



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112533948 B

(45) 授权公告日 2025. 01. 14

(21) 申请号 201980036582.X

张淑燕 陈彦颖 林俞好 唐述纶

(22) 申请日 2019.05.30

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理师 王达佐 洪欣

申请公布号 CN 112533948 A

(43) 申请公布日 2021.03.19

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

C07K 16/28 (2006.01)

62/678,890 2018.05.31 US

C07K 16/30 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 16/34 (2006.01)

2020.11.30

C07K 16/44 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

G01N 33/53 (2006.01)

PCT/US2019/034708 2019.05.30

A61P 35/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

(56) 对比文件

W02019/232246 EN 2019.12.05

CN 101547937 A, 2009.09.30

CN 101578296 A, 2009.11.11

(73) 专利权人 台湾醣联生技医药股份有限公司

审查员 周韵品

地址 中国台湾台北市

权利要求书7页 说明书69页

(72) 发明人 张东玄 杨玫君 刘亮吟 丁志岳

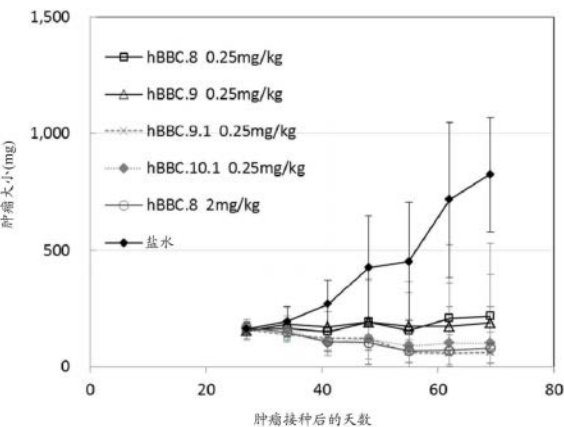
序列表24页 附图52页

(54) 发明名称

与双触角Lewis B以及Lewis Y抗原结合的治疗性抗体

(57) 摘要

本文公开了能够与某些双触角Lewis抗原特异性结合的人源化抗体、其抗原结合片段和抗体缀合物,所述抗原在多种癌症中表达。本发明所公开的抗体可以用于靶向表达抗原的细胞以治疗或检测疾病(包括各种癌症)。还提供了用于产生所公开的抗体及其抗原结合片段的多核苷酸、载体和宿主细胞。还提供了药物组合物、治疗和检测方法,以及抗体、抗原结合片段、抗体缀合物和组合物的用途。



1. 分离的抗体或其抗原结合片段,其包含:

(a) 免疫球蛋白重链可变区,其包含重链互补决定区1(VH CDR1)、重链互补决定区2(VH CDR2)、重链互补决定区3(VH CDR3),所述重链互补决定区1(VH CDR1)由SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列组成,所述重链互补决定区2(VH CDR2)由SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列组成,所述重链互补决定区3(VH CDR3)由SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列组成;和

(b) 免疫球蛋白轻链可变区,其包含轻链互补决定区1(VL CDR1)、轻链互补决定区2(VL CDR2)和轻链互补决定区3(VL CDR3),所述轻链互补决定区1(VL CDR1)由SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列组成,所述轻链互补决定区2(VL CDR2)由SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列组成,所述轻链互补决定区3(VL CDR3)由SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列组成;

其中所述抗体或其抗原结合片段能够特异性结合至:

包含 $\text{Fuc}_4(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc})_2[\text{I}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}]_2[\text{II}]$ 的双触角 Le^B/Le^B 抗原,

包含 $\text{Fuc}_4(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc})_2[\text{III}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}]_2[\text{IV}]$ 的双触角 Le^Y/Le^Y 抗原,

包含 $\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc})[\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc})][\text{V}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}][\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}][\text{VI}]$ 的双触角 Le^B/Le^Y 抗原,

和包含 $\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc})[\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc})][\text{VII}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}][\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}]$

$[\text{VIII}]$ 的双触角 Le^Y/Le^B 抗原,

并且其中所述抗体或其抗原结合片段不特异性结合至:包含 $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNAc}[\text{IX}]$ 的单触角 Le^X 抗原、或包含 $[\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNAc}]_2[\text{X}]$ 的双触角 Le^X 抗原、或包含 $\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}[\text{XI}]$ 的单触角 Le^A 抗原、或包含 $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}[\text{XII}]$ 的单触角2型H抗原、或包含 $(\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc})_2[\text{XIII}]$ 的双触角2型H抗原、或包含 $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}[\text{XIV}]$ 的单触角1型H抗原。

2. 如权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,以及所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列具有至少92%同一性的氨基酸序列,以及所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列具有至少92%同一性的氨基酸序列。

4. 如权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,以及所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。

5. 如权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列具有至少97%同一性的氨基酸序列,以及所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列具有至少97%同一性的氨基酸序列。

序列。

6. 如权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列,以及所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列。

7. 如权利要求1-6任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是单克隆的。

8. 如权利要求7所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是人源化抗体。

9. 如权利要求1-6任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其选自:Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段、单链Fv(ScFv)抗体和双体抗体。

10. 如权利要求7所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其选自:Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段、单链Fv(ScFv)抗体和双体抗体。

11. 如权利要求8所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其选自:Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段、单链Fv(ScFv)抗体和双体抗体。

12. 分离的抗体或其抗原结合片段,其包含免疫球蛋白重链可变区(VH)和免疫球蛋白轻链可变区(VL),其中:

(i) 所述VH包含:由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的变体组成的VH互补决定区(CDR)1,其中变异由在SEQ ID NO:35第33位处的Y→A取代组成;由SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列组成的重链互补决定区2(VH CDR2);和由SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列组成的重链互补决定区3(VH CDR3);以及所述VL包含:由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成的轻链互补决定区1(VL CDR1);由SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列组成的轻链互补决定区2(VL CDR2);和由SEQ ID NO:8所示氨基酸序列组成的轻链互补决定区3(VL CDR3)

(ii) 所述VH包含:由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的VH CDR 1;由SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的变体组成的VH CDR2,其中变异由在SEQ ID NO:35第55位处的T→S取代组成;和由SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列组成的VH CDR3;以及所述VL包含:由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成的VL CDR1;由SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列组成的VL CDR2;和由SEQ ID NO:8所示氨基酸序列组成的VL CDR3;

(iii) 所述VH包含:由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的VH CDR1;由SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列组成的VH CDR2;和由SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的变体组成的VH CDR3,其中变异由在SEQ ID NO:35第104位处的Y→A取代、或在SEQ ID NO:35第106位处的A→H取代组成;以及所述VL包含:由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成的VL CDR1;由SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列组成的VL CDR2;和由SEQ ID NO:8所示氨基酸序列组成的VL CDR3;

(iv) 所述VH包含:由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的VH CDR1;由SEQ ID NO:3所示氨基酸序列组成的VH CDR2;和由SEQ ID NO:4所示氨基酸序列组成的VH CDR3;以及所述VL包含:由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的变体组成的VL CDR1,其中变异由在SEQ ID NO:5第30位处的Y→A取代组成;由SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列组成的VL CDR2;和由SEQ ID NO:8所示氨基酸序列组成的VL CDR3;

(v) 所述VH包含:由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的VH CDR1;由SEQ ID NO:3所

示的氨基酸序列组成的VH CDR2;和由SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列组成的VH CDR3;以及所述VL包含:由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成的VL CDR1;由SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的变体组成的VL CDR2,其中变异由在SEQ ID NO:5第50位处的G→A取代组成;和由SEQ ID NO:8所示氨基酸序列组成的VL CDR3;

(vi) 所述VH包含:由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的VH CDR1;由SEQ ID NO:3所示氨基酸序列组成的VH CDR2;和由SEQ ID NO:4所示氨基酸序列组成的VH CDR3;以及所述VL包含:由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成的VL CDR1;由SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列组成的VL CDR2;和由SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的变体组成的VL CDR3,其中变异由在SEQ ID NO:5第93位处的T→S取代组成;

(vii) 所述VH包含:由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的VH CDR1;由SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的变体组成的VH CDR2,其中变异由在SEQ ID NO:35第55位处的T→S取代组成;和由SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的变体组成的VH CDR3,其中变异由在SEQ ID NO:35第104位处的Y→A取代组成、或由在SEQ ID NO:35第106位处的A→H取代组成;以及所述VL包含:由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成的VL CDR1;由SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列组成的VL CDR2;和由SEQ ID NO:8所示氨基酸序列组成的VL CDR3;

其中所述抗体或其抗原结合片段能够特异性结合至:

包含 $\text{Fuc}_4(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc})_2[\text{I}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}]_2[\text{II}]$ 的双触角 Le^B/Le^B 抗原,

包含 $\text{Fuc}_4(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc})_2[\text{III}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}]_2[\text{IV}]$ 的双触角 Le^Y/Le^Y 抗原,

包含 $\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc})[\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc})][\text{V}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}][\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}][\text{VI}]$ 的双触角 Le^B/Le^Y 抗原,

和包含 $\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc})[\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc})][\text{VII}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}][\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}]$

$[\text{VIII}]$ 的双触角 Le^Y/Le^B 抗原,

并且其中所述抗体或其抗原结合片段不特异性结合至:包含 $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNAc}[\text{IX}]$ 的单触角 Le^X 抗原、或包含 $[\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNAc}]_2[\text{X}]$ 的双触角 Le^X 抗原、或包含 $\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}[\text{XI}]$ 的单触角 Le^A 抗原、或包含 $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}[\text{XII}]$ 的单触角2型H抗原、或包含 $(\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc})_2[\text{XIII}]$ 的双触角2型H抗原、或包含 $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}[\text{XIV}]$ 的单触角1型H抗原。

13. 如权利要求12所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,以及所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。

14. 如权利要求12所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列具有至少92%同一性的氨基酸序列,以及所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列具有至少92%同一性的氨基酸序列。

15. 如权利要求12所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白重链可

变区包含与SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,以及所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。

16.如权利要求12所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列具有至少97%同一性的氨基酸序列,以及所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列具有至少97%同一性的氨基酸序列。

17.如权利要求12所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列,以及所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列。

18.如权利要求12-17任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是单克隆的。

19.如权利要求18所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是人源化抗体。

20.如权利要求12-17任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其选自:Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段、单链Fv(ScFv)抗体和双体抗体。

21.如权利要求18所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其选自:Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段、单链Fv(ScFv)抗体和双体抗体。

22.如权利要求19所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其选自:Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段、单链Fv(ScFv)抗体和双体抗体。

23.分离的抗体或其抗原结合片段,其包含:免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,所述免疫球蛋白重链可变区由SEQ ID NO:35中所示的氨基酸序列组成,所述免疫球蛋白轻链可变区由SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列组成,其中所述抗体或其抗原结合片段能够特异性结合至:

包含Fuc₄(Galβ1→3GlcNAc)₂[I]或[Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc]₂[II]的双触角Le^B/Le^B抗原,

包含Fuc₄(Galβ1→4GlcNAc)₂[III]或[Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc]₂[IV]的双触角Le^Y/Le^Y抗原,

包含Fuc₂(Galβ1→3GlcNAc)[Fuc₂(Galβ1→4GlcNAc)][V]或[Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc][Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc][VI]的双触角Le^B/Le^Y抗原,

和包含Fuc₂(Galβ1-4GlcNAc)[Fuc₂(Galβ1-3GlcNAc)][VII]或[Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc][Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc]

[VIII]的双触角Le^Y/Le^B抗原,

并且其中所述抗体或其抗原结合片段不特异性结合至:包含Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAc[IX]的单触角Le^X抗原、或包含[Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAc]₂[X]的双触角Le^X抗原、或包含Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc[XI]的单触角Le^A抗原、或包含Fucα1-2Galβ1-4GlcNAc[XII]的单触角2型H抗原、或包含(Fucα1-2Galβ1-4GlcNAc)₂[XIII]的双触角2型H抗原、或包含Fucα1-2Galβ1-3GlcNAc[XIV]的单触角1型H抗原。

24.如权利要求23所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是单克隆的。

25. 如权利要求24所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是人源化抗体。

26. 如权利要求24所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其选自:Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段、单链Fv(ScFv)抗体和双体抗体。

27. 分离的抗体,其包含由SEQ ID NO:10中所示氨基酸序列组成的免疫球蛋白重链和由SEQ ID NO:11中所示氨基酸序列组成的免疫球蛋白轻链,其中所述抗体或其抗原结合片段能够特异性结合至:

包含Fuc₄(Galβ1→3GlcNAc)₂[I]或[Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc]₂[II]的双触角Le^B/Le^B抗原,

包含Fuc₄(Galβ1→4GlcNAc)₂[III]或[Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc]₂[IV]的双触角Le^Y/Le^Y抗原,

包含Fuc₂(Galβ1→3GlcNAc)[Fuc₂(Galβ1→4GlcNAc)][V]或[Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc][Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc][VI]的双触角Le^B/Le^Y抗原,

和包含Fuc₂(Galβ1-4GlcNAc)[Fuc₂(Galβ1-3GlcNAc)][VII]或[Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc][Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc]

[VIII]的双触角Le^Y/Le^B抗原,

并且其中所述抗体或其抗原结合片段不特异性结合至:包含Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAc[IX]的单触角Le^X抗原、或包含[Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAc]₂[X]的双触角Le^X抗原、或包含Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc[XI]的单触角Le^A抗原、或包含Fucα1-2Galβ1-4GlcNAc[XII]的单触角2型H抗原、或包含(Fucα1-2Galβ1-4GlcNAc)₂[XIII]的双触角2型H抗原、或包含Fucα1-2Galβ1-3GlcNAc[XIV]的单触角1型H抗原。

28. 如权利要求27所述的分离的抗体,其是单克隆的。

29. 如权利要求28所述的分离的抗体,其中所述抗体是人源化抗体。

30. 分离的多核苷酸,其编码权利要求1-26中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或者权利要求27-29中任一项所述的抗体。

