



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114340671 A

(43) 申请公布日 2022.04.12

(21) 申请号 202080062015.4

(22) 申请日 2020.07.31

(30) 优先权数据

62/881,547 2019.08.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.03.03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/044515 2020.07.31

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/022166 EN 2021.02.04

(71) 申请人 R.P. 谢勒技术有限责任公司

地址 美国内华达州

(72) 发明人 D·拉布卡 P·M·德雷克

Y·C·金 R·M·巴菲尔德

M·保宗

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 岑晓东

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

权利要求书3页 说明书39页

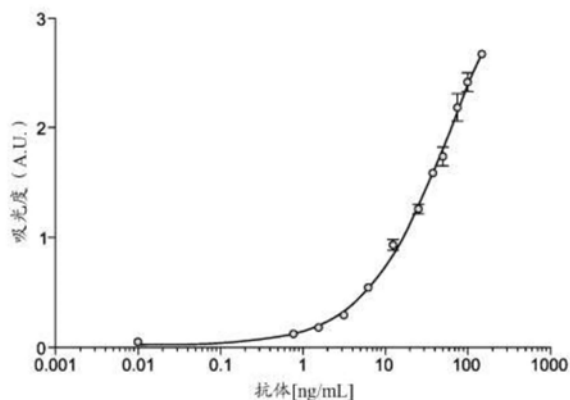
序列表21页 附图3页

(54) 发明名称

对GPC3特异性的抗体及其使用方法

(57) 摘要

本公开提供对磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3) 特异性的抗体。还提供了编码本公开的抗体的可变链多肽之一或二者的核酸,正如包含此类核酸的细胞。还提供的是包含本公开的抗体的组合物,包括在一些情况中的药学组合物。还提供了生成和使用本公开的抗体的方法。在某些方面,提供的是包括对具有细胞增殖性病症的个体施用治疗有效量的本公开的抗体的方法,其中将该抗体施用于该个体以增强针对该细胞增殖性病症的异常增殖细胞的免疫应答,例如T细胞应答。该抗体在各种诊断和监测应用中是有用的,也提供了所述各种诊断和监测应用。



1. 一种抗体,其特异性结合GPC3且与第二抗体竞争对GPC3的结合,该第二抗体包含:
可变重链(V_H)多肽,其包含:
包含氨基酸序列GYTFTSYFLH(SEQ ID NO:2)或氨基酸序列GYTFTSYMH(SEQ ID NO:3)
的 V_H CDR1,
包含氨基酸序列IIDPPTGRTTYAQKFQG(SEQ ID NO:4)的 V_H CDR2,和
包含氨基酸序列GNYGGRYFDY(SEQ ID NO:5)的 V_H CDR3;和
可变轻链(V_L)多肽,其包含:
包含氨基酸序列RASQSISSYLN(SEQ ID NO:6)的 V_L CDR1,
包含氨基酸序列AASSLQS(SEQ ID NO:7)的 V_L CDR2,和
包含氨基酸序列QQSYSTPLT(SEQ ID NO:8)的 V_L CDR3。
2. 权利要求1的抗体,其中该特异性结合GPC3的抗体包含:
可变重链(V_H)多肽,其包含:
包含氨基酸序列GYTFTSYFLH(SEQ ID NO:2)或氨基酸序列GYTFTSYMH(SEQ ID NO:3)
的 V_H CDR1,
包含氨基酸序列IIDPPTGRTTYAQKFQG(SEQ ID NO:4)的 V_H CDR2,和
包含氨基酸序列GNYGGRYFDY(SEQ ID NO:5)的 V_H CDR3;和
可变轻链(V_L)多肽,其包含:
包含氨基酸序列RASQSISSYLN(SEQ ID NO:6)的 V_L CDR1,
包含氨基酸序列AASSLQS(SEQ ID NO:7)的 V_L CDR2,和
包含氨基酸序列QQSYSTPLT(SEQ ID NO:8)的 V_L CDR3。
3. 权利要求1或权利要求2的抗体,其中该 V_H 多肽包含与SEQ ID NO:9中所列氨基酸序列
具有至少70%同一性的氨基酸序列。
4. 权利要求1-3任一项的抗体,其中该 V_L 多肽包含与SEQ ID NO:10中所列氨基酸序列具
有至少70%同一性的氨基酸序列。
5. 权利要求1-4任一项的抗体,其中该抗体是人源化抗体。
6. 权利要求1-5任一项的抗体,其中该抗体是嵌合抗体。
7. 权利要求1-6任一项的抗体,其中该抗体选自自由IgG,Fv,单链抗体,scFv,Fab,F(ab')
2,或Fab'组成的组。
8. 权利要求1-6任一项的抗体,其中该抗体是IgG。
9. 权利要求8的抗体,其中该抗体是IgG1。
10. 权利要求1-6任一项的抗体,其中该抗体是Fab。
11. 权利要求1-6任一项的抗体,其中该抗体是单链抗体。
12. 权利要求11的抗体,其中该抗体是scFv。
13. 权利要求1-12任一项的抗体,其中该抗体是包含特异性结合GPC3的第一抗原结合
域的双特异性抗体,且其中该第一抗原结合域包含如权利要求1-4任一项中限定的 V_H 多肽
和 V_L 多肽。
14. 权利要求1-13任一项的抗体,其中该抗体是可检测标记的。
15. 权利要求1-14任一项的抗体,其中该抗体包含共价连接的非肽合成聚合物。
16. 权利要求15的抗体,其中该合成聚合物是聚乙二醇聚合物。

17. 权利要求1-16任一项的抗体,其中该抗体包含共价连接的脂质或脂肪酸模块。
18. 权利要求1-14任一项的抗体,其中该抗体包含共价连接的多糖或碳水化合物模块。
19. 权利要求1-18任一项的抗体,其中该抗体包含造影剂。
20. 权利要求1-19任一项的抗体,其中该抗体包含亲和域。
21. 权利要求1-20任一项的抗体,其中该抗体固定化在固体支持物上。
22. 权利要求1-21任一项的抗体,其中该抗体包含共价连接的细胞毒素。
23. 权利要求1-22任一项的抗体,其中该抗体包含恒定区氨基酸序列,其包含硫酸酯酶基序的氨基酸序列。
24. 权利要求1-22任一项的抗体,其中该抗体包含恒定区氨基酸序列,其包含硫酸酯酶基序的氨基酸序列,且其中该硫酸酯酶基序经修饰而包含2-甲酰甘氨酸(FG1y)模块。
25. 权利要求24的抗体,其中该抗体包含经该FG1y模块共价连接至该抗体的异源模块。
26. 权利要求25的抗体,其中该异源模块选自药物,毒素,可检测标记物,水溶性聚合物,和合成肽。
27. 一种核酸,其编码权利要求1-13任一项的抗体的可变重链(V_H)多肽,可变轻链(V_L)多肽,或二者。
28. 权利要求27的核酸,其中该抗体是单链抗体,且其中该核酸编码该单链抗体。
29. 权利要求28的核酸,其中该单链抗体是scFv。
30. 一种重组表达载体,其包含权利要求27-29任一项的核酸,其中该核酸可操作连接至在真核细胞中有活性的转录控制元件。
31. 一种细胞,其包含权利要求27-29任一项的核酸或权利要求30的表达载体。
32. 权利要求31的细胞,其中该核酸编码该抗体的 V_H 多肽和该抗体的 V_L 多肽。
33. 权利要求32的细胞,其中该抗体是单链抗体,且其中该核酸编码该单链抗体。
34. 权利要求33的细胞,其中该单链抗体是scFv。
35. 一种细胞,其包含:
编码权利要求1-13任一项的抗体的可变重链(V_H)多肽的第一核酸;和
编码该抗体的可变轻链(V_L)多肽的第二核酸。
36. 权利要求35的细胞,其包含:
包含该第一核酸的第一表达载体;和
包含该第二核酸的第二表达载体。
37. 一种缀合物,其包含:
权利要求1-13任一项的抗体;和
缀合至该抗体的药剂。
38. 权利要求37的缀合物,其中该药剂选自由半衰期延长模块,标记剂,和治疗剂组成的组。
39. 一种融合蛋白,其包含:
权利要求1-13任一项的抗体的可变重链(V_H)多肽,可变轻链(V_L)多肽,或二者;
与之融合的异源氨基酸序列。
40. 一种药学组合物,其包含:
a) 权利要求1-13任一项的抗体;和

- b) 药学可接受载剂。
41. 一种药学组合物,其包含:
- a) 权利要求37-38任一项的缀合物;和
- b) 药学可接受载剂。
42. 一种药学组合物,其包含:
- a) 权利要求40的融合蛋白;和
- b) 药学可接受载剂。
43. 权利要求40-42任一项的药学组合物,其进一步包含T细胞激活剂。
44. 权利要求43的药学组合物,其中该T细胞激活剂选自由免疫检查点抑制剂,细胞因子,和抑制性免疫受体的拮抗剂组成的组。
45. 权利要求40-44任一项的药学组合物,其中该抗体封装在脂质体中。
46. 一种治疗受试者中的细胞增殖性病症的方法,该方法包括:
- 对具有细胞增殖性病症的受试者施用治疗有效量的权利要求40-45任一项的药学组合物。

对GPC3特异性的抗体及其使用方法

对相关申请的交叉援引

[0001] 此申请要求2019年8月1日提交的美国临时申请No.62/881,547的优先权,通过援引将其公开内容完整收入本文。

序列表的引入

[0002] 据此通过援引完整收录2020年7月29日创建的且大小为33KB的命名为“RDWD-024W0 Seq Listing_ST25”的序列列表。

发明背景

[0003] 磷脂酰肌醇(蛋白)聚糖-3(GPC3),一种硫酸乙酰肝素蛋白聚糖,在许多类型的恶性细胞,诸如肝细胞癌(HCC)细胞的表面上表达。磷脂酰肌醇聚糖-3经由糖基磷脂酰肌醇锚(GPI)连接至细胞表面。GPC3已经显示在超过70%的肝细胞癌活检中高表达,但是在相邻非肿瘤组织中不然。具有GPC3阳性HCC的患者具有比具有GPC3阴性HCC的患者显著低的无疾病存活率。

[0004] 本领域需要靶向GPC3来进行GPC3相关状况,诸如癌症的诊断和治疗的安全且有效的药剂。

发明概述

[0005] 本公开提供对GPC3特异性的抗体。还提供了编码本公开的抗体的可变链多肽之一或二者的核酸,正如包含此类核酸的细胞。还提供的是包含本公开的抗体的组合物,包括在一些情况中的药学组合物。还提供了生成和使用本公开的抗体的方法。在某些方面,提供的是包括对具有细胞增殖性病症的个体施用治疗有效量的本公开的抗体的方法,其中将该抗体施用于该个体以增强针对该细胞增殖性病症的异常增殖细胞的免疫应答,例如T细胞应答。该抗体在各种诊断和监测应用中是有用的,也提供了所述各种诊断和监测应用。

附图简述

[0006] 图1显示CAT-07单克隆抗体多于99%是单体,如通过大小排阻层析(SEC)测定的。

[0007] 图2显示CAT-07单克隆抗体结合重组人磷脂酰肌醇聚糖-3蛋白,如通过ELISA评估的。

[0008] 图3显示CAT-07单克隆抗体结合磷脂酰肌醇聚糖-3,但是其它人磷脂酰肌醇聚糖蛋白不然,如通过ELISA评估的。

[0009] 图4提供流式细胞术数据,显示CAT-07单克隆抗体结合来自食蟹猴,大鼠,和小鼠的磷脂酰肌醇聚糖-3蛋白。

定义

[0010] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”包括任何同种型(例如IgG(例如IgG1, IgG2, IgG3, 或IgG4), IgE, IgD, IgA, IgM, 等)的抗体或免疫球蛋白,整个抗体(例如抗体由四聚体构成,四聚体继而由两个重和轻链多肽的二聚体构成);单链抗体(例如scFv);抗体的保留对抗原的特异性结合的片段(例如整个或单链抗体的片段),包括但不限于Fab, Fv, scFv, 和Fd片段,嵌合抗体,人源化抗体,单链抗体,和包含抗体的抗原结合部分和非抗体蛋白的融合蛋白。抗体可以是可检测标记的,例如用放射性同位素,生成可检测产物的酶,荧光蛋白,等等。抗

体可进一步缀合至其它模块,诸如特异性结合对的成员,例如生物素(生物素-亲和素特异性结合对的成员),等等。抗体还可结合至固体支持物,包括但不限于聚苯乙烯板或珠,等等。该术语还涵盖的是Fab',Fv,F(ab')₂,和/或保留对抗原的特异性结合的其它抗体片段,和单克隆抗体。抗体可以是单价的或二价的。

“抗体片段”包含完整抗体的一部分,例如完整抗体的抗原结合或可变区。抗体片段的例子包括Fab,Fab',F(ab')₂,和Fv片段;双抗体;线性抗体(Zapata et al.,Protein Eng.8(10):1057-1062(1995));单链抗体分子;和自抗体片段形成的多特异性抗体。抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段,称作“Fab”片段,每个具有一个抗原结合位点,和一个残留的“Fc”片段,这一名称反映容易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生一个F(ab')₂片段,其具有两个抗原结合位点且仍然能够交联抗原。

[0011] “Fv”是含有完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。这个区域由紧密,非共价联合的一个重链可变域和一个轻链可变域的二聚体组成。正是在这种构造中,每个可变域的三个CDR相互作用而定义V_H-V_L二聚体的表面上的抗原结合位点。六个CDR共同赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即使是单个可变域(或仅仅包含对抗原特异性的三个CDR的半个Fv)也有能力识别和结合抗原,尽管亲和力比整个结合位点低。

[0012] “Fab”片段还含有轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH₁)。Fab片段因在重链CH₁域的羧基末端添加少数残基(包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸)而不同于Fab'片段。Fab'-SH是本文中对恒定域的半胱氨酸残基携带游离巯基的Fab'的名称。F(ab')₂抗体片段最初是作为成对的Fab'片段(它们之间具有铰链半胱氨酸)生成的。还知道抗体片段的其它化学偶联。

[0013] 来自任何脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可以基于它们的恒定域的氨基酸序列指派至两种明显不同的型之一,称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)。取决于它们的重链的恒定域的氨基酸序列,免疫球蛋白可以指派至不同的类。有五大类免疫球蛋白:IgA,IgD,IgE,IgG,和IgM,而且这些中的一些可以进一步分成亚类(同种型),例如IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgA1,和IgA2。

[0014] “单链Fv”或“sFv”抗体片段包含抗体的V_H和V_L域,其中这些域存在于一条多肽链中。在一些方面,Fv多肽进一步包含V_H和V_L域之间的多肽接头,其使得sFv能够为抗原结合形成期望的结构。关于sFv的综述,见Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,vol.113,Rosenburg and Moore eds.,Springer-Verlag,New York,pp.269-315(1994)。

[0015] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,该片段包含在同一条多肽链(V_H-V_L)中连接的重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L)。通过使用太短而不容许同一条链上的两个域之间配对的接头,域被迫与另一条链上的互补域配对并创建两个抗原结合位点。双抗体更加全面地描述于例如EP 404,097;W093/11161;和Hollinger et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993)。

[0016] 如本文中使用的,术语“亲和力”指两个物质的可逆结合的平衡常数且以解离常数(Kd)表示。亲和力可以比抗体对无关氨基酸序列的亲和力大至少1倍,大至少2倍,大至少3倍,大至少4倍,大至少5倍,大至少6倍,大至少7倍,大至少8倍,大至少9倍,大至少10倍,大至少20倍,大至少30倍,大至少40倍,大至少50倍,大至少60倍,大至少70倍,大至少80倍,大

至少90倍,大至少100倍,或大至少1000倍,或更多。抗体对靶蛋白的亲合力可以是例如约100纳摩尔(nM)至约0.1nM,约100nM至约1皮摩尔(pM),或约100nM至约1飞摩尔(fM)或更多。如本文中使用的,术语“亲合力”指两个或更多个物质的复合物在稀释后对解离的抵抗力。就抗体和/或抗原结合片段而言,术语“免疫反应性”和“优先结合”在本文中可互换使用。

[0017] 术语“结合”指由于例如共价,静电,疏水,和离子和/或氢键相互作用,包括诸如盐桥和水桥等相互作用,两个分子之间的直接联合。主题抗GPC3抗体特异性结合GPC3多肽内的表位。非特异性结合会指亲合力小于约 10^{-7} M的结合,例如亲合力为 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M,等的结合。

[0018] 术语“特异性结合”在抗体和抗原的语境中表示抗体以例如大于或等于约 10^5 M⁻¹的亲合力或 K_a (即,单位为1/M的特定结合相互作用的平衡结合常数)结合或联合抗原。

[0019] “高亲合力”结合指 K_a 为至少 10^7 M⁻¹,至少 10^8 M⁻¹,至少 10^9 M⁻¹,至少 10^{10} M⁻¹,至少 10^{11} M⁻¹,至少 10^{12} M⁻¹,至少 10^{13} M⁻¹,或更大的结合。或者,亲合力可以定义为单位为M(例如 10^{-5} M至 10^{-13} M,或更小)的特定结合相互作用的平衡解离常数(K_D)。在一些实施方案中,特异性结合表示抗体以小于或等于约 10^{-5} M,小于或等于约 10^{-6} M,小于或等于约 10^{-7} M,小于或等于约 10^{-8} M,或小于或等于约 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M,或 10^{-12} M或更小的 K_D 结合抗原。可以使用常规技术容易地测定抗体对抗原的结合亲合力,例如通过竞争性ELISA(酶联免疫吸附测定法),平衡透析,通过使用表面等离子共振(SPR)技术(例如BIAcore 2000仪器,使用制造商概述的通用规程);通过放射性免疫测定法;等等。

[0020] 如本文中使用的,术语“CDR”或“互补决定区”意图表示在重和轻链多肽二者的可变区内找到的非连续抗原结合位点。CDR已经描述于Kabat et al., J. Biol. Chem. 252: 6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of proteins of immunological interest” (1991); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); 和MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996), 其中定义包括相互比较时氨基酸残基的子集或交叠。无论如何,应用任一定义提及抗体或嫁接抗体或其变体的CDR意图在如本文中定义和使用的该术语的范围内。下文表1作为比较列出了涵盖如由上文引用的参考文献任一定义的CDR的氨基酸残基。

表1: CDR定义

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

¹残基编号方式遵循Kabat et al., supra的命名法

²残基编号方式遵循Chothia et al., supra的命名法

³残基编号方式遵循MacCallum et al., supra的命名法

[0021] 贯穿本公开,免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链中的残基的编号方式就如Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health

Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) 中的, 通过援引明确收入本文。

[0022] 如本文中使用的, 术语“框架”在提及抗体可变区使用时意图表示抗体的可变区内 CDR 以外的所有氨基酸残基。可变区框架一般是长度为约 100-120 个氨基酸的不连续氨基酸序列, 但是意图仅仅提及 CDR 以外的那些氨基酸。如本文中使用的, 术语“框架区”意图表示框架的由 CDR 分开的每个域。

[0023] “亲本 Ig 多肽”是包含缺乏如本文中描述的带醛标签的恒定区的氨基酸序列的多肽。亲本多肽可以包含天然序列恒定区, 或者可以包含具有预先存在的氨基酸序列修饰 (诸如添加, 删除和/或替代) 的恒定区。

[0024] 在 Ig 多肽的语境中, 术语“恒定区”在本领域充分理解, 指 Ig 重链或 Ig 轻链的 C 端区。Ig 重链恒定区包括 CH1, CH2, 和 CH3 域 (和重链是 μ 或 ϵ 重链的情况中的 CH4 域)。在天然 Ig 重链中, CH1, CH2, CH3 (和, 如果存在的话, CH4) 域在重链可变 (VH) 区之后 (在 C 端) 立即开始, 而且每个长度为约 100 个氨基酸至约 130 个氨基酸。在天然 Ig 轻链中, 恒定区在轻链可变 (VL) 区之后 (在 C 端) 立即开始, 而且长度为约 100 个氨基酸至约 120 个氨基酸。

[0025] “表位”是抗原 (例如 GPC3) 上的抗体结合的位点。表位可以自连续氨基酸或通过蛋白质的折叠 (例如三级折叠) 而并列的非连续氨基酸二者形成。自连续氨基酸形成的表位典型地在暴露于变性溶剂时保留, 而通过折叠形成的表位典型地在用变性溶剂处理时丢失。表位典型地包括线性或空间构象中的至少 3 个, 和更加常见的至少 5 个或 8-10 个氨基酸。测定表位的空间构象的方法包括例如 X 射线晶体学和二维核磁共振。见例如 Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996)。数个商业性实验室提供表位作图服务。受到具有针对膜相关抗原的免疫反应性的抗体结合的表位可以位于细胞的表面上 (例如在跨膜蛋白的胞外区中), 使得此类表位被认为是细胞表面可及的, 溶剂可及的, 和/或细胞表面暴露的。

[0026] 如提交多肽, 肽或蛋白的氨基酸序列使用的, “遗传可编码”表示该氨基酸序列由能够通过编码该氨基酸序列的核酸的转录和翻译而生成的氨基酸残基构成, 其中转录和/或翻译可以在细胞中或在无细胞体外转录/翻译系统中发生。

