树脂对 IgM 的动态结合能力。将不同体积的含有 AB527 的 CCS 以不同的线性流速流过 10X25mm CPG3000A 柱。上样到柱子中和存在于流过液中的 AB527 的浓度,通过测定它们与在装配到 HPLC 系统上的蛋白 A 柱 (POROS A, Applied Biosystems) 上测定的已知 IgM 标准品的标准曲线相比较的相对浓度来计算。对于每次注射,计算了每个流过液中 AB527 与上样抗体量的比率,以确定 5% 和 10% IgM 漏过率下柱子的动态结合能力。

[0278]

线性流速 (cm·hr <sup>-1</sup> )	动态结合能力 (DBC) <sup>1</sup> (mg AB527/L CPG3000A)		流出液 (FT) 中的 AB527 (mg)	
	5% 漏过率	10% 漏过率	5% 漏过率	10% 漏过率
23	5780	6420	11559	12840
38	6869	7630	13737	15260
76	4395	5437	8789	10873
152	3126	3910	6252	7819

[0279] <sup>1</sup>DBC 在 1.0cmx2.5cm 床 (2ml 床体积) 上测定

[0280] 实施例 8

[0281] 通过阳离子交换层析从条件培养上清液污染物分离 IgM

[0282] 为了除去污染物,将悬浮在缓冲液 B 中的 IgM 通过渗滤进行浓缩,使用了 Prep/Scale-TFF 1 柱 (Millipore) 和 10 倍体积的含有 10mM 磷酸钠、75mM NaCl 的缓冲液。渗滤以约 200mL/ 分钟的流速进行,入口压力保持低于 20PSI,渗透流速约为 60mL/ 分钟。向渗滤过的样品加入 10% Triton<sup>®</sup> X-100 溶液,以产生终浓度为 1% 的 Triton<sup>®</sup> X-100,并将样品在室温下温育 1 小时,并通过 0.2 μm 膜过滤。

[0283] 阳离子交换柱装有 MacroCap<sup>™</sup> SP 树脂 (GE Healthcare)。根据 1mL 树脂在 76cm/h 流速下结合约 9mg IgM 的知识 (图 20) 估算用于捕获 IgM 的树脂的体积。一旦柱子装入

所需量树脂后,将其与 FPLC 装置相连,并用 2 倍柱体积的纯水、3 倍柱体积的 0.5M NaOH(缓冲液 A6) 和 3 倍柱体积的 2M NaCl 清洗。在上样之前,将柱子用 5 倍柱体积的 pH 6.8 的含有 10mM 磷酸钠、75mM NaCl 和 0.01% Tween<sup>®</sup>-80 的缓冲液(缓冲液 A4)平衡。

[0284] 将渗滤过的样品施加到柱子,并以 76cm/h 的流速处理。在使用 5 倍柱体积的缓冲液 A4 洗掉未结合蛋白之后,使用 4 倍柱体积的 pH 6.8 的含有 200mM NaCl 和 0.01% Tween<sup>®</sup>-80 的 10mM 磷酸钠缓冲液(缓冲液 C)从柱子上洗脱 IgM。通过施加 3 倍柱体积的缓冲液 A6 和 3 倍柱体积的 2M NaCl 从柱子上除去残留的结合蛋白。如图 13A 和 B 中所示,流过液材料主要包含 IgM 三体和二体的混合物(图 21A);但是,洗脱的材料几乎完全是五聚体 IgM(图 21B)。阳离子交换层析提供  $\geq 95\%$  收率的五聚体 IgM,其基本上不含污染物和不完全装配的 IgM(图 22)。

[0285] 实施例 9

[0286] 通过羟基磷灰石层析从条件培养上清液污染物中分离 IgM

[0287] 羟基磷灰石柱使用珠子尺寸为 80  $\mu\text{m}$  的 CHT<sup>®</sup> II 陶瓷羟基磷灰石(Bio-Rad Laboratories, #157-8100) 制备。根据 1mL 树脂在 76cm/h 流速下结合约 20mg IgM 以及在该流速下在柱子的流出液中 IgM 的损失小于 5% 的知识(图 20),估算用于捕获 IgM 的树脂的体积。通过将基质用 200mM pH9.0 的磷酸钾水合进行装柱,每 mL 所需柱床体积使用 0.54g 干基质。将水合的基质加入到柱子中,允许其沉降,然后将柱子用 5 倍柱体积的 pH 6.8 的含有 10mM 磷酸钠、100mM NaCl 和 0.01% Tween<sup>®</sup>-80 的缓冲液(缓冲液 A8)平衡。

[0288] 为了减少污染物将悬浮在 pH 6.8 的 10mM 磷酸钠、200mM NaCl、0.01% Tween<sup>®</sup>-80 中的 IgM 用相等体积的 0.01% Tween<sup>®</sup>-80 稀释,并加到平衡后的柱子中。IgM 悬液以 76cm/h 的流速处理通过柱子。将柱子用 10 倍柱体积的缓冲液 A8 清洗以除去未结合的物质。结合的 IgM 用 4 倍柱体积的含有 100mM NaCl 和 0.01% Tween<sup>®</sup>-80 的 pH 6.8 的 175mM 磷酸钠缓冲液洗脱。在洗脱后,用含有 100mM NaCl 的 pH6.8 的 500mM 磷酸钠缓冲液从柱子中除去剩余的结合蛋白。得到的 IgM 溶液基本上不含污染物。当进行过本文描述的蛋白 A 亲和层析和阳离子交换层析之后再从羟基磷灰石基质洗脱的溶液,与澄清的细胞培养上清液相比纯度超过 99%。

[0289] 实施例 10

[0290] 神经节苷脂-BSA 偶联物的生产

[0291] 生产 GD2-BSA 偶联物以提供有效的 GD2 抗原,用于通过免疫测定法检测 GD2 特异性抗体的特异性。此外,产生了 GM2-BSA 和 GM3-BSA 偶联物用作 GD2-BSA 结合特异性的对照。共价偶联物使用氰基硼氢钠作为温和还原剂,通过神经节苷脂被 BSA 上存在的胺的位点特异性还原胺化来制备。偶联据认为主要发生在 BSA 中存在的赖氨酸残基侧链上的末端  $\epsilon$ -氨基上。

[0292] 为了制备偶联物,将 400  $\mu\text{l}$  溶解在 pH 9.6 的 0.05M 碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中的 2mg/ml BSA 溶液,与 500  $\mu\text{l}$  溶解在无水乙醇中的 1mg/ml 的 GD2(Biodesign International, #A86168H)、GM2(Axxora, #ALX-302-005-M001) 或 GM3(Axxora, #ALX-302-003-M002) 溶液、2070  $\mu\text{l}$  pH 9.6 的 0.05M 碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液和 30  $\mu\text{l}$  5M 氰基硼氢钠的 10mM 氢氧化钠溶液混合。将反应混合物在 25 $^{\circ}\text{C}$  温育 2 小时,然后加入 1200  $\mu\text{l}$  pH 8.0 的 1M 乙醇胺,并在 25 $^{\circ}\text{C}$  下继续温育 15 分钟。将反应溶液放置在透析管(Pierce

Biotechnology, #68100) 中,并在 1L pH 9.6 的 50mM 碳酸钠 - 碳酸氢钠溶液中,在 2-8°C 下进行两次 6-18 小时的透析。

[0293] 实施例 11

[0294] AB527 结合 BSA 偶联的 GD2

[0295] 通过 ELISA 评估了 GD2-BSA 偶联物的抗原性。通过将一颗碳酸盐 / 碳酸氢盐胶囊 (Sigma) 溶解在 100mL 超纯水中制备了 ELISA 包被缓冲液。将 GD2-BSA 偶联物在 ELISA 包被缓冲液中稀释到 2  $\mu$ g/ml 的浓度,并添加到 96 孔 ELISA 板 (Greiner Bio-One cat#655081) 的孔中。将板密封,并在 2-8°C 下温育 16-24 小时。在温育后,从孔中除去包被缓冲液,并加入 0.3mL/孔的 ELISA 阻断溶液 (补充有 2.5% BSA (w/v) 和 0.05% Tween<sup>®</sup>-20 的 PBS)。将板在微孔板摇床上振摇,在 21-25°C 下温育 2 小时,然后加入 AB527 抗体。加入 AB527 的两倍连续稀释液 (起始工作浓度为 2  $\mu$ g/ml) 以阻断 ELISA 板,并在 21-25°C 下、在微孔板摇床上振摇温育 1 小时。将板在 Dynex Ultrawash<sup>™</sup> 洗板器上,使用 0.3mL/孔 ELISA 清洗缓冲液清洗三次。使用在 ELISA 阻断缓冲液中以 1 : 10,000 稀释的 HRP-偶联的山羊抗人类 IgG+IgM(H+L) 抗体检测结合的 AB527。除去 HRP 偶联物并将孔用 0.3mL/孔 ELISA 清洗缓冲液清洗三次。向洗过的孔加入 SureBlue<sup>™</sup> TMB 底物 (50  $\mu$ l/孔),并将板在 21-25°C 下温育 15 分钟,然后通过光吸收 (450nm) 评估 AB527 结合 (图 23)。在不存在 AB527 的情况下,在 450nm 处的非特异性吸收被测定是 0.065。

[0296] 与 GD2-BSA 偶联物相反,AB527 不识别其他神经节苷脂-BSA 偶联物。通过对 GD2 所描述的方法将神经节苷脂 GM2 和 GM3 与 BSA 相偶联,并通过 ELISA 评估二者引发 AB527 结合的能力。如图 24 中所示,AB527 只识别 GD2-BSA 偶联物。应该指出,GM2 特异性抗体能够检测 GM2-BSA 偶联物;但是,不能获得适合的 GM3 特异性抗体以评估 GM3-BSA 偶联物的抗原性质 (数据未显示)。

[0297] 实施例 12

[0298] CMS 对 GIBCO-CD CHO 完全培养基中生长的表达 AB527 的细胞的影响

[0299] 为了确定培养基补充剂 (CMS) 对细胞生长和抗体生产的影响,将细胞在含有 20mL GIBCO-CD-CHO 完全培养基的摇瓶中复苏并培养。所有培养物在 125mL 摇瓶中,在 37°C、5% CO<sub>2</sub>、120rpm 下温育。接种密度为 3.5x10<sup>5</sup> 个细胞 /mL,存活率 > 95%。将细胞在 CD-CHO 培养基或是在第 3-7 天补充 2% (vol/vol) CMS 的 CD-CHO 培养基中培养 14 天。在第 7 天添加 CMS 后,初始培养体积的总共 10% 是补充的 CMS。在第 0、3、5、7、10、13 和 14 天,使用 CEDEX 自动细胞计数器测定活细胞密度 (图 25)、存活百分数 (图 26) 和积分活细胞密度 (IVC) (图 27)。对于每组培养的细胞,在第 14 天通过蛋白 A HPLC 测定了抗体生产 (图 28)。

[0300] 如图 25 中所示,从第 3 到第 7 天提供有 2% CMS 的培养细胞,在第 7 天获得了 12.8x10<sup>6</sup> 个细胞 /mL 的最高活细胞密度。不含 CMS 的对照细胞培养物,在第 7 天达到 10.7x10<sup>6</sup> 个细胞 /mL 的最大细胞密度。CMS 的使用添补了限制性培养基组分例如葡萄糖、氨基酸和维生素,并帮助培养物达到较高细胞密度。在两种细胞培养条件下,细胞到第 7 天时都维持良好的存活性 (> 90%) (图 26);但是,从第 3 到第 7 天提供有 CMS 的培养细胞被证实 7 天后与对照培养物相比具有更好的存活性。有可能在 7 天后,对照培养物中某些关键营养物质被耗尽,而 CMS 将那些关键营养物质添加回来,并帮助维持细胞更好的存活性。

[0301] 第 14 天时,对每种培养物评估总抗体产量。用 CMS 培养的细胞达到 7240mg/L 的

最大抗体滴度,远高于对于对照培养物所观察到的(3036mg/L)(图28)。较高的抗体滴度可能是添加营养物质后较高的比抗体生产速率的结果。对每种生长条件的细胞生长和抗体生产情况的研究证明,提供有CMS的培养物实现了抗体生产的140%的增加(表5)。即使对于两种培养物来说倍增时间相同,CMS帮助培养物获得了50%的IVC增加和比抗体生产速率的另外50%的增加。IVC的50%的增加是由于在使用CMS的培养物中获得的较高最大细胞密度。因为最终抗体滴度等于IVC乘以比生产速率,这表明IVC和比抗体生产速率两者都对使用CMS的细胞培养物中抗体产量的140%增加有贡献。表5概述了CMS对AB527表达细胞的影响。

[0302] 表5-CMS对AB527表达细胞的细胞生长和抗体产量的影响的概述。

[0303]

培养条件	最大活细胞密度 ( $10^5/\text{mL}$ )	最终抗体滴度 (mg/L)	倍增时间 (DT)	活细胞密度的积分 (IVC) (细胞·天/mL)	比抗体生产速率 (Qp) (mg/ $10^9$ 细胞/天)
CD-CHO 对照	107.00	3036	24.17	6.85E+7	44.08
CMS	128.40	7239.9	24.17	1.04E+8	66.95