31. 如权利要求30所述的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸经密码子优化以在宿主细胞中表达。

32. 重组载体,其包含权利要求30或权利要求31所述的多核苷酸。

33. 如权利要求32所述的重组载体,其包含与编码抗体或其抗原结合片段的多核苷酸可操作地连接的表达控制序列。

34. 如权利要求33的重组载体,其是表达载体,其中所述表达控制序列包含启动子。

35. 宿主细胞,其包含权利要求32所述的重组载体。

36. 宿主细胞,其包含权利要求34所述的重组载体。

37. 产生抗体或其抗原结合片段的方法,所述抗体或其抗原结合片段能够特异性结合至:

包含结构[I]或结构[II]的双触角Le^B/Le^B抗原,

包含Fuc₄(Galβ1→4GlcNAc)₂[III]或[Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc]₂[IV]的双触角Le^Y/Le^Y抗原,

包含Fuc₂(Galβ1→3GlcNAc)[Fuc₂(Galβ1→4GlcNAc)][V]或[Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc][Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc][VI]的双触角Le^B/Le^Y抗原,

和包含 $\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc})[\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc})][\text{VII}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}][\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}]$

$[\text{VIII}]$ 的双触角 Le^Y/Le^B 抗原,

并且其中所述抗体或其抗原结合片段不特异性结合至:包含 $\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1\rightarrow 3)\text{GlcNAc}[\text{IX}]$ 的单触角 Le^X 抗原、或包含 $[\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1\rightarrow 3)\text{GlcNAc}]_2[\text{X}]$ 的双触角 Le^X 抗原、或包含 $\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}[\text{XI}]$ 的单触角 Le^A 抗原、或包含 $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}[\text{XII}]$ 的单触角2型H抗原、或包含 $(\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc})_2[\text{XIII}]$ 的双触角2型H抗原、或包含 $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}[\text{XIV}]$ 的单触角1型H抗原,

所述方法包括:

在足以由宿主细胞表达编码所述抗体或其抗原结合片段的多核苷酸的条件和时间下培养权利要求35所述的宿主细胞,从而获得包含所述抗体或其抗原结合片段的培养物;和从所述培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

38. 抗体缀合物,其包含权利要求1-26中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段或者权利要求27-29中任一项所述的抗体,以及与其连接的有效载荷分子。

39. 如权利要求38所述的抗体缀合物,其中所述有效载荷分子通过连接子与所述抗体或其抗原结合片段共价连接。

40. 如权利要求39所述的抗体缀合物,其中所述连接子是可切割连接子。

41. 如权利要求39所述的抗体缀合物,其中所述连接子是不可切割连接子。

42. 如权利要求40所述的抗体缀合物,其中所述可切割连接子是蛋白酶敏感性连接子、pH敏感性连接子或谷胱甘肽敏感性连接子。

43. 如权利要求42所述的抗体缀合物,其中所述可切割连接子是包含缬氨酸-瓜氨酸二肽的蛋白酶敏感性连接子。

44. 如权利要求40-43中任一项所述的抗体缀合物,其中所述连接子包含马来酰亚胺基团。

45. 如权利要求44所述的抗体缀合物,其中所述抗体或其抗原结合片段在铰链区中包含还原的二硫桥键,并且所述还原的二硫桥键与马来酰亚胺基团偶联。

46. 如权利要求40-43中任一项所述的抗体缀合物,其中所述连接子还包含自拆解基团。

47. 如权利要求46所述的抗体缀合物,其中所述自拆解基团是对氨基苯甲醇(PABC)。

48. 如权利要求38-43中任一项所述的抗体缀合物,其中所述有效载荷分子选自治疗剂和可检测的指示剂。

49. 如权利要求48所述的抗体缀合物,其中所述有效载荷分子是可检测的指示剂。

50. 如权利要求49所述的抗体缀合物,其中所述可检测的指示剂选自:放射性核素、染料、放射性金属、荧光部分、MRI造影剂、微泡、碳纳米管、金颗粒、氟脱氧葡萄糖、酶、发色团和不透射线标志物。

51. 如权利要求50所述的抗体缀合物,其中所述可检测的指示剂是选自以下的放射性核素: ^{68}Ga 、 ^{64}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{89}Zr 、 ^{124}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{131}I 、 ^{76}Br 、 ^{78}Zr 、 ^{18}F 和 ^{124}T 。

52. 如权利要求50或权利要求51所述的抗体缀合物,其还包含选自以下的放射性核素螯合剂:马来酰亚胺标记的DOTA、N-羟基琥珀酰亚胺-DOTA和去铁胺(DFO)。

53. 药物组合物,其包含:权利要求1-26中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段、权利要求27-29中任一项所述的分离的抗体、或权利要求38-52中任一项所述的抗体缀合物,以及药物载体。

54. 权利要求1-26中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求27-29中任一项所述的抗体、权利要求30或31所述的多核苷酸、权利要求32-34中任一项所述的重组载体、权利要求35或36所述的宿主细胞、权利要求38-52中任一项所述的抗体缀合物、或权利要求53所述的药物组合物在制备用于治疗、诊断或检测对象中胃癌或结肠癌的药物中的用途,其中所述胃癌或结肠癌表达选自双触角 Le^B/Le^B 、双触角 Le^Y/Le^Y 、双触角 Le^B/Le^Y 和双触角 Le^Y/Le^B 的一种或多种双触角Lewis抗原。

55. 如权利要求54所述的用途,其中所述胃癌或结肠癌选自胃腺癌和结肠腺癌。

56. 如权利要求54或55所述的用途,其中所述药物通过选自以下的途径施用:静脉内、肠胃外、胃内、胸膜内、肺内、直肠内、皮内、腹膜内、瘤内、皮下、口服、局部、经皮、脑池内、鞘内、鼻内和肌内。

57. 如权利要求54或55所述的用途,其中所述对象正在接受或先前已经接受:

- (a) 免疫抑制疗法;
- (b) 刺激性免疫检查点分子;
- (c) 放射疗法;
- (d) 化学疗法;
- (e) 细胞免疫疗法;或
- (f) (a) - (e) 的任意组合。

58. 权利要求1-26中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求27-29中任一项所述的抗体、权利要求30或31所述的多核苷酸、权利要求32-34中任一项所述的重组载体、权利要求35或36所述的宿主细胞、权利要求38-52中任一项所述的抗体缀合物、或权利要求53所述的药物组合物在制备用于治疗对象中胃癌或结肠癌的药物中的用途,其中所述胃癌或结肠癌表达选自双触角 Le^B/Le^B 、双触角 Le^Y/Le^Y 、双触角 Le^B/Le^Y 和双触角 Le^Y/Le^B 的一种或多种双触角Lewis抗原。

59. 如权利要求58所述的用途,其中所述胃癌或结肠癌选自胃腺癌和结肠腺癌。

60. 如权利要求58或59所述的用途,其中所述药物通过选自以下的途径施用:静脉内、肠胃外、胃内、胸膜内、肺内、直肠内、皮内、腹膜内、瘤内、皮下、口服、局部、经皮、脑池内、鞘内、鼻内和肌内。

61. 如权利要求58或59所述的用途,其中所述对象正在接受或先前已经接受:

- (a) 免疫抑制疗法;
- (b) 刺激性免疫检查点分子;
- (c) 放射疗法;
- (d) 化学疗法;
- (e) 细胞免疫疗法;或
- (f) (a) - (e) 的任意组合。

与双触角Lewis B以及Lewis Y抗原结合的治疗性抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据35U.S.C.§119(e),本申请要求2018年5月31日提交的美国临时申请62/678,890的权益,所述申请通过引用整体并入本文中。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请相关的序列表是以文本格式代替纸质副本提供的,并且在此通过引用并入到本说明书中。包含序列表的文本文件的名称是400100_401WO_SEQUENCE_LISTING.txt。文本文件为43.3KB,于2019年5月30日创建,并通过EFS-Web以电子方式提交。

技术领域

[0005] 本公开的实施方案通常涉及能够与某些Lewis抗原特异性结合的抗体及其抗原结合片段,以及制备和使用它们的方法。还提供了与本文所公开的抗体及抗原结合片段相关的组合物、多核苷酸、载体、融合蛋白和宿主细胞。在某些实施方案中,目前所公开的抗体及其抗原结合片段与双触角Le^B/Le^B、Le^Y/Le^Y、Le^B/Le^Y和Le^Y/Le^B抗原能够特异性结合,并且可用于治疗或检测以此类抗原表达为特征的疾病(如癌症)。

[0006] 背景

[0007] 免疫疗法是用于治疗多种疾病(包括各种癌症)的新兴模式。例如,自20世纪90年代后期以来,已经证明了具有抗肿瘤活性的单克隆抗体(mAb)的临床功效(参见,例如,Topalian等人,J.Clin.Oncol.29(36):4828-4836(2011)),并且几种畅销癌症药物是mAb(例如利妥昔单抗、曲妥珠单抗和贝伐单抗)。

[0008] 基于抗体的疗法可以特异性地靶向表达抗原的细胞(如肿瘤细胞),并且可以例如通过多种方式产生细胞毒性活性(包括通过引发抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)、补体介导的细胞毒性(CDC)和T细胞介导的细胞毒性)。其它方法涉及使用抗体作为载体媒介物来选择性地递送例如细胞毒性剂或抗增殖剂以杀伤靶细胞和/或抑制此类细胞的生长和转移性扩散。

[0009] 单克隆抗体疗法的相关标准包括,例如,抗体特异性识别和结合所期望的抗原的能力,而不是不加区分地结合一种或多种其它潜在表位(例如在健康细胞上表达的蛋白质或聚糖)。而且,抗体不应对患者具有免疫原性。在这点上,特异性针对人类疾病抗原的抗体经常在非人类宿主(如小鼠和兔)中产生,并且可以具有例如在人类患者中可能具有免疫原性的宿主物种氨基酸序列和/或碳水化合物基序。因此,用于治疗的优选抗体缺乏或具有最小化的潜在免疫原性性质。还必须考虑靶抗原的特征。优选地,抗原在特定的疾病状态(例如癌症)中选择性地表达或高度过表达,使得抗体介导的疗法将不会对健康组织具有不希望的有害的“中靶,脱离肿瘤”的作用。

[0010] 异常糖基化(例如,糖蛋白和糖脂的过表达或错误表达)是许多癌症共有的特征(参见,例如,Blanas等人,Front.Oncol.8:39(2018))。不希望受理论束缚,异常糖基化可能影响导致癌症进展和转移的许多细胞过程(例如,细胞生长和代谢、血管生成、细胞-基质相互作用和细胞-细胞粘附)。在癌症中异常表达的示例性碳水化合物抗原包括I型和II型

Lewis抗原,它们是Lewis抗原系统的末端(在非还原性末端)岩藻糖基化碳水化合物表位。I型和II型Lewis抗原包括结构上相关的H1、H2和Lewis A、B、X和Y抗原,所有这些抗原共享三个单糖单元:(还原性的)末端乙酰氨基葡萄糖(GlcNac);半乳糖(Gal);和岩藻糖(Fuc)。I型Lewis抗原与II型Lewis抗原的区别在于它们的乳糖胺核心链中糖苷键的性质($\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNac}$:I型; $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNac}$:II型),并且存在于多种结构中(例如,线性或分支的,具有包含抗原基序的一个、两个或更多个触角)。Lewis抗原在健康成人组织(例如消化和生殖上皮细胞)中具有中等表达水平,但在许多实体癌(包括例如肺、乳腺、肝脏、肾脏、膀胱、胰腺和前列腺的癌症)中在细胞表面上过表达,并且也与急性髓细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病和非霍奇金淋巴瘤有关。

[0011] 靶向Lewis抗原以治疗癌症的一些疗法是已知的,包括停止使用的Seattle Genetics/Bristol Meyers Squibb抗体药物缀合物“cBR96-Dox”,其使用BR96单克隆抗体(Hellstrom等人,Cancer Res.50(7):2183-2190(1990))作为载体分子将阿霉素递送至表达 Le^Y 抗原的肿瘤细胞。显然,本领域仍然需要另外的疗法来治疗癌症,诸如表达Lewis抗原作为肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原的癌症。目前所公开的实施方案解决了这种需要并提供了其它相关的优点。

[0012] 概述

[0013] 根据某些本发明所公开的实施方案,提供了分离的抗体,其包含具有SEQ ID NO:10中所示氨基酸序列的免疫球蛋白重链和具有SEQ ID NO:11中所示氨基酸序列的免疫球蛋白轻链。

[0014] 在某些实施方案中,提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其包含:含有SEQ ID NO:35中所示氨基酸序列的免疫球蛋白重链可变区和含有SEQ ID NO:5中所示氨基酸序列的免疫球蛋白轻链可变区,其中所述抗体或其抗原结合片段能够特异性结合至:

[0015] 包含 $\text{Fuc}_4(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNac})_2$ [I]或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNac}]_2$ [II]的双触角 Le^B/Le^B 抗原,

[0016] 包含 $\text{Fuc}_4(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNac})_2$ [III]或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNac}]_2$ [IV]的双触角 Le^Y/Le^Y 抗原,

[0017] 包含 $\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNac})[\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNac})]$ [V]或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNac}][\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNac}]$ [VI]的双触角 Le^B/Le^Y 抗原,

[0018] 和包含 $\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNac})[\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNac})]$ [VII]或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNac}][\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNac}]$

[0019] [VIII]的双触角 Le^Y/Le^B 抗原,

[0020] 并且其中所述抗体或其抗原结合片段不特异性结合至:包含 $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNac}$ [IX]的单触角 Le^X 抗原、或包含 $[\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNac}]_2$ [X]的双触角 Le^X 抗原、或包含 $\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNac}$ [XI]的单触角 Le^A 抗原、或包含 $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNac}$ [XII]的单触角2型H抗原、或包含 $(\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNac})_2$ [XIII]的双触角2型H抗原、或包含 $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNac}$ [XIV]的单触角1型H抗原。