[0027] 术语“控制序列”指推动可操作连接的编码序列在特定表达系统, 例如哺乳动物细胞, 细菌细胞, 无细胞合成, 等中的表达的 DNA 序列。适合于原核生物系统的控制序列包括例如启动子, 任意的操纵基因序列, 和核糖体结合位点。真核细胞系统可利用启动子, 聚腺苷酸化信号, 和增强子。

[0028] 当核酸放置于与另一核酸序列的功能性相互关系中时, 它是“可操作连接”的。例如, 如果前序列或分泌前导的 DNA 表达成参与多肽的分泌的前蛋白的话, 它与该多肽的 DNA 是可操作连接的; 如果启动子或增强子影响编码序列的转录的话, 它与该序列是可操作连接的; 或者, 如果核糖体结合位点定位成推动翻译的起始的话, 它与编码序列是可操作连接的。一般地, “可操作连接”表示连接的 DNA 序列是相连的, 而且在分泌前导的情况中是相连且在读码框中的。相连通过连接或经由扩增反应来实现。可以依照常规实践使用合成寡核苷酸接头或接头来连接序列。

[0029] 如本文中使用的, 术语“表达盒”指可插入核酸 (例如通过使用与连接入感兴趣构建物相容的限制性位点或通过同源重组入感兴趣构建物或宿主细胞基因组) 的核酸, 通常

是DNA的区段。一般而言,核酸区段包含编码感兴趣多肽的多核苷酸,而且盒和限制性位点设计成推动在适当的读码框中插入盒进行转录和翻译。表达盒还可包含推动编码感兴趣多肽的多核苷酸在宿主细胞,例如哺乳动物宿主细胞中表达的元件。这些元件可包括但不限于启动子,最小启动子,增强子,应答元件,终止子序列,聚腺苷酸化序列,等等。

[0030] “分离的”抗体是已经鉴定和自其天然环境的成分分开和/或回收的抗体。其天然环境的污染物成分是会干扰抗体的诊断或治疗用途的材料,而且可以包括酶,激素,和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在一些实施方案中,抗体会纯化至(1)以抗体的重量计大于90%,大于95%,或大于98%,如通过Lowry方法测定的,例如以重量记多于99%,(2)足以通过使用转杯式测序仪获得N端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度,或(3)根据使用考马斯蓝或银染剂的还原性或非还原性条件下十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)的同质。分离的抗体包括重组细胞内原位的抗体,因为抗体的天然环境的至少一种成分不会存在。在一些情况中,分离的抗体会通过至少一个纯化步骤来制备。

[0031] 术语“天然抗体”指其中抗体的重和轻链已经由多细胞生物体的免疫系统生成并配对的抗体。脾,淋巴结,骨髓和血清是生成天然抗体的组织的例子。例如,由自用抗原免疫的第一动物分离的抗体生成细胞生成的抗体是天然抗体。

[0032] 术语“人源化抗体”或“人源化免疫球蛋白”指含有一个或多个已经用来自人抗体的相应定位的氨基酸替代的氨基酸(例如在框架区,恒定区或CDR中)的非人(例如小鼠或家兔)抗体。一般而言,人源化抗体在人宿主中生成与非人源化型式的相同抗体相比降低的免疫应答。可以使用本领域已知的多种技术人源化抗体,包括例如CDR嫁接(EP239,400;PCT公开文本W091/09967;美国专利No.5,225,539;5,530,101;和5,585,089),贴面或重建表面(EP 592,106;EP 519,596;Padlan,Molecular Immunology 28(4/5):489-498(1991); Studnicka et al.,Protein Engineering 7(6):805-814(1994);Roguska et al.,PNAS 91:969-973(1994)),和链改组(美国专利No.5,565,332)。在某些实施方案中,通过CDR和框架残基的相互作用的建模以鉴定对抗原结合重要的框架残基和序列比较以鉴定特定位置处不寻常的框架残基来鉴定框架替代(见例如美国专利No.5,585,089;Riechmann et al.,Nature 332:323(1988))。设想在本发明中使用的另外的用于人源化抗体的方法描述于美国专利No.5,750,078;5,502,167;5,705,154;5,770,403;5,698,417;5,693,493;5,558,864;4,935,496;和4,816,567,和PCT公开文本W098/45331和W098/45332。在特定的实施方案中,可以依照US20040086979和US20050033031中所列方法人源化主题家兔抗体。相应地,可以使用本领域公知的方法人源化上文描述的抗体。

[0033] 术语“嵌合抗体”指已经自属于不同物种的抗体可变和恒定区基因构建(典型地通过基因工程)其轻和重链基因的抗体。例如,可以将来自小鼠单克隆抗体的基因的可变区段连接人恒定区段,诸如伽马1和伽马3。治疗性嵌合抗体的一个例子是由来自小鼠抗体的可变或抗原结合域和来自人抗体的恒定或效应器域构成的杂合蛋白,尽管可以使用来自其它哺乳动物物种的域。

[0034] 术语“多肽”,“肽”,和“蛋白质”在本文中可互换使用,指任何长度的氨基酸的聚合物形式。除非另有具体说明,“多肽”,“肽”,和“蛋白质”可包括基因编码的和非编码的氨基酸,化学或生化修饰或衍生的氨基酸,和具有经修饰肽骨架的多肽。该术语包括融合蛋白,包括但不限于具有异源氨基酸序列的融合蛋白,具有异源和同源前导序列的融合物,含有

至少一个N端甲硫氨酸残基(例如用于推动重组宿主细胞中的生成)的蛋白;带有免疫学标签的蛋白;等等。

[0035] “天然氨基酸序列”或“亲本氨基酸序列”在本文中可互换使用,指修饰(以包括经修饰氨基酸残基)前的多肽的氨基酸序列。

[0036] 术语“氨基酸类似物”,“非天然氨基酸”,等等可以可互换使用,而且包括在结构和/或整体形状上与在天然发生蛋白中常常找到的一种或多种氨基酸(例如Ala或A,Cys或C,Asp或D,Glu或E,Phe或F,Gly或G,His或H,Ile或I,Lys或K,Leu或L,Met或M,Asn或N,Pro或P,Gln或Q,Arg或R,Ser或S,Thr或T,Val或V,Trp或W,Tyr或Y)相似的氨基酸样化合物。氨基酸类似物还包括具有经修饰侧链或骨架的天然氨基酸。氨基酸类似物还包括与天然发生D型以及L型的氨基酸类似物具有相同立体化学的氨基酸类似物。在一些情况中,氨基酸类似物分享一种或多种天然氨基酸的骨架结构和/或侧链结构,差异在于分子中的一个或多个经修饰基团。此类修饰可以包括但不限于原子(诸如N)对相关原子(诸如S)的替代,基团(诸如甲基,或羟基,等)或原子(诸如Cl或Br,等)的添加,基团的删除,共价键的替代(单键替代双键,等),或其组合。例如,氨基酸类似物可以包括 α -羟基酸,和 α -氨基酸,等等。

[0037] 术语“氨基酸侧链”或“氨基酸的侧链”等等可用于指附着于氨基酸残基(包括天然氨基酸,非天然氨基酸,和氨基酸类似物)的 α -碳的取代基。氨基酸侧链还可以包括如本文中描述的经修饰氨基酸和/或缀合物的语境中描述的氨基酸侧链。

[0038] 术语“缀合的”一般指近距离联合一种感兴趣分子与第二感兴趣分子的化学连接,或是共价的或是非共价的,通常是共价的。在一些实施方案中,该物质选自半衰期延长模块,标记剂,和治疗剂。例如,为了延长半衰期,可以任选修饰本公开的抗体以提供改良的药理学概况(例如通过PEG化,高糖基化,等等)。对能增强血清半衰期的修饰感兴趣。

[0039] 术语“碳水化合物”等等可用于指单糖,二糖,寡糖,和多糖的单体单元和/或聚合物。术语糖可用于指较小的碳水化合物,诸如单糖,二糖。术语“碳水化合物衍生物”包括其中感兴趣碳水化合物的一个或多个官能团取代(用任何方便的取代基替换),修饰(使用任何方便的化学转变成另一种基团)或缺失(例如消除或用H替换)的化合物。多种碳水化合物和碳水化合物衍生物是可行的且可适应于主题化合物和缀合物。

[0040] 如本文中使用的,术语“治疗”,“处理”,等等指获得期望的药理学和/或生理学效果。效果可以是预防性的,就完全或部分预防疾病或其症状而言,和/或可以是治疗性的,就部分或完全治愈疾病和/或可归于疾病的不利作用而言。如本文中使用的,“治疗”涵盖哺乳动物,特别是人中的疾病的任何治疗,而且包括:(a)预防疾病在可能倾向于疾病但尚未诊断为具有疾病的受试者中发生;(b)抑制疾病,即阻滞其发生;(c)缓解疾病,即引起疾病消退

[0041] 在本文中可互换使用的术语“个体”,“受试者”,“宿主”,和“患者”指哺乳动物,包括但不限于鼠类(大鼠,小鼠),非人灵长类,人,犬类,猫类,有蹄类(例如马,牛,绵羊,猪,山羊),等。

[0042] “治疗有效量”或“有效量”指在施用于哺乳动物或其它受试者以治疗疾病时足以实现针对疾病的此类治疗的主题抗GPC3抗体的量。“治疗有效量”会随抗GPC3抗体,疾病及其严重性和要治疗的受试者的年龄,重量,等而变化。

[0043] “生物学样品”涵盖自个体获得的多种样品类型且可用于诊断或监测测定法。该定

义涵盖血液和生物学起源的其它液体样品,固体组织样品,诸如活检标本或组织培养物或自其衍生的细胞及其后代。该定义还包括在采购它们之后已经以任何方式操作的样品,诸如通过用试剂处理,溶解,或富集某些成分,诸如多核苷酸。术语“生物学样品”涵盖临床样品,而且还包括培养中的细胞,细胞上清液,细胞裂解物,血清,血浆,生物学流体,和组织样品。在一些情况中,生物学样品会包括肝细胞。

[0044] 在进一步描述本发明之前,应了解,本发明并不限于所描述的特定实施方案,所述实施方案当然可以有变化。还应了解,本文中使用的术语仅仅出于描述特定实施方案的目的,并不意图是限制性的,因为本发明的范围会仅受所附权利要求书的限制。

[0045] 在提供数值的范围的情况下,应了解,除非上下文另有明确规定,本发明内涵盖介于该范围的上限和下限和该规定范围内的任何其它规定值或居间值之间相隔下限单位十分之一的每个居间值。这些较小范围的上限和下限可以独立包括在较小范围中,而且也涵盖于本发明内,服从于在规定范围内任何特定排除的界限。在规定范围包括两个界限之一或二者的情况下,排除那些所包括的界限中的任一或二者的范围也包括于本发明中。

[0046] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。虽然也可以使用与本文中描述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料来实施或测试本发明,但是现在描述优选的方法和材料。通过援引将本文中提到的所有出版物收入本文以披露和记载与所引用的出版物有关的方法和/或材料。

[0047] 必须注意,除非上下文另有明确规定,如本文和所附权利要求书中使用的单数形式“一个”,“一种”,和“所述/该”包括复数指示物。如此,例如,提及“一个抗体”包括多个此类抗体,而且,提及“该CDR”包括提及一种或多种CDR及其本领域技术人员知道的等同物,等等。应进一步注意,权利要求书可以撰写成排除任何任选要素。这样的话,这个陈述意图充当与列举权利要求的要素或使用“负向”限制相结合来使用诸如“只”,“仅”等排他性术语的在先基础。

[0048] 本文中讨论的出版物仅仅因为它们在本申请的提交日之前公开而提供。本文中的任何内容都不应解释为承认本发明依据在先发明没有先于所述出版物的资格。而且,所提供的出版物的日期可能不同于实际的出版日期,这可能需要独立确认。

发明详述

[0049] 本公开提供对GPC3特异性的抗体。还提供了编码本公开的抗体的可变链多肽之一或二者的核酸,正如包含此类核酸的细胞。还提供的是包含本公开的抗体的组合物,包括在一些情况中的药学组合物。还提供了生成和使用本公开的抗体的方法。在某些方面,提供的是包括对具有细胞增殖性病症的个体施用治疗有效量的本公开的抗体的方法,其中将该抗体施用于该个体以增强针对该细胞增殖性病症的异常增殖细胞的免疫应答,例如T细胞应答。该抗体在各种诊断和监测应用中是有用的,也提供了所述各种诊断和监测应用。

GPC3抗体

[0050] 如上文概述的,本公开提供抗GPC3抗体。

[0051] 依照一些方面,本公开的抗体特异性结合GPC3且与包含下述各项的抗体竞争对GPC3的结合:

[0052] 可变重链(V_H)多肽,其包含:包含氨基酸序列GYTFTSYFLH(SEQ ID NO:2)或氨基酸

序列GYTFTSYMH (SEQ ID NO:3)的 V_H CDR1,包含氨基酸序列IIDPPTGRTTYAQKFQG (SEQ ID NO:4)的 V_H CDR2,和包含氨基酸序列GNYGGRYFDY (SEQ ID NO:5)的 V_H CDR3;和

[0053] 可变轻链(V_L)多肽,其包含:包含氨基酸序列RASQSISSYLN (SEQ ID NO:6)的 V_L CDR1,包含氨基酸序列AASSLQS (SEQ ID NO:7)的 V_L CDR2,和包含氨基酸序列QQSYSTPLT (SEQ ID NO:8)的 V_L CDR3。

[0054] 可以采用用于测定第一抗体是否与第二抗体竞争对GPC3的结合的任何合适办法。可以使用本领域已知的竞争性结合测定法容易地测定第一抗体是否与第二抗体“竞争”对化合物的结合。可以例如经抗体竞争测定法来鉴定竞争性抗体。例如,可以将第一抗体的样品结合至固体支持物。然后,添加怀疑能够与此类第一抗体竞争的第二抗体的样品。两种抗体之一是标记的。如果标记的抗体和未标记的抗体结合化合物上分开且离散的位点,那么标记的抗体会以相同的水平结合,无论是否存在怀疑是竞争性的抗体。然而,如果相互作用的位点相同或交叠,那么未标记的抗体会竞争,而且结合至抗原的标记的抗体的量会降低。如果未标记的抗体过量存在,那么如果有的话,很少的标记的抗体会结合。

[0055] 为了本公开的目的,竞争性抗体是将抗体对化合物的结合降低约50%或更多,约60%或更多,约70%或更多,约80%或更多,约85%或更多,约90%或更多,约95%或更多,或约99%或更多的抗体。用于进行此类竞争测定法的规程的详情是本领域公知的且可见于例如Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988, 567-569, 1988, ISBN 0-87969-314-2。可以通过使用纯化的抗体将此类测定法变成定量的。可以通过针对其自身滴定一种抗体(即,同一抗体用于标记者和竞争者二者)来建立标准曲线。可滴定未标记的竞争性抗体抑制已标记的抗体对板的结合的能力。可以将结果绘图,而且可以比较实现期望程度的结合抑制所必需的浓度。

[0056] 依照一些实施方案,本公开的抗体特异性结合GPC3,例如人GPC3,大鼠GPC3,小鼠GPC3,和食蟹猴GPC3中的一种或多种且包含:

[0057] 可变重链(V_H)多肽,其包含:包含氨基酸序列GYTFTSYFLH (SEQ ID NO:2)或氨基酸序列GYTFTSYMH (SEQ ID NO:3)的 V_H CDR1,包含氨基酸序列IIDPPTGRTTYAQKFQG (SEQ ID NO:4)的 V_H CDR2,和包含氨基酸序列GNYGGRYFDY (SEQ ID NO:5)的 V_H CDR3;和

[0058] 可变轻链(V_L)多肽,其包含:包含氨基酸序列RASQSISSYLN (SEQ ID NO:6)的 V_L CDR1,包含氨基酸序列AASSLQS (SEQ ID NO:7)的 V_L CDR2,和包含氨基酸序列QQSYSTPLT (SEQ ID NO:8)的 V_L CDR3。

[0059] 在某些实施方案中,本公开的抗体特异性结合GPC3,与包含下述各项的抗体竞争对GPC3的结合:可变重链(V_H)多肽,其包含:包含氨基酸序列GYTFTSYFLH (SEQ ID NO:2)或氨基酸序列GYTFTSYMH (SEQ ID NO:3)的 V_H CDR1,包含氨基酸序列IIDPPTGRTTYAQKFQG (SEQ ID NO:4)的 V_H CDR2,和包含氨基酸序列GNYGGRYFDY (SEQ ID NO:5)的 V_H CDR3;和可变轻链(V_L)多肽,其包含:包含氨基酸序列RASQSISSYLN (SEQ ID NO:6)的 V_L CDR1,包含氨基酸序列AASSLQS (SEQ ID NO:7)的 V_L CDR2,和包含氨基酸序列QQSYSTPLT (SEQ ID NO:8)的 V_L CDR3;且其中该 V_H 多肽包含与SEQ ID NO:9或13中所列氨基酸序列具有70%或更大,75%或更大,80%或更大,85%或更大,90%或更大,95%或更大,或99%或更大同一性的氨基酸序列;和/或其中该 V_L 多肽包含与SEQ ID NO:10中所列氨基酸序列具有70%或更大,75%或更

大,80%或更大,85%或更大,90%或更大,95%或更大,或99%或更大同一性的氨基酸序列。

[0060] 主题抗GPC3抗体可包含:包含具有SEQ ID NO:9或13中所列氨基酸序列的V_H区的重链;和包含具有SEQ ID NO:10中所列氨基酸序列的V_L区的轻链。

[0061] 本公开的抗体特异性结合GPC3且包含下述各项或与包含下述各项的抗体竞争:重链多肽,其包含:包含氨基酸序列GYTFSTYFLH (SEQ ID NO:2) 或氨基酸序列GYTFSTYYMH (SEQ ID NO:3) 的V_H CDR1,包含氨基酸序列IIDPPTGRTTYAQKFQG (SEQ ID NO:4) 的V_H CDR2,和包含氨基酸序列GNYGGRYFDY (SEQ ID NO:5) 的V_H CDR3;和轻链多肽,其包含:包含氨基酸序列RASQSISSYLN (SEQ ID NO:6) 的V_L CDR1,包含氨基酸序列AASSLQS (SEQ ID NO:7) 的V_L CDR2,和包含氨基酸序列QQSYSTPLT (SEQ ID NO:8) 的V_L CDR3;且其中该重链多肽包含与SEQ ID NO:11或14中所列氨基酸序列具有70%或更大,75%或更大,80%或更大,85%或更大,90%或更大,95%或更大,或99%或更大同一性的氨基酸序列;和/或其中该轻链多肽包含与SEQ ID NO:12中所列氨基酸序列具有70%或更大,75%或更大,80%或更大,85%或更大,90%或更大,95%或更大,或99%或更大同一性的氨基酸序列。

[0062] 主题抗GPC3抗体可包含:包含具有SEQ ID NO:11或14中所列氨基酸序列的V_H区的重链;和/或包含具有SEQ ID NO:12中所列氨基酸序列的V_L区的轻链。

[0063] 下文提供了本文中公开的抗GPC3抗体的氨基酸和核苷酸序列:

氨基酸序列:

CAT-07可变重链:

[0064] **QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYFLHWVRQAPGQGL**
EWMGIIDPPTGRTTYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGN
YGGRYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:9)

[0065] CDR1, CDR2, 和CDR3标有下划线。可变区框架以粗体显示。

CAT-07重链:

[0066] **QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYFLHWVRQAPGQGL**
EWMGIIDPPTGRTTYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGN
YGGRYFDYWGQGLTVTVSS***ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS***
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:11)

[0067] CDR1, CDR2, 和CDR3标有下划线。可变区框架以粗体显示。恒定区为斜体。

CAT-07YM可变重链:

[0068] **QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYYMHWVRQAPGQGL**
EWMGIIDPPTGRTTYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGN
YGGRYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 13)

[0069] CDR1, CDR2, 和CDR3标有下划线。可变区框架以粗体显示。CAT-07YM抗体的CDR1序

列因残基“YM”而不同于CAT-07抗体的CDR1序列。

CAT-07YM重链

[0070] **QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY~~YM~~****HWVRQAPGQGL**
EWMGIIDPPTGRTTYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME**LSLRSEDTAVYYCARGN**
YGGRYFDYWGQGT**LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS**
WNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQOGN**VFSCSVMH****EALHNHYTQKSLSLSPGK** (SEQ ID NO:14)

[0071] CDR1, CDR2, 和CDR3标有下划线。可变区框架以粗体显示。恒定区为斜体。CAT-07YM抗体的CDR1序列因残基“YM”而不同于CAT-07抗体的CDR1序列。

CAT-07可变轻链:

[0072] **DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI**
YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGG**TKVEI**
K (SEQ ID NO:10)

[0073] CDR1, CDR2, 和CDR3标有下划线。可变区框架以粗体显示。

CAT-07轻链:

[0074] **DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI**
YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGG**TKVEI**
KRTVAAPS**VFIFPPSDEQLKSGTASV****VCLLNNFY****PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS**
KDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:12)

[0075] CDR1, CDR2, 和CDR3标有下划线。可变区框架以粗体显示。恒定区为斜体。

核苷酸序列:

CAT-07重链DNA:

[0076] **CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG**

GGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTCACCAGCTACT
TTTTGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAT
AATTGATCCGCCTACTGGTTCGGACAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTC
ACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCC
TGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGAACTACGGGGGC
AGATACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCCTC
CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTG
GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTC
AGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG
ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGA
GCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGG
GGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA
GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGG
CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGA
GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC
CCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACTA
CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCA
CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA (SEQ ID
 NO:15)

[0077] 编码CDR1, CDR2, 和CDR3的序列标有下划线。编码可变区框架的序列以粗体显示。编码恒定区的序列为斜体。

CAT-07YM重链DNA:

[0078] **CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG**
GGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTCACCAGCTACT
ACATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAT
AATTGATCCGCCTACTGGTTCGGACAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTC
ACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCC
TGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGAACTACGGGGGC

AGATACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTACCGTCTCGAGCGCCTC
CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTG
GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTC
AGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG
ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGA
GCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGG
GGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA
GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCTGCACCAGGACTGG
CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGA
GAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC
CCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
TCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATA
CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCA
CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA (SEQ ID
 NO:16)

[0079] 编码CDR1, CDR2, 和CDR3的序列标有下划线。编码可变区框架的序列以粗体显示。编码恒定区的序列为斜体。

CAT-07轻链DNA:

[0080] **GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTA**
GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTA
AATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGC
ATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGA
CAGATTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTAC
TACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTG
GAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC
AGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG
CCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTC
ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCA
AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC
TCGCCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO:17)

[0081] 编码CDR1, CDR2, 和CDR3的序列标有下划线。编码可变区框架的序列以粗体显示。编码恒定区的序列为斜体。

[0082] 抗体可用于多种研究, 诊断, 和治疗应用, 包括用于实施国际专利申请 No. US20150132782A1, US20170233462A1, 和US20150098941A1中描述的任何方法, 通过援引将其公开内容完整收入本文用于所有目的。

[0083] 主题抗体特异性结合GPC3多肽, 其中表位包含GPC3抗原内的氨基酸残基, 所述GPC3抗原包含SEQ ID NO:1中所列氨基酸序列:

[0084] MAGTVRTACLVVAMLLSLDFPGQAQPPPPPPDATCHQVRSFFQRLQPGLKWVPETPVPGSDLQVCLPKGPTCCSRKMEEKYQLTARLNMEQLLQSASMELKFLIIQNAAFVQEAFAEIVVRHAKNYTNAMFKNNYPSLTPQAFEFVGEFFTDVSLYILGSDINVDDMVNELFDSLFPVIYITQLMNPGLPDSALDINECLRGARRDLKVFNGFPKLIMTQVSKSLQVTRIFLQALNLGIEVINTTDHLKFSKDCGRMLTRMWYCSYCQGLMMVKPCGGYCNVVMQGC MAGVVEIDKYWREYI LSLEELVNGMYRIYDMENVLLGLFSTIHDSIQYVQKNAGKLTITIGKLC AHSQQRQYRSAYYPEDLFDKVKLVKVAH VEHEETLSSRRRELIQKLKSFISFYALPGYICSHSPVAENDTLCWNGQELVERYSQKAARNGMKNQFNLHELKMKG PEPVVSQIIDKCLKHINQLLRTMSMPKGRVLDKNLDEEGFESGDCGDDDEDECIGGSGDGMKVKVKNQLRFLAELAYDLDDVDDAPGNSQQATPKDNEISTFHNLGNVHSPLKLLTSMASVVCFFFLVH

[0085] 在某些实施方案中,主题抗体特异性结合人GPC3,大鼠GPC3,小鼠GPC3,和食蟹猴GPC3中的一种或多种且并不显示对其它磷脂酰肌醇聚糖,诸如磷脂酰肌醇聚糖-1,磷脂酰肌醇聚糖-2,磷脂酰肌醇聚糖-5,和磷脂酰肌醇聚糖-6的显著结合。

[0086] 主题抗体展现对GPC3的高亲和力结合。例如,主题抗体以至少约 10^{-7} M,至少约 10^{-8} M,至少约 10^{-9} M,至少约 10^{-10} M,至少约 10^{-11} M,或至少约 10^{-12} M,或大于 10^{-12} M的亲和力结合GPC3。主题抗体以约 10^{-7} M至约 10^{-8} M,约 10^{-8} M至约 10^{-9} M,约 10^{-9} M至约 10^{-10} M,约 10^{-10} M至约 10^{-11} M,或约 10^{-11} M至约 10^{-12} M,或大于 10^{-12} M的亲和力结合GPC3上存在的表位。

[0087] 本公开的抗GPC3抗体在一些情况中能在细胞中诱导凋亡,该细胞在其细胞表面上表达GPC3。

[0088] “GPC3抗原”或“GPC3多肽”可包含与SEQ ID NO:1具有至少约75%,至少约80%,至少约90%,至少约95%,至少约98%,至少约99%,或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0089] 如本文中使用的,术语“免疫球蛋白”指由一条或多条实质上由免疫球蛋白基因编码的多肽组成的蛋白。公认的人免疫球蛋白基因包括卡帕(κ),拉姆达(λ),阿尔法(α) (IgA1和IgA2),伽马(γ) (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4),德尔塔(δ),厄普西隆(ϵ)和谬(μ)恒定区基因;和众多免疫球蛋白可变区基因。全长免疫球蛋白轻链(约25kD或214个氨基酸)由处于N端的可变区基因(约110个氨基酸)和处于C端的卡帕或拉姆达恒定区编码。全长免疫球蛋白重链(约50kD或446个氨基酸)由处于N端的可变区基因(约116个氨基酸)和处于C端的其它上述恒定区基因之一,例如伽马(编码约330个氨基酸)编码。在一些实施方案中,主题抗体包含全长免疫球蛋白重链和全长免疫球蛋白轻链。

[0090] 在一些实施方案中,主题抗体不包含全长免疫球蛋白重链和全长免疫球蛋白轻链,而是包含全长免疫球蛋白重链和全长免疫球蛋白轻链的抗原结合片段。在一些实施方案中,抗原结合片段包含在分开的多肽链上;在其它实施方案中,抗原结合片段包含在一条多肽链内。术语“抗原结合片段”指如上文描述的能够特异性结合GPC3的全长抗体的一种或多种片段。结合片段的例子包括(i) Fab片段(由VL, VH, CL和CH1域组成的单价片段);(ii) F(ab')₂片段(包含通过较链区处的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段);(iii) Fd片段(由VH和CH1域组成);(iv) Fv片段(由抗体的一个臂的VH和VL域组成);(v) dAb片段(由VH域组成);(vi) 分离的CDR;(vii) 单链Fv(scFv)(由抗体的一个臂的VH和VL域组成,使用重组手段通过合成接头连接,使得VH和VL域配对以形成单价分子);(viii) 双抗体(由两个scFv组成,其中连接VH和VL域,使得它们并不配对形成单价分子;每一个scFv的VH与另一个scFv的VL域配对以形成二价分子);(ix) 双特异性抗体(由至少两个抗原结合区组成,每个区结合

不同的表位)。在一些实施方案中,主题抗体片段是Fab片段。在一些实施方案中,主题抗体片段是单链抗体(scFv)。

[0091] 在一些实施方案中,主题抗体是重组的或经修饰的抗体,例如嵌合的,人源化的,去免疫的或体外生成的抗体。如本文中使用的,术语“重组的”或“经修饰的”抗体意图包括通过重组手段制备,表达,创建,或分离的所有抗体,诸如(i)使用转染入宿主细胞的重组表达载体表达的抗体;(ii)自重组,组合抗体库分离的抗体;(iii)自对于人免疫球蛋白基因而言是转基因的动物(例如小鼠)分离的抗体;或(iv)通过牵涉将人免疫球蛋白基因序列剪接至其它DNA序列的任何其它手段制备,表达,创建,或分离的抗体。此类重组抗体包括人源化的,CDR嫁接的,嵌合的,去免疫的,和体外生成的抗体;而且可任选包括自人种系免疫球蛋白序列衍生的恒定区。

[0092] 全长双特异性抗体可以例如使用两种单特异性二价抗体之间的Fab臂交换(或半分子交换)来生成,其通过在每个半分子中在重链CH3界面处引入替代以有利于具有不同特异性的两个抗体半分子的异二聚体形成,或是在体外在无细胞环境中或是使用共表达。Fab臂交换反应是二硫键异构化反应和CH3域解离-结合的结果。亲本单特异性抗体的铰链区中的重链二硫键被还原。亲本单特异性抗体之一的所得游离半胱氨酸与第二亲本单特异性抗体分子的半胱氨酸残基形成重链间二硫键,同时亲本抗体的CH3域通过解离-结合而释放和再形成。Fab臂的CH3域可以改造成有利于异二聚化胜过同二聚化。所得产物是具有各自结合不同表位的两个Fab臂或半分子的双特异性抗体。

[0093] 可使用“节-入-穴”策略(见例如PCT国际公开文本No.WO2006/028936)来生成全长双特异性抗体。简言之,可以在影响CH3域相互作用的位置突变人IgG中形成CH3域的界面的选定氨基酸以促进异二聚体形成。将具有小侧链的氨基酸(穴)引入特异性结合第一抗原的抗体的重链并将具有大侧链的氨基酸(节)引入特异性结合第二抗原的抗体的重链。在两种抗体共表达之后,异二聚体作为具有“穴”的重链与具有“节”的重链的优先相互作用的结果而形成。形成节和穴的例示性CH3替代对是(表述为第一重链的第一CH3域中的修饰位置/第二重链的第二CH3域中的修饰位置):T366Y/F405A,T366W/F405W,F405W/Y407A,T394W/Y407T,T394S/Y407A,T366W/T394S,F405W/T394S和T366W/T366S/L368A/Y407V。

[0094] 可使用其它策略,诸如使用静电相互作用促进重链异二聚化,其通过替代一个CH3表面处的带正电荷的残基和第二CH3表面处的带负电荷的残基,如描述于美国专利公开文本No.US2010/0015133;美国专利公开文本No.US2009/0182127;美国专利公开文本No.US2010/028637或美国专利公开文本No.US2011/0123532。在其它策略中,可以通过以下替代来促进异二聚化(表述为第一重链的第一CH3域中的修饰位置/第二重链的第二CH3域中的修饰位置):L351Y/F405A/Y407V/T394W,T366I/K392M/T394W/F405A/Y407V,T366L/K392M/T394W/F405A/Y407V,L351Y/Y407A/T366A/K409F,L351Y/Y407A/T366V/K409F,Y407A/T366A/K409F,T350V/L351Y/F405A/Y407V,或T350V/T366L/K392L/T394W,如描述于美国专利公开文本No.US2012/0149876或美国专利公开文本No.US2013/0195849。

[0095] 还提供的是单链双特异性抗体。在一些实施方案中,本公开的单链双特异性抗体是双特异性scFv。关于双特异性scFv的详情可见于例如Zhou et al.(2017) J Cancer 8(18):3689-3696。

[0096] 主题抗体可以是人源化的。见Queen et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:

10029-10033 (1989), 美国专利No. 5,530,101, 美国专利No. 5,585,089, 美国专利No. 5,693,761, W090/07861, 和美国专利No. 5,225,539。如果存在的话, 恒定区还可以是实质性或整个来自人免疫球蛋白的。生成人源化抗体的方法是本领域已知的。见例如美国专利No. 7,256,273。

[0097] 小鼠CDR替代入人可变域框架可导致保留它们的正确空间取向, 其中例如人可变域框架采取与CDR起源的小鼠可变框架相同或相似的构象。这可以通过自其框架序列展现与衍生CDR的鼠可变框架域的高度序列同一性的人抗体获得人可变域来实现。重和轻链可变框架区可衍生自相同或不同的人抗体序列。人抗体序列可以是天然发生人抗体的序列, 或者可以是数种人抗体的共有序列。见Kettleborough et al., *Protein Engineering* 4:773 (1991); Kolbinger et al., *Protein Engineering* 6:971 (1993)。

[0098] 在鉴定鼠供体免疫球蛋白的互补决定区和适宜的人受体免疫球蛋白之后, 下一步是如果有的话, 确定应当替代来自这些成分的哪些残基来优化所得人源化抗体的特性。一般而言, 应当最小限度用鼠替代人氨基酸残基, 因为引入鼠残基提高抗体在人中引发人抗小鼠抗体 (HAMA) 应答的风险。可以实施本领域公认的测定免疫应答的方法来监测特定患者中的或临床试验期间的HAMA应答。可以在开始时和贯穿所述疗法的施用对施用人源化抗体的患者给予免疫原性评估。测量HAMA应答, 例如通过使用本领域技术人员知道的方法检测来自患者的血清样品中针对人源化治疗性试剂的抗体, 包括表面等离子共振技术 (BIACORE) 和/或固相ELISA分析。在许多实施方案中, 主题人源化抗体并不在人受试者中实质性引发HAMA应答。

[0099] 基于它们可能的对CDR构象和/或对抗原的结合的影响, 选择来自人可变区框架残基的某些氨基酸进行替代。鼠CDR区与人可变框架区的非天然并列可导致非天然构象约束, 除非通过替代某些氨基酸残基来纠正, 其导致结合亲和力的丧失。

[0100] 用于替代的氨基酸残基的选择可以部分通过计算机建模来确定。用于生成免疫球蛋白分子的三维图像的计算机硬件和软件是本领域已知的。一般而言, 分子模型的生成始于免疫球蛋白链或其域的解析结构。将要建模的链与解析三维结构的链或域比较氨基酸序列相似性, 并且选择显示最大序列相似性的链或域作为用于构建分子模型的起点。选择分享至少50%序列同一性的链或域用于建模, 而且优选选择那些分享至少60%, 70%, 80%, 90%序列同一性或更多的用于建模。修改解析起始结构以容许正在建模的免疫球蛋白链或域中的实际氨基酸和起始结构中的那些之间的差异。然后将修改后的结构组装成复合免疫球蛋白。最后, 通过能量最小化和通过验证所有原子彼此在适宜距离内和键长和键角在化学可接受限度内来细化模型。

[0101] CDR和框架区由Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987和1991) 定义。Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987); *Nature* 342:878 (1989); 和 *J. Mol. Biol.* 186:651 (1989) (统称为“Chothia”) 提出了一种备选结构定义。当由Kabat, *supra*定义的框架残基构成由Chothia, *supra*定义的结构环残基时, 可以选择小鼠抗体中存在的氨基酸用于替代入人源化抗体。“与CDR区相邻的”残基包括人源化免疫球蛋白链的一级序列中紧邻CDR中一个或多个的位置中的氨基酸残基, 例如紧邻由Kabat定义的CDR或由Chothia定义的CDR (见例如Chothia and Lesk *JMB* 196:901 (1987)) 的位置中的。这些氨基酸特别有可能与CDR中的氨

氨基酸相互作用,而且,如果选自受体的话,扭曲供体CDR和降低亲和力。此外,相邻的氨基酸可能直接与抗原相互作用(Amit et al., Science, 233:747 (1986)),而且选择来自供体的这些氨基酸可能是保持原始抗体中提供亲和力的所有抗原接触所想要的。

[0102] 在一些实施方案中,主题抗体包含scFv多聚体。例如,在一些实施方案中,主题抗体是scFv二聚体(例如包含两个串联的scFv(scFv₂)),scFv三聚体(例如包含三个串联的scFv(scFv₃)),scFv四聚体(例如包含四个串联的scFv(scFv₄)),或是多于四个scFv(例如串联的)的多聚体。scFv单体可以经长度为约2个氨基酸至约10个氨基酸,例如长度为2个,3个,4个,5个,6个,7个,8个,9个,或10个氨基酸的接头串联连接。合适的接头包括例如(Gly)_x,其中x是2至10的整数,甘氨酸-丝氨酸聚合物,等等。其它合适的接头是上文讨论的那些。

[0103] 在某些实施方案中,抗体经可切割或不可切割接头缀合至药剂。适合于在主题抗体中使用的接头包括“柔性接头”。如果存在的话,接头分子的长度一般足以允许所连接的区域之间的一些柔性运动。接头分子一般长约6-50个原子。接头分子还可以是例如芳基乙炔,含有2-10个单体单元的乙二醇低聚物,二胺,二酸,氨基酸,或其组合。可以根据此公开使用能结合至多肽的其它接头分子。

[0104] 依照一些实施方案,接头是化学不稳定接头,诸如在中性pH(血流pH7.3-7.5)稳定但在内在化入靶细胞(例如癌细胞)的微酸性内体(pH 5.0-6.5)和溶酶体(pH4.5-5.0)时经水解的酸可切割接头。化学不稳定接头包括但不限于基于脲的接头,基于脲的接头,基于碳酸根的接头,基于酯的接头,等。在某些实施方案中,接头是酶不稳定接头,诸如在血流中稳定但在内在化入靶细胞时经历酶促切割的酶不稳定接头,例如由靶细胞(例如癌细胞)的溶酶体中的溶酶体蛋白酶(诸如组织蛋白酶或纤溶酶)进行。酶不稳定接头包括但不限于包括肽键的接头,例如基于二肽的接头,诸如缬氨酸-瓜氨酸(Vc)接头,诸如马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-p-氨基苄基(MC-vc-PAB)接头,缬氨酸-丙氨酸-对-氨基苄氧基(Val-Ala-PAB)接头,等等。化学不稳定接头,酶不稳定接头,和不可切割接头是已知的且详细描述于例如Ducry&Stump(2010) Bioconjugate Chem. 21:5-13; Nolting, B. (2013) Methods Mol Biol. 1045:71-100; Tsuchikama and An(2018) Protein&Cell 9(1):33-46; 和别处。

[0105] 在一些实施方案中,主题scFv多聚体中的每个scFv单体是人源化的,如上文所述。

[0106] 在一些实施方案中,主题抗体包含免疫球蛋白的恒定区(例如Fc区)。如果存在的话,Fc区可以是人Fc区。如果恒定区存在的话,抗体可含有轻链和重链恒定区二者。合适的重链恒定区包括CH1, 铰链, CH2, CH3, 和CH4区。本文中描述的抗体包括具有所有类型,包括IgM, IgG, IgD, IgA和IgE, 和任何同种型,包括IgG1, IgG2, IgG3和IgG4的恒定区的抗体。合适的重链Fc区的一个例子是人同种型IgG1 Fc。轻链恒定区可以是拉姆达或卡帕。主题抗体(例如主题人源化抗体)可以包含来自多于一个类或同种型的序列。抗体可以表达为含有两条轻链和两条重链的四聚体,为分开的重链,轻链,为Fab, Fab', F(ab')₂, 和Fv, 或为其中重和轻链可变域经由间隔物连接的单链抗体。

[0107] 在一些实施方案中,本公开的抗磷脂酰肌醇聚糖-3抗体可包括在Fc区中引入的一个或多个氨基酸替代。在一些实施方案中,氨基酸替代中一个或多个可处于Fc区中的位置239, 298, 326, 330和332。在一些实施方案中,本公开的抗磷脂酰肌醇聚糖-3抗体可包括在Fc区中引入的下述氨基酸替代中一个或多个:I332E; S239D/A330L/I332E; S239D/S298A/

I332E;S239D/K326T/I332E;S239D/S298A/K326T/I332E;或S239D/A330L/I332E/D356E/L358M。

[0108] 在一些实施方案中,主题抗体包含羧基末端处的游离硫醇(-SH)基团,其中该游离硫醇基团可用于将抗体附着至第二多肽(例如另一抗体,包括主题抗体),支架,载剂,等。

[0109] 在一些实施方案中,主题抗体包含一个或多个非天然发生氨基酸。在一些实施方案中,非天然编码的氨基酸包含羰基基团,乙酰基基团,氨基氧基基团,胍基团,酰胍基团,氨基脒基团,叠氮化物基团,或炔基团。关于合适的非天然发生氨基酸,见例如美国专利No.7,632,924。包含非天然发生氨基酸可提供对聚合物,第二多肽,支架,等的连接。例如,可以通过使包含羰基的水溶性聚合物(例如PEG)与包含含有氨基氧基,胍,酰胍或氨基脒基团的非天然编码的氨基酸的主题抗体来生成连接至水溶性聚合物的主题抗体。作为另一个例子,可以通过使包含炔基的主题抗体与包含叠氮化物模块的水溶性聚合物(例如PEG)反应来生成连接至水溶性聚合物的主题抗体;在一些实施方案中,叠氮化物或炔基团经由酰胺连接而连接至PEG分子。“非天然编码的氨基酸”指不是20种常见氨基酸或吡咯赖氨酸或硒代半胱氨酸之一的氨基酸。可以与术语“非天然编码的氨基酸”同义使用的其它术语是“非天然氨基酸”,“非天然发生氨基酸”,及其各种有连字符和无连字符的版本。术语“非天然编码的氨基酸”还包括但不限于通过天然编码的氨基酸(包括但不限于20种常见氨基酸或吡咯赖氨酸和硒代半胱氨酸)的修饰(例如翻译后修饰)发生但它们自身并不由翻译复合物天然掺入生长中的多肽链的氨基酸。此类非天然发生氨基酸的例子包括但不限于N-乙酰基葡萄糖胺基-L-丝氨酸,N-乙酰基葡萄糖胺基-L-苏氨酸,和O-磷酸酪氨酸。