[0304] 实施例13

[0305] 戊酸对GIBCO-CD CHO完全培养基中生长的AB527表达细胞的影响

[0306] 为了确定戊酸对细胞生长的影响,将AB527表达细胞培养在添加戊酸至浓度为0mM、1mM、2mM、4mM或8mM的GIBCO-CD-CHO完全培养基中。将细胞培养14天,并在第0、3、5、7、10、13和14天使用CEDEX自动细胞计数器测定活细胞密度、存活百分数和积分活细胞密度。对于每组培养的细胞,在第14天通过蛋白A HPLC测定抗体生产。

[0307] 不使用戊酸培养的细胞在第7天达到 $10.8 \times 10^6$ 个细胞/mL的最大细胞密度;但是,用戊酸培养的细胞随着戊酸浓度的增加,生长越来越慢。例如,在8mM戊酸中培养的细胞,在第7天时达到 $5.4 \times 10^6$ 个细胞/mL的最大细胞密度,这在所有培养物中是最低的最大细胞密度。细胞存活性研究证明,用戊酸培养的细胞在第7天之前具有较低存活性,其中对于在8mM戊酸中培养的细胞来说观察到最低的第7天时的存活性(67.4%)。这些结果表明,较高浓度的戊酸抑制细胞增殖。在第7天后,对照培养物的存活性下降得快得多;但是,这可能是由于关键营养物质的消耗,因为该细胞培养物比在戊酸中培养的细胞具有高得多的细胞密度(表6)。

[0308] 但是,出人意料的是,戊酸对抗体生产具有阳性效应。所有在戊酸存在下培养的细胞,除了8mM的最高浓度之外,在第14天时都具有比对照培养物更高的抗体滴度。在1mM戊酸中培养的细胞在第14天时产生最高的抗体滴度(4137mg/L),其比对照培养物(3036mg/L)高36%(表6)。

[0309] 尽管戊酸抑制细胞生长,但除了8mM的最高浓度之外,没有证实对活细胞密度积分的显著的负面影响。第14天时的IVC值与其他四种培养条件相当近似。可能戊酸对细胞增殖的抑制导致了营养物质的较慢消耗,因此避免了对照培养物所遇到的晚期营养物耗

尽的培养基。

[0310] 概括来说,细胞培养物在戊酸存在下能够实现更好的抗体生产。在使用戊酸的培养物中观察到了 52 到 58mg/10<sup>9</sup> 个细胞 / 天的比抗体生产速率 (表 6), 其比对于对照培养物观察到的 44mg/10<sup>9</sup> 个细胞 / 天的值高的多。因此,在 1mM 戊酸中培养的细胞获得的最高抗体产量主要是由于比抗体生产速率的增加引起的 (表 6)。

[0311] 表 6- 戊酸对 AB527 表达细胞的细胞生长和抗体产生的影响的概述。

[0312]

培养条件	最大活细胞密度 (10 <sup>5</sup> /mL)	最终抗体滴度 (mg/L)	倍增时间 (DT)	活细胞密度的积分 (IVC) (细胞·天/mL)	比抗体生产速率 (Qp) (mg/10 <sup>9</sup> 细胞/天)
CD-CHO 对照	107.00	3036	24.17	6.85E+7	44.08
戊酸 (1 mM)	94.60	4137.1	24.17	6.74 E+7	58.44
戊酸 (2 mM)	81.00	3706.7	24.17	6.55 E+7	54.45
戊酸 (4 mM)	77.40	3600.1	24.17	6.72 E+7	52.24
戊酸 (8 mM)	54.40	2760.4	24.17	4.76 E+7	56.16