[0021] 在某些实施方案中,提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其包含:(a)免疫球蛋白重链可变区,其包含重链互补决定区1(VH CDR1)、重链互补决定区2(VH CDR2)、重链互补决定区3(VH CDR3),所述重链互补决定区1(VH CDR1)包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序

列,所述重链互补决定区2(VH CDR2)包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列,所述重链互补决定区3(VH CDR3)包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列;和(b)免疫球蛋白轻链可变区,其包含轻链互补决定区1(VL CDR1)、轻链互补决定区2(VL CDR2)和轻链互补决定区3(VL CDR3),所述轻链互补决定区1(VL CDR1)包含SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列,所述轻链互补决定区2(VL CDR2)包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列,所述轻链互补决定区3(VL CDR3)包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列;其中所述抗体或其抗原结合片段能够特异性结合至:

[0022] 包含 $\text{Fuc}_4(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc})_2$ [I]或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}]_2$ [II]的双触角 Le^B/Le^B 抗原,

[0023] 包含 $\text{Fuc}_4(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc})_2$ [III]或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}]_2$ [IV]的双触角 Le^Y/Le^Y 抗原,

[0024] 包含 $\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc})[\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc})]$ [V]或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}][\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}]$ [VI]的双触角 Le^B/Le^Y 抗原,

[0025] 和包含 $\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc})[\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc})]$ [VII]或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}][\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}]$

[0026] [VIII]的双触角 Le^Y/Le^B 抗原,

[0027] 并且其中所述抗体或其抗原结合片段不特异性结合至:包含 $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNAc}$ [IX]的单触角 Le^X 抗原、或包含 $[\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNAc}]_2$ [X]的双触角 Le^X 抗原、或包含 $\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}$ [XI]的单触角 Le^A 抗原、或包含 $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ [XII]的单触角2型H抗原、或包含 $(\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc})_2$ [XIII]的双触角2型H抗原、或包含 $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}$ [XIV]的单触角1型H抗原

[0028] 在本文中所述的某些实施方案中,分离的抗体可以是单克隆抗体。在某些实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段是人源化抗体。在某些实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段选自Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段、单链Fv(scFv)抗体和双特异抗体(a diabody)。

[0029] 本文还提供了以下实施方案:其中分离的抗体或其抗原结合片段包含免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,所述免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:35中所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:5中所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,其中所述抗体或其抗原结合片段能够特异性结合至:

[0030] 包含 $\text{Fuc}_4(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc})_2$ [I]或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}]_2$ [II]的双触角 Le^B/Le^B 抗原,

[0031] 包含 $\text{Fuc}_4(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc})_2$ [III]或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}]_2$ [IV]的双触角 Le^Y/Le^Y 抗原,

[0032] 包含 $\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc})[\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc})]$ [V]或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}][\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}]$ [VI]的双触角 Le^B/Le^Y 抗原,

[0033] 和包含 $\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc})[\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc})]$ [VII]或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}][\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}]$

[0034] [VIII]的双触角Le^Y/Le^B抗原,

[0035] 并且其中所述抗体或其抗原结合片段不特异性结合至:包含Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAc[IX]的单触角Le^X抗原、或包含[Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAc]₂[X]的双触角Le^X抗原、或包含Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc[XI]的单触角Le^A抗原、或包含Fucα1-2Galβ1-4GlcNAc[XII]的单触角2型H抗原、或包含(Fucα1-2Galβ1-4GlcNAc)₂[XIII]的双触角2型H抗原、或包含Fucα1-2Galβ1-3GlcNAc[XIV]的单触角1型H抗原。

[0036] 在某些实施方案中,本公开提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其包含(a)免疫球蛋白重链可变区,其包含重链互补决定区1(VH CDR1)、重链互补决定区2(VH CDR2)、重链互补决定区3(VH CDR3),所述重链互补决定区1包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列;所述重链互补决定区2(VH CDR2)包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列;所述重链互补决定区3(VH CDR3)包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列;和(b)免疫球蛋白轻链可变区,其包含轻链互补决定区1(VL CDR1)、轻链互补决定区2(VL CDR2)和轻链互补决定区3(VL CDR3),所述轻链互补决定区1(VL CDR1)包含SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列;所述轻链互补决定区2(VL CDR2)包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列;所述轻链互补决定区3(VL CDR3)包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0037] 在某些其它实施方案中,提供了根据本公开的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含如下(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)或(vi)、或它们的任意组合:(i)包含SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列的变体的VH CDR1,其中变异由根据Kabat编号在第33位处的Y→A取代组成;(ii)包含SEQ ID NO:4中所示氨基酸序列的变体的VH CDR3,其中变异由根据Kabat编号在第104位处的Y→A取代组成;(iii)包含SEQ ID NO:4中所示氨基酸序列的变体的VH CDR3,其中变异由根据Kabat编号在第106位处的H→A取代组成;(iv)包含SEQ ID NO:6中所示氨基酸序列的变体的VL CDR1,其中变异由根据Kabat编号在第30位处的Y→A取代组成;(v)包含SEQ ID NO:7中所示氨基酸序列的变体的VL CDR2,其中变体由根据Kabat编号在第50位处的G→A取代组成;或(vi)包含SEQ ID NO:8中所示氨基酸序列的变体的VL CDR3,其中变异由根据Kabat编号在第93位处的T→S取代组成。

[0038] 在某些其它实施方案中,提供了分离的抗体或抗原结合片段,其包含如本文中所述的互补决定区(CDR)(即,分别与SEQ ID NO:2、3、4、6、7和8具有至少90%同一性的CDR,其包括具有本文中所述氨基酸取代的那些CDR变体),并且包含免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,所述免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:35中所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或

由与SEQ ID NO:35中所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列组成,所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:5中所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由与SEQ ID NO:5中所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列组成。

[0039] 在本文所述的任意实施方案中,与“BBC”抗体相比,分离的抗体或其抗原结合片段、或包含本公开的抗体或抗原结合片段的抗体药物缀合物可以展现出与单触角Lewis B抗原或单触角Lewis Y抗原的减少的(例如,如使用本领域接受的方法确定的以统计学显著的方式的降低)结合(包括,在某些实施方案中,不结合),如本文中所公开的,所述“BBC”抗体包含具有SEQ ID NO:27中所示氨基酸序列的VL结构域和具有SEQ ID NO:28中所示氨基酸序列的VH结构域。单价Lewis B是在正常人组织中表达的血型抗原;因此,与BBC抗体相比,本发明所公开的抗体、抗原结合片段和抗体药物缀合物对癌症抗原具有改善的特异性,并且与在正常人组织中表达的单触角Lewis B抗原的结合减少。在某些实施方案中,与结合至单触角Lewis B抗原相比,本文中所公开的抗体、抗原结合片段或抗体药物缀合物在与根据本文中式[I]-[VIII]中的任意一个或多个的细胞表面表达的抗原结合中具有1倍、2倍、3倍、5倍、6倍、7倍、8倍或更大的增加。

[0040] 在某些实施方案中,抗体、抗原结合片段或抗体药物缀合物以BR96亲和力的1/10、1/9、1/8、1/7、1/6、1/5、1/4、1/3或1/2(例如如在ELISA结合测定中所测量的)与单触角Lewis B抗原结合。

[0041] 在本文中所描述的任意实施方案中,与BR96相比,分离的抗体或其抗原结合片段、或包含本公开的抗体或抗原结合片段的抗体药物缀合物结合与由抗体BR96识别的单触角Le^Y抗原不同的抗原,并且可以根据非限制性理论允许在治疗应用中更安全和更特异性地靶向癌细胞。在本文中所描述的任意实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段、或包含本公开的抗体或抗原结合片段的抗体药物缀合物与表达抗原的癌细胞结合,有效且稳定地内在化到此类细胞的溶酶体中,并且在非人灵长类动物模型中在治疗剂量下是安全耐受的。

[0042] 在另一方面,本公开提供了编码本文中所公开的抗体或其抗原结合片段的分离的多核苷酸。在某些实施方案中,多核苷酸经密码子优化以在宿主细胞中表达。在某些相关实施方案中,提供了包含编码本文中所公开的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸的重组载体。在某些实施方案中,重组载体包含与编码抗体或其抗原结合片段的多核苷酸可操作地连接的表达控制序列。在具体的实施方案中,重组载体是表达载体,其中表达控制序列包含启动子。

[0043] 在另一个实施方案中,提供了包含本公开的重组和/或表达载体的宿主细胞。在某些其它实施方案中,提供了产生本文中所公开的抗体或其抗原结合片段的相关方法,所述抗体或其抗原结合片段能够特异性结合至:

[0044] 包含Fuc₄(Galβ1→3GlcNAc)₂[I]或[Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc]₂[II]的双触角Le^B/Le^B抗原,

[0045] 包含Fuc₄(Galβ1→4GlcNAc)₂[III]或[Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc]₂[IV]的双触角Le^Y/Le^Y抗原,

[0046] 包含Fuc₂(Galβ1→3GlcNAc)[Fuc₂(Galβ1→4GlcNAc)][V]或[Fucα1-2Galβ1-3(Fuc

$\alpha 1-4$)GlcNAc][Fuc $\alpha 1-2$ Gal $\beta 1-4$ (Fuc $\alpha 1-3$)GlcNAc][VI]的双触角Le^B/Le^Y抗原,

[0047] 和包含Fuc₂(Gal $\beta 1-4$ GlcNAc)[Fuc₂(Gal $\beta 1-3$ GlcNAc)][VII]或[Fuc $\alpha 1-2$ Gal $\beta 1-4$ (Fuc $\alpha 1-3$)GlcNAc][Fuc $\alpha 1-2$ Gal $\beta 1-3$ (Fuc $\alpha 1-4$)GlcNAc]

[0048] [VIII]的双触角Le^Y/Le^B抗原,

[0049] 并且其中所述抗体或其抗原结合片段不特异性结合至:包含Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ (Fuc $\alpha 1 \rightarrow 3$)GlcNAc[IX]的单触角Le^X抗原、或包含[Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ (Fuc $\alpha 1 \rightarrow 3$)GlcNAc]₂[X]的双触角Le^X抗原、或包含Gal $\beta 1-3$ (Fuc $\alpha 1-4$)GlcNAc[XI]的单触角Le^A抗原、或包含Fuc $\alpha 1-2$ Gal $\beta 1-4$ GlcNAc[XII]的单触角2型H抗原、或包含(Fuc $\alpha 1-2$ Gal $\beta 1-4$ GlcNAc)₂[XIII]的双触角2型H抗原、或包含Fuc $\alpha 1-2$ Gal $\beta 1-3$ GlcNAc[XIV]的单触角1型H抗原,其中所述方法包括:在足以由宿主细胞表达编码所述抗体或其抗原结合片段的多核苷酸的条件和时间下培养所述的宿主细胞,从而获得包含所述抗体或其抗原结合片段的培养物;和从所述培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

[0050] 在另一个实施方案中,提供了包含本公开的分离的抗体或其抗原结合片段的抗体缀合物以及与其连接的有效载荷分子。在某些实施方案中,有效载荷分子通过连接子与所述抗体或其抗原结合片段共价连接。在某些实施方案中,所述连接子选自可切割连接子和不可切割连接子。在某些实施方案中,所述可切割连接子是蛋白酶敏感性连接子、pH敏感性连接子或谷胱甘肽敏感性连接子。在某些实施方案中,所述可切割连接子是包含缬氨酸-瓜氨酸二肽的蛋白酶敏感性连接子。在一些实施方案中,所述连接子包含马来酰亚胺基团。在某些实施方案中,本文中所公开的抗体或其抗原结合片段在铰链区中包含还原的二硫桥键,并且所述还原的二硫桥键与马来酰亚胺基团偶联。本文还提供了以下实施方案:其中所述连接子还包含自拆解基团,诸如例如对氨基苯甲醇(PABC)。在某些实施方案中,抗体缀合物包含本文中所公开的抗体或抗原结合片段以及有效载荷分子,所述有效载荷分子选自治疗剂和可检测的指示剂。在某些实施方案中,所述有效载荷分子是治疗剂,其选自:靶向微管蛋白的抗有丝分裂剂、基于肽的毒素、吡咯并苯并二氮杂(PBD)二聚体、抗生素、嘧啶合成抑制剂、抗代谢物、DNA烷化剂和拓扑异构酶抑制剂。在某些实施方案中,所述有效载荷分子选自美登木素生物碱(maytansinoid)、澳瑞他汀(an auristatin)、阿霉素、加利车霉素、PBD二聚体、一甲基澳瑞他汀E(MMAE)和一甲基澳瑞他汀F(MMAF)。在某些其它实施方案中,所述有效载荷分子是可检测的指示剂。在某些其它实施方案中,所述可检测的指示剂选自:放射性核素、染料、放射性金属、荧光部分、MRI造影剂、微泡、碳纳米管、金颗粒、氟脱氧葡萄糖、酶、发色团和不透射线标志物。在具体的实施方案中,所述可检测的指示剂是选自以下的放射性核素:⁶⁸Ga、⁶⁴Cu、⁸⁶Y、⁸⁹Zr、¹²⁴I、^{99m}Tc、¹²³I、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、¹³¹I、⁷⁶Br、⁷⁸Zr、¹⁸F和¹²⁴T。在某些实施方案中,所述抗体缀合物包含以下的放射性核素螯合剂:马来酰亚胺标记的DOTA、N-羟基琥珀酰亚胺-DOTA和去铁胺(DFO)。

[0051] 本文还提供了药物组合物,并且在一些实施方案中,包含本文中所公开的分离的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物和药物载体。

[0052] 在某些实施方案中,本公开还提供了治疗或检测方法,其包括使用本发明所公开的抗体、抗原结合片段和/或抗体缀合物。在一些实施方案中,提供了治疗或检测癌症的方法,其中所述方法包括向有需要的对象施用如本文中所公开的药物组合物。在某些实施方案中,对象对象患有或疑似患有选自以下的癌症:胃癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌、淋巴瘤、肝

癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、子宫癌和鳞状细胞癌。在某些实施方案中,癌症选自:胃腺癌、粘液性胃腺癌、未分化的胃腺癌、印戒细胞胃癌、结肠腺癌、浸润性乳腺导管癌、肝细胞癌、肺腺癌、鳞状细胞癌、转移性淋巴结腺癌、粘液性卵巢腺癌、胰腺导管腺癌、胰腺乳头状腺癌、前列腺腺癌和子宫内膜样癌。在某些实施方案中,提供了方法,其包括通过选自以下的途径向对象施用本发明所公开的组合物(例如,包含本文中所公开的抗体或其抗原结合片段):静脉内、肠胃外、胃内、胸膜内、肺内、直肠内、皮内、腹膜内、瘤内、皮下、口服、局部、经皮、脑池内、鞘内、鼻内和肌内。在本发明所公开的用于检测或治疗癌症的方法的某些其它实施方案中,所述对象正在接受或先前已经接受:(a) 免疫抑制疗法;(b) 刺激性免疫检查点分子;(c) 放射疗法;(d) 化学疗法;(e) 细胞免疫疗法;或(f) (a) - (e) 的任意组合。

[0053] 通过参考以下详细描述和附图,本公开的这些和其它方面和实施方案将变得显而易见。本文中所公开的所有参考文献在此通过引用整体并入,如同各自单独并入一样。

[0054] 附图的几种视图的简要描述

[0055] 图1显示了本发明所公开的“BBC”抗体重链可变区(SEQ ID NO:28)与所选择的候选人受体氨基酸序列(1-8;分别对应于SEQ ID NO:44-51)的多氨基酸序列比对。第3行(虚线框)显示了选择用于CDR移植的人受体序列。在该图的中间部分,单加框氨基酸(V/I/M)是人受体序列中的稀有甲硫氨酸;在人源化过程中,该残基被更常见的异亮氨酸取代。

[0056] 图2A显示了IMH2/BBC抗体(SEQ ID NO:27)和人源化变体:hBBC.8(SEQ ID NO:31);hBBC.9和hBBC.9.1(SEQ ID NO:33);以及hBBC.10、hBBC.10.1和hBBC.10.1FQ(SEQ ID NO:5)的轻链(LC)可变区序列的氨基酸序列比对。hBBC CDR序列以框(虚线)表示,并且人受体CDR序列用下划线标出。在该图的底部,两个单加框氨基酸残基(R/G和Y/F)显示了框架区序列的差异。图2B显示了在AGS细胞结合测定中BBC抗体、hBBC.8抗体、具有R66G取代突变的hBBC.8抗体,hBBC.9抗体和hBBC.10抗体的相对活性。具有F71Y突变的hBBC-LC代表hBBC.9。具有F71Y和R66G突变的hBBC-LC代表hBBC.10。图2C-图2E显示了其它产生的变体抗体针对AGS细胞(2C)的结合特异性,以及与合成的单触角Le^B抗原相比,其它产生的变体抗体针对AGS细胞(2D、2E)的结合特异性。

[0057] 图3提供了hBBC.10.1抗体(SEQ ID NO:38)、hBBC.10.1FQ抗体(SEQ ID NO:39)和两种FDA批准的人源化治疗性抗体(参照1和参照2)(分别为SEQ ID NO:40和41)在重链构架3区内的序列比对。

[0058] 图4A和图4B显示了未结合的级分(4A)和BBC结合(洗脱的)级分(4B)中COLO 205GSL细胞的Fuc₄(LacNAc)₃Lac在m/z 2521处的MALDI-MSMS测序。在图4A-图7B中,聚糖描述如下:空心圆=Gal;实心圆=Glc;实心正方形=GlcNAc;闭合三角形=Fuc。在图8A-图8B中使用相同的约定,不同之处在于实心圆=Man。

[0059] 图5A和图5B分别显示了(A)NCI-N87 GSL细胞和(B)SW1116GSL细胞的BBC结合(底部)聚糖和非结合(顶部)聚糖的MALDI-MS图谱。

[0060] 图6A和图6B显示了BBC结合(洗脱的)级分中NCI-N87 GSL细胞(6A)和SW1116 GSL细胞(6B)的Fuc₄(LacNAc)₃Lac在m/z 2521处的MALDI-MSMS测序。

[0061] 图7A和图7B提供了BBC结合(洗脱的)级分中NCI-N87 GSL细胞的Fuc₄(LacNAc)₃Lac和Fuc₆(LacNAc)₅Lac在m/z 2970(7A)和m/z 3767(7B)处的MALDI-MSMS测序。

[0062] 图8A和图8B显示了富含BBC的AGS N-聚糖的MALDI-Q/TOF MS/MS测序。

[0063] 图9A和图9B分别显示了聚糖抗原(A)Le^Y-戊糖和(B)Le^B-戊糖与hBBC.10.1抗体的ITC滴定图。

[0064] 图10A-图10C显示了另外的聚糖抗原与hBBC.10.1抗体的ITC滴定图:(A)Le^Y/Le^Y-ASGA;(B)Le^Y/Le^Y-I抗原;(C)Le^Y/Le^B-I抗原。

[0065] 图11A-图11F显示了其它聚糖抗原与hBBC.10.1抗体的ITC滴定图:(A)Le^X-四糖;(B)Le^A-四糖;(C)I型H抗原;(D)II型H抗原;(E)H-ASGP;(F)Le^X/Le^X-ASGP。

[0066] 图12A-图12C提供了聚糖抗原与参照抗体“BR96”的ITC滴定图:(A)Le^Y-戊糖;(B)Le^Y/Le^Y-I抗原,和(C)Le^Y/Le^Y-ASGP。

[0067] 图13A和图13B显示了针对所示聚糖抗原的hBBC.10.1和BR96的表面等离子共振(SPR)传感图:(A)Le^Y-Gal和Le^Y/Le^Y-ASGA;(B)Le^B-Gal和Le^B/Le^B-ASGA。

[0068] 图14A和图14B显示了在指定浓度下与包被的Lewis抗原结合的hBBC.10.1的间接ELISA的结果:(A)Le^Y/Le^Y-ASGA-生物素;(B)Le^Y-Gal-生物素。

[0069] 图15显示了在指定浓度下与包被的Lewis抗原(Le^B/Le^B-ASGA相对于Le^Y/Le^Y-ASGA和Le^B-Gal)结合的hBBC.10.1的间接ELISA结果。

[0070] 图16A显示了hBBC.10.1与聚糖抗原的抗原结合ELISA结果,所述聚糖抗原包括Le^Y-Gal-sp3-生物素(Le^Y-Gal)、Le^B-Gal-LC-生物素(Le^B-Gal)、Le^Y/Le^Y-ASGA-生物素(Le^Y/Le^Y-ASGA)、Le^B/Le^B-ASGA-生物素(Le^B/Le^B-ASGA)、3-Le^Y/6-Le^B-ASGA-生物素(Le^Y/Le^B-ASGA)和3-Le^B/6-Le^Y-ASGA-生物素(Le^B/Le^Y-ASGA)。所有抗原的包被量相同(1.87pmole)。图16B和图16C分别显示了来自抗原结合ELISA实验的结果,其比较了(16B)BBC抗体和(16C)hBBC.10.1抗体对抗原的亲合力和选择性。

[0071] 图17提供了荧光显微镜图像,其显示了AGS胃癌细胞对hBBC.10.1的内吞作用。左图:通过Alexa488缀合的抗人IgG染色的hBBC.10.1(绿色通道)。右图:叠加有用鬼笔环肽若丹明标记的F-肌动蛋白的染色(红色通道)。其中荧光素和若丹明共分布的区域在显微镜下显示为黄色,并且在合并图像中显示为共定位的荧光信号。

[0072] 图18提供了荧光显微镜图像,其显示了hBBC.10.1在AGS胃癌细胞中的溶酶体定位。左图:通过Alexa488缀合的抗人IgG染色的hBBC.10.1(绿色通道)。中间图:用抗Lamp-1抗体标记,然后通过抗兔IgG标记的溶酶体(红色通道)。右图:合并。

[0073] 图19A和图19B显示了在体内异种移植实验中hBBC.10.1的抗肿瘤活性,其中向免疫缺陷的SCID小鼠施用(A)人DLD-1肿瘤细胞或(B)COLO 205肿瘤细胞,然后一旦肿瘤形成就施用抗体。

[0074] 图20A和图20B分别显示了在体内异种移植实验中各种浓度的(A)hBBC.10.1和(B)BR96的抗肿瘤活性,其中向免疫缺陷SCID小鼠施用人AGS胃癌腺癌细胞,然后一旦肿瘤形成就施用抗体。图20C和图20D显示了本公开的hBBC抗体在体内异种移植实验中的抗肿瘤活性。

[0075] 图21显示了在各种抗体浓度下,hBBC.10.1(“hBBC”)和BR96直接杀伤AGS肿瘤细胞。以用碘化丙啶(PI)染色的靶细胞的百分比来测量杀伤率。

[0076] 图22显示了在体内异种移植实验中hBBC.10.1(“hBBC”)和BR96的抗肿瘤活性,其中向免疫缺陷SCID小鼠施用人TSGH 9201胃癌细胞,然后一旦肿瘤形成就施用抗体。

[0077] 图23显示了在体内异种移植实验中各种浓度的hBBC.10.1(“hBBC”)的抗肿瘤活

性,其中向免疫缺陷SCID小鼠施用人COLO 201结肠直肠腺癌细胞,然后一旦肿瘤形成就施用抗体。

[0078] 图24A和图24B显示了在体内异种移植实验中(A)hBBC.10.1(“hBBC”)和(B)BR96的抗肿瘤活性,其中向免疫缺陷SCID小鼠施用人COLO 201结肠直肠腺癌细胞,然后一旦肿瘤形成就施用抗体。

[0079] 序列简述

[0080] SEQ ID NO:1是抗体hBBC.10.1FQ的重链可变(VH)结构域的氨基酸序列:

[0081] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSGYTWHWIRQHPGKGLEWLG YIHYTGNTKYSPSLKSR
LSISRDTSKNTFYLMNSLTEDTAVYYCGREALRGYD AGFWFTYWGQGLVTV。

[0082] SEQ ID NO:2是抗体IMH2/BBC、抗体hBBC.8、抗体hBBC.9、抗体hBBC.9.1、抗体hBBC.10、抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的重链互补决定区1(VH CDR1)的氨基酸序列:

[0083] SGYTW。

[0084] SEQ ID NO:3是抗体hBBC.9.1、抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的VH CDR2的氨基酸序列:

[0085] YIHYTGNTKYSPSLKS。

[0086] SEQ ID NO:4是抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的VH CDR3的氨基酸序列:

[0087] EALRGYDAGFWFTY。

[0088] SEQ ID NO:5是抗体hBBC.10、抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的轻链可变(VL)结构域的氨基酸序列:

[0089] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCTASEDIYNRLTWYQQKPGKVPRLISGAT SLDTGVPSRFSGSGS
GTDYTLTISSLQPEDVATYYCQQYWTPWTFGQGTKLEI K。

[0090] SEQ ID NO:6是抗体IMH2/BBC、抗体hBBC.8、抗体hBBC.9、抗体hBBC.9.1、抗体hBBC.10、抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的轻链互补决定区1(VL CDR1)的氨基酸序列:

[0091] TASEDIYNRLT。

[0092] SEQ ID NO:7是抗体IMH2/BBC、抗体hBBC.8、抗体hBBC.9、抗体hBBC.9.1、抗体hBBC.10、抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的VL CDR2的氨基酸序列:

[0093] GATSLDT。

[0094] SEQ ID NO:8是抗体IMH2/BBC、抗体hBBC.8、抗体hBBC.9、抗体hBBC.9.1、抗体hBBC.10、抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的VL CDR3的氨基酸序列:

[0095] QQYWTPWT。

[0096] SEQ ID NO:9是在[VL-VH]方向上衍生自抗体hBBC.10.1的单链可变区片段(scFv)的氨基酸序列:

[0097] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCTASEDIYNRLTWYQQKPGKVPRLISGAT SLDTGVPSRFSGSGS
GTDYTLTISSLQPEDVATYYCQQYWTPWTFGQGTKLEI K (GGGS)_x QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGY
SITSGYTWHWIRQHPGKGL EWLGYIHYTGNTKYSPSLKSRLSISRDTSKNQFFLKLSSVTEDTAVYYCGREAL
RGYDAGFWFTYWGQGLVTV,其中“x”可以是括号中所示的序列GGGS的1、或2、3、4、5、6、7、8、9、
10个或更多个重复。

[0098] SEQ ID NO:10是抗体hBBC.10.1的全长重链(HC)的氨基酸序列:

[0099] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSGYTWHWIRQHPGKGLEWLG YIHYTGNTKYSPSLKSRL

SISRDTSKNQFFLKLSSVTTEDTAVYYCGREALRGYDAGFWFTYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK。

[0100] SEQ ID NO:11是抗体hBBC.10、抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的全长轻链(LC)的氨基酸序列:

[0101] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCTASEDIYNRLTWYQQKPGKVPRLGISGATSLDTGVPSRFSGSGSG
TDYTLTISSLQPEDVATYYCQQYWTTPTWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC。

[0102] SEQ ID NO:12是编码抗体hBBC.10.1的重链可变(VH)结构域的核苷酸序列:

[0103] Caggtgcagctgcaggaaagcgccggcctggtgaaaccgagccagacctgagcctgacctgcac
cgtgagcggctatagcattaccagcggctatacctggcattggattcgccagcatccgggcaaaggcctggaatg
ctgggctatattcattataccggcaacaccaaataatagcccgagcctgaaaagccgctgagcattagccgcgata
ccagcaaaaaccagttcttctgaaactgagcagcgtgaccaccgaagataccgcggtgtattattgcggccgcga
agcgctgcgcggctatgatgctggcttctggtttacctattggggccaaggcaccctggtgaccgtg。