[0110] 本公开还提供具有感兴趣的附着模块,例如可检测标记物,药物,半衰期延长模块,等等的抗GPC3抗体。抗体的修饰可以通过多种合成和/或重组方法来实现。附着至抗体的模块可提供极其多种功能或特征中一个或多个。例示性模块包括可检测标记物(例如染料标记物(例如生色团,荧光团),生物物理探针(自旋标记物,核磁共振(NMR)探针), Förster共振能量转移(FRET)型标记物(例如FRET对的至少一个成员,包括荧光团/淬灭剂对的至少一个成员),生物发光共振能量转移(BRET)型标记物(例如BRET对的至少一个成员),免疫可检测标签(例如FLAG,His(6),等等);水溶性聚合物(例如PEG化);纯化标签(例如用于推动通过亲和层析的分离(例如附着FLAG表位;膜定位域(例如脂质或糖磷脂酰肌醇(GPI)型锚);固定化标签(例如用于推动将多肽附着至表面,包括选择性附着);药物(例如用于推动药物靶向,例如经由将药物附着至抗体);等等。

[0111] 在一些实施方案中,主题抗体连接(例如共价连接)至聚合物(例如除了多肽以外的聚合物)。合适的聚合物包括例如生物相容性聚合物和水溶性生物相容性聚合物。合适的聚合物包括合成聚合物和天然发生聚合物。合适的聚合物包括例如经取代的或未取代的直链或支链聚亚烷基,聚亚烯基或聚氧亚烷基聚合物或分支或不分支多糖,例如同型或异型多糖。合适的聚合物包括例如乙烯乙二醇共聚物(通常称作通用名EVOH或商品名EVAL);聚甲基丙烯酸丁酯;聚(羟基戊酸酯);聚(L-乳酸);聚己内酯;聚(丙交酯-共-乙交酯);聚(羟基丁酸酯);聚(羟基丁酸酯-共-戊酸酯);聚二噁烷酮;聚原酯;聚酸酐;聚(乙醇酸);聚(D,L-乳酸);聚(乙醇酸-共-碳酸三甲烯);聚磷酸酯;聚磷酸酯氨酯;聚(氨基酸);氰基丙烯酸酯;聚(碳酸三甲烯);聚(亚氨基碳酸酯);共聚(醚-酯)(例如聚(环氧乙烷)-聚(乳酸)(PEO/PLA)共聚物);聚草酸亚烷基酯;聚磷腈;生物分子,诸如纤维蛋白,纤维蛋白原,纤维素,淀

粉, 胶原蛋白和透明质酸; 聚氨酯; 硅酮; 聚酯; 聚烯烃; 聚异丁烯和乙烯- α -烯烃共聚物; 丙烯酸聚合物和共聚物; 卤化乙烯聚合物和共聚物, 诸如聚氯乙烯; 聚乙烯醚, 诸如聚乙烯甲醚; 聚偏二卤乙烯, 诸如聚偏二氟乙烯和聚偏二氯乙烯; 聚丙烯腈; 聚乙烯酮; 聚乙烯芳烃, 诸如聚苯乙烯; 聚乙烯酯, 诸如聚乙酸乙烯酯; 乙烯基单体彼此和与烯烃的共聚物, 诸如乙烯-甲基丙烯酸甲酯共聚物, 丙烯腈-苯乙烯共聚物, ABS树脂, 和乙烯-乙酸乙烯酯共聚物; 聚酰胺, 诸如尼龙66和聚己内酰胺; 醇酸树脂; 聚碳酸酯; 聚氧亚甲基; 聚酰亚胺; 聚醚; 环氧树脂; 聚氨酯; 人造丝; 三乙酸人造丝; 纤维素; 乙酸纤维素; 丁酸纤维素; 乙酸丁酸纤维素; 玻璃纸; 硝酸纤维素; 丙酸纤维素; 纤维素醚; 无定形特氟隆; 聚乙二醇; 和羧甲基纤维素。

[0112] 合适的合成聚合物包括未取代的和经取代的直链或支链聚(乙二醇), 聚(丙二醇), 聚(乙烯醇), 及其衍生物, 例如经取代的聚(乙二醇), 诸如甲氧基聚(乙二醇), 及其衍生物。合适的天然发生聚合物包括例如清蛋白, 直链淀粉, 右旋糖酐, 胶原, 及其衍生物。

[0113] 合适的聚合物可具有500Da至50000Da, 例如5000Da至40000Da, 或25000至40000Da范围中的平均分子量。例如, 在一些实施方案中, 在主题抗体包含聚乙二醇(PEG)或甲氧基聚(乙二醇)聚合物的情况中, PEG或甲氧基聚(乙二醇)聚合物可具有约0.5千道尔顿(kDa)至1kDa, 约1kDa至5kDa, 5kDa至10kDa, 10kDa至25kDa, 25kDa至40kDa, 或40kDa至60kDa范围中的分子量。

[0114] 如上所述, 在一些实施方案中, 主题抗体共价连接至PEG聚合物。在一些实施方案中, 主题scFv多聚体共价连接至PEG聚合物。适合于PEG化蛋白质的方法和试剂是本领域公知的且可见于例如美国专利No. 5, 849, 860。适合于缀合至蛋白质的PEG一般是于室温在水中可溶的, 而且具有通式 $R(O-CH_2-CH_2)_n-O-R$, 其中R是氢或保护基团, 诸如烷基或烷醇基, 且其中n是1至1000的整数。在R是保护基团的情况中, 它一般具有1至8个碳。

[0115] 缀合至主题抗体的PEG可以是线性的。缀合至主题蛋白的PEG也可以是分支的。分支PEG衍生物, 诸如美国专利No. 5, 643, 575中描述的那些, “star-PEG”和多臂PEG, 诸如Shearwater Polymers, Inc. 目录“Polyethylene Glycol Derivatives 1997-1998”中描述的那些。Star PEG在本领域有描述, 包括例如美国专利No. 6, 046, 305。

[0116] 主题抗体可以是糖基化的, 例如, 主题抗体可包含共价连接的碳水化合物或多糖模块。抗体的糖基化典型地或是N连接的或是O连接的。N连接的指碳水化合物模块附着至天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除了脯氨酸以外的任何氨基酸)是酶促附着碳水化合物模块至天冬酰胺侧链的识别序列。如此, 多肽中这些三肽序列任一的存在创建潜在的糖基化位点。O连接的糖基化指糖N-乙酰基半乳糖胺, 半乳糖, 或木糖之一附着至羟基氨基酸, 最常见的是丝氨酸或苏氨酸, 尽管也可以使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。糖基化可以通过例如具有期望的糖基化机制的宿主细胞中的重组生成来实现。

[0117] 糖基化位点添加至抗体通过改变氨基酸序列, 使得它含有一个或多个上文所述三肽序列方便地实现(对于N连接的糖基化位点)。也可以通过对原始抗体的序列添加或替代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基进行改变(对于O连接的糖基化位点)。类似地, 去除糖基化位点可以通过抗体的天然糖基化位点内的氨基酸改变来实现。

[0118] 可以使用例如戊二醛, 同型双功能交联剂, 或异型双功能交联剂将主题抗体共价连接至第二模块(例如脂质, 除了主题抗体以外的多肽, 合成聚合物, 碳水化合物, 等等)。戊

二醛经它们的氨基模块交联多肽。同型双功能交联剂(例如同型双功能酰亚胺基酯,同型双功能N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS)酯,或同型双功能巯基反应性交联剂)含有两个或更多个相同的反应性模块且可用于一步反应规程,其中将交联剂添加至含有要连接的多肽的混合物的溶液。同型双功能NHS酯和酰亚胺基酯交联含有胺的多肽。在弱碱性pH,酰亚胺基酯只与伯胺反应以形成酰亚胺基酰胺,而且交联多肽的总体电荷不受影响。同型双功能巯基反应性交联剂包括双马来酰亚胺基己烷(BMH),1,5-二氟-2,4-二硝基苯(DFDNB),和1,4-二-(3',2'-吡啶基二硫代)丙酰胺基丁烷(DPDPB)。

[0119] 异型双功能交联剂具有两个或更多个不同反应性模块(例如胺反应性模块和巯基反应性模块)且经胺或巯基反应性模块与多肽之一交联,然后经未反应的模块与另一多肽反应。多种异型双功能卤乙酰基交联剂是可用的,正如吡啶基二硫化物交联剂。碳二亚胺是用于将羧基偶联至胺,产生酰胺键的异型双功能交联试剂的一个经典例子。

[0120] 主题抗体可以在固体支持物上固定化。合适的支持物是本领域公知的且格外包含可商购的柱材料,聚苯乙烯珠,乳胶珠,磁珠,胶体金属颗粒,玻璃和/或硅芯片和表面,硝化纤维素条,尼龙膜,薄片,硬脑膜细胞(duracytes),反应盘(例如多孔板)的孔,塑料管,等。固体支持物可包含多种物质中任一,包括例如玻璃,聚苯乙烯,聚氯乙烯,聚丙烯,聚乙烯,聚碳酸酯,右旋糖酐,尼龙,直链淀粉,天然和修饰的纤维素,聚丙烯酰胺,琼脂糖,和磁铁矿。用于将主题抗体固定化到固体支持物上的合适方法是公知的且包括但不限于离子,疏水,共价相互作用等等。固体支持物可以是可溶性的或不溶性的,例如在水溶液中。在一些实施方案中,合适的固体支持物一般是在水溶液中不溶性的。

[0121] 在一些实施方案中,主题抗体可包含可检测标记物。合适的可检测标记物包括通过光谱学,光化学,生物化学,免疫化学,电学,光学或化学手段可检测的任何组合物。合适的标记物包括但不限于磁珠(例如Dynabeads™),荧光染料(例如异硫氰酸荧光素,德克萨斯红,罗丹明,绿色荧光蛋白,红色荧光蛋白,黄色荧光蛋白,等等),放射性标记物(例如³H,¹²⁵I,³⁵S,¹⁴C,或³²P),酶(例如辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶,萤光素酶,和其它在酶联免疫吸附测定法(ELISA)中常用的),和比色标记物,诸如胶体金或有色玻璃或塑料(例如聚苯乙烯,聚丙烯,乳胶,等)珠。

[0122] 在一些实施方案中,主题抗体包含造影剂或放射性同位素,其中造影剂或放射性同位素是适合于用作可检测标记物的,例如在成像中,例如对人进行的成像规程。标记物的非限制性例子包括放射性同位素,诸如¹²³I(碘),¹⁸F(氟),⁹⁹Tc(锝),¹¹¹In(铟),和⁶⁷Ga(镓),和造影剂,诸如钆(Gd),镉,和铁。放射性Gd同位素(¹⁵³Gd)也是可用的且适合于非人哺乳动物中的成像规程。

[0123] 可以使用标准技术来标记主题抗体。例如,可以使用氯胺T或1,3,4,6-四氯-3 α ,6 α -二苯基甘脲碘化主题抗体。对于氟化,通过氟离子置换反应在合成期间将氟添加至主题抗体。关于用此类放射性同位素合成蛋白质的综述,见Muller-Gartner,H.,TIB Tech.,16:122-130(1998)和Saji,H.,Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst.,16(2):209-244(1999)。还可以经由标准技术用造影剂标记主题抗体。例如,可以通过将低分子Gd螯合物,诸如Gd二乙烯三胺五乙酸(GdDTPA)或Gd四氮杂环十二烷四乙酸(GdDOTA)缀合至抗体用钆(Gd)标记主题抗体。见Caravan et al.,Chem.Rev.99:2293-2352(1999)和Lauffer et al.,J.Magn.Reson.Imaging,3:11-16(1985)。可以通过例如将聚赖氨酸-Gd螯合物缀合至抗体

用Gd标记主题抗体。见例如Curtet et al., Invest. Radiol., 33(10):752-761(1998)。或者,可以通过将包括Gd螯合剂脂质的顺磁性聚合脂质体与亲合素和生物素化抗体一起温育用Gd标记主题抗体。见例如Sipkins et al., Nature Med., 4:623-626(1998)。

[0124] 可连接至主题抗体的合适的荧光蛋白包括但不限于来自维多利亚多管水母(Aequoria victoria)的绿色荧光蛋白或其突变体或衍生物,例如如描述于美国专利No.6,066,476;6,020,192;5,985,577;5,976,796;5,968,750;5,968,738;5,958,713;5,919,445;5,874,304;例如增强型GFP,许多此类GFP是可商购的,例如购自Clontech, Inc.;红色荧光蛋白;黄色荧光蛋白;来自珊瑚虫物种的多种荧光和有色蛋白中任一,如描述于例如Matz et al.(1999) Nature Biotechnol. 17:969-973;等等。

[0125] 在一些实施方案中,主题抗体会包含“不透射线”标记物,例如可使用例如X射线容易可视化的标记物。不透射线材料是本领域技术人员公知的。最常见的不透射线材料包括碘化物,溴化物或钡盐。还知道其它不透射线材料,包括但不限于有机铋衍生物(见例如美国专利No.5,939,045),不透射线多聚氨酯(见美国专利No.5,346,981),有机铋复合材料(见例如美国专利No.5,256,334),不透射线钡多聚体复合物(见例如美国专利No.4,866,132),等等。

[0126] 在一些实施方案中,主题抗体会连接(例如共价或非共价连接)至融合配偶,例如配体;表位标签;肽;除了抗体以外的蛋白;等等。合适的融合配偶包括如下的肽和多肽,其赋予增强的体内稳定性(例如增强的血清半衰期);提供容易纯化,等等;提供自细胞分泌融合蛋白;提供表位标签,例如(His)_n,例如6His,等等;提供自细胞分泌融合蛋白;提供表位标签,例如GST,血凝素(HA;例如CYPYDVPDYA;SEQ ID NO:35),FLAG(例如DYKDDDDK;SEQ ID NO:36),c-myc(例如CEQKLISEEDL;SEQ ID NO:37),等等;提供可检测信号,例如生成可检测产物的酶(例如β-半乳糖苷酶,萤光素酶),或自身可检测的蛋白,例如绿色荧光蛋白,红色荧光蛋白,黄色荧光蛋白,等;提供多聚化,例如多聚化域,诸如免疫球蛋白的Fc部分;等等。

[0127] 融合还可包括亲和域,包括能与结合配偶相互作用的肽序列,例如诸如在固体支持物上固定化的,对于鉴定或纯化有用的。连续单一氨基酸,诸如组氨酸,在融合至蛋白时,可用于通过高亲和力结合至树脂柱,诸如镍Sepharose而一步纯化融合蛋白。亲和域的例子包括His₅(HHHHH)(SEQ ID NO:18),His₆(HHHHHH)(SEQ ID NO:19),C-myc(EQKLISEEDL)(SEQ ID NO:20),Flag(DYKDDDDK)(SEQ ID NO:21),Strep标签(WSHPQFEK)(SEQ ID NO:22),血凝素,例如HA标签(YPYDVPDYA;SEQ ID NO:23),谷胱甘肽-S-转移酶(GST),硫氧还蛋白,纤维素结合域,RYIRS(SEQ ID NO:24),Phe-His-His-Thr(SEQ ID NO:25),几丁质结合域,S肽,T7肽,SH2域,C端RNA标签,WEAAAREACCRECCARA(SEQ ID NO:26),金属结合域,例如锌结合域或钙结合域,诸如那些来自钙结合蛋白的,例如钙调蛋白,肌钙蛋白C,钙调神经磷酸酶B,肌球蛋白轻链,恢复蛋白,S-调节蛋白,视锥蛋白,VILIP,神经钙蛋白,海马钙蛋白,频青霉菌素,钙牵蛋白,钙蛋白酶大亚基,S100蛋白,细小清蛋白,钙结合蛋白D9K,钙结合蛋白D28K,和钙视网膜蛋白,内含肽,生物素,链霉亲合素,MyoD,亮氨酸拉链序列,和麦芽糖结合蛋白。

[0128] 在一些实施方案中,主题抗体包含多胺修饰。可以用或是天然发生的或是合成的多胺修饰主题抗体。见例如美国专利No.5,670,477。有用的天然发生多胺包括腐胺,亚精胺,精胺,1,3-二氨基丙烷,去甲亚精胺,合成高亚精胺,热胺,热精胺,钙戊胺,高钙戊胺,和刀豆胺。腐胺,亚精胺和精胺是特别是有用的。合成多胺由经验式C_xH_yN_z构成,可以是环状的

或无环的,分支的或不分支的,3-12个碳原子的烃链,其进一步包括1-6个NR或N(R)₂模块,其中R是H,(C₁-C₄)烷基,苯基,或苄基。可以使用任何标准交联方法将多胺连接至抗体。

[0129] 在一些实施方案中,修饰主题抗体以包括碳水化合物模块,其中可以将碳水化合物模块共价连接至抗体。在一些实施方案中,修饰主题抗体以包括脂质模块,其中可以将脂质模块共价连接至抗体。合适的脂质模块包括例如N-脂肪酰基基团,诸如N-月桂酰基,N-油酰基,等;脂肪胺,诸如十二烷基胺,油酰胺,等;C3-C16长链脂肪族脂质;等等。见例如美国专利No.6,638,513。在一些实施方案中,将主题抗体掺入脂质体中。

[0130] 在本公开的抗GPC3抗体包含共价连接的异源模块的情况中,可以直接或经接头将异源模块连接至抗GPC3重和/或轻链。合适的接头可以容易的选择且可以是任何合适的不同长度,诸如1个氨基酸(例如Gly)至20个氨基酸,2个氨基酸至15个氨基酸,3个氨基酸至12个氨基酸,包括4个氨基酸至10个氨基酸,5个氨基酸至9个氨基酸,6个氨基酸至8个氨基酸,或7个氨基酸至8个氨基酸,而且可以是1,2,3,4,5,6,或7个氨基酸。

[0131] 柔性接头的例子包括甘氨酸聚合物(G)_n,甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如(GS)_n,(GSGGS)_n(SEQ ID NO:27)和(GGGS)_n(SEQ ID NO:28),其中n是至少一的整数),甘氨酸-丙氨酸聚合物,丙氨酸-丝氨酸聚合物,和本领域已知的其它柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是感兴趣的,因为这些氨基酸都是相对无结构的,因此可以充当各成分之间的中性系链。甘氨酸聚合物是特别感兴趣的,因为甘氨酸到达比甚至丙氨酸显著更多的φ-ψ空间,而且约束比具有更长侧链的残基少得多(见Scheraga,Rev.Computational Chem.11173-142(1992))。例示性柔性接头包括但不限于GGSG(SEQ ID NO:29),GGSGG(SEQ ID NO:30),GSGSG(SEQ ID NO:31),GSGGG(SEQ ID NO:32),GGGSG(SEQ ID NO:33),GSSSG(SEQ ID NO:34),等等。普通技术人员会认识到缀合至上文描述的任何元件的肽的设计可包括整个或部分柔性的接头,使得接头可包括柔性接头以及赋予较不柔性的结构的一个或多个部分。

用于修饰抗体的方法

[0132] 可以通过使用多种方法中任一修饰抗体以具有共价附着的异源模块(例如可检测标记物,药物,等)。本公开提供缀合至感兴趣模块的抗GPC3抗体,其中缀合至感兴趣模块的抗GPC3抗体称作“抗GPC3抗体缀合物”。本公开的抗GPC3抗体缀合物可包括:1)缀合至感兴趣模块的Ig重链恒定区;和缀合至感兴趣模块的Ig轻链恒定区;2)缀合至感兴趣模块的Ig重链恒定区;和未缀合至感兴趣模块的Ig轻链恒定区;或3)未缀合至感兴趣模块的Ig重链恒定区;和缀合至感兴趣模块的Ig轻链恒定区。主题抗GPC3抗体缀合物还可包括VH和/或VL域。

[0133] 在一个例子中,可以修饰抗体以包括2-甲酰甘氨酸残基,其可充当用于附着异源模块的化学把手。例如,可以修饰本公开的抗GPC3抗体的重和/或轻链恒定区以包括硫酸酯酶基序的氨基酸序列,其能够通过2-甲酰甘氨酸生成酶(FGE)的作用转变成含有2-甲酰甘氨酸(FGly)。此类硫酸酯酶基序在本文中还可以称作FGE修饰位点。FGE的作用以序列特异性方式进行,在于FGE作用于位于免疫球蛋白多肽内的硫酸酯酶基序。提供感兴趣模块作为反应性配偶的成分,用于与带标签的Ig多肽的已转变的醛标签的FGly残基的醛反应。可使用极其多种可商购试剂来实现将感兴趣模块附着至带醛标签的Ig多肽的FGly残基。例如,多种感兴趣模块的氨基氧基,酰肼,或氨基硫脲衍生物是合适的反应性配偶,而且容易获得或可以使用标准化学方法来生成。

[0134] 例如,为了将聚乙二醇(PEG)模块附着至带标签的Ig多肽,可以使用标准方案自单氨基-PEG和氨基氧基甘氨酸生成氨基氧基-PEG。然后可以使氨基氧基-PEG与已转变的(例如FGly修饰的)带醛标签的Ig多肽反应以提供PEG模块的附着。将生物素模块投递至已转变的带醛标签的多肽可以使用氨基氧基生物素,生物素酰肼或2,4-二硝基苯肼来实现。