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; 诺福泰克公司

&lt;120&gt; 抗 GD2 抗体和方法及其相关应用

&lt;130&gt; SCT105968-30

&lt;150&gt; US 61/077,041

&lt;151&gt; 2008-06-30

&lt;150&gt; US 61/097,034

&lt;151&gt; 2008-09-15

&lt;160&gt; 60

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1767

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 1

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt acacagcgag      60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtccagcctg gggggtcct gagactctcc      120
tgtgcagcct ctgggttcac cgtcagtggc agctacatga gctgggtccg ccaggctcca      180
gggaaggac tggagtgggt ctcagtcatt tatagcggtg gtagcacata ctacgcagac      240
tccgtgaagg gcagattcac catctccaga gacaattcga agaacaccct gtatcttcaa      300
atgaacagcc tgagagccga ggacacggct gtgtattact gtgcgagaga cctccgcggt      360
tcctatgact actggggcca gggaaccctg gtcacgtct cctcaggag tgcatccgcc      420
ccaaccctt tccccctgt ctctgtgag aattccccgt cggatacag cagcgtggcc      480
gttggtgcc tcgcacagga cttcctccc gactccatca ctttctctg gaaatacaag      540

```

[0002]

aacaactctg acatcagcag caccggggc ttccatcag tcctgagagg gggcaagtac	600
gcagccacct cacaggtgct gctgccttcc aaggacgtca tgcagggcac agacgaacac	660
gtggtgtgca aagtccagca cccaacggc aacaaagaaa agaactgcc tcttccagt	720
attgtgagc tgcctccaa agtgagcgtc ttctgcccac cccggcagg cttcttcggc	780
aacccccga agtccaagct catctgccag gccacgggtt tcagtcccc gcagattcag	840
gtgtcctggc tgcgcgaggg gaagcaggtg gggctcggcg tcaccacgga ccaggtgcag	900
gctgaggcca aagagtctgg gccacgacc tacaaggtga ccagcacact gaccatcaaa	960
gagagcgact ggctcagcca gagcatgttc acctgccgcg tggatcacag gggcctgacc	1020
ttccagcaga atgcgtctc catgtgtgtc cccgatcaag acacagccat ccgggtcttc	1080
gcatcccc catcctttgc cagcatcttc ctaccaagt ccaccaagtt gacctgctg	1140
gtcacagacc tgaccaccta tgacagcgtg accatctcct ggaccgccca gaatggcga	1200
gctgtgaaaa cccacaccaa catctccag agccaccca atgccactt cagcgcctg	1260
ggtgaggcca gcatctgcga ggatgactgg aattccgggg agaggttac gtgcaccgtg	1320
accacacag acctgcctc gccactgaag cagaccatct cccggcccaa ggggtggcc	1380
ctgcacagc ccatgtctc cttgtgcca ccagcccggg agcagctgaa cctgcgggag	1440
tcggccacca tcactgcct ggtgacgggc ttctctcccg cggactctt cgtgcagtgg	1500
atgcagaggg ggcagccctt gtccccggag aagtatgtga ccagcgcctt aatgcctgag	1560
cccaggccc caggccgta cttcggccac agcatcctga ccgtgtccga agaggaatgg	1620
aacacggggg agacctacac ctgcgtggtg gccatgagg ccctgcccga cagggtcacc	1680
gagaggaccg tggacaagtc caccggtaaa cccacctgt acaactgtc cctggtcatg	1740
tccgacacag ctggcacctg ctactga	1767

[0003]

<210> 2	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 2	
gggttcaccg tcagtggcag ctacatgagc	30
<210> 3	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 3	
gtcatttata gcggtggtag cacatactac gcagactccg tgaagggc	48
<210> 4	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 4	
gacctccgcg gttcctatga ctac	24
<210> 5	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 5	
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc	60
tctgtgcag cctct	75
<210> 6	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 6	

[0004]

tgggtccgcc aggtccagg gaaggactg gagggtct ca 42

<210> 7

<211> 96

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

agattcacca tctccagaga caattcgaag aacacctgt atcttcaat gaacagcctg 60

agagccgagg acacggctgt gtattactgt gcgaga 96

<210> 8

<211> 315

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

gaggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60

tctgtgcag cctctgggtt caccgtcagt ggcagctaca tgagctgggt ccgccaggt 120

ccaggaagg gactggagtg ggtctcagtc atttatagcg gtgtagcac atactacgca 180

gactcctga agggcagatt caccatctcc agagacaatt cgaagaacac cctgtatctt 240

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agacctccgc 300

ggttcctatg actac 315

<210> 9

<211> 588

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 9

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

[0005]

1	5	10	15
Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	20	25	30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val	35	40	45
Ser Gly Ser Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	50	55	60
Glu Trp Val Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp	65	70	75
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr	85	90	95
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr	100	105	110
Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Arg Gly Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	115	120	125
Thr Leu Val Ile Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe	130	135	140
Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala	145	150	155
Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser	165	170	175
Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro			

[0006]

	180		185		190
Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu					
	195		200		205
Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys					
	210		215		220
Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val					
225		230		235	240
Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp					
	245		250		255
Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr					
	260		265		270
Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys					
	275		280		285
Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys					
	290		295		300
Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys					
305		310		315	320
Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His					
	325		330		335
Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp					
	340		345		350
Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser					

[0007]

355	360	365
Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu		
370	375	380
Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu		
385	390	395
Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr		
405	410	415
Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser		
420	425	430
Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro		
435	440	445
Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro		
450	455	460
Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu		
465	470	475
Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val		
485	490	495
Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr		
500	505	510
Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe		
515	520	525
Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu		

[0008]

530	535	540
Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr		
545	550	555 560
Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val		
	565	570 575
Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr		
	580	585
<210> 10		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 10		
Gly Phe Thr Val Ser Gly Ser Tyr Met Ser		
1	5	10
<210> 11		
<211> 16		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 11		
Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly		
1	5	10 15
<210> 12		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 12		

[0009]

Asp Leu Arg Gly Ser Tyr Asp Tyr  
1 5

<210> 13

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
20 25

<210> 14

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
1 5 10

<210> 15

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
20 25 30

[0010]

<210> 16  
 <211> 105  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 16  
  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                   5                   10                   15  
  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Gly Ser  
                  20                   25                   30  
  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                  35                   40                   45  
  
 Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
                  50                   55                   60  