[0104] SEQ ID NO:13是编码抗体IMH2/BBC、抗体hBBC.8、抗体hBBC.9、抗体hBBC.9.1、抗
体hBBC.10、hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的重链互补决定区1(VH CDR1)的核苷酸序列:

[0105] agcggctatacctggcat。

[0106] SEQ ID NO:14是编码抗体hBBC.9.1、抗体hBBC.10和抗体hBBC.10.1FQ的VH CDR2
的核苷酸序列:

[0107] tatattcattataccggcaacaccaaataatagcccgagcctgaaaagc。

[0108] SEQ ID NO:15是编码抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的VH CDR3的核苷酸序
列:

[0109] gaagcgctgcgcggctatgatgctggcttctggtttacctat。

[0110] SEQ ID NO:16是编码抗体hBBC.10、抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的轻链可
变(VL)结构域的核苷酸序列:

[0111] gatattcagatgaccagagcccgagcagcctgagcgcgagcgtggcgcatcgctgaccattacctg
caccgcgagcgaagatatattataaccgcctgacctggtatcagcagaaaccgggcaaagtgccgcgtctgctgatt
tctggcgcgaccagcctggataccggcgctgccgagccgcttttagcggcagcggcagcggcaccgattacacctga
ccattagcagcctgcagccgaagatgtggcgacctattattgccagcagatttgaccaccccgctggacctttgg
ccagggcaccaaactggaaattaaa。

[0112] SEQ ID NO:17是编码抗体IMH2/BBC、抗体hBBC.8、抗体hBBC.9、抗体hBBC.9.1、抗
体hBBC.10、抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的轻链互补决定区1(VL CDR1)的核苷酸序
列:

[0113] accgcgagcgaagatatattataaccgcctgacc。

[0114] SEQ ID NO:18是编码抗体IMH2/BBC、抗体hBBC.8、抗体hBBC.9、抗体hBBC.9.1、抗
体hBBC.10、抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的VL CDR2的核苷酸序列:

[0115] ggcgcgaccagcctggatacc。

[0116] SEQ ID NO:19是编码抗体IMH2/BBC、抗体hBBC.8、抗体hBBC.9、抗体hBBC.9.1、抗体hBBC.10、抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的VL CDR3的核苷酸序列：

[0117] cagcagtattggaccacccgtggacc。

[0118] SEQ ID NO:20是编码在[VL-(L)-VH]方向上衍生自抗体hBBC.10.1的单链可变区片段(scFv)的核苷酸序列：

[0119] gatattcagatgaccagagcccgagcagcctgagcgcgagcgtggcgatcgcgtagcattacctg
caccgcgagcgaagatatattataaccgcctgacctggtatcagcagaaaccgggcaaagtgccggtctgctgatt
tctggcgcgaccagcctggataccggcggtgccgagccgcttttagcggcagcggcagcgccaccgattacacccctga
ccattagcagcctgcagccggaagatgtggcgacctattattgccagcagtagtgaccaccccggtggacctttgg
ccagggcaccaaactggaaattaaa (ggtaggagcggttct)_xcaggtgcagctgcaggaaagcgcccg gcct
ggtgaaaccgagccagaccctgagcctgacctgcacctgagcggtatagcattaccagcggtataacctggcat
tggtatcgccagcatccgggcaaaggcctggaatggctgggtatattcattataccggcaacaccaaatatagcc
cgagcctgaaaagccgcctgagcattagccgcgataccagcaaaaaccagttcttctgaaactgagcagcgtgac
caccgaagataccgcggtgtattattgcgccgcgaagcgtgcgcggctatgatgctggcttctggtttacctat
tggggccaaggcaccctggtgacctg,

[0120] 其中“x”可以是括号中所示的序列ggtggagcggttct的1、或2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个重复。

[0121] SEQ ID NO:21是编码抗体hBBC.10.1的全长重链(HC)的核苷酸序列：

[0122] caggtgcagctgcaggaaagcgcccgccctggtgaaaccgagccagaccctgagcctgacctgcac
cgtgagcggtatagcattaccagcggtataacctggcatttgattcgccagcatccgggcaaaggcctggaatgg
ctgggctatattcattataccggcaacaccaaatatagccgagcctgaaaagccgcctgagcattagccgcgata
ccagcaaaaaccagttcttctgaaactgagcagcgtgaccaccgaagataccgcggtgtattattgcgccgcga
agcgtgcgcggctatgatgctggcttctggtttacctattggggccaaggcaccctggtgacctgtcgagcgct
tccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcgccctgggct
gcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggtgcacac
cttcccggtgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctgacctccagcagcttgggc
accagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaattctt
gtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcactgaactcctggggggaccgtcagttcttcttcccccc
aaaaccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagac
cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagt
acaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtg
caaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaacca
caggtgtacacctgcccccatcccggtatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggt
tctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccg
gtggtgactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtc
ttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaat
ga。

[0123] SEQ ID NO:22是编码抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的全长轻链(LC)的核苷

酸序列:

[0124] gatattcagatgacccagagcccgagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgctgaccattacctg
caccgcgagcgaagatatttataaccgcctgacctggtatcagcagaaaccgggcaaagtgccgcgtctgctgatt
tctggcgcgaccagcctggataccggcggtgccgagccgcttttagcggcagcggcagcggcaccgattacacctga
ccattagcagcctgcagccggaagatgtggcgacctattattgccagcagtattggaccaccccgctggacctttgg
ccagggcaccaaactggaaattaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcag
ttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaagg
tggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcct
cagcagcacccctgacgctgagcaaagcagactacagaaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggc
ctgagctcgcccgctcacaaagagcttcaacaggggagagtgttaa。

[0125] SEQ ID NO:23是说明性间隔区氨基酸序列EGKSSSGSGSESKVD。

[0126] SEQ ID NO:24是说明性间隔区氨基酸序列KESGSVSSEQLAQFRSLD。

[0127] SEQ ID NO:25是柔性多连接子氨基酸序列GGGS。

[0128] SEQ ID NO:26是柔性多连接子氨基酸序列GGGSGGGSGGGGS。SEQ ID NO:27是抗
体IMH2/BBC的VL结构域的氨基酸序列:

[0129] DIQMTQSSSSFSVSLGDRVITITCTASEDIYNRLTWYQQKPGNVPRLGISGAT SLDTGVPSPRFSGRS
GKDIALSITSLQTEDVATYYCQQYWTPWTFGGGTRLEI K。

[0130] SEQ ID NO:28是抗体IMH2/BBC的VH结构域的氨基酸序列:

[0131] DVQLQESGPD LVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYTHWIRQFPNGTLEWLG YIHYSNTKYSPSLKSR
LSVTRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCGREALRGYDH GFWFTYWGQGLVTV。

[0132] SEQ ID NO:29是人受体框架AAS01771.1的VL结构域的氨基酸序列:

[0133] DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAAS TLQSGVPSPRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDVATYYCQKYNSAPYTFGQGTKLEIK。

[0134] SEQ ID NO:30是人受体框架CAD89404.1的VH结构域的氨基酸序列:

[0135] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGISGAYYWSWIRQHPGKGLEWIG YIYSGTTYYNPSLKS
RLSMSRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGPYDSP RPFDPWGQGLVTV。

[0136] SEQ ID NO:31是抗体hBBC.8的VL结构域的氨基酸序列:

[0137] DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCTASEDIYNRLTWYQQKPGKVPRLGISGAT SLDTGVPSPRFSGRS
GTDFTLTISLQPEDVATYYCQQYWTPWTFGQGTKLEI K。

[0138] SEQ ID NO:32是抗体hBBC.8、抗体hBBC.9和抗体hBBC.10的VH结构域的氨基酸序
列:

[0139] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSGYTHWIRQHPGKGLEWLG YIHYSNTKYSPSLKSR
LSISRDTSKNQFFLKLSSVTEDTAVYYCGREALRGYD HGFWFTYWGQGLVTV。

[0140] SEQ ID NO:33是抗体hBBC.9和抗体hBBC.9.1的VL结构域的氨基酸序列:

[0141] DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCTASEDIYNRLTWYQQKPGKVPRLGISGAT SLDTGVPSPRFSGRS
GTDYTLTISLQPEDVATYYCQQYWTPWTFGQGTKLEI K。

[0142] SEQ ID NO:34是抗体hBBC.9.1的VH结构域的氨基酸序列:

[0143] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSGYTHWIRQHPGKGLEWLG YIHYTGNTKYSPSLKSR
LSISRDTSKNQFFLKLSSVTEDTAVYYCGREALRGAD HGFWFTYWGQGLVTV。

[0144] SEQ ID NO:35是抗体hBBC.10.1的VH结构域的氨基酸序列:

[0145] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSGYTHWIRQHPGKGLEWLG YIHYTGNTKYSPSLKSR
LSISRDTSKNQFFLKLSSVTTEDTAVYYCGREALRGYD AGFWFTYWGQGLTVTV。

[0146] SEQ ID NO:36是在[VH-VL]方向上衍生自抗体hBBC.10.1的单链可变区片段(scFv)的氨基酸序列:QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSGYTHWIRQHPGKGLEWLG YIHY TG
NTKYSPSLKSR LSISRDTSKNQFFLKLSSVTTEDTAVYYCGREALRGYDAGF WFTYWGQGLTVTV (GGGGS)_xDI
QMTQSPSSLSASVGDRTITCTASEDIYNRLT WYQQKPGKVPRL LISGATSLDTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISS
LQPEDVATYYC QQYWTTPWTFGQGTKLEIK,其中“x”可以是括号中所示的序列GGGGS的1或2、3、4、
5、6、7、8、9、10个或更多个重复。

[0147] SEQ ID NO:37是编码在[VH-(L)-VL]方向上衍生自抗体hBBC.10.1的单链可变区片段(scFv)的核苷酸序列:

[0148] caggtgcagctgcaggaaagcggcccgccgctggtgaaaccgagccagaccctgagcctgacctgcac
cgtgagcggctatagcattaccagcggctatacctggcattggattcgccagcatccgggcaaaggcctggaatgg
ctgggctatattcattataccggcaacaccaaataatagcccgagcctgaaaagccgctgagcattagccgcgata
ccagcaaaaaccagttcttctgaaactgagcagcgtgaccaccgaagataaccgcggtgtattattgcggccgcga
agcgtgcgcggctatgatgctggcttctggtttacctattggggccaaggcaccctggtgaccgtg (ggtgga
ggcggttct)_xgatattcagatgaccagagcccagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgctgaccatta
cctgcaccgcgagcgaagatatttataaccgcctgacctggtatcagcagaaaccgggcaaagtgccgcgtctgct
gatttctggcgcgaccagcctggataccggcggtgccgagccgcttttagcggcagcggcagcggcaccgattacacc
ctgaccattagcagcctgcagccggaagatgtggcgacctattattgccagcagtattggaccaccccggtggacct
ttggccagggcaccaaactggaaattaaa,

[0149] 其中“x”可以是括号中所示的序列ggtggaggcggttct的1或2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个重复。

[0150] 在所附的序列表中提供了这些序列和其它序列。

[0151] 详述

[0152] 本公开涉及人源化抗体及其抗原结合片段,其能够与在多种癌症上表达的某些Lewis抗原特异性结合。更具体地,如本文中首次描述并在下面更详细呈现的,本发明的嵌合人源化抗体出乎意料地以强的特异性与在癌细胞上表达的某些双触角Lewis^{B/Y}抗原结合,并且在体内具有强的抗肿瘤活性。另外,与包含具有SEQ ID NO:27中所示氨基酸序列的VL结构域和具有SEQ ID NO:28中所示氨基酸序列的VH结构域的BBC抗体相比,本发明所公开的抗体有利地具有令人惊讶地与单触角Lewis B抗原(其在健康组织中表达)减少(例如,以统计学上显著的方式降低)的结合。本文中所公开的抗体结合与抗体BR96所识别的单触角Le^Y抗原不同的抗原,并且不希望受理论束缚,本发明的抗体可以允许与BR96相比在治疗应用中更安全和更特异性地靶向癌细胞。此外,本公开的抗体和抗原结合片段还结合表达抗原的癌细胞,有效和稳定地内在化到此类细胞的溶酶体中,并且在非人灵长类动物模型中在治疗剂量下是安全耐受的。

[0153] 根据某些优选的实施方案并且进一步根据非限制性理论,本发明所公开的抗体及其抗原结合片段的有益用途涉及诊断和/或治疗癌症的方法,所述癌症诸如例如为各种胃癌、卵巢癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌和其它癌症。本文更详细地公开了这些实施方案和相关

的实施方案。

[0154] 多肽和蛋白质

[0155] 术语“多肽”、“蛋白质”和“肽”和“糖蛋白”可以互换使用并且是指不限于任何特定长度的氨基酸的聚合物。该术语不排除修饰,诸如十四烷基化、硫酸化、糖基化、磷酸化以及信号序列的添加或删除。术语“多肽”或“蛋白质”可以意指一条或多条氨基酸链,其中每条链包含通过肽键共价连接的氨基酸,并且其中所述多肽或蛋白质可以包含通过肽键非共价和/或共价连接在一起的多条链(其具有天然蛋白质的序列即,由天然存在的和特异性非重组的细胞,或基因工程化的或重组的细胞产生的蛋白质),并且包含具有天然蛋白的氨基酸序列的分子,或具有天然序列的一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代的分子。因此,“多肽”或“蛋白质”可以包含一条(被称为“单体”)或多条(被称为“多聚体”)氨基酸链。术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”具体包括本公开的抗体和抗原结合片段,或具有抗体或其抗原结合片段的一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代的序列。