醛标签的最小硫酸酯酶基序通常长度为5或6个氨基酸残基,通常长度不多于6个氨基酸残基。在Ig多肽中提供的硫酸酯酶基序是至少5或6个氨基酸残基,而且可以是长度为例如5-16,6-16,5-15,6-15,5-14,6-14,5-13,6-13,5-12,6-12,5-11,6-11,5-10,6-10,5-9,6-9,5-8,或6-8个氨基酸残基,从而定义长度少于16,15,14,13,12,11,10,9,8或7个氨基酸残基的硫酸酯酶基序。在某些实施方案中,所使用的硫酸酯酶基序可以以下式来描述:

[0135] $X^1Z^1X^2Z^2X^3Z^3$ (I) (SEQ ID NO:40)

[0136] 其中

[0137] Z^1 是半胱氨酸或丝氨酸(其也可以以(C/S)来表示);

[0138] Z^2 或是脯氨酸或是丙氨酸残基(其也可以以(P/A)来表示);

[0139] Z^3 是碱性氨基酸(例如精氨酸(R),而且可以是赖氨酸(K)或组氨酸(H),通常是赖氨酸),或脂肪族氨基酸(丙氨酸(A),甘氨酸(G),亮氨酸(L),缬氨酸(V),异亮氨酸(I),或脯氨酸(P),通常是A,G,L,V,或I);

[0140] X^1 存在或缺失,而且,当存在时,可以是任何氨基酸,尽管通常是脂肪族氨基酸,含硫氨基酸,或极性,不带电荷氨基酸(即,除了芳香族氨基酸或带电荷氨基酸以外),通常是L,M,V,S或T,更加通常是L,M,S或V,前提是当硫酸酯酶基序在靶多肽的N端时, X^1 存在;且

[0141] X^2 和 X^3 可以独立是任何氨基酸,尽管通常是脂肪族氨基酸,极性,不带电荷氨基酸,或含硫氨基酸(即,除了芳香族氨基酸或带电荷氨基酸以外),例如S,T,A,V,G或C;例如S,T,A,V或G。在一个例子中,醛标签是式L(C/S)TPSR(SEQ ID NO:35)的,例如LCTPSR(SEQ ID NO:36)或LSTPSR(SEQ ID NO:37)。如此,本公开提供包括带醛标签的Ig重链和/或带醛标签的Ig轻链的抗体,其中带醛标签的Ig抗体包含含有此类硫酸酯酶基序的重和/或轻链的Ig恒定区氨基酸序列。

[0142] 一般而言,用于推动半胱氨酸或丝氨酸转变成靶多肽的醛标签的硫酸酯酶基序中的FGly的FGE是根据醛标签中存在的硫酸酯酶基序选择的。FGE可以对于带醛标签的多肽在其中表达的宿主细胞而言是天然的,或可以遗传修饰宿主细胞以表达适宜的FGE。在一些实施方案中,可能想要使用与人FGE相容的硫酸酯酶基序,并在表达FGE的人细胞中或在经遗传修饰而表达人FGE的宿主细胞,通常是哺乳动物细胞中表达带醛标签的蛋白。一般而言,适合用于生成经FGly修饰的抗体的FGE可以自天然发生来源获得或合成生成。例如,适宜的FGE可以衍生自天然生成FGE或经遗传修饰而表达编码FGE的重组基因的生物来源。编码多种FGE的核酸是本领域已知的且容易获得的。

[0143] 在FGE作用于硫酸酯酶基序后, Z_1 被氧化以生成2-甲酰甘氨酸(FGly)残基。而且,在FGE介导的转变和与包含感兴趣模块的反应性配偶的反应二者之后,位于上式中的 Z_1 处的FGly共价结合至感兴趣模块(例如可检测标记物,水溶性聚合物,多肽,药物,等)。如此,本公开提供经修饰而包含FGly模块的抗GPC3抗体,其中抗GPC3抗体包含下式的FGly转变的硫酸酯酶基序:

[0144] $X^1(\text{FGly})X^2Z^2X^3Z^3$ (SEQ ID NO:41)

[0145] 其中:

[0146] X^1 存在或缺失,而且,当存在时,是任何氨基酸,前提是当硫酸酯酶基序在多肽的N末端时, X^1 存在;

[0147] X^2 和 X^3 每个独立是任何氨基酸;

[0148] Z^2 或是脯氨酸或是丙氨酸残基(其还可以以(P/A)表示);且

[0149] Z^3 是碱性氨基酸;且

[0150] 其中当处于折叠状态时,FGly修饰的抗GPC3抗体在溶剂可及表面上呈现FGly基团。在一些实施方案中,FGly转变的硫酸酯酶基序是式L (FGly) TPSR (SEQ ID NO:38)的。

[0151] 如上所述,经修饰而包括FGly模块的主题抗GPC3抗体可进一步修饰以包括经FGly模块共价结合至抗GPC3抗体的感兴趣异源模块(例如可检测标记物,水溶性聚合物,多肽,药物,等)。如此,本公开提供抗GPC3抗体缀合物(在本文中还可称作“抗GPC3缀合物”),抗GPC3缀合物包含:

[0152] X^1 (FGly') $X^2 Z^2 X^3 Z^3$ (I') (SEQ ID NO:42)

[0153] 其中

[0154] FGly' 是具有共价附着模块的2-甲酰甘氨酸残基;

[0155] Z^2 或是脯氨酸或是丙氨酸残基(其也可以以(P/A)表示); Z^3 是碱性氨基酸(例如精氨酸(R),而且可以是赖氨酸(K)或组氨酸(H),通常是赖氨酸),或脂肪族氨基酸(丙氨酸(A),甘氨酸(G),亮氨酸(L),缬氨酸(V),异亮氨酸(I),或脯氨酸(P),通常是A,G,L,V,或I);

[0156] X^1 可以存在或缺失,而且当存在时,可以是任何氨基酸,尽管通常是脂肪族氨基酸,含硫氨基酸,或极性,不带电荷氨基酸(即,除了芳香族氨基酸或带电荷氨基酸以外),通常是L,M,V,S或T,更加通常是L,M或V,前提是当硫酸酯酶基序在靶多肽的N末端时, X^1 存在;且 X^2 和 X^3 可以独立是任何氨基酸,尽管通常是脂肪族氨基酸,含硫氨基酸,或极性,不带电荷氨基酸(即,除了芳香族氨基酸或带电荷氨基酸以外),通常是S,T,A,V,G或C,更加通常是S,T,A,V或G。在一些实施方案中,基序是式L (FGly') TPSR (SEQ ID NO:39)的。

药物

[0157] 在一些情况中,本公开的抗GPC3抗体包含共价连接至抗体的重和/或轻链的药物。“药物”包括小分子药物,肽药物,毒素(例如细胞毒素),等等。

[0158] 如本文中使用的,“小分子药物”指如下的化合物,例如有机化合物,其展现感兴趣的药理学活性且一般具有不大于800Da,或不大于2000Da的分子量,但可以涵盖高达5kDa的分子且可以大至10kDa。无机小分子指不含碳原子的分子,而有机小分子指含有至少一个碳原子的化合物。

[0159] 如本文中使用的,“肽药物”指含有氨基酸的聚合化合物,而且意图涵盖天然发生的和非天然发生的肽,寡肽,环肽,多肽,和蛋白,以及肽模拟物。肽药物可以通过化学合成来获得,或者可以自遗传编码的来源(例如重组来源)生成。肽药物可以具有一定范围的分子量,而且分子量可以是200Da至10kDa或更大。

[0160] 在一些情况中,药物是毒素,例如细胞毒素。作为高等植物中普遍存在的一类蛋白,核糖体灭活蛋白(RIP)是此类细胞毒素的例子。由于它们作为真核蛋白质合成的有力抑制剂的活性,分成I型和II型类别的RIP是细胞毒性的。I型RIP由具有核糖体灭活活性的一条肽链构成,而II型蛋白由本质上等同于I型蛋白的A链和与其二硫化物连接的具有细胞结

合特性的B链构成。在真核核糖体的28S rRNA的高度保守的环区中特定腺嘌呤碱基的N-糖苷键受到RIP的水解切割,由此灭活真核细胞中的翻译。见例如美国专利No.5,744,580。白树毒蛋白,商陆毒蛋白,天花粉蛋白,栝楼毒蛋白,异株腹泻毒蛋白,紫茉莉(Mirabilis)抗病毒蛋白(MAP),大麦核糖体灭活蛋白(BRIP),美洲商路抗病毒蛋白(PAP),皂草毒蛋白,丝瓜毒蛋白,和苦瓜毒蛋白是I型RIP的例子;而蓖麻毒蛋白和相思豆毒蛋白是II型RIP的例子。合适的细胞毒素包括但不限于蓖麻毒蛋白,相思豆毒蛋白,白喉毒素,假单胞菌外毒素(例如PE35,PE37,PE38,PE40,等),皂草毒蛋白,白树毒蛋白,美洲商路抗病毒蛋白(PAP),肉毒菌毒素,异株腹泻毒蛋白,苦瓜毒蛋白,和三角梅毒蛋白。

[0161] 在一些情况中,药物是癌症化疗剂。癌症化疗剂包括降低癌细胞增殖的非肽(即非蛋白质性质)化合物,而且涵盖细胞毒害剂和细胞抑制剂。化疗剂的非限制性例子包括烷化剂,亚硝基脲,抗代谢物,抗肿瘤抗生素,植物(长春花)生物碱,和类固醇激素。还可以使用肽化合物。

[0162] 合适的癌症化疗剂包括多拉司他汀(dolastatin)及其活性类似物和衍生物;和奥瑞司他汀(auristatin)及其活性类似物和衍生物。见例如W096/33212,W096/14856,和美国专利No.6,323,315。例如,多拉司他汀10或奥瑞司他汀PE可以包括在本公开的抗体-药物缀合物中。合适的癌症化疗剂还包括美登木素生物碱(maytansinoid)及其活性类似物和衍生物(见例如EP 1,391,213;和Liu et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623);和倍癌霉素(duocarmycin)及其活性类似物和衍生物(例如包括合成类似物KW-2189和CB 1-TM1)。

[0163] 起降低细胞增殖作用的药剂是本领域已知且广泛使用的。此类药剂包括烷化剂,诸如氮芥,亚硝基脲,乙撑亚胺衍生物,磺酸烷基酯,和三氮烯,包括但不限于二氯甲基二乙胺(mechlorethamine),环磷酰胺(cyclophosphamide) (CytoxanTM),美法仑(melphalan) (L-沙可来新(sarcosine)),卡莫司汀(carmustine) (BCNU),洛莫司汀(lomustine) (CCNU),司莫司汀(semustine) (甲基-CCNU),链脲菌素(streptozocin),氯脲霉素(chlorozotocin),尿嘧啶氮芥(uracil mustard),双氯乙基甲胺(chlormethine),异环磷酰胺(ifosfamide),苯丁酸氮芥(chlorambucil),哌泊溴烷(pipobroman),三乙撑蜜胺(triethylenemelamine),三乙撑硫代磷酸胺(triethylenethiophosphoramine),白消安(busulfan),达卡巴嗪(dacarbazine),和替莫唑胺(temozolomide)。

[0164] 抗代谢物剂包括叶酸类似物,嘧啶类似物,嘌呤类似物,和腺苷脱氨酶抑制剂,包括但不限于阿糖胞苷(cytarabine) (CYTOSAR-U),胞嘧啶阿拉伯糖苷(cytosine arabinoside),氟尿嘧啶(flourouracil) (5-FU),氟尿苷(floxuridine) (FudR),6-硫鸟嘌呤(thioguanine),6-巯基嘌呤(mercaptapurine) (6-MP),喷司他丁(pentostatin),5-氟尿嘧啶(5-FU),甲氨蝶呤(methotrexate),10-炔丙基-5,8-二脱氮杂叶酸(PDDF,CB3717),5,8-二脱氮杂四氢叶酸(DDATHF),甲酰四氢叶酸(leucovorin),磷酸氟达拉滨(fludarabine phosphate),喷司他丁,和吉西他滨(gemcitabine)。

[0165] 合适的天然产物及其衍生物(例如长春花生物碱,抗肿瘤抗生素,酶,淋巴因子,和表鬼臼毒素(epipodophyllotoxin))包括但不限于Ara-C,帕利他赛(paclitaxel) (Taxol®),多西他赛(docetaxel) (Taxotere®),脱氧助间型霉素(deoxycoformycin),丝裂霉素(mitomycin)-C,L-天冬酰胺酶(asparaginase),硫唑嘌呤(azathioprine);布喹那

(brequinar);生物碱,例如长春新碱(vincristine),长春碱(vinblastine),长春瑞滨(vinorelbine),长春地辛(vindesine),等;鬼臼毒素(podophyllotoxin),例如依托泊苷(etoposide),替尼泊苷(teniposide),等;抗生素,例如蒽环霉素(anthracycline),盐酸柔红霉素(daunorubicin hydrochloride)(道诺霉素(daunomycin),红比霉素(rubidomycin),司比定(cerubidine)),伊达比星(idarubicin),多柔比星(doxorubicin),表柔比星(epirubicin)和吗啉代(morpholino)衍生物,等;吩噻嗪酮双环肽(phenoxizone biscyclopeptide),例如放线菌素D(dactinomycin);碱性糖肽(basic glycopeptide),例如博来霉素(bleomycin);蒽醌苷(anthraquinone glycoside),例如普卡霉素(plicamycin)(光神霉素(mithramycin));蒽二酮(anthracenedione),例如米托蒽醌(mitoxantrone);氮丙啶吡咯并吡啶二酮(azirinopyrrolo indoledione),例如丝裂霉素(mitomycin);大环免疫抑制剂,例如环孢菌素(cyclosporine),FK-506(他克莫司(tacrolimus),普乐可复(prograf)),雷帕霉素(rapamycin),等;等等。

[0166] 其它抗增殖细胞毒剂是诺维本(navelbene),CPT-11,阿那曲唑(anastrazole),来曲唑(letrozole),卡培他滨(capecitabine),雷洛昔芬(reloxafine),环磷酰胺,异环磷酰胺,和屈洛昔芬(droloxafine)。

[0167] 具有抗增殖活性的微管影响剂也适合使用,而且包括但不限于秋水仙素(allocolchicine)(NSC 406042),软海绵素(Halichondrin)B(NSC 609395),秋水仙素(colchicine)(NSC 757),秋水仙素衍生物(例如NSC 33410),多拉司他汀10(NSC 376128),美登木素(NSC 153858),根霉菌素(rhizoxin)(NSC 332598),帕利他赛(Taxol®),Taxol®衍生物,多西他赛(Taxotere®),硫代秋水仙素(thiocolchicine)(NSC 361792),三苯甲基半胱氨酸(trityl cysterin),硫酸长春碱(vinblastine sulfate),硫酸长春新碱(vincristine sulfate),天然的和合成的埃博霉素(epothilone)(包括但不限于埃博霉素A,埃博霉素B),圆皮海绵内酯(discodermolide);雌莫司汀(estramustine),诺考达唑(nocodazole),等等。

[0168] 适合使用的激素调控剂和类固醇(包括合成类似物)包括但不限于肾上腺皮质类固醇,例如强的松(prednisone),地塞米松(dexamethasone),等;雌激素和孕酮,例如己酸羟孕酮(hydroxyprogesterone caproate),醋酸甲羟孕酮(medroxyprogesterone acetate),醋酸甲地孕酮(megestrol acetate),雌二醇(estradiol),克罗米芬(clomiphene),他莫昔芬(tamoxifen),等;和肾上腺皮质抑制剂,例如氨基鲁米特(aminoglutethimide);17 α -乙炔基雌二醇(17 α -ethinylestradiol);己烯雌酚(diethylstilbestrol),睾酮(testosterone),氟甲睾酮(flouxymesterone),丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate),睾内酯(testolactone),甲泼尼龙(methylprednisolone),甲基睾酮(methyl-testosterone),泼尼龙(prednisolone),曲安西龙(triamcinolone),氯烯雌醚(chlorotrianisene),羟孕酮(hydroxyprogesterone),氨基鲁米特,雌莫司汀,醋酸甲羟孕酮,亮丙瑞林(leuprolide),氟他胺(Flutamide)(佐吉能(Drogenil)),托瑞米芬(Toremifene)(法乐通(Fareston)),和Zoladex®。雌激素刺激增殖和分化;因此,使用结合雌激素受体的化合物来阻断这种活性。

[0169] 其它合适的化疗剂包括金属复合物,例如顺铂(cis-DDP),卡铂,等;脲,例如羟基脲;和胍,例如N-甲基胍;表鬼臼毒素;拓扑异构酶抑制剂;丙卡巴胍(procarbazine);米托

葱醌;甲酰四氢叶酸;替加氟 (tegafur);等。其它感兴趣抗增殖剂包括免疫抑制剂,例如霉酚酸 (mycophenolic acid),沙利度胺 (thalidomide),脱氧精胍菌素 (desoxyspergualin),氮杂孢菌素 (azasporine),来氟米特 (leflunomide),咪唑立宾 (mizoribine),氮杂螺烷 (azaspirane) (SKF 105685); Iressa® (ZD 1839,4-(3-氯-4-氟苯基氨基)-7-甲氧基-6-(3-(4-吗啉基)丙氧基)喹唑啉);等。

[0170] 紫杉烷适合使用。“紫杉烷”包括帕利他赛 (paclitaxel),以及任何活性紫杉烷衍生物或前药。“帕利他赛”(其在本文中应理解为包括类似物,配制剂,和衍生物,诸如例如多西他赛 (docetaxel),TAXOL™,TAXOTERE™(多西他赛的一种配制剂),帕利他赛的10-脱乙酰基类似物和帕利他赛的3'-N-脱苯甲酰基-3'-N-叔丁氧羰基类似物)可以容易地利用本领域技术人员知道的技术来制备(还见W094/07882,W094/07881,W094/07880,W094/07876,W093/23555,W093/10076;美国专利No.5,294,637;5,283,253;5,279,949;5,274,137;5,202,448;5,200,534;5,229,529;和EP 590,267),或自多种商业来源获得,包括例如Sigma Chemical Co.,St.Louis,Mo.(T7402,来自短叶红豆杉 (*Taxus brevifolia*);或T-1912,来自云南红豆杉 (*Taxus yunnanensis*))。

[0171] 帕利他赛应理解为不仅指帕利他赛的常见化学可得形式,而且指类似物和衍生物(例如如上文描述的Taxotere™多西他赛)和帕利他赛缀合物(例如帕利他赛-PEG,帕利他赛-右旋糖苷,或帕利他赛-木糖)。

[0172] 术语“紫杉烷”内还包括的是多种已知的衍生物,包括亲水性衍生物和疏水性衍生物二者。紫杉烷衍生物包括但不限于国际专利申请No.W099/18113中描述的半乳糖和甘露糖衍生物;W099/14209中描述的哌嗪代 (piperazino) 和其它衍生物;W099/09021,W098/22451,和美国专利No.5,869,680中描述的紫杉烷衍生物;W098/28288中描述的6-硫代衍生物;美国专利No.5,821,263中描述的次磺酰胺 (sulfenamide) 衍生物;和美国专利No.5,415,869中描述的泰素 (taxol) 衍生物。它进一步包括帕利他赛的前药,包括但不限于W098/58927;W098/13059;和美国专利No.5,824,701中描述的那些。

生成抗体的方法

[0173] 可以通过任何已知方法来生成主题抗体,例如用于蛋白质合成的常规合成方法;重组DNA方法,等。

[0174] 在主题抗体是单链多肽的情况中,可以使用标准化学肽合成技术来合成它。在化学合成多肽的情况中,可以经液相或固相进行合成。固相多肽合成 (SPPS) 是适合于化学合成主题抗体的方法的一个例子,其中将序列的C末端氨基酸附着至不溶性支持物,继以顺序添加序列中的剩余氨基酸。各种形式的SPPS可用于合成主题抗体,诸如Fmoc和Boc。用于固相合成的技术描述于Barany and Merrifield,Solid-Phase Peptide Synthesis;pp.3-284in The Peptides:Analysis,Synthesis,Biology.Vol.2:Special Methods in Peptide Synthesis,Part A.,Merrifield,et al.J.Am.Chem.Soc.,85:2149-2156(1963); Stewart et al.,Solid Phase Peptide Synthesis,2nd ed.Pierce Chem.Co.,Rockford,Ill.(1984);Ganesan A.2006Mini Rev.Med Chem.6:3-10;和Camarero JA et al.2005Protein Pept Lett.12:723-8。简言之,用在其上建造肽链的功能性单元处理小的不溶性多孔珠。在偶联/去保护的重复循环之后,将所附着的固相的游离N末端胺偶联至一个N-保护的氨基酸单元。然后将这个单元去保护,露出新的N-末端氨基,可以对其附着又一

个氨基酸。肽仍然固定化在固相上并经历过滤过程,之后切割掉。

[0175] 可使用标准重组方法来生成主题抗体。例如,将编码任选连接至恒定区的轻和重链可变区的核酸插入表达载体。可以在相同的或不同的表达载体中克隆轻和重链。将编码免疫球蛋白链的DNA区段可操作连接至表达载体中的确保免疫球蛋白多肽表达的控制序列。表达控制序列包括但不限于启动子(例如天然相关的或异源的启动子),信号序列,增强子元件,和转录终止序列。表达控制序列可以是能够转化或转染真核宿主细胞(例如COS或CHO细胞)的载体中的真核启动子系统。一旦已经将载体掺入适宜的宿主,在适合于核苷酸序列高水平表达及抗体收集和纯化的条件下维持宿主。