  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65                   70                   75                   80  
  
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
                  85                   90                   95  
  
 Arg Asp Leu Arg Gly Ser Tyr Asp Tyr  
                  100                   105  
  
 <210> 17  
 <211> 717  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Synthetic construct

[0011]

<400> 17	
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt acacagcgaa	60
attgtgctga ctcagtctcc actctccctg cccgtcacc ttggacagcc ggcctccatc	120
tcctgcaggt ctagtcaaag cctcgtatac agtgatggaa acacctactt gaattggttt	180
cagcagaggc caggccaatc tccaaggcgc ctaatttata aggtttctaa cgggactct	240
gggtcccag acagattcag cggcagtggg tcaggcactg atttcacact gaaaatcagc	300
agggtggagg ctgaggatgt tggggtttat tactgcatgc aaggtaacaca ctggccgagg	360
acgttcggcc aagggaccaa ggtggaaatc aaacgaactg tgctgcacc atctgtcttc	420
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg	480
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg	540
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc	600
agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc	660
accatcagg gctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttaa	717
<210> 18	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 18	
aggtctagtc aaagcctcgt atacagtgat gaaacacct acttgaat	48
<210> 19	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 19	
aaggtttcta accgggactc t	21

[0012]

<210> 20	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 20	
atgcaaggta cacactggcc gcggacg	27
<210> 21	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 21	
gaaattgtgc tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccttgaca gccggcctcc	60
atctctctgc	69
<210> 22	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 22	
tggtttcagc agaggccagg ccaatctcca aggcgcctaa tttat	45
<210> 23	
<211> 96	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 23	
ggggtcccag acagattcag cggcagtggg tcaggcactg atttcacact gaaaatcagc	60
agggtggagg ctgaggatgt tggggtttat tactgc	96
<210> 24	
<211> 306	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	

[0013]

<400> 24  
 gaaattgtgc tgactcagtc tccactctcc ctgccctca cccttgaca gccggcctcc 60  
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg 120  
 tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taaccgggac 180  
 tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240  
 agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaggtag aactggccg 300  
 cggacg 306

<210> 25  
 <211> 238  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic construct

<400> 25

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val  
 20 25 30

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

Val Tyr Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro  
 50 55 60

Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser  
 65 70 75 80

[0014]

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

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

Met Gln Gly Thr His Trp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val  
 115 120 125

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

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu  
 145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn  
 165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser  
 180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala  
 195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly  
 210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

<210> 26  
 <211> 16  
 <212> PRT

[0015]

<213> Homo sapiens

<400> 26

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn  
1                    5                    10                    15

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser  
1                    5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Gln Gly Thr His Trp Pro Arg Thr  