[0156] 如本文中所使用的,“氨基酸”是指天然存在的氨基酸和合成的氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸,以及随后被修饰的那些氨基酸(例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸)。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即,与氢、羧基、氨基和R基团结合的 α -碳,例如,高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基硫。此类类似物具有经修饰的R基团(例如正亮氨酸)或经修饰的肽主链,但保持与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构,但以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的化学化合物。

[0157] 如本文中所使用的,“突变”是指分别与参比核酸分子或参考多肽分子、或与野生型核酸分子或野生型多肽分子相比,核酸分子或多肽分子的序列中的变化。突变可导致序列中几种不同类型的变化,其包括核苷酸或氨基酸的取代、插入或缺失。

[0158] 术语“多肽片段”是指具有天然存在的或重组产生的多肽的氨基末端缺失、羧基末端缺失和/或内部缺失或取代的多肽(其可以是单体的或多聚体的)。如本文中所使用的,“连续氨基酸”是指与所公开的氨基酸序列的不间断线性部分对应的共价连接的氨基酸。在某些实施方案中,多肽片段可以包含至少5至约500个氨基酸长的氨基酸链。应理解,在某些实施方案中,片段为至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、150、200、250、300、350、400或450个氨基酸长。

[0159] 本文中所指的术语“分离的蛋白质”和“分离的多肽”意指主题蛋白质或多肽(1) 不含通常在自然界中发现的至少一些其它蛋白质或多肽,(2) 基本上不含来自相同来源(例如来自相同物种)的其它蛋白质或多肽,(3) 由来自不同物种的细胞表达,(4) 已经与与其在自然界中相关的多核苷酸、脂质、碳水化合物或其它材料的至少约50%分离,(5) 与蛋白质或多肽的部分不相关(通过共价或非共价相互作用),所述蛋白质或多肽的部分与“分离的蛋白质”或“分离的多肽”可以在自然界中相关,(6) 与多肽可操作地相关(通过共价或非共价相互作用),所述多肽与所述多肽在自然界中不相关,或(7) 在自然界中不存在。此类分离的蛋白质或多肽可以由基因组DNA、cDNA、mRNA或其它RNA编码的,可以是根据用于人工肽和蛋白质合成的许多熟知化学中的任何一种的合成来源,或它们的任意组合。在某些实施方案

中,分离的蛋白质或多肽基本上不含在其天然环境中发现的干扰其用途(治疗性、诊断性、预防性、研究性等)的蛋白质或多肽或其它污染物。

[0160] 多肽可以在蛋白质的N-末端包含信号(或前导)序列,其共同翻译或翻译后指导蛋白质的转移。多肽也可以与连接子或其它序列框内融合或缀合,以易于多肽的合成、纯化或鉴定(例如,聚His),或增强多肽与固体支撑物的结合。如本文中所使用的,“融合蛋白”或“融合多肽”是指在单链中具有至少两个不同结构域的蛋白,其中所述结构域不是天然一起存在于蛋白质中。可以使用PCR、重组工程化等构建编码融合蛋白的多核苷酸,或可以合成此类融合蛋白。融合蛋白还可以含有其它组分,诸如标签、连接子或转导标志物。融合结构域多肽可以在N-末端和/或C-末端与多肽连接,并且如本领域技术人员所熟知的可以包括作为非限制性实例的免疫球蛋白衍生的序列(如Ig恒定区序列或其部分)、亲和标签(如His标签(例如,六聚组氨酸或其它聚组氨酸))、FLAGTM或myc或其他肽亲和标签、可检测的多肽部分(如绿色荧光蛋白(GFP)或其变体(例如,黄色荧光蛋白(YFP)、蓝色荧光蛋白(BFP)、其它水母发光蛋白或其衍生物等)或其它可检测的多肽融合结构域、酶或其部分(如谷胱甘肽-S-转移酶(GST))或其它已知的酶促检测和/或报告融合结构域等。本文讨论了另外的可检测部分。

[0161] 含半胱氨酸的肽可以被用作融合肽,其可以被连接到多肽(如本公开的抗体或其抗原结合片段)的N-末端和/或C-末端,以允许根据已建立的方法将此类多肽容易地组装成二硫键交联的二聚体、三聚体、四聚体或更高的多聚体。例如,含有包括能够形成链间二硫桥键的半胱氨酸残基的免疫球蛋白基因超家族成员衍生的序列的融合多肽是众所周知的,也是用于工程化S-S连接的多聚体的其它策略(例如Reiter等人,1994Prot.Eng.7:697;Zhu等人,1997Prot.Sci.6:781;Mabry等人,2010Mabs 2:20;Gao等人,1999Proc.Nat.Acad.Sci.美国96:6025;Lim等人,2010Biotechnol.Bioeng.106:27)。还考虑了用于将促进多聚体装配的肽序列作为融合结构域移植到所期望的多肽(如本文中所述的抗体和抗原结合片段)上的可替代方法(例如,Fan等人,2008,FASEB J.22:3795)。

[0162] 可以根据各种熟知的方法进行生物合成和/或化学的多肽修饰,并且还可以包括与载体蛋白(例如匙孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)或其它分子)的缀合,以及在固体支撑物上的共价或非共价固定。根据某些实施方案,考虑了与载体的化学或生物合成缀合用于产生相对于本文中所述的抗体或其抗原结合片段是多价的缀合物。

[0163] 还考虑了用可检测的指示剂部分(有时被称为报告部分)(如荧光团(例如FITC、TRITC、得克萨斯红等))进行可检测的标记。可以选择的用于特定目的的多种可检测的指示剂(包括比色指示剂)的实例描述于Haugland,2005The Handbook:A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies-第十版,Invitrogen Corp./Molecular ProbesTM,尤金,OR;Mohr,1999J.Mater.Chem.,9:2259-2264;Suslick等人,2004Tetrahedron 60:11133-11138;和美国专利第6,323,039号中。(还参见,例如,Fluka实验室产品目录(Fluka Laboratory Products Catalog),2001Fluka,密尔沃基市,WI;和Sigma生命科学研究目录(Sigma Life Sciences Research Catalog),2000,Sigma,圣路易斯,MO.)。可检测的指示剂可以是荧光指示剂、发光指示剂、磷光指示剂、辐射指示剂、染料、酶、酶的底物、能量转移分子或亲和标记。

[0164] 用于本文中所考虑的某些实施方案中的其它可检测指示剂包括亲和试剂,诸如抗

体、凝集素、免疫球蛋白Fc受体蛋白(例如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)蛋白A、蛋白G或其它Fc受体)、抗生物素蛋白、生物素、其它配体、受体或反受体或它们的类似物或模拟物等。对于此类亲和方法,可以制备用于免疫测定测量的试剂,诸如适当标记的抗体或凝集素,包括例如用放射性核素(例如, ^{76}Br 、 ^{78}Zr 、 ^{18}F)、用荧光团、用亲和标记、用生物素或生物素模拟序列标记的那些或制备为抗体-酶缀合物的那些(参见,例如,Weir,D.M., *Handbook of Experimental Immunology*,1986,Blackwell Scientific,波士顿;Scouten,W.H.,1987 *Methods in Enzymology* 135:30-65;Harlow和Lane, *Antibodies:A Laboratory Manual*,1988冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory),冷泉港,NY;Haugland, *Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*-第十版,2005Invitrogen Corp./Molecular ProbesTM,尤金,OR;Scopes,R.K., *Protein Purification:Principles and Practice*,1987,Springer-Verlag,NY;Hermanson,G.T.等人, *Immobilized Affinity Ligand Techniques*,1992,Academic Press,Inc.,NY;Luo等人,1998 *J.Biotechnol.* 65:225和其中引用的参考文献)。

[0165] 如果期望,肽连接子/间隔区序列也可以被用于将多种多肽组分分离足够的距离,以确保每种多肽折叠成其二级和/或三级结构。可以使用本领域熟知的标准技术将此类肽连接子序列掺入融合多肽中。

[0166] 某些肽间隔区序列可以例如基于以下选择:(1)它们采用柔性延伸构象的能力;(2)它们不能采用能够与第一多肽和第二多肽上的功能表位相互作用的二级结构的能力;和/或(3)缺乏可能与多肽功能表位反应的疏水或带电残基。在某些实施方案中,肽间隔区序列含有例如Gly、Asn和Ser残基。其它接近中性的氨基酸(如Thr和Ala)也可以被包括在间隔区序列中。可以被用作间隔区的其它氨基酸序列包括描述于以下中的那些:Maratea等人, *Gene* 40:39-46(1985);Murphy等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.美国* 83:8258-8262(1986);美国专利第4,935,233号和美国专利第4,751,180号。间隔区的其它说明性和非限制性实例可以包括,例如,Glu-Gly-Lys-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Glu-Ser-Lys-Val-Asp(SEQ ID NO:23)(Chaudhary等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.美国* 87:1066-1070(1990))和Lys-Glu-Ser-Gly-Ser-Val-Ser-Ser-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Phe-Arg-Ser-Leu-Asp(SEQ ID NO:24)(Bird等人, *Science* 242:423-426(1988))。

[0167] 在一些实施方案中,当第一多肽和第二多肽具有非必需N-末端氨基酸区域时,不需要间隔区序列,所述非必需N-末端氨基酸区域可以被用于分离功能结构域并防止空间干扰。两个编码序列可以直接融合而无需任何间隔区,或者通过使用由例如当存在于单次迭代中或重复1至5次或更多次或更多次(参见,例如,SEQ ID NO:26)时的五聚体Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(SEQ ID NO:25)组成的柔性多连接子直接融合。在某些说明性和非限制性的实施方案中,肽间隔区可以是1至5个氨基酸、5至10个氨基酸、5至25个氨基酸、5至50个氨基酸、10至25个氨基酸、10至50个氨基酸、10至100个氨基酸,或任何居间范围的氨基酸。在其它说明性实施方案中,肽间隔区包含约1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50个或更多个氨基酸长度。

[0168] 根据某些实施方案,还考虑了本文中所述的抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列修饰。修饰包括,例如,保守的和非保守的氨基酸取代。“保守取代”是指不显著影响或改变特定蛋白质的特定特性(例如,结合活性,如特异性结合活性)的氨基酸取代。通常,保守取

代是其中被取代的氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替换的取代。保守取代包括在以下组中的一个中发现的取代：第1组：丙氨酸 (Ala或A)、甘氨酸 (Gly或G)、丝氨酸 (Ser或S)、苏氨酸 (Thr或T)；第2组：天冬氨酸 (Asp或D)、谷氨酸 (Glu或Z)；第3组：天冬酰胺 (Asn或N)、谷氨酰胺 (Gln或Q)；第4组：精氨酸 (Arg或R)、赖氨酸 (Lys或K)、组氨酸 (His或H)；第5组：异亮氨酸 (Ile或I)、亮氨酸 (Leu或L)、甲硫氨酸 (Met或M)、缬氨酸 (Val或V)；和第6组：苯丙氨酸 (Phe或F)、酪氨酸 (Tyr或Y)、色氨酸 (Trp或W)。另外地或可替代地，氨基酸可以通过类似的功能、化学结构或组成 (例如酸性、碱性、脂肪族、芳香族或含硫) 分组为保守性取代组。例如，出于取代的目的，脂肪族分组可以包括Gly、Ala、Val、Leu和Ile。其它保守取代基团包括：含硫：Met和半胱氨酸 (Cys或C)；酸性：Asp、Glu、Asn和Gln；小脂肪族、非极性或非极性残基：Ala、Ser、Thr、Pro和Gly；极性、带负电荷的残基及其酰胺：Asp、Asn、Glu和Gln；极性、带正电荷的残基：His、Arg和Lys；大的脂肪族、非极性残基：Met、Leu、Ile、Val和Cys；以及大的芳香族残基：Phe、Tyr和Trp。另外的信息可以发现于Creighton (1984) *Proteins*, W.H.Freeman and Company。

[0169] 例如，可能期望改善抗体或其抗原结合片段的结合亲和力和/或其它生物学性质。可以例如通过将适当的核苷酸变化引入编码氨基酸序列变体的多核苷酸中或通过肽合成来制备所述氨基酸序列变体。此类修饰包括，例如，抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列中残基的缺失、和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任意组合以获得最终的抗体或抗原结合片段变体，条件是最终构建体具有所期望的特性 (例如，保持与本文中所述的双触角Lewis抗原的特异性结合，同时与本文中别处所述的单触角Le^X或Le^A或H抗原的不可检测地结合或显示与本文中别处所述的单触角Le^X或Le^A或H抗原的统计学显著降低的结合)。氨基酸变化也可以改变抗体或其抗原结合片段的翻译后过程，诸如改变糖基化位点的数目或位置。

[0170] 代表性抗体或其抗原结合片段的三维结构的确定可以通过常规方法进行，使得可以虚拟地模拟一个或多个氨基酸的所选择的天然或非天然氨基酸的取代、添加、缺失或插入，以确定如此衍生的结构变体是否保留了目前所公开的物种的空间填充性质。参见，例如，Donate等人，1994 *Prot. Sci.* 3:2378；Bradley等人，*Science* 309:1868-1871 (2005)；Schueler-Furman等人，*Science* 310:638 (2005)；Dietz等人，*Proc. Nat. Acad. Sci.*，美国，103:1244 (2006)；Dodson等人，*Nature* 450:176 (2007)；Qian等人，*Nature* 450:259 (2007)；Raman等人，*Science* 327:1014-1018 (2010)；Marcos等人，2017 *Science* 355:201，以及其中所引用的参考文献。可以被用于这些实施方案和相关实施方案 (如用于如本文中所提供的抗体和抗原结合片段的合理设计) 的计算机算法的一些另外的非限制性实例包括VMD，其是使用3-D图形和内置脚本显示、动画化和分析大型生物分子系统的分子可视化程序 (参见可用于这些及相关实施方案的计算机算法的一些其他非限制性示例，例如用于本文提供的抗体和抗原结合片段的合理设计，包括VMD，VMD是用于显示、动画化和使用3-D图形和内置脚本分析大型生物分子系统 (参见：伊利诺伊大学厄巴纳香槟分校理论和计算生物物理组 (the Theoretical and Computational Biophysics Group, University of Illinois at Urbana-Champaign) 的网站：ks.uiuc.edu/Research/vmd/)。)