[0176] 由于代码的简并性,多种核酸序列可以编码每种免疫球蛋白氨基酸序列。可以通过从头固相DNA合成或通过期望多核苷酸的早期制备变体的聚合酶链式反应(PCR)诱变来生成期望的核酸序列。寡核苷酸介导的诱变是适合于制备靶多肽DNA的替代,删除和插入变体的方法的一个例子。见Adelman et al.,DNA 2:183(1983)。简言之,如下改变靶多肽DNA,即将编码期望突变的寡核苷酸杂交至单链DNA模板。杂交后,使用DNA聚合酶来合成模板的完整第二互补链,其掺入寡核苷酸引物并编码靶多肽DNA中的选定改变。

[0177] 合适的表达载体典型地在宿主生物体中复制,或是作为附加体或是作为宿主染色体DNA的组成部分。通常,表达载体含有选择标志物(例如氨苄青霉素抗性,潮霉素抗性,四环素抗性,卡那霉素抗性,或新霉素抗性)以允许检测那些经期望DNA序列转化的细胞。

[0178] 大肠杆菌(*Escherichia coli*)是可用于克隆编码主题抗体的多核苷酸的原核宿主细胞的一个例子。适合于使用的其它微生物宿主包括芽孢杆菌,诸如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),和其它肠杆菌科,诸如沙门氏菌属(*Salmonella*),沙雷氏菌属(*Serratia*),和各种假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种。在这些原核宿主中,也能生成表达载体,其典型地会含有与宿主细胞相容的表达控制序列(例如复制起点)。另外,会存在任何数目的多种公知启动子,诸如乳糖启动子系统,色氨酸(*trp*)启动子系统, β -内酰胺酶启动子系统,或来自噬菌体 λ 的启动子系统。启动子典型地会控制表达,任选地用操纵基因序列,而且具有核糖体结合位点序列等等,用于启动和完成转录和翻译。

[0179] 其它微生物,诸如酵母,对于表达也是有用的。糖酵母(*Saccharomyces*) (例如酿酒酵母(*S.cerevisiae*))和毕赤酵母(*Pichia*)是合适的酵母宿主细胞的例子,其中合适的载体根据需要具有表达控制序列(例如启动子),复制起点,终止序列等等。典型的启动子包括3-磷酸甘油酸激酶和其它糖酵解酶。可诱导酵母启动子格外包括来自醇脱氢酶,异细胞色素C,和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子。

[0180] 在微生物以外,还可以使用哺乳动物细胞(例如在体外细胞培养中生长的哺乳动物细胞)来表达和生成本发明的多肽(例如编码免疫球蛋白或其片段的多核苷酸)。见Winnacker,From Genes to Clones,VCH Publishers,N.Y.,N.Y.(1987)。合适的哺乳动物宿主细胞包括CHO细胞系,各种Cos细胞系,HeLa细胞,骨髓瘤细胞系,和经转化的B细胞或杂交瘤。用于这些细胞的表达载体可包括表达控制序列,诸如复制起点,启动子,和增强子(Queen et al.,Immunol.Rev.89:49(1986)),和必要的加工信息位点,诸如核糖体结合位点,RNA剪接位点,聚腺苷酸化位点,和转录终止子序列。合适的表达控制序列的例子是自免疫球蛋白基因,SV40,腺病毒,牛乳头瘤病毒,巨细胞病毒等等衍生的启动子。见Co et al.,J.Immunol.148:1149(1992)。

[0181] 一旦合成(或是化学的或是重组的),可以依照本领域标准规程纯化完整抗体,它们的二聚体,单独的轻和重链,或其它形式的主题抗体(例如scFv,等),包括硫酸铵沉淀,亲和柱,柱层析,高效液体层析(HPLC)纯化,凝胶电泳,等等(一般见Scopes, Protein Purification(Springer-Verlag,N.Y.,(1982))。主题抗体可以是基本上纯的,例如至少约80%至85%纯,至少约85%至90%纯,至少约90%至95%纯,或98%至99%,或更加纯,例如不含污染物,诸如细胞碎片,除了主题抗体以外的大分子,等。

组合物

[0182] 本公开提供包含主题抗体的组合物。在主题抗体以外,主题抗体组合物可包含下述中一种或多种:盐,例如NaCl,MgCl₂,KCl,MgSO₄,等;缓冲剂,例如Tris缓冲剂,N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES),2-(N-吗啉基)乙磺酸(MES),2-(N-吗啉基)乙磺酸钠盐(MES),3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS),N-三[羟甲基]甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS),等;增溶剂;洗涤剂,例如非离子型洗涤剂,诸如Tween-20,等;蛋白酶抑制剂;甘油;等等。

核酸

[0183] 本公开提供包含编码主题抗体的核苷酸序列的核酸。编码主题抗体的核苷酸序列可以可操作连接容许核苷酸序列在预期靶细胞(例如经遗传修饰而合成所编码的抗体的细胞)中表达的一个或多个调节元件,诸如启动子和增强子。

[0184] 合适的启动子和增强子元件是本领域已知的。对于细菌细胞中的表达,合适的启动子包括但不限于lacI,lacZ,T3,T7,gpt, λ P和trc。对于真核细胞中的表达,合适的启动子包括但不限于轻和/或重链免疫球蛋白基因启动子和增强子元件;巨细胞病毒立即早期启动子;单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子;早期和晚期SV40启动子;来自逆转录病毒的长末端重复中存在的启动子;小鼠金属硫蛋白-I启动子;和各种本领域已知组织特异性启动子。

[0185] 在一些实施方案中,例如对于酵母细胞中的表达,合适的启动子是组成性启动子,诸如ADH1启动子,PGK1启动子,ENO启动子,PYK1启动子等等;或可调节启动子,诸如GAL1启动子,GAL10启动子,ADH2启动子,PHO5启动子,CUP1启动子,GAL7启动子,MET25启动子,MET3启动子,CYC1启动子,HIS3启动子,ADH1启动子,PGK启动子,GAPDH启动子,ADC1启动子,TRP1启动子,URA3启动子,LEU2启动子,ENO启动子,TP1启动子,和AOX1(例如供毕赤酵母中使用)。适宜载体和启动子的选择完全在本领域普通技术水平之内。

[0186] 适合于在原核宿主细胞中使用的启动子包括但不限于噬菌体T7 RNA聚合酶启动子;trp启动子;lac操纵子启动子;杂合启动子,例如lac/tac杂合启动子,tac/trc杂合启动子,trp/lac启动子,T7/lac启动子;trc启动子;tac启动子,等等;araBAD启动子;体内调节的启动子,诸如ssaG启动子或相关启动子(见例如美国专利公开文本No.20040131637),pagC启动子(Pulkkinen and Miller,J.Bacteriol.,1991,173(1):86-93;Alpuche-Aranda et al.,PNAS,1992,89(21):10079-83),nirB启动子(Harborne et al.(1992) Mol.Micro.6:2805-2813),等等(见例如Dunstan et al.(1999) Infect.Immun.67:5133-5141;McKelvie et al.(2004) Vaccine 22:3243-3255;和Chatfield et al.(1992) Biotechnol.10:888-892);sigma70启动子,例如共有sigma70启动子(见例如GenBank登录号AX798980,AX798961,和AX798183);静止期启动子,例如dps启动子,spv启动子,等等;自致病岛SPI-2衍生的启动子(见例如W096/17951);actA启动子(见例如Shetron-Rama et al.(2002) Infect.Immun.70:1087-1096);rpsM启动子(见例如Valdivia and Falkow

(1996) *Mol. Microbiol.* 22:367); tet 启动子 (见例如 Hillen, W. and Wissmann, A. (1989) In Saenger, W. and Heinemann, U. (eds), *Topics in Molecular and Structural Biology, Protein-Nucleic Acid Interaction*. Macmillan, London, UK, Vol. 10, pp. 143-162); SP6 启动子 (见例如 Melton et al. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12:7035); 等等。适合于在原核生物, 诸如大肠杆菌中使用的强启动子包括但不限于 Trc, Tac, T5, T7, 和 P_{λ} 。供细菌宿主细胞中使用的操纵基因的非限制性例子包括乳糖启动子操纵基因 (LacI 阻遏蛋白在与乳糖接触时改变构象, 由此阻止 LacI 阻遏蛋白结合操纵基因), 色氨酸启动子操纵基因 (在与色氨酸复合时, TrpR 阻遏蛋白具有结合操纵基因的构象; 在色氨酸缺失时, TrpR 阻遏蛋白具有不结合操纵基因的构象), 和 tac 启动子操纵基因 (见例如 de Boer et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25)。

[0187] 编码主题抗体的核苷酸序列可以存在于表达载体和/或克隆载体中。在主题抗体包含两条分开多肽的情况下, 编码两条多肽的核苷酸序列可以克隆在相同或分开的载体中。表达载体可包括可选择标志物, 复制起点, 和提供载体的复制和/或维持的其它特征。

[0188] 本领域技术人员知道大量的合适的载体和启动子; 许多是可商购的, 用于生成主题重组构建物。作为例子提供下面的载体。细菌: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, 和 pRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)。真核: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG 和 pSVL (Pharmacia)。

[0189] 表达载体一般具有方便的限制性位点, 位于启动子序列附近, 提供编码异源蛋白的核酸序列的插入。可存在在表达宿主中可运转的可选择标志物。合适的表达载体包括但不限于病毒载体 (例如基于下述病毒的病毒载体: 痘苗病毒; 脊髓灰质炎病毒; 腺病毒 (见例如 Li et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:2543-2549, 1994; Borrás et al., *Gene Ther* 6:515-524, 1999; Li and Davidson, *PNAS* 92:7700-7704, 1995; Sakamoto et al., *H Gene Ther* 5:1088-1097, 1999; W094/12649, W093/03769; W093/19191; W094/28938; W095/11984 和 W095/00655); 腺伴随病毒 (见例如 Ali et al., *Hum Gene Ther* 9:81-86, 1998; Flannery et al., *PNAS* 94:6916-6921, 1997; Bennett et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:2857-2863, 1997; Jomary et al., *Gene Ther* 4:683-690, 1997; Rolling et al., *Hum Gene Ther* 10:641-648, 1999; Ali et al., *Hum Mol Genet* 5:591-594, 1996; Srivastava in W093/09239, Samulski et al., *J. Vir.* (1989) 63:3822-3828; Mendelson et al., *Virol.* (1988) 166:154-165; 和 Flotte et al., *PNAS* (1993) 90:10613-10617); SV40; 单纯疱疹病毒; 人免疫缺陷病毒 (见例如 Miyoshi et al., *PNAS* 94:10319-23, 1997; Takahashi et al., *J Virol* 73:7812-7816, 1999); 逆转录病毒载体 (例如鼠白血病病毒, 脾坏死病毒, 和自逆转录病毒, 诸如劳斯肉瘤病毒, 哈维肉瘤病毒, 禽白血病病毒, 人免疫缺陷病毒, 骨髓增殖性肉瘤病毒, 和乳腺肿瘤病毒衍生的载体); 等等。

[0190] 如上所述, 主题核酸包含编码主题抗体的核苷酸序列。主题核酸可包含编码抗 GPC3 重和轻链的核苷酸序列, 如上文描述的。

[0191] 在某些方面, 编码抗 GPC3 重链的核苷酸序列可包含与 SEQ ID NO:11 或 14 具有至少 50% 同一性 (例如至少 60%, 至少 70%, 至少 80%, 至少 90%, 至少 95%, 至少 96%, 至少 97%, 至少 98%, 至少 99%, 或 100% 同一性) 的核苷酸序列。

[0192] 在某些方面,编码抗GPC3轻链的核苷酸序列可包含与SEQ ID NO:12具有至少50%同一性(例如至少60%,至少70%,至少80%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%,或100%同一性)的核苷酸序列。

细胞

[0193] 本公开提供分离的遗传修饰的宿主细胞(例如体外细胞),是经主题核酸遗传修饰的。在一些实施方案中,分离的遗传修饰的主题宿主细胞能生成主题抗体。

合适的宿主细胞包括真核宿主细胞,诸如哺乳动物细胞,昆虫细胞,酵母细胞;和原核细胞,诸如细菌细胞。将主题核酸引入宿主细胞可以例如通过磷酸钙沉淀,DEAE右旋糖酐介导的转染,脂质体介导的转染,电穿孔,或其它已知方法来实现。

[0194] 合适的哺乳动物细胞包括原代细胞和永生化细胞系。合适的哺乳动物细胞系包括人细胞系,非人灵长类动物细胞系,啮齿类动物(例如小鼠,大鼠)细胞系,等等。合适的哺乳动物细胞系包括但不限于HeLa细胞(例如美国典型培养物保藏中心(ATCC)No.CCL-2),CHO细胞(例如ATCC No.CRL9618,CCL61,CRL9096),Vero细胞,NIH 3T3细胞(例如ATCC No.CRL-1658),Huh-7细胞,BHK细胞(例如ATCC No.CCL10),PC12细胞(ATCC No.CRL1721),COS细胞,COS-7细胞(ATCC No.CRL1651),RAT1细胞,小鼠L细胞(ATCC No.CCLI.3),人胚肾(HEK)293细胞(ATCC No.CRL1573),HLHepG2细胞,等等。

[0195] 合适的酵母细胞包括但不限于巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*),芬兰毕赤酵母(*Pichia finlandica*),喜海藻糖毕赤酵母(*Pichia trehalophila*),*Pichia koclamae*,膜醭毕赤酵母(*Pichia membranaefaciens*),*Pichia opuntiae*,耐热毕赤酵母(*Pichia thermotolerans*),柳毕赤酵母(*Pichia salictaria*),*Pichia guercuum*,皮杰普氏毕赤酵母(*Pichia pijperi*),具柄毕赤酵母(*Pichia stiptis*),甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*),毕赤酵母属物种(*Pichia sp.*),酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),糖酵母属物种(*Saccharomyces sp.*),多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*),克鲁维酵母属物种(*Kluyveromyces sp.*),乳克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*),白色假丝酵母(*Candida albicans*),构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*),黑色曲霉(*Aspergillus niger*),米曲霉(*Aspergillus oryzae*),里氏木霉(*Trichoderma reesei*),*Chrysosporium lucknowense*,镰孢属物种(*Fusarium sp.*),禾赤镰孢(*Fusarium gramineum*),*Fusarium venenatum*,粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*),莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*),等等。

[0196] 合适的原核细胞包括但不限于大肠杆菌(*Escherichia coli*),乳酸杆菌属物种(*Lactobacillus sp.*),沙门氏菌属物种(*Salmonella sp.*),志贺氏菌属物种(*Shigella sp.*),等等的多种实验室菌株中任一。见例如Carrier et al. (1992) *J. Immunol.* 148:1176-1181;美国专利No.6,447,784;和Sizemore et al. (1995) *Science* 270:299-302。本发明中可采用的沙门氏菌菌株的例子包括但不限于伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)和鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)。合适的志贺氏菌菌株包括但不限于弗氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*),索氏志贺氏菌(*Shigella sonnei*),和痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)。典型地,实验室菌株是非致病性的。其它合适细菌的非限制性例子包括但不限于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),*Pseudomonas mevalonii*,类球红细菌(*Rhodobacter*

sphaeroides), 荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*), 深红红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*), 红球菌属物种 (*Rhodococcus* sp.), 等等。在一些实施方案中, 宿主细胞是大肠杆菌。

药学组合物

[0197] 本公开提供包含主题抗体的组合物, 包括药学组合物。一般而言, 配制剂包含有效量的主题抗体。“有效量”表示足以产生期望结果, 例如癌性细胞的数目减少的剂量。在一些情况中, 期望的结果至少是与对照相比, 恶性的症状的减轻。

配制剂

[0198] 在主题方法中, 可以使用能够导致期望的治疗效果或诊断效果的任何方便手段将主题抗体施用于宿主。如此, 可以将药剂掺入多种配制剂用于治疗性施用。更加特别地, 主题抗体可以通过与适宜的药学可接受载剂或稀释剂组合而配制入药学组合物, 而且可以配制入固体, 半固体, 液体或气体形式的制剂, 诸如片剂, 胶囊剂, 粉剂, 颗粒剂, 软膏剂, 溶液, 栓剂, 注射液, 吸入剂和气雾剂。

[0199] 在药学剂量形式中, 可以以它们的药学可接受盐的形式施用主题抗体, 或者它们还可以单独或与其它药学活性化合物适当联合以及组合使用。下面的方法和赋形剂仅仅是例示性的且绝非限制性的。

[0200] 对于口服制剂, 主题抗体可以单独或与适宜添加剂组合使用, 以生成片剂, 粉剂, 颗粒剂或胶囊剂, 例如与方便的添加剂一起, 诸如乳糖, 甘露醇, 玉米淀粉或马铃薯淀粉; 与粘合剂一起, 诸如结晶纤维素, 纤维素衍生物, 阿拉伯胶, 玉米淀粉或明胶; 与崩解剂一起, 诸如玉米淀粉, 马铃薯淀粉或羧甲基纤维素钠; 与润滑剂一起, 诸如滑石或硬脂酸镁; 和在期望的情况中, 与稀释剂, 缓冲剂, 湿润剂, 防腐剂 and 调味剂一起。

[0201] 主题抗体可以配制成用于注射的制剂, 这通过在水性或非水性溶剂, 诸如植物油或其它类似油, 合成脂肪酸甘油酯, 高级脂肪酸的酯或丙二醇中; 而且如果需要的话, 与常规添加剂, 诸如增溶剂, 等渗剂, 悬浮剂, 乳化剂, 稳定剂和防腐剂一起溶解, 悬浮或乳化它们。

[0202] 通过混合具有期望纯度的抗体与任选的生理学可接受载剂, 赋形剂, 稳定剂, 表面活性剂, 缓冲剂和/或张力剂来制备包含主题抗体的药学组合物。可接受载剂, 赋形剂和/或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的, 而且包括缓冲剂, 诸如磷酸盐, 柠檬酸盐, 和其它有机酸; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸, 谷胱甘肽, 半胱氨酸, 甲硫氨酸和柠檬酸; 防腐剂 (诸如乙醇, 苄醇, 酚, 间甲酚, 对-氯-间-甲酚, 对羟基苯甲酸甲酯或丙酯, 苯扎氯铵, 或其组合); 氨基酸, 诸如精氨酸, 甘氨酸, 鸟氨酸, 赖氨酸, 组氨酸, 谷氨酸, 天冬氨酸, 异亮氨酸, 亮氨酸, 丙氨酸, 苯丙氨酸, 酪氨酸, 色氨酸, 甲硫氨酸, 丝氨酸, 脯氨酸及其组合; 单糖, 二糖和其它碳水化合物; 低分子量 (少于约10个残基) 多肽; 蛋白, 诸如明胶或血清清蛋白; 螯合剂, 诸如EDTA; 糖, 诸如海藻糖, 蔗糖, 乳糖, 葡萄糖, 甘露糖, 麦芽糖, 半乳糖, 果糖, 山梨糖, 棉子糖, 葡萄糖胺, N-甲基葡萄糖胺, 半乳糖胺, 和神经氨酸; 和/或非离子型表面活性剂, 诸如Tween, Brij, Pluronic, Triton-X, 或聚乙二醇 (PEG)。

[0203] 药学组合物可以是液体形式, 冻干形式或自冻干形式重建的液体形式, 其中冻干制剂要在施用前用无菌溶液重建。用于重建冻干组合物的标准规程是加回一定体积的纯水 (典型地等同于冻干期间去除的体积); 然而, 包含抗菌剂的溶液可用于生成用于胃肠外

施用的药学组合物;还见Chen(1992) Drug Dev Ind Pharm 18,1311-54。

[0204] 主题药学组合物中的例示性抗体浓度的范围可以是约1mg/mL至约200mg/mL,或约50mg/mL至约200mg/mL,或约150mg/mL至约200mg/mL。

[0205] 可以在pH缓冲溶液中制备抗体的水性配制剂,例如处于范围为约4.0至约7.0,或约5.0至约6.0,或约5.5的pH。适合于此范围内的pH的缓冲剂的例子包括磷酸盐,组氨酸,柠檬酸盐,琥珀酸盐,乙酸盐缓冲剂和其它有机酸缓冲剂。缓冲剂浓度可以是约1mM至约100mM,或约5mM至约50mM,取决于例如缓冲剂和配制剂的期望张力。

[0206] 张力剂可以包括在抗体配制剂中以调控配制剂的张力。例示性张力剂包括氯化钠,氯化钾,甘油和来自氨基酸,糖及其组合的组的任何成分。在一些实施方案中,水性配制剂是等渗的,尽管高渗或低渗溶液可能是合适的。术语“等渗”表示溶液具有与同之比较的一些其它溶液,诸如生理盐水或血清相同的张力。可以以约5mM至约350mM的量,例如以100mM至350mM的量使用张力剂。