1                    5

<210> 29

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
1                    5                    10                    15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys  
20

[0016]

<210> 30  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr  
 1                    5                    10                    15

<210> 31  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1                    5                    10                    15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys  
                   20                    25                    30

<210> 32  
 <211> 102  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1                    5                    10                    15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser  
                   20                    25                    30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45

[0017]

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
 85 90 95

Thr His Trp Pro Arg Thr  
 100

<210> 33

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer

<400> 33

gatcggatcc aagcttgccg ccaccatggg atggagctgt atcatcctct tcttgtagc 60

aacagctaca ggtgtacaca gcgaggtgca gctggtggag tct 103

<210> 34

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer

<400> 34

gggaagctta ccatgaagag gccaggagt ccccccgagg gtcagggtga tggaggcagg 60

[0018]

<210>	35	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Oligonucleotide primer	
<400>	35	
	gatcaattgt cagtagcagg tgccagctgt gtcggacatg accag	45
<210>	36	
<211>	80	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Oligonucleotide primer	
<400>	36	
	gatcggatcc gccgccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc	60
	tacaggtgta cacagcga	80
<210>	37	
<211>	60	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Oligonucleotide primer	
<400>	37	
	gggaagctta ccatgaagag gcccaggagt ccccccgagg gtcagggtga tggaggcagg	60
<210>	38	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		

[0019]

<223> Oligonucleotide primer	
<400> 38	
gatcgaattc ttaacactct ccctgttga ag	32
<210> 39	
<211> 1710	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 39	
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc	60
tctgtgcag cctctgggtt caccgtcagt ggcagctaca tgagctgggt ccgccaggct	120
ccagggaaagg gactggagtg ggtctcagtc atttatagcg gtggtagcac atactacgca	180
gactccgtga agggcagatt caccatctcc agagacaatt cgaagaacac cctgtatctt	240
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agacctccgc	300
ggttcctatg actactgggg ccagggaaacc ctggtcatcg tctcctcagg gagtgcattc	360
gccccaaccc ttttcccct cgtctctgt gagaattccc cgtcggatac gagcagcgtg	420
gccgttggt gcctgcaca ggacttctt cccgactcca tcactttctc ctggaatac	480
aagaacaact ctgacatcag cagcaccggt ggcttccat cagtcctgag agggggcaag	540
tacgcagcca cctcacaggt gctgctgcct tccaaggacg tcatgcaggg cacagacgaa	600
cacgtggtgt gcaaagtcca gcacccaac ggcaacaaag aaaagaacgt gcctcttcca	660
gtgattgctg agctgcctcc caaagtgagc gtcttcgtcc caccccgca cggtctctc	720
ggcaaccccc gcaagtccaa gctcatctgc caggccacgg gtttcagtcc ccggcagatt	780
cagggtctct ggctgcgca ggggaagcag gtggggtctg gcgtcaccac ggaccaggtg	840
caggctgagg ccaaagagtc tgggccacg acctacaagg tgaccagcac actgaccatc	900
aaagagagcg actggtcag ccagagcatg ttcacctgcc gcgtggatca caggggcctg	960

[0020]

acctccagc agaatgcgtc ctccatgtgt gtccccgac aagacacagc catccgggtc 1020  
 ttgccaatcc ccccatcctt tgccagcatc ttctcacca agtccaccaa gttgacctgc 1080  
 ctggtcacag acctgaccac ctatgacagc gtgacatctt cctggaccog ccagaatggc 1140  
 gaagctgtga aaaccacac caacatctcc gagagccacc ccaatgccac tttcagcgcc 1200  
 gtgggtgagg ccagcatctg cgaggatgac tggaattccg gggagaggtt cacgtgcacc 1260  
 gtgaccaca cagacctgcc ctgccactg aagcagacca tctcccgcc caaggggtg 1320  
 gccctgcaca ggcccgatgt ctacttctg ccaccagccc gggagcagct gaacctgcgg 1380  
 gagtggcca ccatcacgtg cctggtgac ggcttctctc ccgcgacgt cttcgtgcag 1440  