[0171] 许多其它计算机程序在本领域中是已知的并且对于技术人员是可用的，并且它们允许从能量最小化的构象的空间填充模型 (范德华半径) 确定原子尺寸。GRID (其旨在确定

对不同化学基团的高亲和力区域,从而增强结合)、蒙特卡罗搜索(Monte Carlo searches)(其计算数学比对)和CHARMM(Brooks等人(1983) J.Comput.Chem.4:187-217)和AMBER(Weiner等人,(1981) J.Comput.Chem.106:765),它们评估力场的计算和分析(另参见:Eisenfield等人(1991) Am.J.Physiol.261:C376-386;Lybrand(1991) J.Pharm.Belg.46:49-54;Froimowitz(1990) Biotechniques 8:640-644;Burbam等人(1990) Proteins 7:99-111;Pedersen(1985) Environ.Health Perspect.61:185-190;和Kini等人,(1991) J.Biomol.Struct.Dyn.9:475-488)。各种合适的计算计算机程序也可商购获得,诸如从Schrödinger(德国慕尼黑)。

[0172] 抗体

[0173] 本发明的某些优选实施方案涉及抗体或其抗原结合片段,其特异性结合至:

[0174] 包含 $\text{Fuc}_4(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc})_2[\text{I}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}]_2[\text{II}]$ 的双触角 Le^b/Le^b 抗原,

[0175] 包含 $\text{Fuc}_4(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc})_2[\text{III}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}]_2[\text{IV}]$ 的双触角 Le^y/Le^y 抗原,

[0176] 包含 $\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc})[\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc})][\text{V}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}][\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}][\text{VI}]$ 的双触角 Le^B/Le^y 抗原,

[0177] 和包含 $\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc})[\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc})][\text{VII}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}][\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}]$

[0178] [VIII]的双触角 Le^y/Le^B 抗原,

[0179] 并且其中所述抗体或其抗原结合片段不特异性结合至:包含 $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNAc}[\text{IX}]$ 的单触角 Le^x 抗原、或包含 $[\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNAc}]_2[\text{X}]$ 的双触角 Le^x 抗原、或包含 $\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}[\text{XI}]$ 的单触角 Le^A 抗原、或包含 $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}[\text{XII}]$ 的单触角2型H抗原、或包含 $(\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc})_2[\text{XIII}]$ 的双触角2型H抗原、或包含 $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}[\text{XIV}]$ 的单触角1型H抗原,并且在某些其他特别优选的实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段不特异性结合至如本文中所述的某些其它双触角或单触角Lewis抗原。

[0180] 如本文中所使用的,术语“抗体”(Ab)包括单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性或三特异性抗体)、人源化抗体、嵌合抗体、异源缀合抗体和抗体片段,只要它们展现出所期望的生物活性,例如,保留与本发明所公开的双触角Lewis抗原特异性结合的能力。术语“免疫球蛋白”(Ig)在本文中可与“抗体”互换使用。

[0181] 碱性抗体单元是由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)组成的异四聚体糖蛋白。每条L链通过至少一个(并且通常是一个)共价二硫键与H链连接,而根据H链同种型,两条H链通过一个或多个二硫键彼此连接。每条H链和L链还具有规则间隔的链内二硫桥键。每条H链在N-末端具有可变结构域(V_H),其后为 α 和 γ 链中的每一个的三个恒定结构域(C_H)以及 μ 和 ϵ 同种型的四个 C_H 结构域。每条L链在N-末端具有可变结构域(V_L),其后为在它的另一端的恒定结构域(C_L)。 V_L 与 V_H 对齐,并且 C_L 与重链的第一恒定结构域(C_H1)对齐。据信特定的氨基酸残基在轻链可变结构域和重链可变结构域之间形成界面。 V_H 和 V_L 的配对一起形成单个抗原结合位点。

[0182] 基于它们的恒定结构域(C_L)的氨基酸序列,来自任何脊椎动物物种的L链可以被

指定为两种明显不同类型(被称为 κ 和 λ)中的一种。根据它们重链(C_H)恒定结构域的氨基酸序列,免疫球蛋白可以被指定为不同的类别或同种型。有五类免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其具有分别命名为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链。基于 C_H 序列和功能上相对较小的差异,将 γ 和 α 类进一步分成亚类,例如,人类表达以下亚类: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。应当理解,编码多种Ig同种型的哺乳动物将能够进行同种型类别转换。

[0183] IgM抗体由5个碱性异四聚体单元以及另一个被称为J链的多肽组成,因此含有10个抗原结合位点,而分泌的IgA抗体可以聚合形成包含2至5个碱性四链单位以及J链的多价组合体。在IgG的情况下,四链单元通常具有约150,000道尔顿的分子量。对于不同类别的抗体的结构和性质,参见,例如Basic and Clinical Immunology,第8版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr和Tristram G. Parslow(编辑), Appleton&Lange, Norwalk, Conn., 1994, 第71页, 和第6章。

[0184] 可变(V)结构域介导抗原结合并限定特定抗体对其特定抗原的特异性。编码 V_H 结构域的基因序列具有多个拷贝的可变(V)区段、多样性(D)区段和连接(J)区段。编码 V_L 结构域的基因序列含有多个拷贝的V区段和J区段。 V_H 区和 V_L 区经历基因重排(即体细胞重组)以在抗体中产生多种抗原特异性。术语“可变的”是指V结构域的某些区段在抗体之间的序列上有很大的不同的事实。

[0185] 然而,可变性不是均匀地分布在可变结构域的110个氨基酸的跨度上的。相反,V区由15-30个氨基酸的被称为框架区(FR)的相对不变的段组成,所述相对不变的段被称为“高变区”的具有极度可变性的短区隔开。这些高变区是亲和成熟过程中体细胞超突变的结果,并且它们通常每个9-18个氨基酸长。然而,已发现它们的长度范围为4-28个氨基酸,这取决于特定的表位。例如,已经描述了长达至少22或23个氨基酸的CDR3区。参见例如Morea V等人, J Mol Biol. 275 (2): 269-94 (1998) 和 Kabat, E. A 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版. NIH出版第91-3242号 (1991)。抗体氨基酸位置(例如, CDR序列)可以根据已知的编号方案(如Kabat、Chothia、IMGT和/或EU编号方案)来确定。

[0186] 天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个框架区(FR),其主要采用由三个高变区(也被称为互补决定区(CDR),下文进一步限定)连接的 β -片层构型,所述三个高变区形成连接 β -片层结构的环,并且在一些情况下形成 β -片层结构的一部分。每条链中的高变区通过FR紧密接近地保持在一起,并且在一些情况下,与来自另一条链的高变区一起有助于抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, Public Health Service, 美国国立卫生研究院(National Institutes of Health), 马里兰州贝塞斯达, Md. (1991))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但展现出各种效应子功能,诸如抗体参与抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)或可能涉及恒定区结构域与细胞表面Fc受体(FcR)相互作用的其它机制。

[0187] 如本文中所使用的,术语“高变区”是指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。高变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如,可以根据Kabat编号来确定,在 V_L 中为约残基24-34(L1)、残基50-56(L2)和残基89-97(L3),并且在 V_H 中为约残基28-36(H1)、残基50-65(H2)和残基95-102(H3);参见Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, Public Health Service, 美国国立卫生研究院, 马里兰州贝塞斯达, Md. (1991); 和/或根据用于鉴定通过Kabat限定的CDR的本领域已知的方法, 诸

如通过以下描述的那些方法:Martin,“Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains”,In Antibody Engineering,R.Kontermann和S.Dubel, 2001, Springer-Verlag, 德国柏林,第422-438页),和/或来自“超变环”的那些残基(例如, V_L 中的残基26-32(L1)、残基50-52(L2)和残基91-96(L3),以及 V_H 中的残基26-32(H1)、残基53-55(H2)和残基96-101(H3);Chothia和Lesk, J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。

[0188] “分离的抗体”是已经从其天然环境的组分中分离和/或回收的抗体。它天然环境的污染物组分是会干扰抗体的诊断或治疗用途的物质,并且可以包括酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质溶质。在优选的实施方案中,将抗体纯化至:(1) 如通过Bradford方法所确定的大于95重量%的抗体,并且最优选超过99重量%;(2) 足以通过使用旋转杯测序仪获得N-末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或(3) 在还原或非还原条件下使用考马斯蓝或银染通过SDS-PAGE的均匀性。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为抗体的天然环境的至少一个组分将不存在。然而,通常通过至少一个纯化步骤制备分离的抗体。

[0189] “完整的”抗体是包含抗原结合位点以及 C_L 和至少重链恒定结构域 (C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3}) 的抗体。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如,人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。优选地,完整的抗体具有一个或多个效应子功能。

[0190] “抗体片段”是包含完整抗体的一部分(优选完整抗体的抗原结合区或可变区)的多肽,或由完整抗体的一部分(优选完整抗体的抗原结合区或可变区)组成的多肽。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 和Fv片段;双体抗体(diabodies);线性抗体(参见美国专利第5,641,870号;Zapata等人,Protein Eng.8(10):1057-1062[1995]);单链抗体分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0191] 木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段(被称为“Fab”片段)和残余的“Fc”片段(反映容易结晶的能力的名称)。Fab片段由整个L链以及H链(V_H)的可变区结构域和一条重链的第一恒定结构域(C_{H1})组成。每个Fab片段在抗原结合方面是单价的,即它具有单个抗原结合位点。抗体的胃蛋白酶处理产生单个大的 $F(ab')_2$ 片段,其大致对应于具有二价抗原结合活性的两个二硫键连接的Fab片段,并且仍然能够交联抗原。Fab和 $F(ab')_2$ 都是“抗原结合片段”的实例。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在 C_{H1} 结构域的羧基末端具有额外的少量残基,其包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH在本文中是其中恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离巯基基团的Fab'的名称。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初是作为在其间具有铰链半胱氨酸的Fab'片段对产生的。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

[0192] “Fc”片段包含通过二硫键连接在一起的两条H链的羧基末端部分(即,IgG的CH2和CH3结构域)。抗体的效应子功能由Fc区域中的序列确定。Fc结构域是被细胞受体(如FcR)所识别的抗体的部分,并且补体激活蛋白C1q与之结合。如本文中所讨论的,可以对Fc结构域进行修饰(例如,氨基酸取代)以便修饰(例如,改善、减少或消除)含Fc多肽(例如,本公开的抗体)的一种或多种功能。

[0193] “Fv”是含有完全抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。该片段由紧密非共价缔合的一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。从这两个结构域的折叠中产生六个高变环(每三个环来自H链和L链),其为抗原结合贡献了氨基酸残基并赋予了抗体抗原结合特异性。然而,即使是单个可变结构域(或仅包含特异性针对抗原的三个

CDR的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力,尽管通常亲和力低于整个结合位点。

[0194] “单链Fv”也被缩写为“sFv”或“scFv”,是包含连接成单条多肽链的V_H和V_L抗体结构域的抗体片段。优选地,sFv多肽还包含V_H和V_L结构域之间的多肽连接子,其使得sFv能够形成抗原结合所期望的结构。关于sFv的综述,参见Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*,第113卷,Rosenburg和Moore编辑,Springer-Verlag,纽约,第269-315页(1994);Borrebaeck 1995,见下文。

[0195] 术语“双体抗体”是指通过在V_H和V_L结构域之间构建具有短连接子(约5-10个残基)的sFv片段(参见前段)制备的小抗体片段,从而实现V结构域的链间而不是链内配对,得到二价片段,即具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双体抗体是两个“交叉”sFv片段的异二聚体,其中两个抗体的V_H结构域和V_L结构域存在于不同的多肽链上。双体抗体更全面的描述于,例如,EP 404,097;WO 93/11161;和Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.美国,90:6444-6448(1993)。包含其的其它抗体片段和分子包括,例如,线性抗体、串联scFv、scFv-Fc、串联scFv-Fc、scFv二聚体、scFv-拉链、双体抗体-Fc、双体抗体-CH3、sc双体抗体、sc双体抗体-Fc、sc双体抗体-CH3、纳米抗体、TandAb、微型体、微型抗体、三体抗体、四体抗体、scFab、Fab-scFv、Fab-scFv-Fc、scFv-CH-CL-scFv和F(ab')₂-scFv₂,所有这些也在本文中被考虑。

[0196] 在某些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段是多特异性抗体,诸如双特异性抗体或三特异性抗体。双特异性抗体的形式公开于例如Spiess等人,Mol.Immunol.67(2):95(2015)以及Brinkmann和Kontermann,mAbs 9(2):182-212(2017)中,这些双特异性形式及其制备方法在此通过引入并入本文中,并且包括例如双特异性T细胞衔接子(Bispecific T cell Engagers,BiTE)、DART、杵臼结构(Knobs-Into-Holes,KIH)组装体、scFv-CH3-KIH组装体、KIH常见轻链抗体、TandAb、三体、TriBi微型体、Fab-scFv、scFv-CH-CL-scFv、F(ab')₂-scFv₂、四价HCab、内体、CrossMabs、双作用Fab(DAF)(二合一或四合一)、DutaMab、DT-IgG、电荷对、Fab臂交换、SEEDbodies、Triomab、LUZ-Y组装体、Fcab、κλ体、正交Fab(orthogonal Fab)、DVD-IgG、IgG(H)-scFv、scFv-(H)IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)IgG、IgG(L,H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig, Zyboby和DVI-IgG(四合一)。