[0207] 表面活性剂也可以添加至抗体配制剂以降低配制的抗体的聚集和/或最小化配制剂中颗粒的形成和/或降低吸附。例示性表面活性剂包括聚氧乙烯山梨聚糖脂肪酸酯(Tween),聚氧乙烯烷基醚(Brij),烷基苯基聚氧乙烯醚(Triton-X),聚氧乙烯-聚丙烯共聚物(Poloxamer,Pluronic),和十二烷基硫酸钠(SDS)。合适的聚氧乙烯山梨聚糖脂肪酸酯的例子是聚山梨酯20(以商标Tween 20TM销售)和聚山梨酯80(以商标Tween 80TM销售)。合适的聚氧乙烯-聚丙烯共聚物的例子是以名称Pluronic®F68或Poloxamer 188TM销售的那些。合适的聚氧乙烯烷基醚的例子是以商标BrijTM销售的那些。表面活性剂的例示性浓度的范围可以是约0.001%至约1%w/v。

[0208] 也可以添加冻干保护剂以在冻干过程期间针对失稳条件保护不稳定的活性组分(例如蛋白质)。例如,已知的冻干保护剂包括糖(包括葡萄糖和蔗糖);多元醇(包括甘露醇,山梨醇和甘油);和氨基酸(包括丙氨酸,甘氨酸和谷氨酸)。可以以约10mM至500mM的量包括冻干保护剂。

[0209] 在一些实施方案中,主题配制剂包括主题抗体和上文鉴定的药剂(例如表面活性剂,缓冲剂,稳定剂,张力剂)中一种或多种且本质上不含一种或多种防腐剂,诸如乙醇,苯醇,酚,间甲酚,对-氯-间-甲酚,对羟基苯甲酸甲酯或丙酯,苯扎氯铵,及其组合。在其它实施方案中,配制剂中包括防腐剂,例如处于范围为约0.001至约2%(w/v)的浓度。

[0210] 例如,主题配制剂可以是适合于胃肠外施用的液体或冻干配制剂,而且可包含:约1mg/mL至约200mg/mL主题抗体;约0.001%至约1%至少一种表面活性剂;约1mM至约100mM缓冲剂;任选地,约10mM至约500mM稳定剂;和约5mM至约305mM张力剂;且具有约4.0至约7.0的pH。

[0211] 作为另一个例子,主题胃肠外配制剂是液体或冻干配制剂,其包含:约1mg/mL至约200mg/mL主题抗体;0.04%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;且具有5.5的pH。

[0212] 作为另一个例子,主题胃肠外配制剂包含冻干配制剂,其包含:1) 15mg/mL主题抗体;0.04%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;且具有5.5的pH;或2) 75mg/mL主题抗体;0.04%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;且具有5.5的pH;或3) 75mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;且具有5.5的pH;或4) 75mg/mL主题抗体;0.04%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;且具有5.5的pH;或6)

75mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;且具有5.5的pH。

[0213] 作为另一个例子,主题胃肠外配制剂是液体配制剂,其包含:1) 7.5mg/mL主题抗体;0.022%Tween 20w/v;120mM L-组氨酸;和250 125mM蔗糖;且具有5.5的pH;或2) 37.5mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;10mM L-组氨酸;和125mM蔗糖;且具有5.5的pH;或3) 37.5mg/mL主题抗体;0.01%Tween 20w/v;10mM L-组氨酸;和125mM蔗糖;且具有5.5的pH;或4) 37.5mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;10mM L-组氨酸;125mM海藻糖;且具有5.5的pH;或5) 37.5mg/mL主题抗体;0.01%Tween 20w/v;10mM L-组氨酸;和125mM海藻糖;且具有5.5的pH;或6) 5mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;且具有5.5的pH;或7) 75mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM甘露醇;且具有5.5的pH;或8) 75mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和140mM氯化钠;且具有5.5的pH;或9) 150mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;且具有5.5的pH;或10) 150mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM甘露醇;且具有5.5的pH;或11) 150mg/mL主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和140mM氯化钠;且具有5.5的pH;或12) 10mg/mL主题抗体;0.01% Tween20w/v;20mM L-组氨酸;和40mM氯化钠;且具有5.5的pH。

[0214] 可以以要经吸入来施用的气雾剂配制剂利用主题抗体。主题抗体可以配制入加压的可接受推进剂,诸如二氯二氟甲烷,丙烷,氮气等等。

[0215] 而且,主题抗体可以通过与多种基材,诸如乳化基材或水溶性基材混合而制成栓剂。主题抗体可以经栓剂而直肠施用。栓剂可包括媒介,诸如可可脂,碳蜡和聚乙二醇,它们在体温融化,在室温仍然固化。

[0216] 可以提供用于口或直肠施用的单位剂量形式,诸如糖浆剂,酏剂,和悬浮剂,其中每个剂量单位(例如茶匙,汤匙,片剂或栓剂)含有预定量的含有一种或多种抑制剂的组合物。类似地,用于注射或静脉内施用的单位剂量形式可包含作为无菌水,生理盐水或另一种药学可接受载剂中的溶液的组合物中的主题抗体。

[0217] 如本文中使用的,术语“单位剂量形式”指作为用于人和动物受试者的单一剂量合适的物理离散单元,每个单位含有与药学可接受稀释剂,载剂或媒介联合的以足以产生期望效果的量计算的预定数量的本发明的化合物。主题抗体的规格可取决于采用的特定抗体和要实现的效果,和宿主中与每种抗体有关的药效学。

[0218] 其它施用模式也可用于本发明。例如,可以在栓剂和一些情况中的气雾剂和鼻内组合物中配制主题抗体。对于栓剂,媒介组合物会包括传统的粘合剂和载剂,诸如聚烷基二醇,或甘油三酯。可以自含有约0.5%至约10% (w/w),例如约1%至约2%的范围中的活性组分的混合物形成此类栓剂。

[0219] 鼻内配制剂通常会包括既不引起对鼻粘膜的刺激又不显著扰乱纤毛功能的媒介。本发明可以采用稀释剂,诸如水,盐水或其它已知物质。鼻配制剂还可以含有防腐剂,诸如但不限于氯丁醇和苯扎氯铵。可以存在表面活性剂以增强鼻粘膜对主题蛋白的吸收。

[0220] 可以作为可注射配制剂施用主题抗体。典型地,可注射组合物制备成液体溶液或悬浮液;还可以制备适合于临注射前在液体媒介中溶解或悬浮的固体形式。还可以在脂质体媒介中乳化制剂或封装抗体。

[0221] 合适的赋形剂媒介是例如水,盐水,右旋糖,甘油,乙醇,等等,及其组合。另外,如

果需要的话,媒介可以含有微小量的辅助物质,诸如湿润或乳化剂或pH缓冲剂。制备此类剂量形式的实际方法是本领域技术人员已知的,或是显然的。见例如Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 17th edition, 1985。要施用的组合物或配制剂在任何情况下会含有数量足够在所治疗的受试者中实现期望状态的主题抗体。

[0222] 药学可接受赋形剂,诸如媒介,佐剂,载剂或稀释剂是公众容易可获得的。此外,药学可接受辅助物质,诸如pH调节和缓冲剂,张力调节剂,稳定剂,湿润剂等等是公众容易可获得的。

[0223] 在一些实施方案中,在受控释放配制剂中配制主题抗体。可以使用本领域公知的方法制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,其中基质是定型产品的形式,例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯,L-谷氨酸和L-谷氨酸乙酯的共聚物,不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯,水凝胶,聚乳酸,可降解的乳酸-乙醇酸共聚物和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。通过使用适宜的添加剂,通过控制水分含量和通过开发特定聚合物基质组合物,可以防止持续释放制剂中包含的抗体的生物学活性的可能丧失和免疫原性的可能变化。

[0224] 本发明的范围内的受控释放可以用来表示多种延长释放剂量形式中任一种。为了本发明的目的,可以认为下面的术语与受控释放实质性等同:连续释放,受控释放,延迟释放,储库,逐渐释放,长期释放,编程释放,延长释放,比例释放,拖延释放,贮库,迟滞,减缓释放,间隔释放,持续释放,时间包衣,定时释放,延迟作用,延伸作用,分层时间作用,长期作用,延长作用,重复作用,减缓作用,持续作用,持续作用药疗,和延伸释放。这些术语的进一步讨论可见于Lesczek Krowczynski, Extended-Release Dosage Forms, 1987 (CRC Press, Inc.)。

[0225] 各种受控释放技术涵盖非常广谱的药物剂量形式。受控释放技术包括但不限于物理系统和化学系统。

[0226] 物理系统包括但不限于具有速率控制膜的贮库系统,诸如微封装,宏封装,和膜系统;没有速率控制膜的贮库系统,诸如中空纤维,超微孔三乙酸纤维素,和多孔聚合物基质和泡沫;单一系统,包括在非多孔,聚合,或弹性体基质(例如不可腐蚀的,可腐蚀的,环境因素侵入,和可降解的)中物理溶解的那些系统,和在非多孔,聚合,或弹性体基质(例如不可腐蚀的,可腐蚀的,环境因素侵入,和可降解的)中物理分散的材料;层状结构,包括与外部控制层在化学上相似或不相似的贮库层;和其它物理方法,诸如渗透泵,或吸附到离子交换树脂上。

[0227] 化学系统包括但不限于聚合物基质的化学腐蚀(例如异质或同质腐蚀),或聚合物基质的生物学腐蚀(例如异质的或同质的)。用于受控释放的系统的范畴的另外的讨论可见于Agis F. Kydonieus, Controlled Release Technologies: Methods, Theory and Applications, 1980 (CRC Press, Inc.)。

[0228] 有多种受控释放药物配制剂,开发用于口服施用。这些包括但不限于渗透压受控胃肠投递系统;流体动力压受控胃肠投递系统;膜渗透受控胃肠投递系统,其包括微孔膜渗透受控胃肠投递装置;胃液抗性肠靶向性受控释放胃肠投递装置;凝胶扩散受控胃肠投递系统;和离子交换受控胃肠投递系统,其包括阳离子和阴离子药物。关于受控释放药物投递

系统的另外的信息可见于Yie W.Chien, Novel Drug Delivery Systems, 1992 (Marcel Dekker, Inc.)。

剂量

[0229] 可以由主治医师或其他合格医务人员基于各种临床因素确定合适的剂量。正如医学领域公知的,用于任一患者的剂量取决于许多因素,包括患者的体型,体表面积,年龄,要施用的特定化合物,患者的性别,时间,和施用路径,总体健康,和并行施用的其它药物。可以以1ng/kg体重和20mg/kg体重每剂之间,例如0.1mg/kg体重至10mg/kg体重之间,例如0.5mg/kg体重至5mg/kg体重之间的量施用主题抗体;然而,涵盖低于或高于这个例示性范围的剂量,尤其是考虑上述因素。如果摄生法是连续输注的话,它还可以在1 μ g至10mg每千克体重每分钟的范围中。

技术人员会容易地领会剂量水平可以随具体抗体的功能,症状的严重性和受试者对副作用的易感性而变化。给定化合物的优选剂量是本领域技术人员通过多种手段可容易确定的。

施用路径

[0230] 使用适合于药物投递的任何可得方法和路径将主题抗体施用于个体,包括体内和离体方法,以及全身和局部施用路径。

[0231] 常规的且药学可接受的施用路径包括鼻内,肌肉内,气管内,皮下,皮内,表面应用,静脉内,动脉内,直肠,鼻,口,和其它肠和肠胃外施用路径。可以根据需要组合施用路径,或根据抗体和/或期望的效果调整施用路径。可以以单剂或以多剂施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,口服施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,经吸入路径施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,鼻内施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,局部施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,颅内施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,静脉内施用主题抗体组合物。

[0232] 可以使用适合于投递常规药物的任何可得的常规方法和路径将药剂施用于宿主,包括全身或局部路径。一般而言,本发明涵盖的施用路径包括但并不必然限于肠,胃肠外,或吸入路径。

[0233] 除了吸入施用以外的胃肠外施用路径包括但并不必然限于表面,经皮,皮下,肌肉内,眶内,囊内,脊柱内,胸骨内,肝内,和静脉内路径,即除了经由消化道以外的任何施用路径。可以进行胃肠外施用以实现主题抗体的全身或局部投递。在想要全身投递的情况中,施用典型地牵涉药制剂的侵入性或全身性吸收的表面或粘膜施用。

[0234] 还可以通过肠施用将主题抗体投递至受试者。肠施用路径包括但并不必然限于口和直肠(例如使用栓剂)投递。

[0235] 治疗至少表示与折磨宿主的病理学状况有关的症状的改善,其中改善以广义使用,至少指与所治疗的病理学状况(诸如B细胞恶性或B细胞介导的自身免疫病症)有关的参数(例如症状)的幅度的降低。因此,治疗还包括如下情况,其中病理学状况或至少与其相关的症状受到完全抑制,例如防止发生,或停止,例如终止,使得宿主不再受苦于病理学状况或至少表征病理学状况的症状。

在一些实施方案中,通过注射来施用主题抗体,例如用于系统投递(例如静脉内输注)或局部部位。

[0236] 多种宿主(其中术语“宿主”在本文中与术语“受试者”,“个体”,和“患者”可互换使用)是依照主题方法可治疗的。此类宿主一般是“哺乳类动物”或“哺乳动物”,其中这些术语以广义使用,描述哺乳动物纲内的生物体,包括食肉目(例如犬和猫),啮齿目(例如小鼠,豚鼠,和大鼠),和灵长目(例如人,黑猩猩,和猴)。在一些实施方案中,宿主会是人。

[0237] 提供了具有单位剂量(例如口服或可注射剂)的主题抗体的试剂盒。在此类试剂盒中,在装有单位剂量的容器以外,会有描述抗体治疗感兴趣病理学状况的用途和附带益处的信息性包装插页。优选的化合物和单位剂量是本文中上文描述的那些。

治疗方法

[0238] 本公开提供治疗与GPC3阳性细胞(例如癌性GPC3阳性细胞;自身反应性GPC3阳性细胞)相关或由其引起的疾病或病症的方法。

治疗恶性

[0239] 本公开提供治疗恶性的方法,包括实体瘤或血液学恶性,该方法一般牵涉对有需要的个体(例如具有恶性的个体)施用有效量的主题抗体,单独(例如在单药疗法中)或与一种或多种另外的治疗剂组合(例如在组合疗法中)。

恶性包括例如HCC,非霍奇金(Hodgkin)氏淋巴瘤,伯基特(Burkitt)氏淋巴瘤,多发性骨髓瘤,慢性淋巴细胞性白血病,毛细胞白血病,前淋巴细胞性白血病,肛门癌、阑尾癌、胆管癌,膀胱癌,脑瘤,乳腺癌,宫颈癌,结肠癌,原发性不明癌(CUP),食管癌,眼癌,输卵管癌,胃肠道癌,肾癌,肝癌,肺癌,髓母细胞瘤,黑色素瘤,口腔癌,卵巢癌,胰腺癌,甲状旁腺疾病,阴茎癌,垂体瘤,前列腺癌,直肠癌,皮肤癌,胃癌,睾丸癌,喉癌,甲状腺癌,子宫癌,阴道癌,外阴癌,等等。

[0240] 在一些实施方案中,主题抗体的有效量是如下的量,即以一剂或多剂,单独(例如在单药疗法中)或与一种或多种另外的治疗剂组合(例如在组合疗法中)施用时将个体中的癌性细胞的数目与在抗体治疗缺失下个体中癌性细胞的数目相比有效减少至少约5%,至少约10%,至少约15%,至少约20%,至少约25%,至少约30%,至少约40%,至少约50%,至少约60%,至少约70%,至少约80%,至少约90%,或更多。

组合疗法

[0241] 在一些实施方案中,治疗恶性的主题方法牵涉施用主题抗体和一种或多种另外的治疗剂。合适的另外的治疗剂包括但不限于癌症化疗剂(如上文描述的)。

适合于治疗的受试者

[0242] 多种受试者适合于用主题方法治疗。合适的受试者包括具有恶性;已经诊断有恶性;已经具有恶性且处于恶性复发的风险;已经用除了主题抗GPC3抗体以外的药剂治疗恶性(例如已经用癌症化疗剂治疗)且不响应该药剂;或已经用除了主题抗GPC3抗体以外的药剂治疗恶性(例如已经用癌症化疗剂治疗)且最初响应该药剂但随后停止响应(例如复发)的任何个体,例如人。

检测方法

[0243] 本公开提供牵涉使用主题抗体的各种检测方法。检测方法包括诊断方法,预后方法,和监测方法。主题检测方法一般牵涉检测GPC3阳性细胞,例如癌性细胞。

[0244] 在一些实施方案中,主题方法是诊断方法,例如测定个体是否具有恶性。

[0245] 在一些实施方案中,主题方法是监测方法,例如对已经诊断为具有恶性且正在治

疗该病症的个体监测对治疗的响应和/或该病症的进展/消退。

[0246] 在一些情况中,主题检测方法牵涉对个体施用可检测标记的本公开的抗GPC3抗体;并检测该抗体对该个体中的组织的结合。检测可以例如通过磁共振成像或其它合适的成像技术来实现。

[0247] 在其它情况中,主题检测方法牵涉使可检测标记的本公开的抗GPC3抗体与自个体获得的生物学样品接触;并检测该抗体对该生物学样品中的分子的结合。

[0248] 抗GPC3抗体可以是直接或间接标记的。间接标记物包括包含可检测标记物的二抗,其中该二抗结合主题抗GPC3抗体。其它间接标记物包括生物素,其中可使用包含可检测标记物的亲合素或链霉亲合素检测生物素化的抗GPC3抗体。

[0249] 合适的可检测标记物包括通过光谱学,光化学,生物化学,免疫化学,电学,光学或化学手段可检测的任何组合物。合适的标记物包括但不限于磁珠(例如DynaBeads™),荧光染料(例如异硫氰酸荧光素,德克萨斯红,罗丹明,绿色荧光蛋白,红色荧光蛋白,黄色荧光蛋白,等等),放射性标记物(例如³H,¹²⁵I,³⁵S,¹⁴C,或³²P),酶(例如辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶,萤光素酶,和其它在酶联免疫吸附测定法(ELISA)中常用的),和比色标记物,诸如胶体金或有色玻璃或塑料(例如聚苯乙烯,聚丙烯,乳胶,等)珠。

[0250] 在一些实施方案中,主题抗体包含造影剂或放射性同位素,其中造影剂或放射性同位素是适合于用于成像,例如对人进行的成像规程的。标记物的非限制性例子包括放射性同位素,诸如¹²³¹I(碘),¹⁸F(氟),⁹⁹Tc(锝),¹¹¹In(铟),和⁶⁷Ga(镓),和造影剂,诸如钆(Gd),镱,和铁。放射性Gd同位素(¹⁵³Gd)也是可用的且适合于非人哺乳动物中的成像规程。可以使用标准技术来标记主题抗体。例如,可以使用氯胺T或1,3,4,6-四氯-3 α ,6 α -二苯基甘脲碘化主题抗体。对于氟化,通过氟离子置换反应在合成期间将氟添加至主题抗体。关于用此类放射性同位素合成蛋白质的综述,见Muller-Gartner,H.,TIB Tech.,16:122-130(1998)和Saji,H.,Crit.Rev.Ther Drug Carrier Syst.,16(2):209-244(1999)。还可以经由标准技术用造影剂标记主题抗体。例如,可以通过将低分子Gd螯合物,诸如Gd二乙烯三胺五乙酸(GdDTPA)或Gd四氮杂环十二烷四乙酸(GdDOTA)缀合至抗体用Gd标记主题抗体。见Caravan et al.,Chem.Rev.99:2293-2352(1999)和Lauffer et al.,J.Magn.Reson.Imaging,3:11-16(1985)。可以通过例如将聚赖氨酸-Gd螯合物缀合至抗体用Gd标记主题抗体。见例如Curtet et al.,Invest.Radiol.,33(10):752-761(1998)。或者,可以通过将包括Gd螯合剂脂质的顺磁性聚合脂质体与亲合素和生物素化抗体一起温育用Gd标记主题抗体。见例如Sipkins et al.,Nature Med.,4:623-626(1998)。

[0251] 可连接至主题抗体的合适的荧光蛋白包括但不限于来自维多利亚多管水母(Aequoria victoria)的绿色荧光蛋白或其突变体或衍生物,例如如描述于美国专利No.6,066,476;6,020,192;5,985,577;5,976,796;5,968,750;5,968,738;5,958,713;5,919,445;5,874,304;例如增强型GFP,许多此类GFP是可商购的,例如购自Clontech,Inc.;红色荧光蛋白;黄色荧光蛋白;来自珊瑚虫物种的多种荧光和有色蛋白中任一,如描述于例如Matz et al.(1999)Nature Biotechnol.17:969-973;等等。

试剂盒

[0252] 本公开提供包括主题抗体的试剂盒(例如测试试剂盒)。主题试剂盒在进行主题检测方法中是有用的。

[0253] 主题试剂盒可包括下述中一种或多种:主题抗体,编码主题抗体的核酸,或包含主题核酸的细胞。主题试剂盒中的主题抗体可以是人源化的。主题试剂盒可包括用于标记抗体的试剂。在一些实施方案中,主题试剂盒中的抗体包含可检测标记物。

[0254] 试剂盒的其它任选成分包括:缓冲剂;蛋白酶抑制剂;可检测标记物;等。在主题试剂盒包含主题核酸的情况中,核酸还可具有限制性位点,多个克隆位点,引物位点,等。试剂盒的各种成分可以存在于分开的容器中,或者某些相容成分可以根据需要预组合到一个容器中。