 tggatgcaga gggggcagcc cttgtccccg gagaagtatg tgaccagcgc cccaatgcct 1500  
 gagccccagg cccagggccg gtacttegcc cacagcatcc tgacctgtc cgaagaggaa 1560  
 tggaacacgg gggagacctc cacctgcgtg gtggccatg aggccctgcc caacagggtc 1620  
 accgagagga ccgtggacaa gtccaccggt aaaccaccc tgtacaacgt gtcctgtgc 1680  
 atgtccgaca cagctggcac ctgctactga 1710

<210> 40

<211> 569

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Gly Ser  
                   20                    25                    30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                    40                    45

[0021]

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Asp Leu Arg Gly Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Ile Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val  
115 120 125

Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys  
130 135 140

Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr  
145 150 155 160

Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu  
165 170 175

Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys  
180 185 190

Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His  
195 200 205

Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu  
210 215 220

[0022]

Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe  
225 230 235 240

Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser  
245 250 255

Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly  
260 265 270

Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly  
275 280 285

Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp  
290 295 300

Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu  
305 310 315 320

Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr  
325 330 335

Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu  
340 345 350

Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr  
355 360 365

Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys  
370 375 380

Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala  
385 390 395 400

[0023]

Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg  
 405 410 415

Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln  
 420 425 430

Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr  
 435 440 445

Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr  
 450 455 460

Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln  
 465 470 475 480

Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser  
 485 490 495

Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser  
 500 505 510

Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr  
 515 520 525

Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr  
 530 535 540

Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val  
 545 550 555 560

Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr  
 565

[0024]

<210> 41  
 <211> 660  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 41  
 gaaattgtgc tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60  
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg 120  
 tttcagcaga gccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taaccgggac 180  
 tctggggctc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240  
 agcaggggtg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaggtag aactggccc 300  
 cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360  
 ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420  
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgcctccaa 480  
 tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540  
 agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaac acaaagtcta cgctgcgaa 600  
 gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttaa 660

<210> 42  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 42