[0255] 在上述成分以外,主题试剂盒可包括关于使用试剂盒的成分来实践主题方法的说明书。关于实践主题方法的说明书一般记录在合适的记录介质上。例如,说明书可以打印在基材,诸如纸或塑料,等上。因此,说明书可以作为包装插页,在试剂盒或其成分的容器的标签中(即与包装或子包装相关),等而存在于试剂盒中。在其它实施方案中,说明书作为合适的计算机可读存储介质上存在的电子存储数据文件存在,例如光盘只读存储器(CD-ROM),数字万用盘(DVD),软盘,等。在还有其它实施方案中,试剂盒中不存在实际的说明书,但是提供了用于自远程来源获得说明书的手段,例如经因特网。这个实施方案的一个例子是包括其中能查看说明书和/或自其能下载说明书的网址的试剂盒。与说明书一样,这种用于获得说明书的手段记录在合适的基材上。

实施例

[0256] 提出下面的实施例以向本领域普通技术人员提供如何生成和使用本发明的全面公开和描述,并非意图限制发明人视为其发明的范围,也并非意图宣称下面的实验是所实施的所有或唯一实验。已经做出了努力来确保关于所用数值(例如量,温度,等)的准确性,但是一些实验误差和偏差应当考虑在内。除非另有指示,份是重量份,分子量是重量平均分子量,温度是摄氏度,而压力是处于或接近大气压。可以使用标准缩写,例如,bp,碱基对;kb,千碱基;pL,皮升;s或sec,秒;min,分钟;h或hr,小时;aa,氨基酸;kb,千碱基;bp,碱基对;nt,核苷酸;i.m.,肌肉内;i.p.,腹膜内;s.c.,皮下;等等。

除非另有指示,依照制造商的说明书使用实施例中提到的可商购试剂。实施例中和贯穿说明书以ECACC登录号鉴定的细胞的来源是欧洲细胞培养物保藏中心(ECACC),Salisbury,England。除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员的普遍理解相同的含义。下文描述了例示性方法和材料,尽管在本发明的实践或测试中也可以使用与本文中描述的那些相似或等同的方法和材料。材料,方法,和例子仅仅是示例性的,并非意图是范围上限制性的。

实施例1:CAT-07单克隆抗体

[0257] CAT-07是针对人磷脂酰肌醇聚糖-3的人IgG1卡帕单克隆抗体。为了测定聚集,使用分析性大小排阻层析(SEC;Tosoh#08541)分析含有CAT-07的样品,流动相300mM NaCl,25mM磷酸钠pH 6.8。图1显示CAT-07单克隆抗体>99%是单体,如通过分析性SEC测定的。

[0258] 为了实施ELISA,将Maxisorp 96孔板(Nunc)用PBS中的1 μ g/mL人磷脂酰肌醇聚糖-3-His(R&D Systems)于4 $^{\circ}$ C包被过夜。将板用酪蛋白缓冲液(ThermoFisher)封闭,然后以2倍稀释的11步系列将CAT-07铺板,始于150ng/mL。将板在摇动中于室温温育2小时。在PBS 0.1%Tween-20中清洗后,用驴抗人Fc γ 特异性辣根过氧化物酶(HRP)缀合的二抗检测结合

的分析物。用UltraTMMB (Pierce) 可视化信号并用2N H₂SO₄淬灭。使用Molecular Devices SpectraMax M5读板仪测定450nm处的吸光度并使用GraphPad Prism分析数据。图2显示CAT-07单克隆抗体结合重组人磷脂酰肌醇聚糖-3蛋白质,如通过ELISA评估的。

实施例2:CAT-07单克隆抗体的结合特异性

[0259] 为了实施ELISA,将Maxisorp 96孔板 (Nunc) 用PBS中的1μg/mL人磷脂酰肌醇聚糖带His标签的蛋白质(磷脂酰肌醇聚糖-1,磷脂酰肌醇聚糖-2,磷脂酰肌醇聚糖-3,磷脂酰肌醇聚糖-5,和磷脂酰肌醇聚糖-6,均来自R&D Systems)于4℃包被过夜。将板用酪蛋白缓冲液(ThermoFisher)封闭,然后以2倍稀释的11步系列将CAT-07铺板,始于150ng/mL。将板在摇动中于室温温育2小时。在PBS 0.1%Tween-20中清洗后,用驴抗人Fcγ特异性辣根过氧化物酶(HRP)缀合的二抗检测结合的分析物。用Ultra TMB (Pierce) 可视化信号并用2N H₂SO₄淬灭。使用Molecular Devices SpectraMax M5读板仪测定450nm处的吸光度并使用GraphPad Prism分析数据。图3显示CAT-07结合磷脂酰肌醇聚糖-3但不结合其它人磷脂酰肌醇聚糖蛋白质,如通过ELISA评估的。

[0260] 为了实施物种交叉反应性研究,经由用编码蛋白的质粒稳定转染CHO-K1细胞,继以在潮霉素中选择而生成表达人,食蟹猴,大鼠,或小鼠磷脂酰肌醇聚糖-3蛋白质的细胞系试剂。将所得细胞集合用于下面的流式细胞术研究。使用TrypLE (ThermoFisher) 收获细胞,放置在含2%热灭活FBS的PBS中,并与100μL细胞(0.5e6个细胞/测试)中的1μg CAT-07一起在冰上温育1小时。接下来,将细胞在PBS+2%FBS中清洗一次并与荧光素缀合的驴抗人Fc第二试剂[F(ab)₂片段, Jackson Immunoresearch]一起在冰上温育30分钟。在PBS+2%FBS中清洗两次后,使用FACS DivaTM软件在Becton Dickinson FACSCantoTM仪器上分析细胞。还评估与野生型(未转染细胞)的反应性。作为在经转染细胞中观察到的均值荧光强度与未转染细胞(背景)相比的升高报告数据。图4。流式细胞术数据支持CAT-07结合来自多种物种,包括食蟹猴,大鼠,和小鼠的磷脂酰肌醇聚糖-3蛋白质。

[0261] 虽然已经参考其具体实施方案描述了本发明,但是本领域技术人员应当了解,在不违背本发明的真正精神和范围的情况下可以做出各种变化且可以取代等效方案。另外,可以做出许多修改以使特定的情况,材料,物质组合物,工艺,一个或多个工艺步骤适应本发明的目的,精神和范围。所有这些修改意图在本文所附权利要求书的范围内。

Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro
 165 170 175
 Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu
 180 185 190
 Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe
 195 200 205
 Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln
 210 215 220
 Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile
 225 230 235 240
 Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu
 245 250 255
 Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys
 260 265 270
 Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly
 275 280 285
 Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu
 290 295 300
 Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu
 305 310 315 320
 Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys
 325 330 335
 Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Thr Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser
 340 345 350
 Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile
 355 360 365
 Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala His Val Glu His Glu Glu Thr Leu
 370 375 380
 Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser
 385 390 395 400
 Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala
 405 410 415
 Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr
 420 425 430
 Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His
 435 440 445
 Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp
 450 455 460
 Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys

1 5
 <210> 9
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的序列
 <400> 9
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Phe Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Asp Pro Pro Thr Gly Arg Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Asn Tyr Gly Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的序列
 <400> 10
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的序列

<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 13
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的序列
 <400> 13
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

	35		40		45														
	Gly	Ile	Ile	Asp	Pro	Pro	Thr	Gly	Arg	Thr	Thr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe			
	50						55					60							
	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr			
	65					70					75				80				
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
				85						90				95					
	Ala	Arg	Gly	Asn	Tyr	Gly	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly			
				100					105					110					
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser												
	115																		
<210>	14																		
<211>	449																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<220>																			
<223>	合成的序列																		
<400>	14																		
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala			
	1				5					10				15					
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr			
				20					25					30					
	Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met			
				35					40					45					
	Gly	Ile	Ile	Asp	Pro	Pro	Thr	Gly	Arg	Thr	Thr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe			
	50						55					60							
	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr			
	65					70					75				80				
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
				85						90				95					
	Ala	Arg	Gly	Asn	Tyr	Gly	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly			
				100					105					110					
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe			
				115					120					125					
	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu			
				130					135				140						
	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp			
	145					150					155				160				
	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu			

	165		170		175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser					
	180		185		190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro					
	195		200		205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys					
	210		215		220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro					
225		230		235	240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser					
	245		250		255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp					
	260		265		270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn					
	275		280		285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val					
	290		295		300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu					
305		310		315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys					
	325		330		335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr					
	340		345		350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr					
	355		360		365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu					
	370		375		380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu					
385		390		395	400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys					
	405		410		415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu					
	420		425		430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly					
	435		440		445

Lys

<210> 15

<211> 1347

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的序列

<400> 15

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactttt tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagt gatgggaata attgatccgc ctactggtcg gacaacctac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggaac 300
tacgggggca gatactttga ctactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctcgagcgcc 360
tccaccaagg gcccacggt ctccccctg gcacctct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggegtgcac accttccccg ctgtctaca gtctcagga 540
cttactccc tcagcagcgt ggtgaccgt ccctccagca gcttgggac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcaca gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg gaccctgag 780
gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc cccatcccg ggaagagatg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggt tctatcccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag acaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1347

```

<210> 16

<211> 1347

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的序列

<400> 16

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactaca tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagt gatgggaata attgatccgc ctactggtcg gacaacctac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggaac 300

```

tacgggggca gatactttga ctactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctcgagcgcc 360
 tccaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 540
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
 atctgcaacg tgaatcacao gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660
 tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 780
 gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840
 gtggacggcg tggagggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
 tacaagtgca aggtctccaa caaagcctc ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa 1020
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaagagatg 1080
 accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatgcc 1140
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag acaactaca agaccacgc tcccgtgctg 1200
 gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1347

<210> 17

<211> 642

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的序列

<400> 17

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactetca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的序列
<400> 18
His His His His His
1 5
<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的序列
<400> 19
His His His His His His
1 5
<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的序列
<400> 20
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10
<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的序列
<400> 21
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5
<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的序列

<400> 22

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的序列

<400> 23

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的序列

<400> 24

Arg Tyr Ile Arg Ser

1 5

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的序列

<400> 25

Phe His His Thr

1

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的序列

<400> 26

Trp Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Cys Cys Arg Glu Cys Cys Ala Arg

1 5 10 15

Ala

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的序列

<220>

<221> 混杂特征

<222> (1) .. (5)

<223> 残基可以重复n次，其中n是至少一的整数

<400> 27

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 28

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的序列

<220>

<221> 混杂特征

<222> (1) .. (4)

<223> 残基可以重复n次，其中n是至少一的整数

<400> 28

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的序列

<400> 29

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<400> 34
Gly Ser Ser Ser Gly
1 5

<210> 35
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的序列
<220>
<221> 混杂特征
<222> (2) .. (2)
<223> Xaa可以是Cys或Ser

<400> 35
Leu Xaa Thr Pro Ser Arg
1 5

<210> 36
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的序列
<400> 36
Leu Cys Thr Pro Ser Arg
1 5

<210> 37
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的序列
<400> 37
Leu Ser Thr Pro Ser Arg
1 5

<210> 38
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> Xaa可以是任何氨基酸，尽管通常是脂肪族氨基酸，
极性，不带电荷氨基酸，或含硫氨基酸

(即，除了芳香族氨基酸或带电荷氨基酸以外)，

例如S, T, A, V, G或C; 例如S, T, A, V或G

<220>

<221> 混杂特征

<222> (4) .. (4)

<223> Xaa是脯氨酸或丙氨酸

<220>

<221> 混杂特征

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa可以是任何氨基酸，尽管通常是脂肪族氨基酸，
极性，不带电荷氨基酸，或含硫氨基酸

(即，除了芳香族氨基酸或带电荷氨基酸以外)，

例如S, T, A, V, G或C; 例如S, T, A, V或G

<220>

<221> 混杂特征

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa是碱性氨基酸(例如精氨酸(R)，而且可以是赖氨酸(K)

或组氨酸(H)，通常是赖氨酸)，或脂肪族氨基酸

(丙氨酸(A)，甘氨酸(G)，亮氨酸(L)，缬氨酸(V)，异亮氨酸(I)，

或脯氨酸(P)，通常是A, G, L, V, 或I)

<400> 40

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

<210> 41

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的序列

<220>

<221> 混杂特征

<222> (1) .. (1)

<223> Xaa存在或缺失，而且当存在时，是任何氨基酸，
前提是当硫酸酯酶基序处于多肽的N-末端时，X1存在

<220>

<221> 残基修饰

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa可以是任何氨基酸，尽管通常是脂肪族氨基酸，
含硫氨基酸，或极性，不带电荷氨基酸

<220>

<221> 混杂特征

<222> (4) .. (4)

<223> Xaa可以是任何天然发生氨基酸

<220>

<221> 混杂特征

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa可以是任何氨基酸，尽管通常是脂肪族氨基酸，
含硫氨基酸，或极性，不带电荷氨基酸

<220>

<221> 混杂特征

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa是碱性氨基酸(例如精氨酸(R)，而且可以是赖氨酸(K)
或组氨酸(H)，通常是赖氨酸)，或脂肪族氨基酸
(丙氨酸(A)，甘氨酸(G)，亮氨酸(L)，缬氨酸(V)，异亮氨酸(I)，
或脯氨酸(P)，通常是A，G，L，V，或I)

<400> 42

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

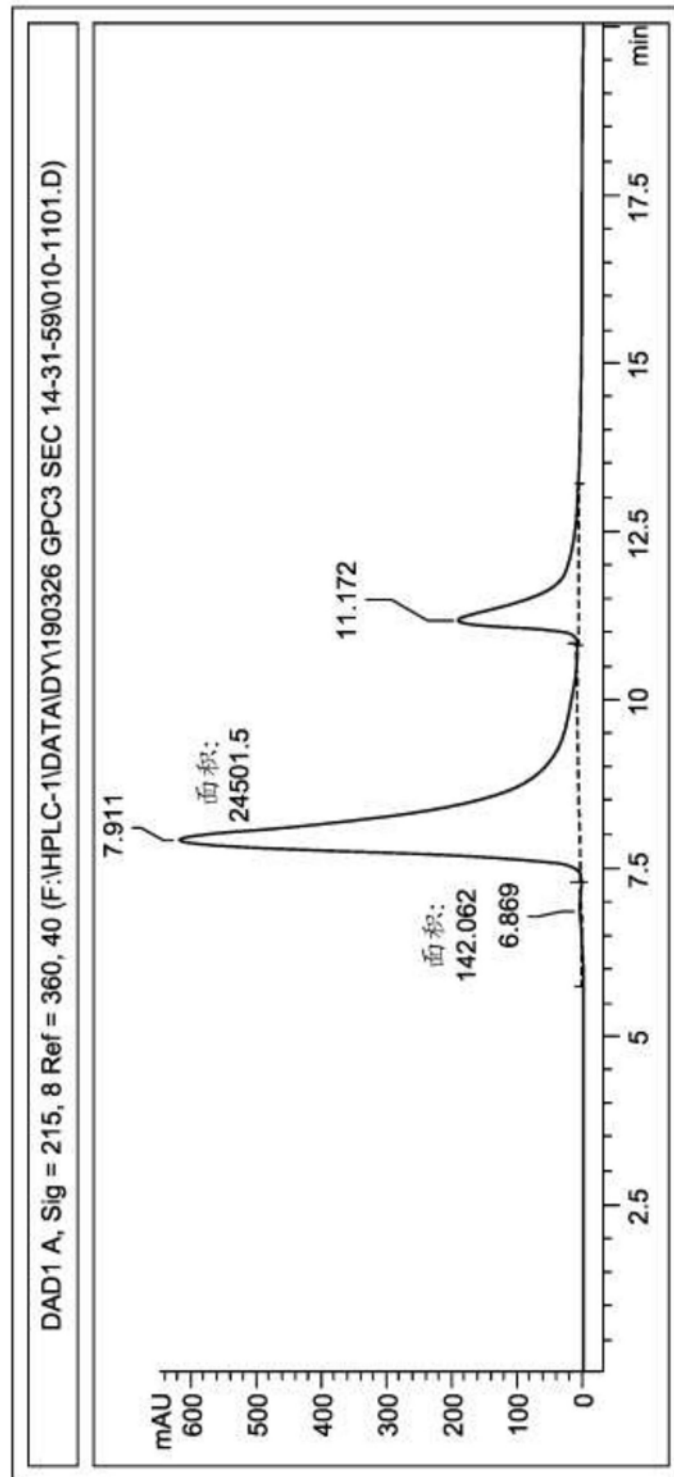


图1

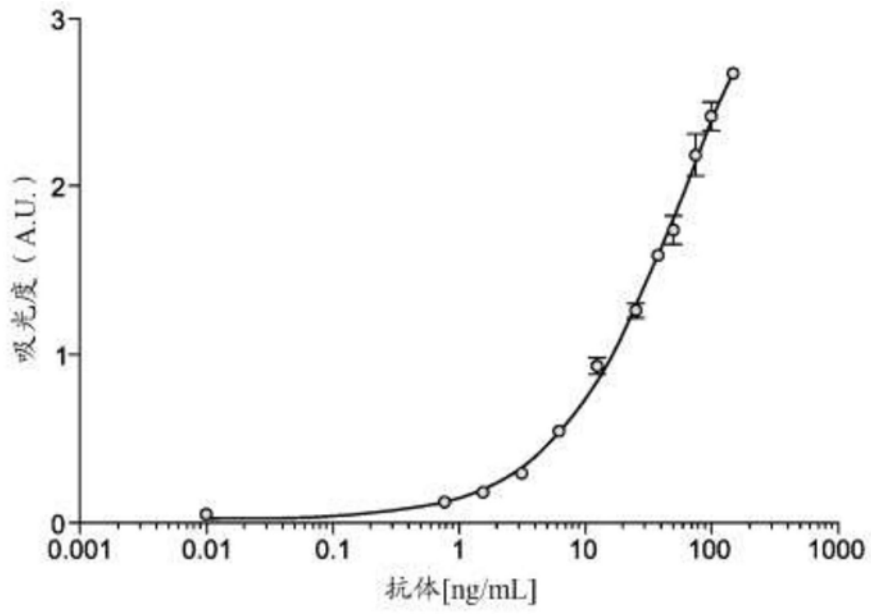


图2

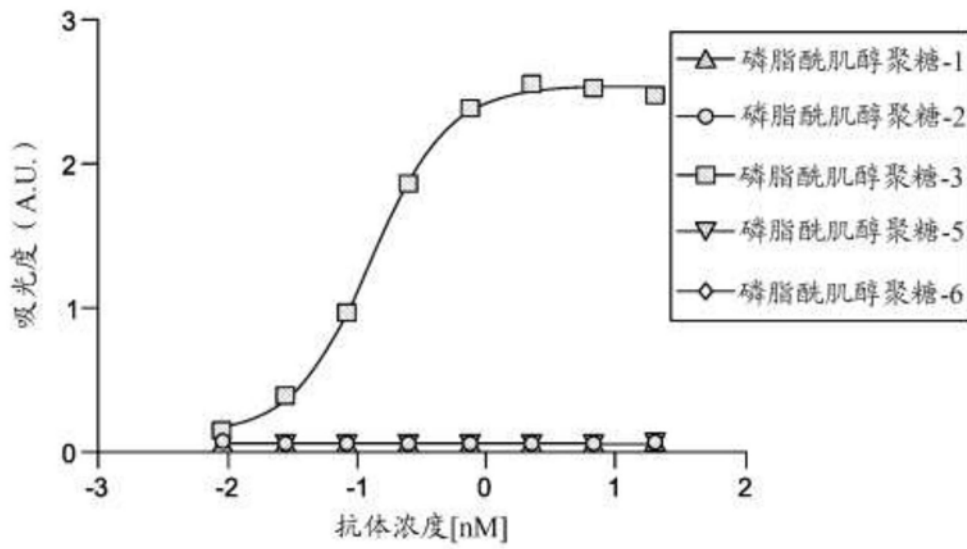


图3

CAT-07 结合来自多个物种的磷脂酰肌醇聚糖-3

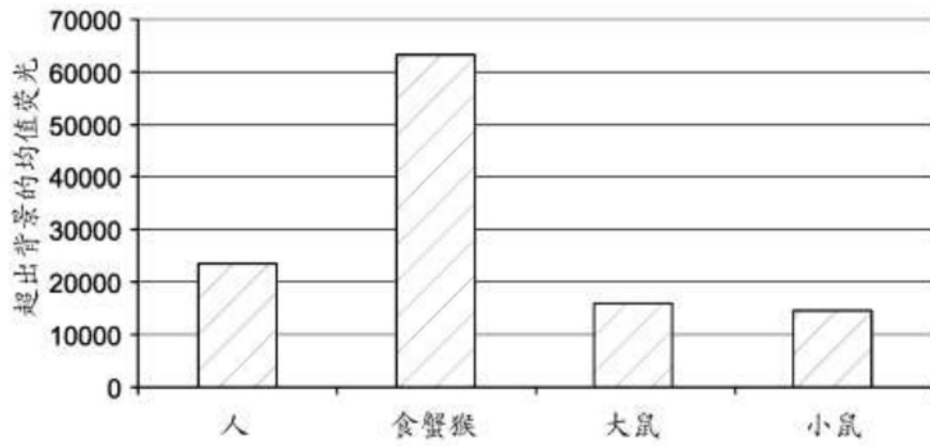


图4