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1                    5                                    10                                    15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser  
                   20                                    25                                    30

[0025]

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
 85 90 95

Thr His Trp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 195 200 205

[0026]

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 43

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt acacagc

57

<210> 44

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Val His Ser

<210> 45

<211> 24

<212> DNA

<213> Epstein-Barr Virus

<400> 45

agcatgcctg aactaagtcc agtc

24

<210> 46

<211> 24

<212> DNA

<213> Epstein-Barr Virus

[0027]

<400> 46	
tttactgggt ccctccacat aatc	24
<210> 47	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Epstein-Barr Virus	
<400> 47	
ttctactagg aaacggcgag cagg	24
<210> 48	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Epstein-Barr Virus	
<400> 48	
ccggggtgct ggcgtctcat aa	22
<210> 49	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Epstein-Barr Virus	
<400> 49	
ctgattgctg agaacctgct g	21
<210> 50	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Epstein-Barr Virus	
<400> 50	
ctcccttgag cgtggcgttg at	22
<210> 51	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Epstein-Barr Virus	

[0028]

<400> 51  
aggtcgtgtt ccatacctcag g 21

<210> 52  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Epstein-Barr Virus

<400> 52  
tgccccagca agccgcagcg ac 22

<210> 53  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Epstein-Barr Virus

<400> 53  
gggcagtgtg tcaggagcaa g 21

<210> 54  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Epstein-Barr Virus

<400> 54  
actttccgcg cctgcctcat ga 22

<210> 55  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Epstein-Barr Virus

<400> 55  
ttcacctgtc ttggtccctg 20

<210> 56  
<211> 20  
<212> DNA

[0029]

<213> Epstein-Barr Virus	
<400> 56	
gtaaaagggt cctaaggaac	20
<210> 57	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 57	
cctcaccatt gagaaccaga	20
<210> 58	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 58	
tgtagcactg tttcatcac a	21
<210> 59	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Murine	
<400> 59	
cctccccact gagaaggaac	20
<210> 60	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Murine	
<400> 60	
tetcaggaac accatcgtct	20

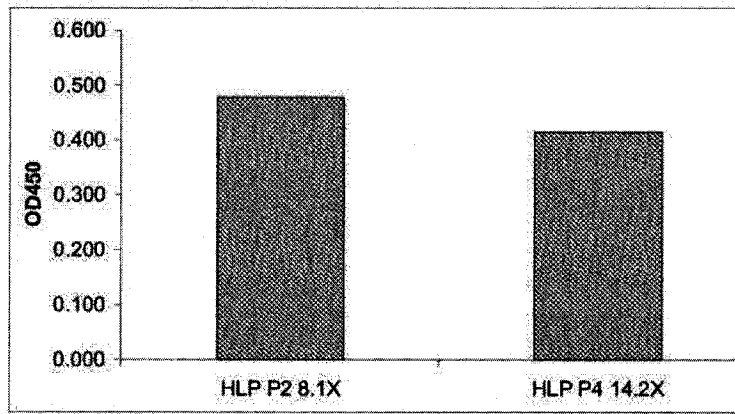


图 1A

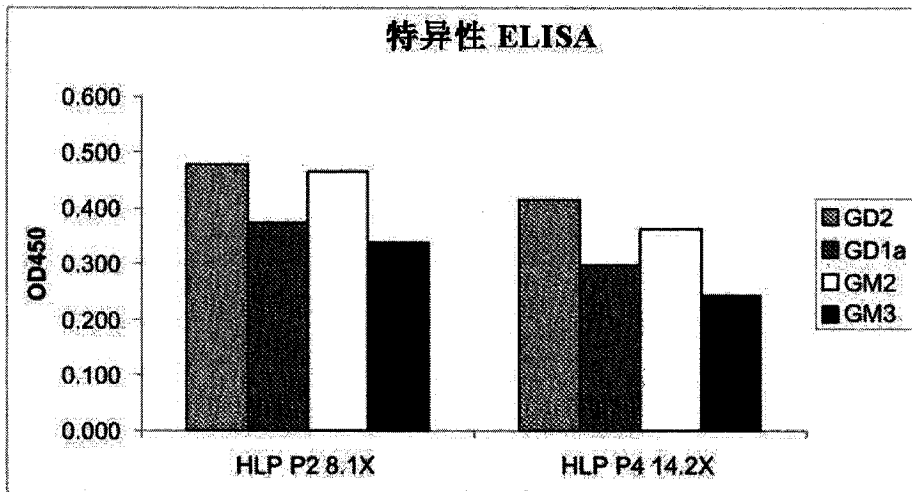


图 1B

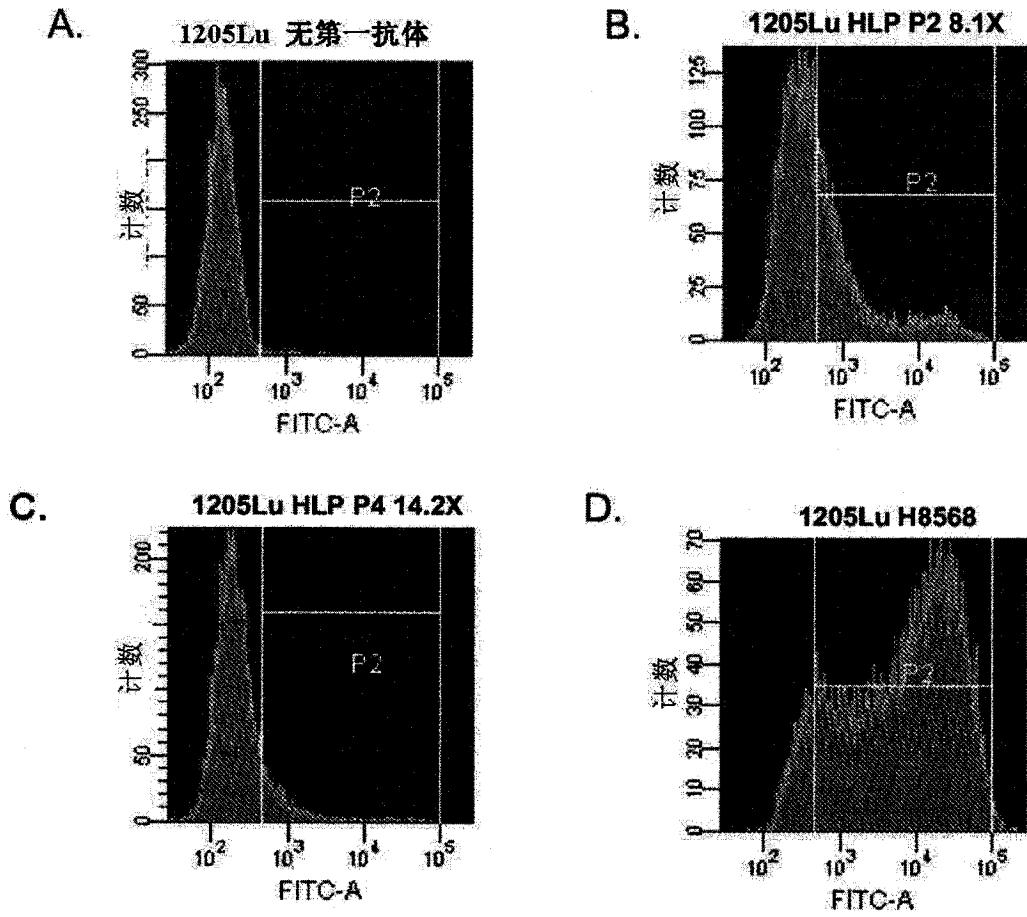


图 2

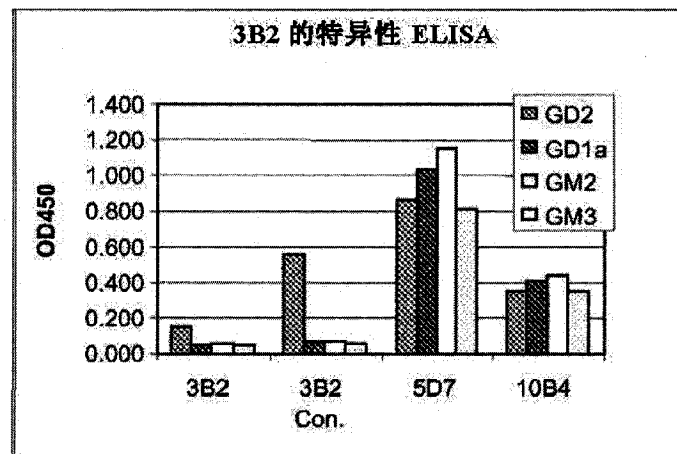


图 3A

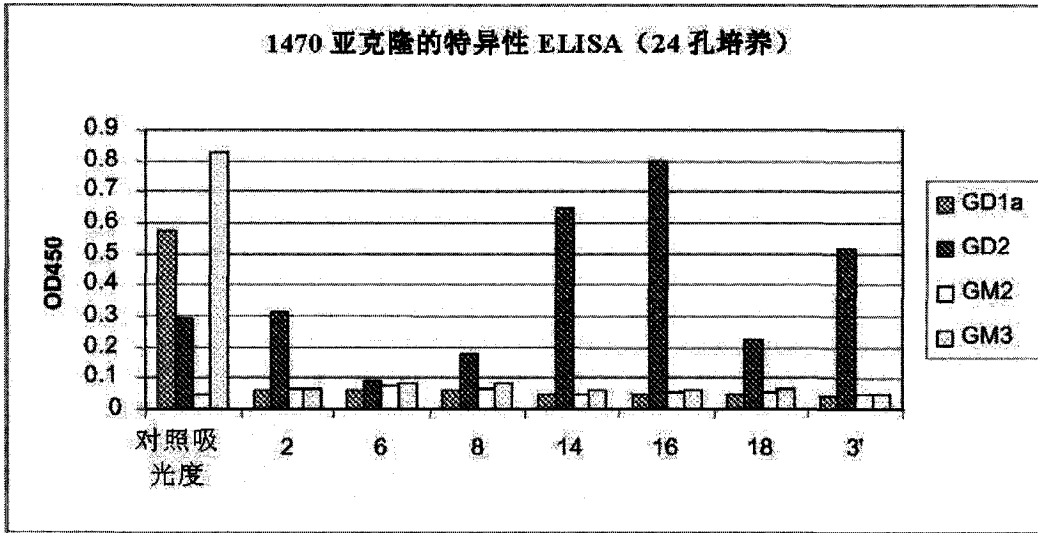


图 3B

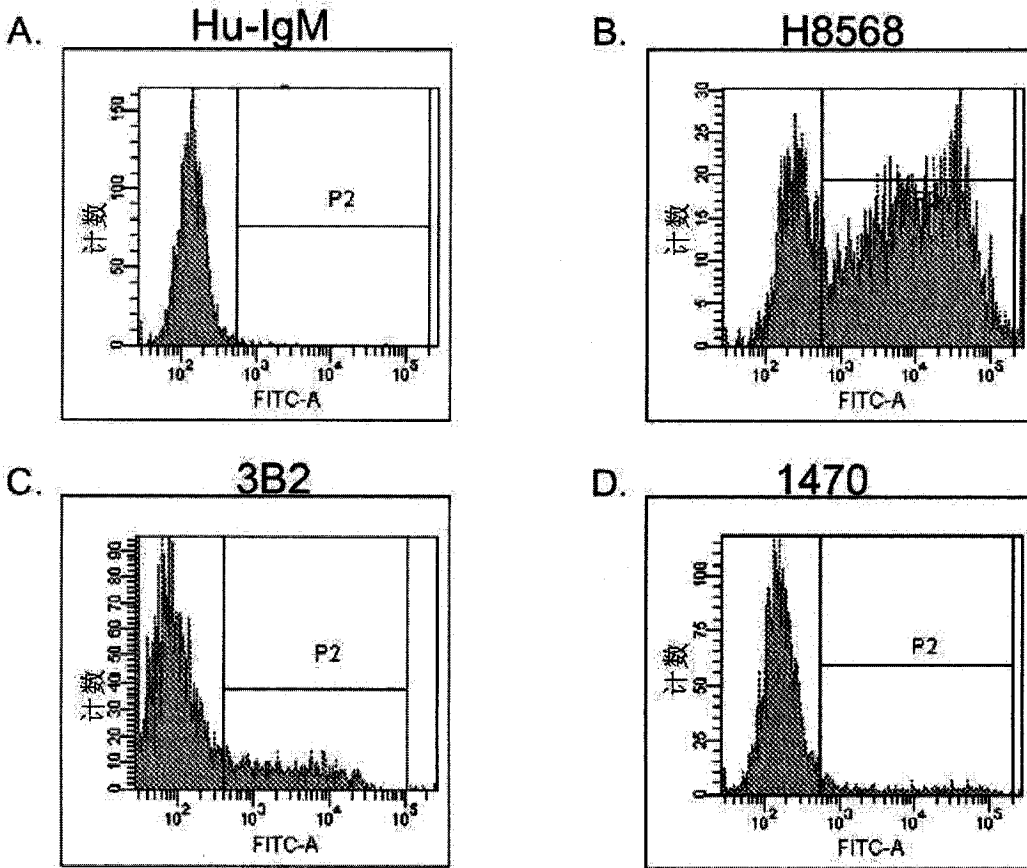


图 4

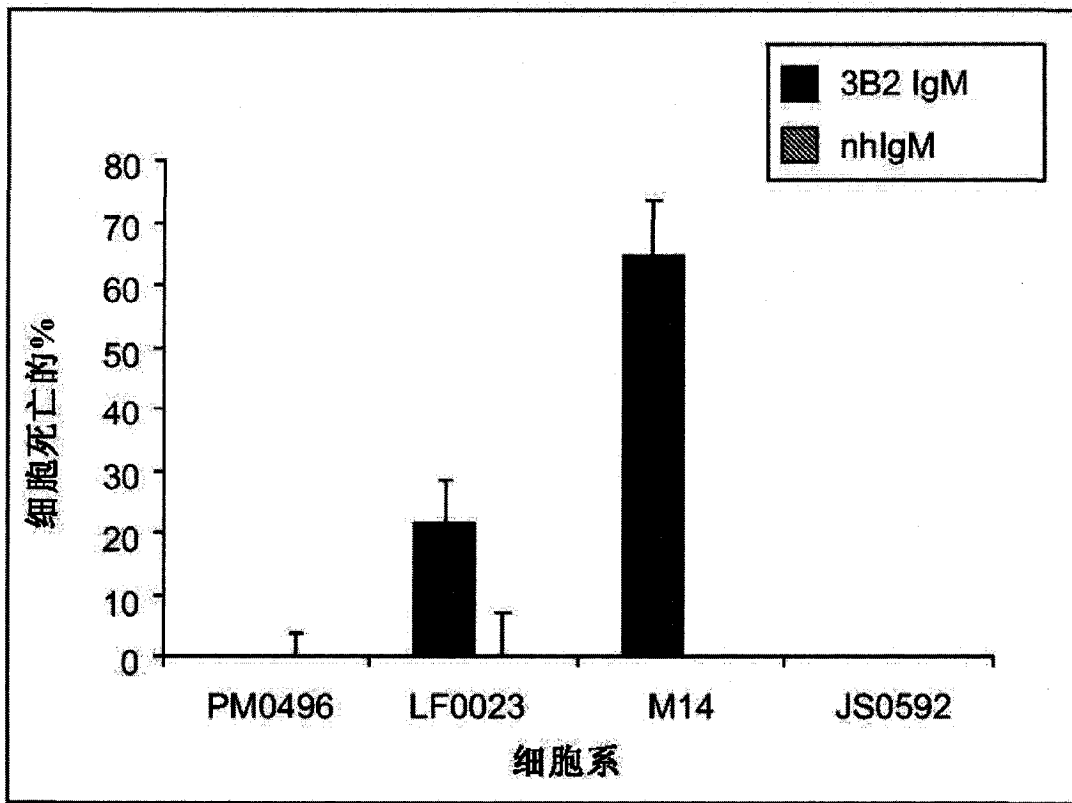


图 5

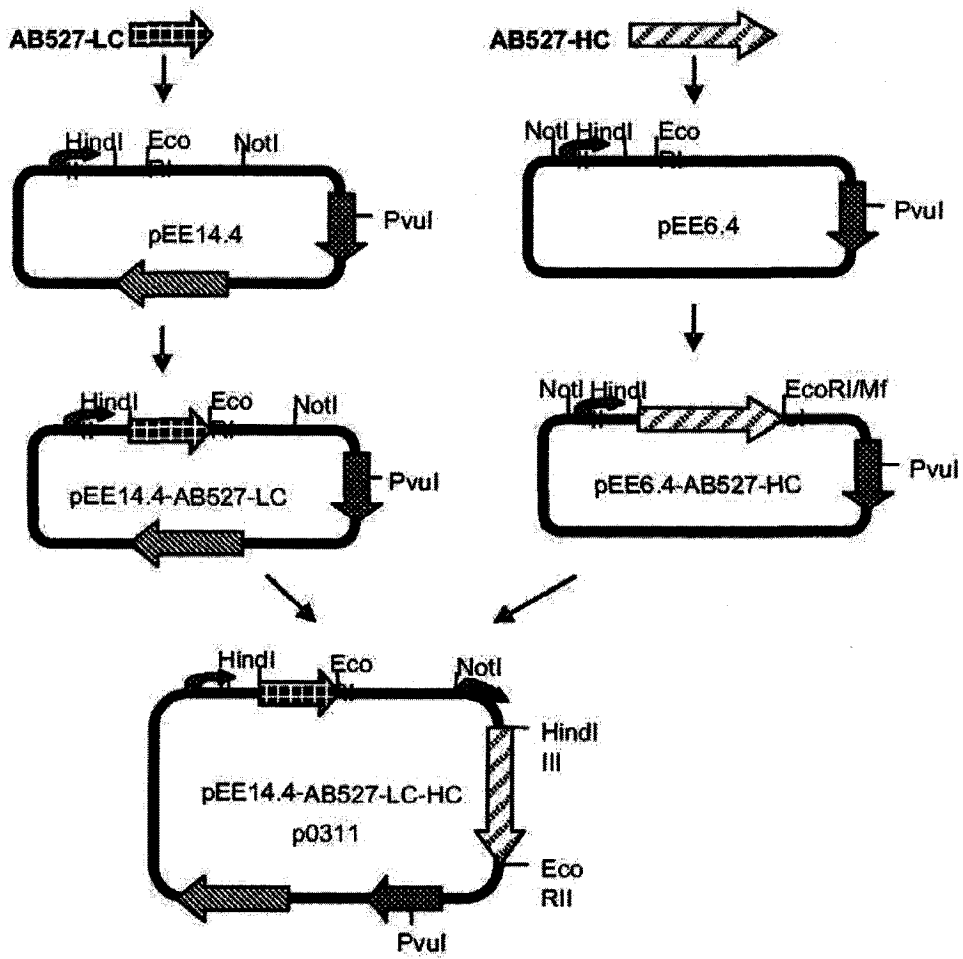


图 6

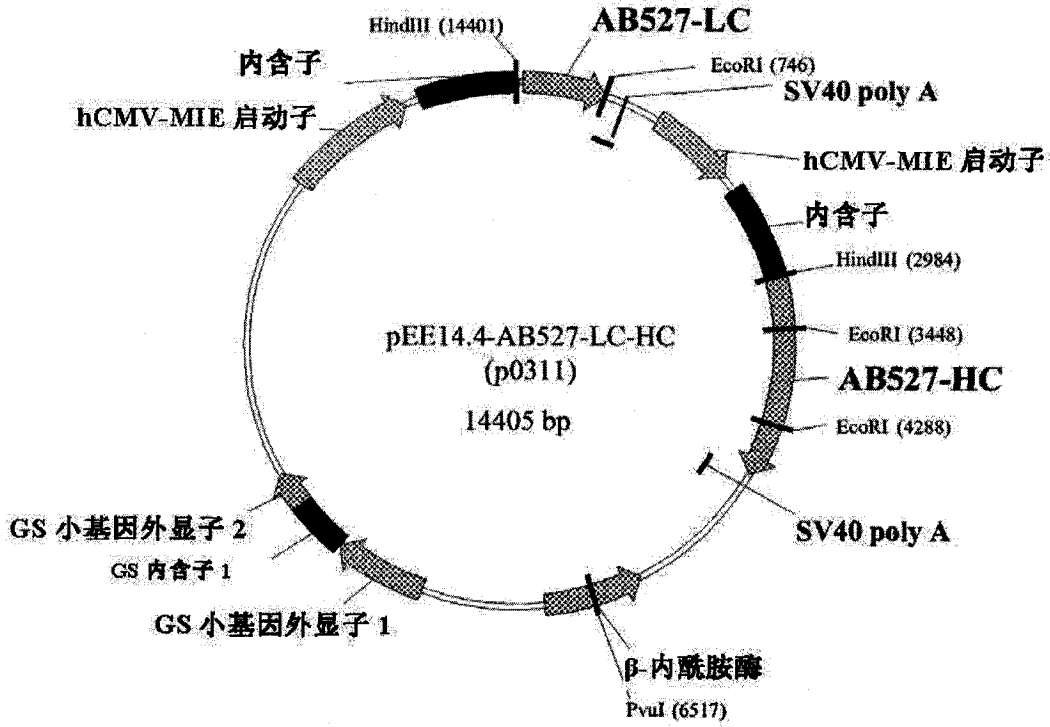


图 7

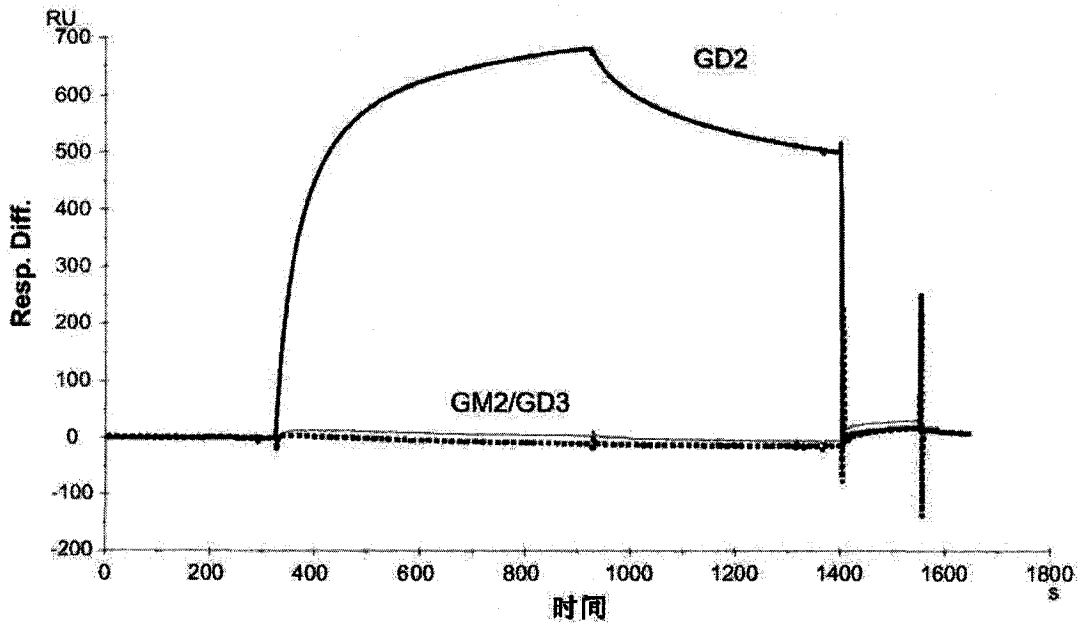


图 8

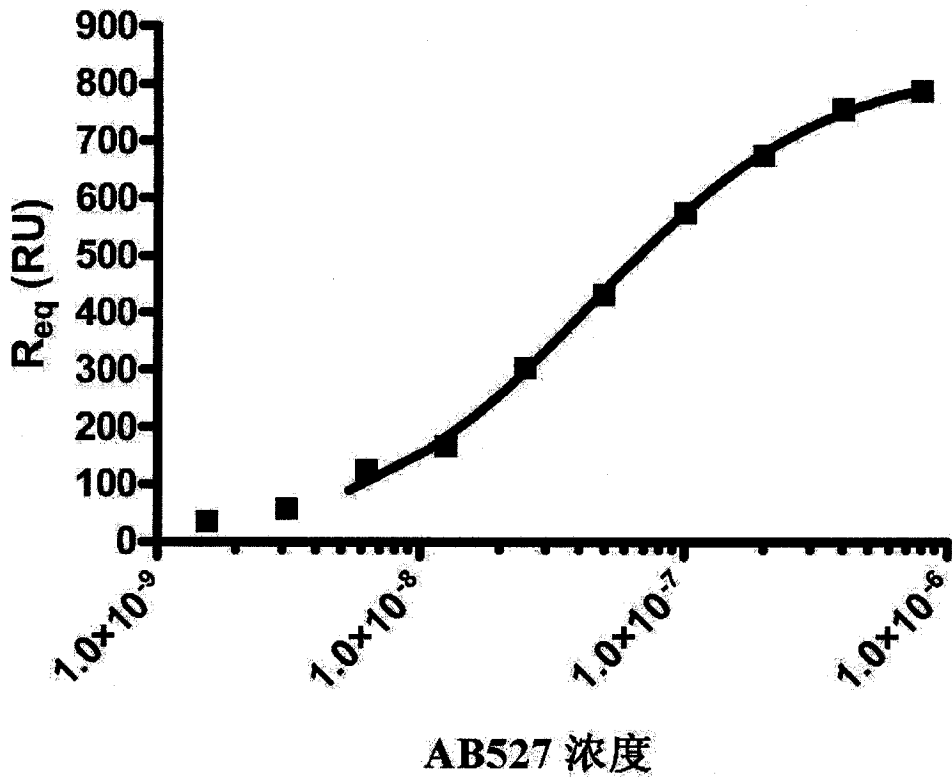


图 9

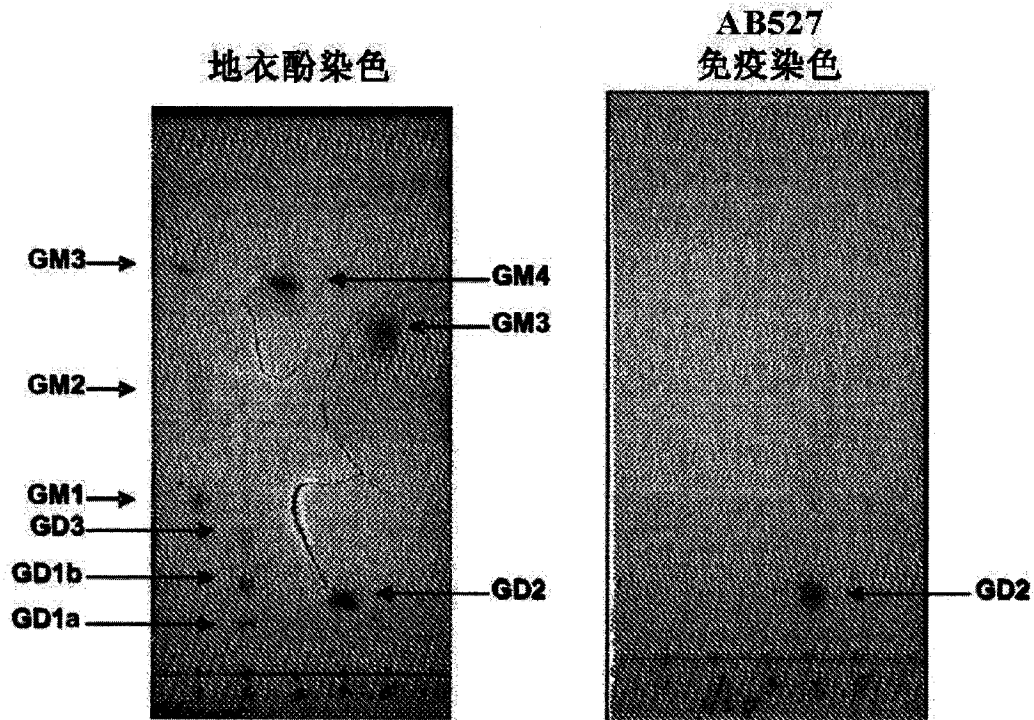


图 10

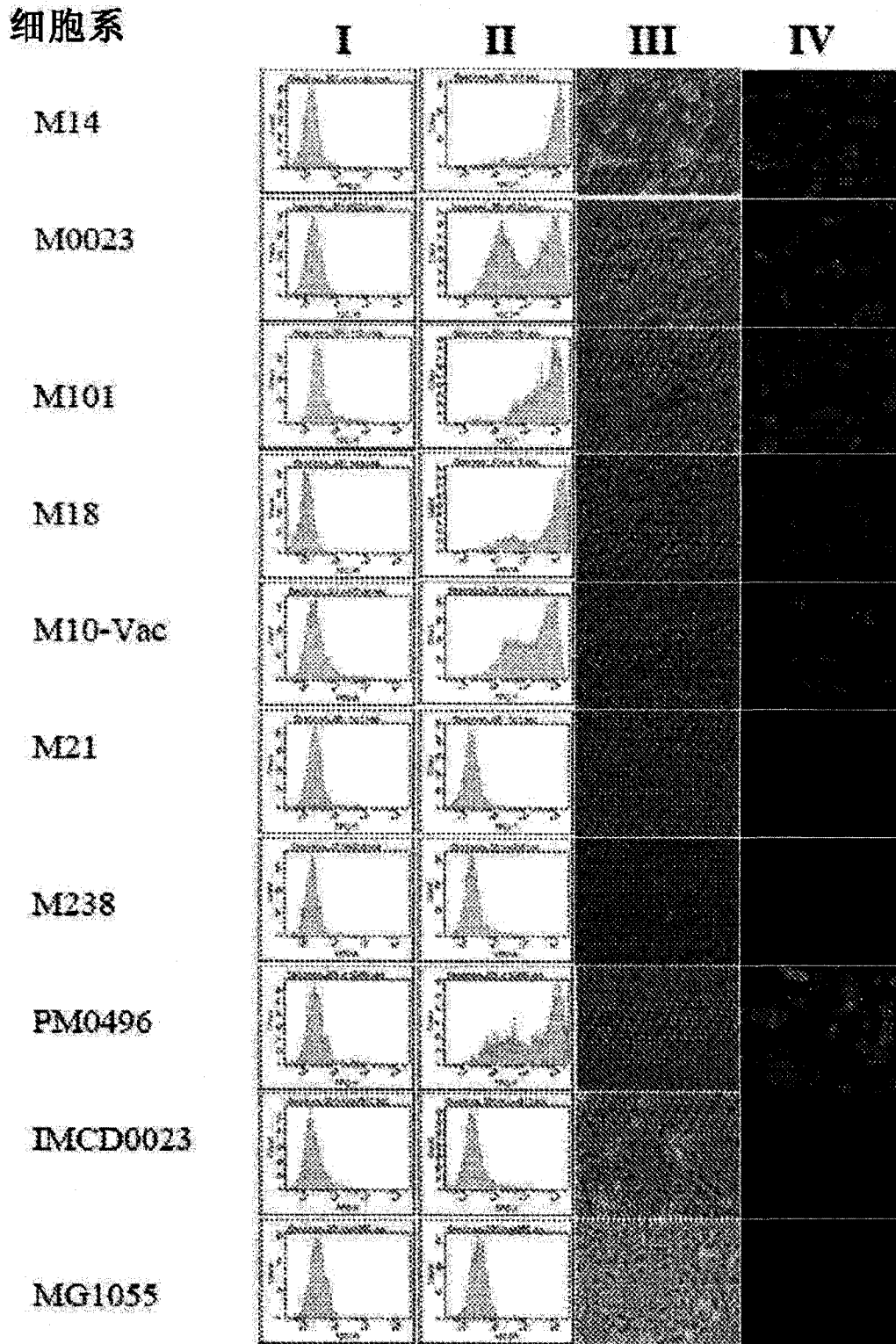


图 11

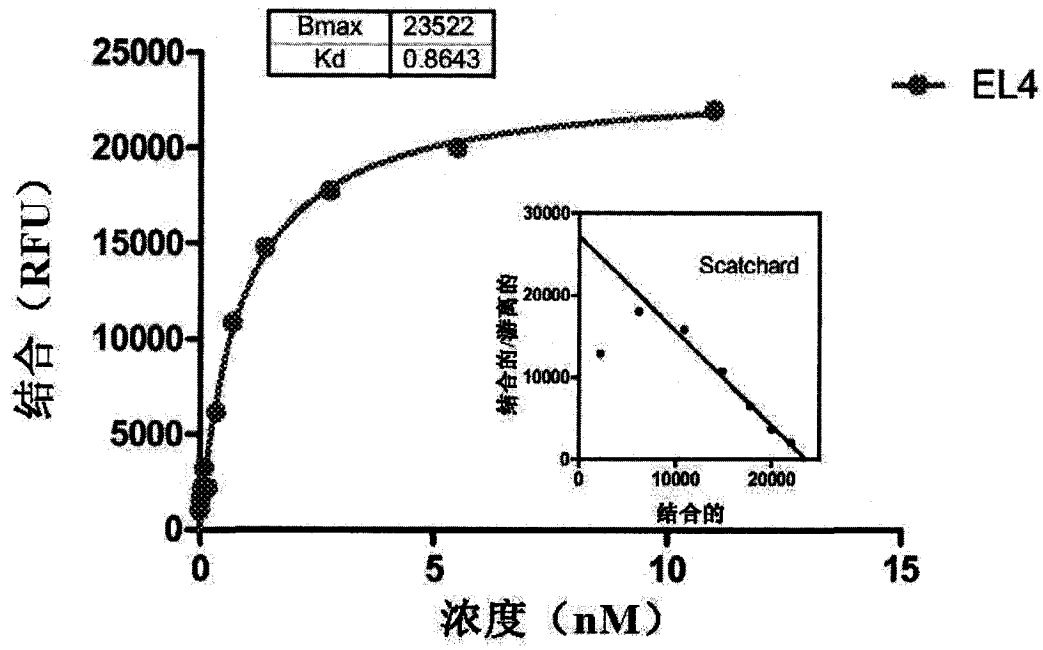


图 12

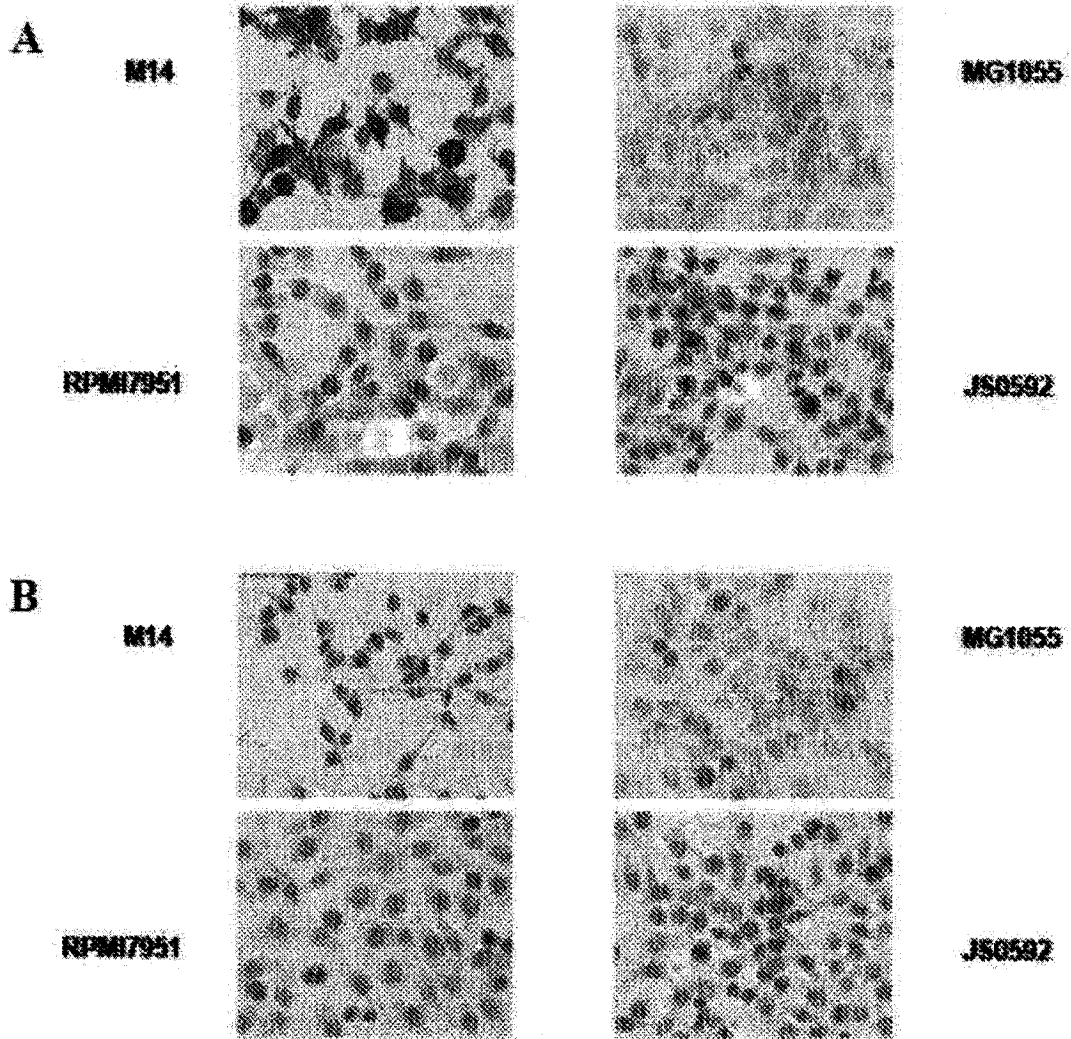


图 13

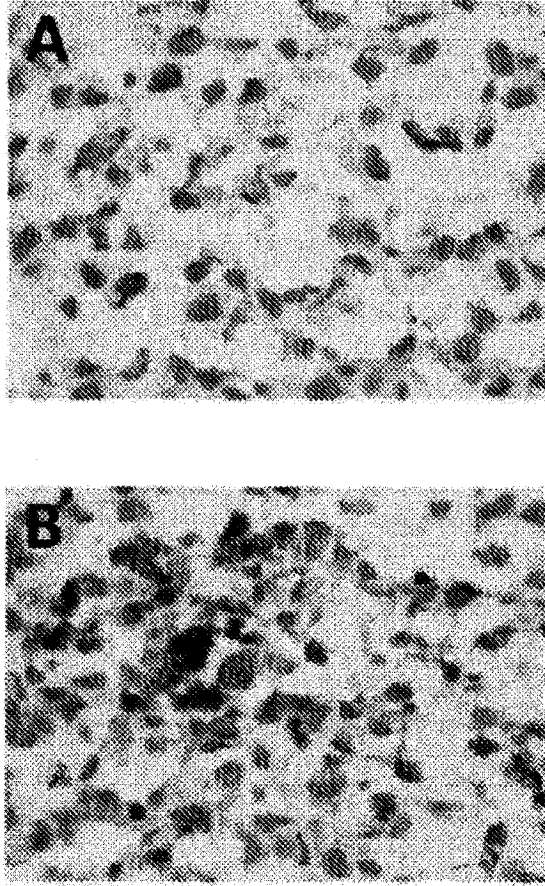


图 14

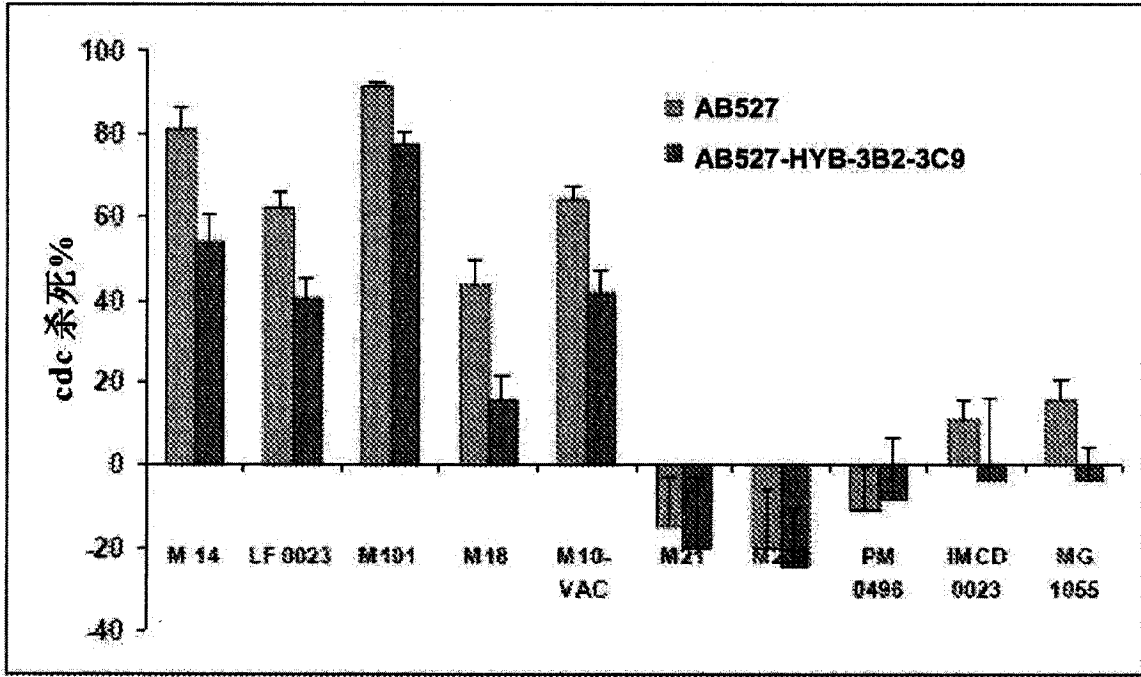


图 15

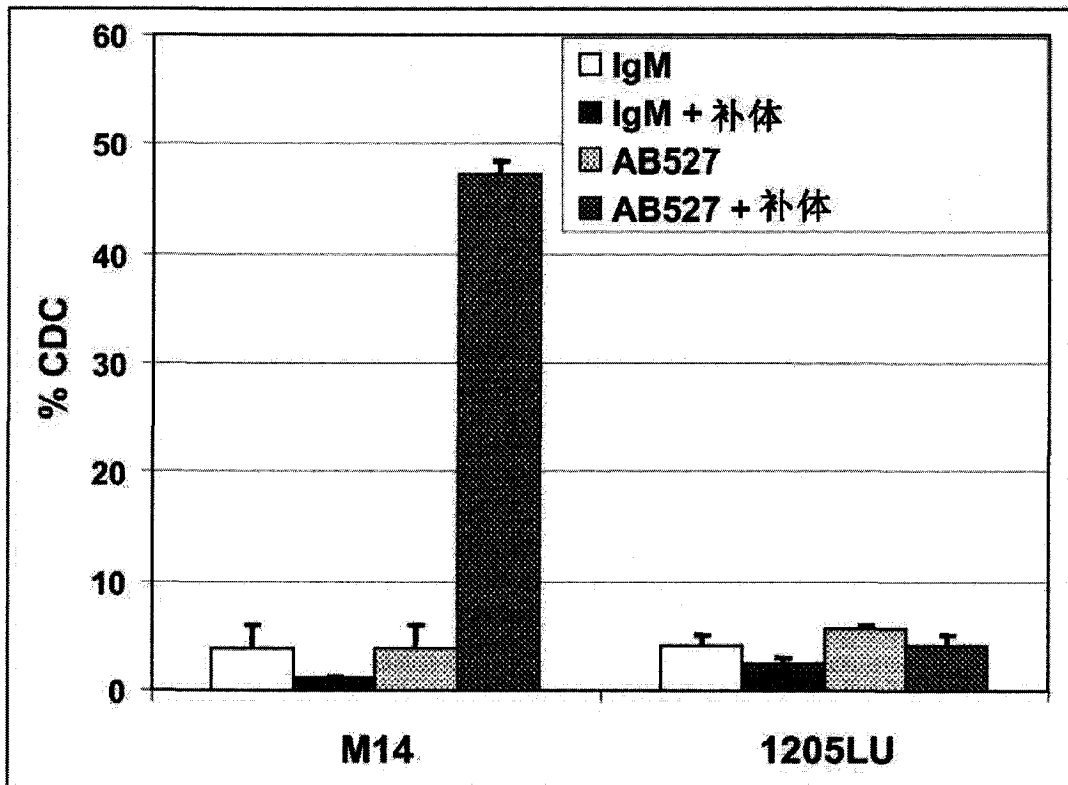


图 16

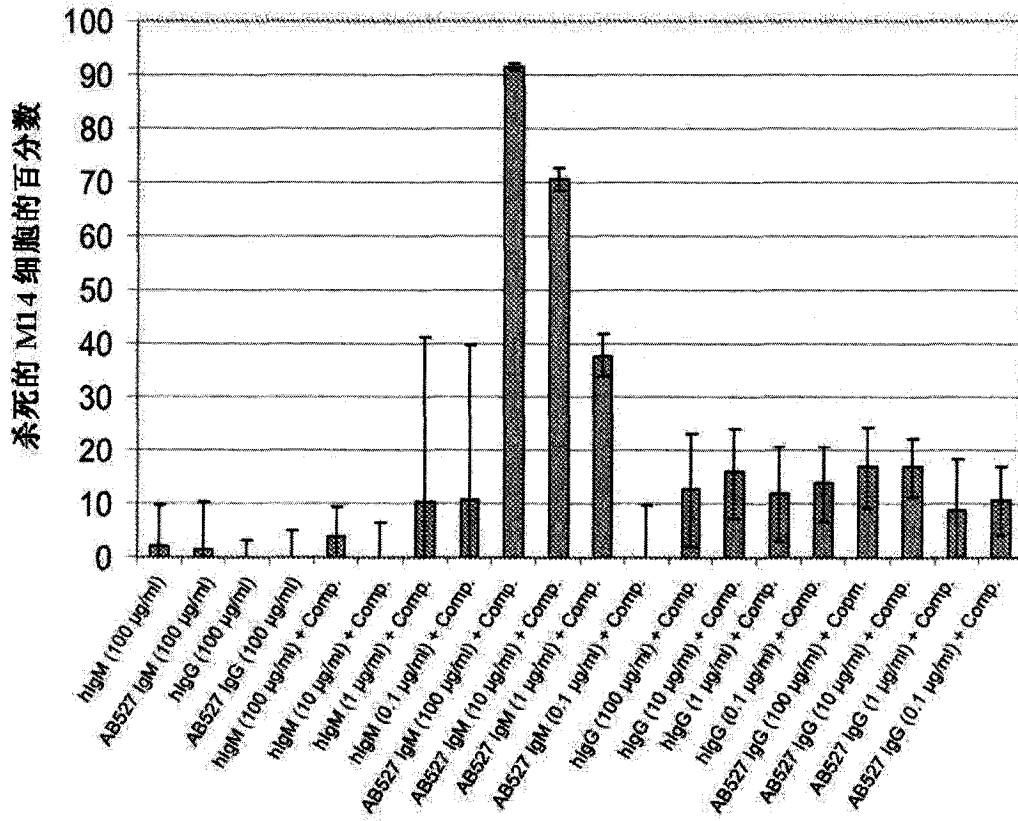


图 17

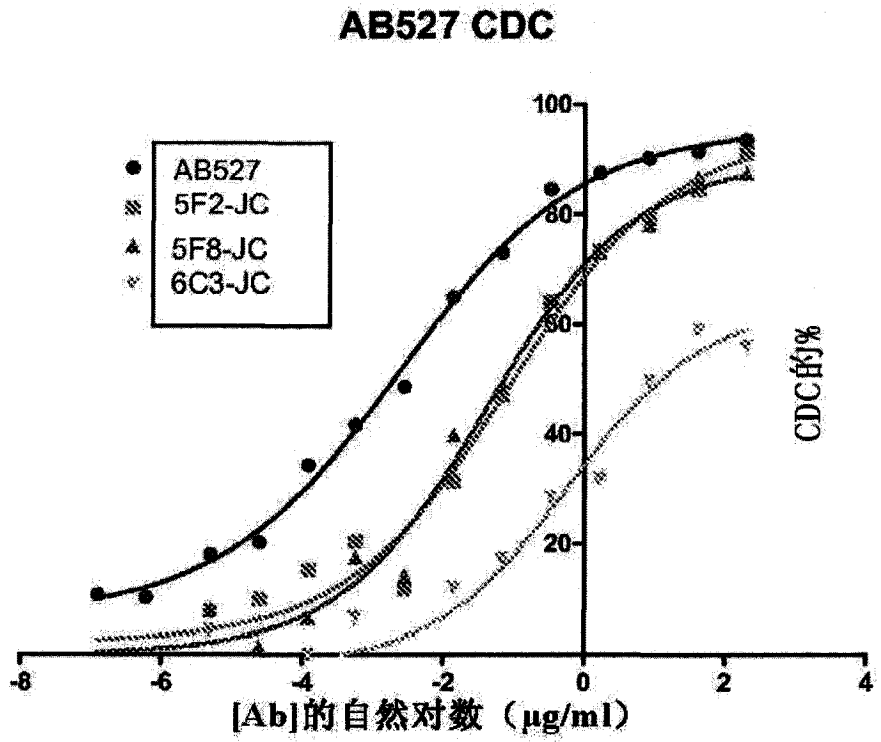


图 18

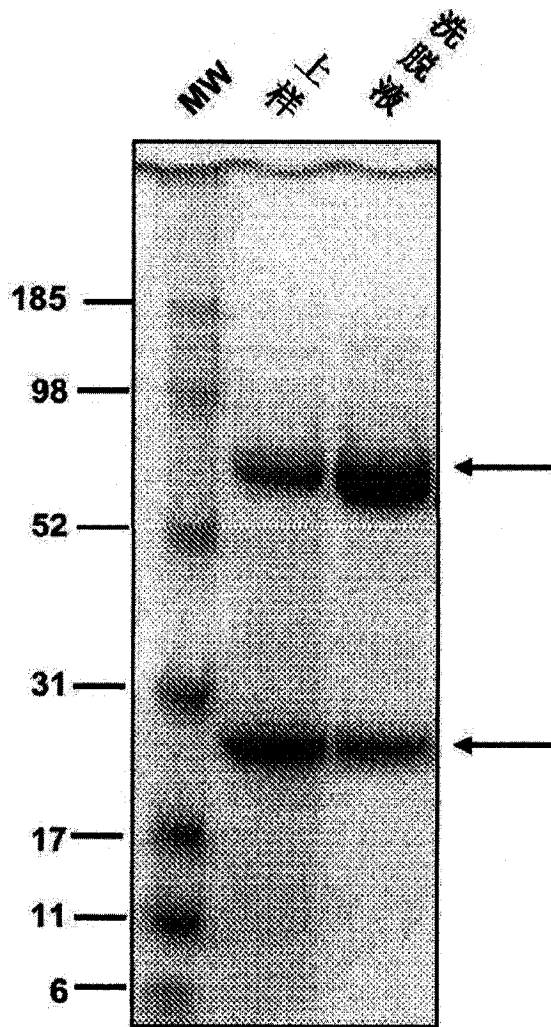


图 19

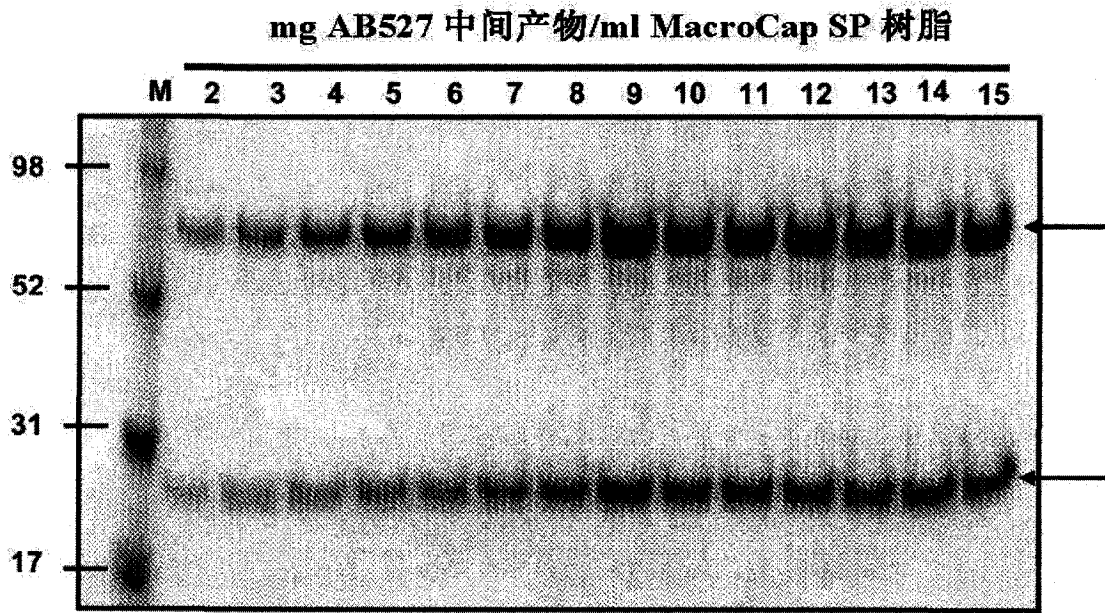


图 20

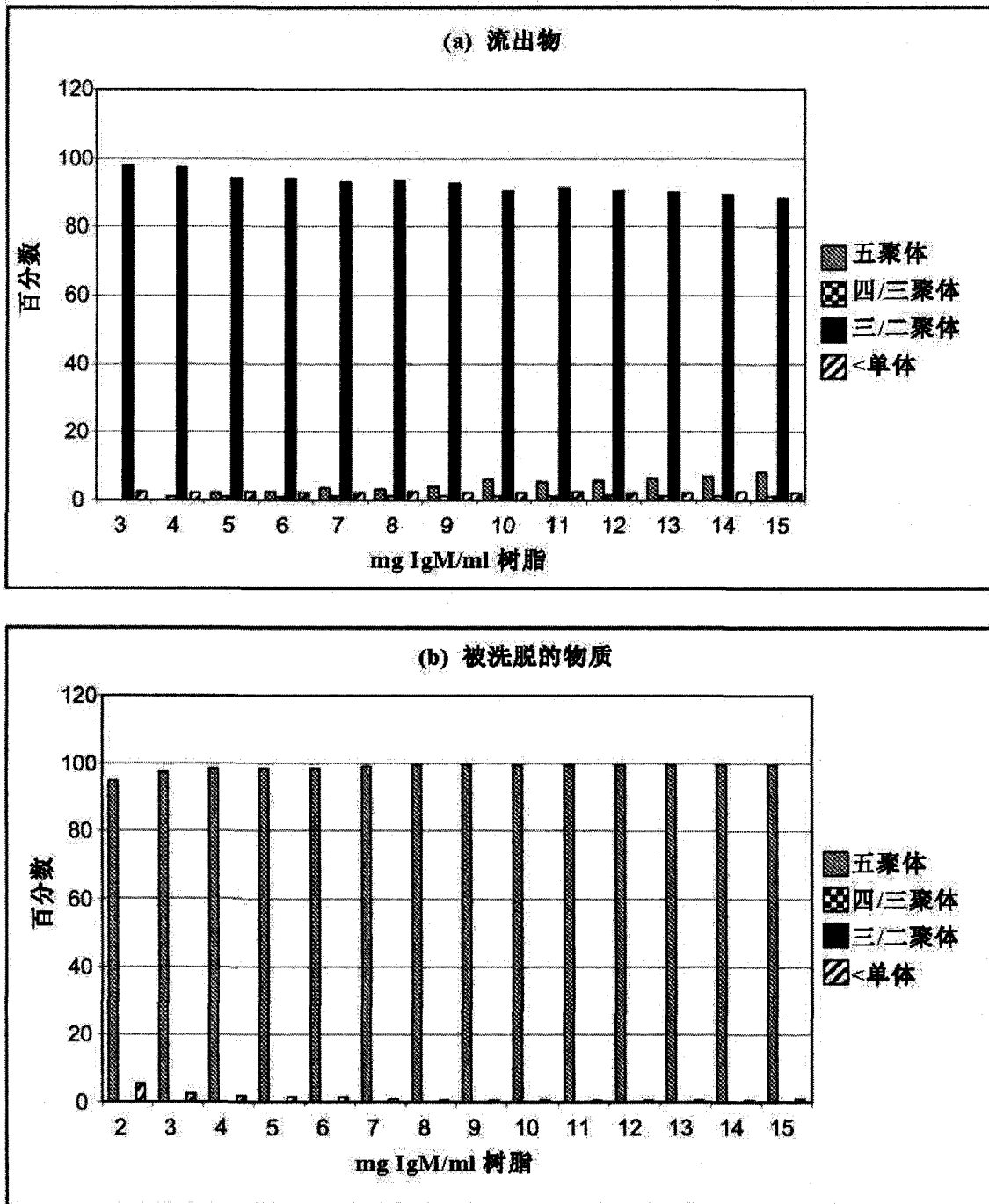


图 21

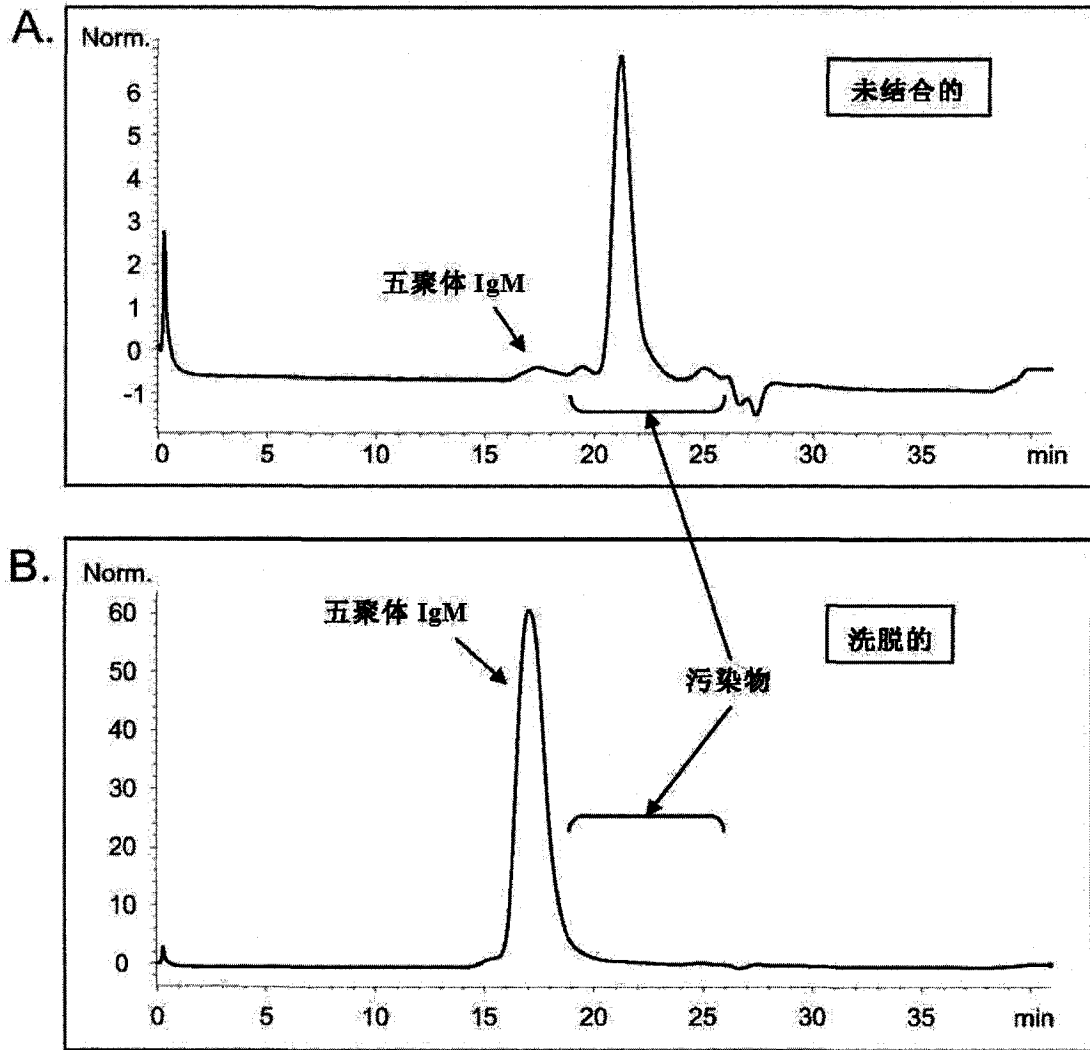


图 22

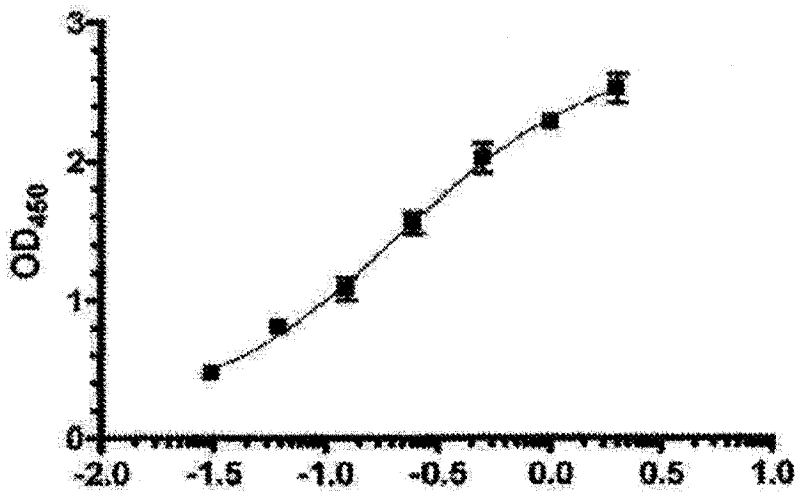


图 23

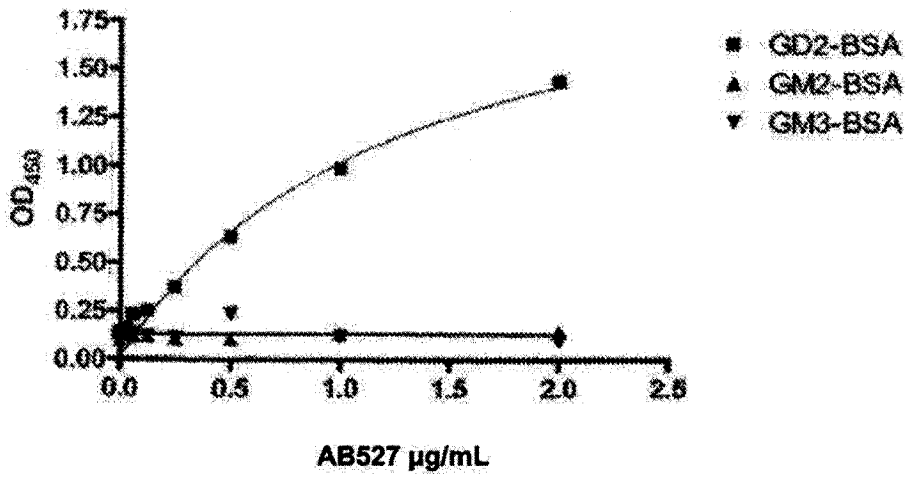


图 24

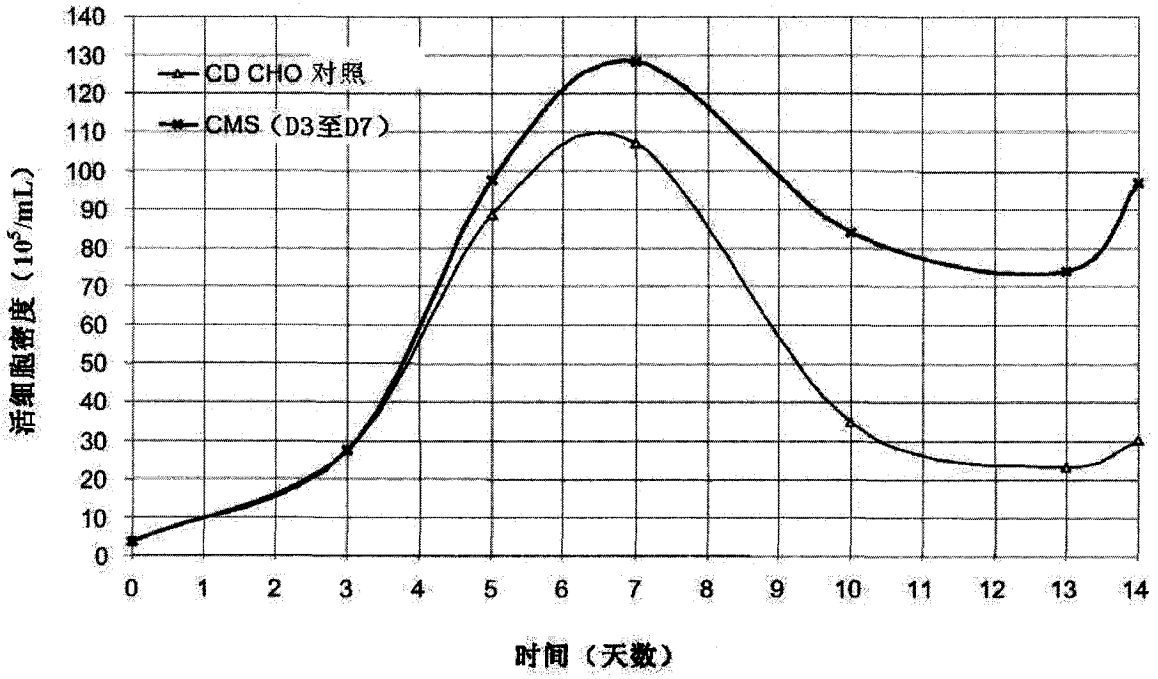


图 25

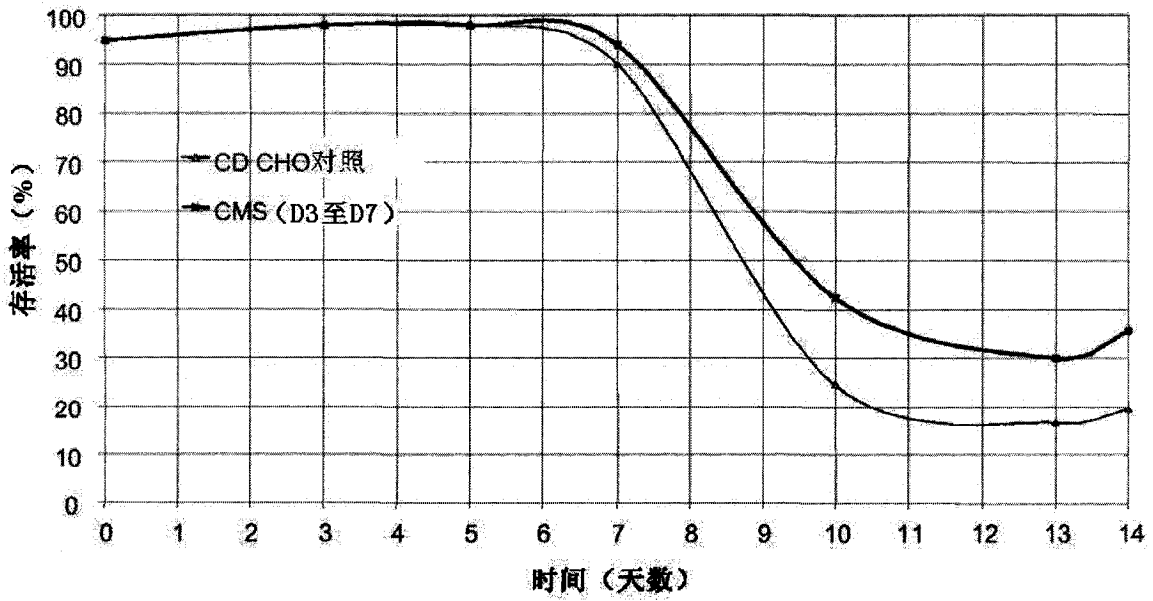


图 26

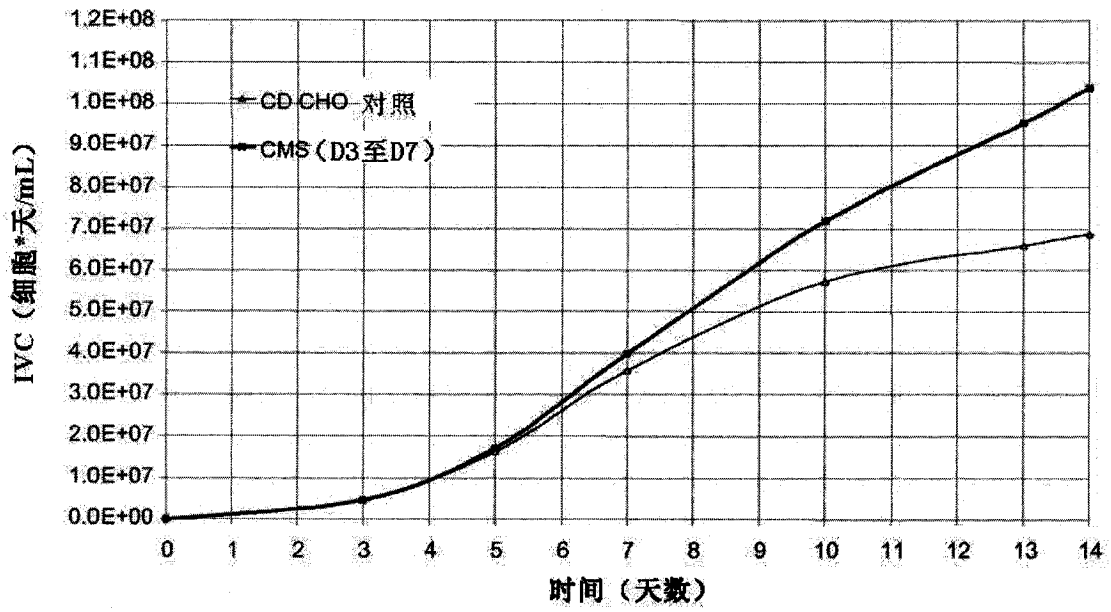


图 27

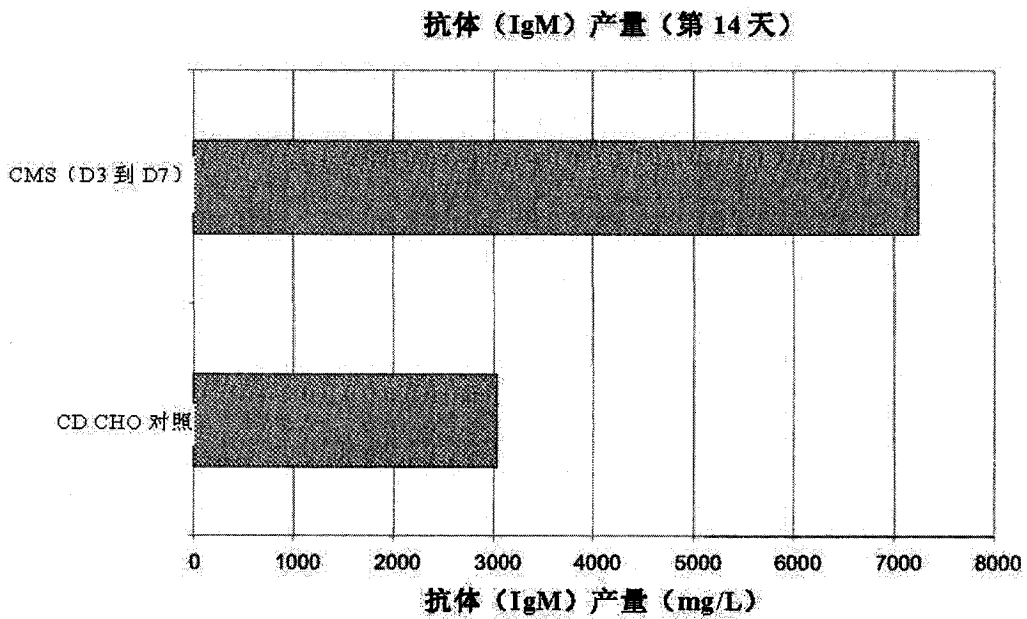


图 28