[0197] 如本文中所使用的,术语“多克隆抗体”是指从识别特异性抗原的一个以上表位的抗原特异性抗体群获得的抗体。“抗原”或“免疫原”是指被适应性免疫系统识别的肽、脂质、多糖或多核苷酸。抗原可以是自身或非自身分子。抗原的实例包括但不限于细菌细胞壁组分,花粉和rh因子。被特异性抗体特异性识别的抗原区域是“表位”或“抗原决定簇”。单一抗原可以具有多个表位。

[0198] 如本文中所使用的,术语“单克隆抗体”(mAb)是指从基本上同质的抗体群获得的抗体,即,包含该群体的各个抗体是相同的,除了可能以少量存在的天然存在的突变之外。单克隆抗体针对单个抗原位点具有高度特异性。此外,与包括针对不同表位的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,每个单克隆抗体针对抗原的单个表位。除了它们的特异性之外,单克隆抗体的优点在于它们可以被合成而不被其它抗体污染。修饰词“单克隆的”不应被解释为需要通过任何特定方法生产抗体。例如,可用于本发明的单克隆抗体可以通过首先由Kohler等人,Nature,256:495(1975)描述的杂交瘤方法来制备,或者可以使用重组DNA方法

在细菌、真核动物或植物中制备(参见,例如,美国专利第4,816,567号)。“单克隆抗体”也可以使用例如描述于以下文献中的技术从噬菌体抗体文库中分离:Clackson等人,Nature, 352:624-628(1991)和Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)。

[0199] 本文的单克隆抗体包括“嵌合抗体”,其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的其余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类或亚类的抗体以及此类抗体的片段中的相应序列相同或同源,只要它们展现出所期望的生物活性(参见美国专利第4,816,567号;第5,530,101号和第7,498,415号;以及Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.美国,81:6851-6855(1984))。例如,嵌合抗体可以包含人类和非人类残基。此外,嵌合抗体可以包含在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修改以进一步改进抗体性能。关于进一步的细节,参见Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。嵌合抗体还包括灵长类和人源化抗体。

[0200] “人源化抗体”通常被认为是人抗体,其具有从非人来源导入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常取自可变结构域。人源化传统上是按照Winter和合作者的方法(Jones等人,Nature,321:522-525(1986);Reichmann等人,Nature,332:323-327(1988);Verhoeyen等人,Science,239:1534-1536(1988))通过将非人可变序列替换为人抗体的相应序列来进行的。因此,此类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利第4,816,567号;第5,530,101号和第7,498,415号),其中基本上少于完整的人可变结构域已经被来自非人物种的相应序列取代。在一些情况下,“人源化的”抗体是由非人细胞或动物产生并且包含人序列(例如H_C结构域)的人序列。

[0201] “人抗体”是仅含有存在于人天然产生的抗体中的序列的抗体。然而,如本文中所使用的,人抗体可以包含在天然存在的人抗体中未发现的残基或修饰,其包括本文中所述的那些修饰和变体序列。这些通常被制成进一步改进或增强抗体性能。在一些情况下,人抗体是由转基因动物产生的。例如,参见美国专利第5,770,429号;第6,596,541号和第7,049,426号。

[0202] 抗体的“效应子功能”是指可归因于抗体的Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的那些生物活性,并且随抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性;Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如,B细胞受体)的下调;以及B细胞活化。用于修改(例如改善、降低或消除)Fc功能的氨基酸修饰(例如取代)包括例如T250Q/M428L、M252Y/S254T/T256E、H433K/N434F、M428L/N434S、E233P/L234V/L235A/G236+A327G/A330S/P331、E333A、S239D/A330L/I332E、P257I/Q311、K326W/E333S、S239D/I332E/G236A、N297Q、K322A、S228P、L235E+E318A/K320A/K322A、L234A/L235A和L234A/L235A/P329G突变,这些突变总结并注释于InvivoGen(2011)出版的“工程化的Fc区(Engineered Fc Regions)”中,并可以从以下网站在线获得:www.invivogen.com/PDF/review/review-Engineered-Fc-Regions-invivogen.pdf?utm_source=review&utm_medium=pdf&utm_campaign=review&utm_content=Engineered-Fc-Regions,其通过引用并入本文中。

[0203] 抗体或其抗原结合片段的短语“功能片段或类似物”是与全长抗体或其抗原结合片段共同具有定性生物学活性的化合物。

[0204] 具有指定的抗体或其抗原结合片段的“生物学特性”的抗体或其抗原结合片段是具有将其与其它抗体或抗体衍生的结合片段区分开的所述抗体或其抗原结合片段的生物学特性中的一个或多个的抗体或其抗原结合片段。例如,在某些实施方案中,具有指定抗体的生物学特性的抗体或其抗原结合片段将结合与指定抗体所结合的表位相同的表位和/或具有与指定抗体相同的效应子功能。

[0205] 如本文中所使用的,如果抗体以可检测水平(优选以大于或等于约 10^4M^{-1} 、或大于或等于约 10^5M^{-1} 、大于或等于约 10^6M^{-1} 、大于或等于约 10^7M^{-1} 、或大于或等于 10^8M^{-1} 的亲合常数 K_a)与抗原反应,则其被称为“免疫特异性的”、“特异性针对”抗原的或“特异性结合”抗原。抗体对其同源抗原的亲合力也通常表示为解离常数 K_d ,并且在某些实施方案中,如果抗体或其抗原结合片段以小于或等于 10^{-4}M 、小于或等于约 10^{-5}M 、小于或等于约 10^{-6}M 、小于或等于 10^{-7}M 、或小于或等于 10^{-8}M 的 K_d 结合,则其与本公开的Lewis抗原特异性结合。抗体和抗原结合片段的亲合力可以使用常规技术容易地确定,例如通过Scatchard等人(Ann.N.Y.Acad.Sci.美国,51:660(1949))描述的那些,或通过表面等离子体共振(SPR)(例如,Hearty等人,2012Meths.Mol.Biol.907:411),通过等温滴定量热法(ITC)(例如,Dam等人,2008J.Biol.Chem.283:31366),通过酶联免疫吸附测定(ELISA)(例如,Bobrovnik,2003J.Biochem.Biophys.Meths.75(3):213),或通过本领域技术人员熟悉的其它方法。

[0206] 抗体与其抗原、细胞或组织的结合性质通常可以使用免疫检测方法来确定和评估,所述免疫检测方法包括例如基于免疫荧光的测定,诸如免疫组织化学(IHC)和/或荧光激活细胞分选(FACS)。确定抗体与抗原结合的其它方法包括,例如,酶联免疫吸附测定(ELISA)、等温滴定量热法(ITC)和表面等离子体共振(SPR)技术。

[0207] 如本文中所使用的,“载体”包括药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂,其在所使用的剂量和浓度下对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。通常生理学上可接受的载体是水性pH缓冲溶液。生理学上可接受的载体的实例包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,其包括抗坏血酸;低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖醇,诸如甘露糖醇或山梨糖醇;成盐平衡离子,诸如钠;和/或非离子表面活性剂,诸如聚山梨醇酯20(TWEENTM)聚乙二醇(PEG)和泊洛沙姆(PLURONICSTM)等。

[0208] 多核苷酸、载体和宿主细胞

[0209] 在其它方面,本公开在某些实施方案中提供了编码如本文中所所述的抗体及其抗原结合片段的分离的多核苷酸,并且还提供了包含所述多核苷酸的载体。包含多核苷酸的核酸可以包含DNA或RNA,并且可以是完全或部分合成的。

[0210] 如本文中所指的术语“多核苷酸”意指单链或双链核酸聚合物,并且具体包括单链和双链形式的DNA。多核苷酸可以例如通过聚合酶链式反应(PCR)或通过体外翻译产生,并且通过任何连接、断裂、核酸内切酶作用或核酸外切酶作用产生片段。在某些实施方案中,本公开的多核苷酸通过PCR产生。多核苷酸可以由天然存在的核苷酸(如脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸)、天然存在的核苷酸的类似物(如天然存在的核苷酸的 α -对映体形式)或两者的组合的单体组成。在其它实施方案中,包含多核苷酸的核苷酸可以是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或任一类型核苷酸的修饰形式。

[0211] 术语“天然存在的核苷酸”包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。术语“修饰的核苷酸”包括具有修饰的或取代的糖基团等的核苷酸(例如,用溴尿嘧啶核苷、阿拉伯糖核苷或2’3’-二脱氧核糖修饰)。术语“寡核苷酸键”包括寡核苷酸键,诸如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯(phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯(phosphorodiselenoate)、硫代苯胺磷酸酯(phosphoroanilothioate)、phosphoraniladate、氨基磷酸酯等。参见,例如,LaPlanche等人,1986,Nucl.Acids Res.,14:9081;Stec等人,1984,J.Am.Chem.Soc.,106:6077;Stein等人,1988,Nucl.Acids Res.,16:3209;Zon等人,1991,Anti-Cancer Drug Design,6:539;Zon等人,1991,OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES:A PRACTICAL APPROACH,第87-108页(F.Eckstein编辑),牛津大学出版社(Oxford University Press),英国牛津;Stec等人,美国专利第5,151,510号;Uhlmann和Peyman,1990,Chemical Reviews,90:543,出于任何目的将它们的公开内容在此通过引用并入。寡核苷酸可以包括可检测的标记以能够检测寡核苷酸或其杂交物。

[0212] 如本文中所使用的,术语“分离的多核苷酸”意指基因组、cDNA、或合成来源的多核苷酸或它们的一些组合,其中由于其来源,分离的多核苷酸(1)与其中在自然界中发现的分离的多核苷酸的全部或部分多核苷酸不相关,(2)与其在自然界中未连接的多核苷酸连接,或(3)在自然界中不作为较大序列的一部分存在。

[0213] 除非上下文另有要求,否则本文中所提及的核苷酸序列包括具有指定序列的DNA分子,并且包括具有指定序列的RNA分子,其中U取代了T。

[0214] 术语“可操作地连接”意指该术语所应用的组分处于允许它们在合适的条件下执行它们固有功能的关系中。例如,将与蛋白质编码序列“可操作地连接”的转录控制序列与其连接,以便在与控制序列的转录活性相容的条件下实现蛋白质编码序列的表达。

[0215] 如本文中所使用的,术语“控制序列”是指可以影响与其连接或可操作连接的编码序列的表达、加工或细胞内定位的多核苷酸序列。此类控制序列的性质可取决于宿主生物体。在具体实施方案中,用于原核生物的转录控制序列可以包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列。在其它具体实施方案中,真核生物的转录控制序列可以包括包含一个或多个转录因子识别位点的启动子、转录增强子序列、转录终止序列和聚腺苷酸化序列。在某些实施方案中,“控制序列”可以包括前导序列和/或融合伴侣序列。表达控制序列可以包括适当的转录起始序列、终止序列、启动子序列和增强子序列;高效的RNA处理信号(如剪接和聚腺苷酸化信号);稳定细胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(即Kozak共有序列);增强蛋白质稳定性的序列;以及可能的增强蛋白质分泌的序列。如果表达控制序列与目的基因邻接,它们可以有效地连接,并且所述表达控制序列以反式或一定距离起作用以控制目的基因。

[0216] 如果存在内含子,则表达包括但不限于诸如转录、翻译和RNA剪接的过程。

[0217] 如本领域技术人员将理解的,多核苷酸可以包括基因组序列、基因组外和质粒编码的序列以及表达或可以适于表达蛋白质、多肽、肽等的较小的工程化基因片段。此类片段可以是天然分离的,或由技术人员合成修饰的。

[0218] 本领域技术人员还将认识到,多核苷酸可以是单链(编码或反义)或双链的,并且可以是DNA(基因组、cDNA或合成的)或RNA分子。RNA分子可以包括含有内含子并以一对一的方式对应于DNA分子的hnRNA分子,和不含有内含子的mRNA分子。另外的编码或非编码序列

可以但不必须存在于根据本公开的多核苷酸中,并且多核苷酸可以但不必须与其它分子和/或支撑材料连接。多核苷酸可以包含天然序列或可以包含编码此类序列的变体或衍生物的序列。

[0219] 因此,根据这些实施方案和相关实施方案,本公开还提供了编码如本文中所述抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。

[0220] 在其它相关的实施方案中,多核苷酸变体可以与编码本文中所述的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列基本相同。例如,使用本文中所述的方法(例如,如下所述的使用标准参数的BLAST分析),多核苷酸可以是与参照多核苷酸序列(如编码本文中所述的抗体或其抗原结合片段的序列)相比,包含至少70%序列同一性(优选至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或更高的序列同一性)的多核苷酸。本领域技术人员将认识到,通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、阅读框定位等,可以适当调整这些值以确定由两个核苷酸序列编码的蛋白质的相应同一性。

[0221] 通常,多核苷酸变体将含有一个或多个取代、添加、缺失和/或插入,优选使得由变体多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段的结合亲和力相对于由本文中具体阐述的多核苷酸序列编码的抗体或其抗原结合片段(例如,相对于本文称为hBBC.10.1的抗体,其包含具有SEQ ID NO:10中所示氨基酸序列的免疫球蛋白重链和具有SEQ ID NO:11中所示氨基酸序列的免疫球蛋白轻链)基本上不减弱。

[0222] 在某些其它相关实施方案中,多核苷酸片段可以包含与本文中所述的编码抗体或其抗原结合片段的序列相同或互补的各种长度的序列的连续片段,或基本上由与本文中所述的编码抗体或其抗原结合片段的序列相同或互补的各种长度的序列的连续片段组成。例如,提供包含以下数量的编码本文中所公开的抗体或其抗原结合片段或其变体的序列的连续核苷酸以及它们之间的所有中间长度的序列的连续核苷酸的多核苷酸,或基本上由以下数量的编码本文中所公开的抗体或其抗原结合片段或其变体的序列的连续核苷酸以及它们之间的所有中间长度的序列的连续核苷酸的多核苷酸:至少约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、200、300、400、500或1000个或更多个。容易理解的是,在本文中,“中间长度”意指所引用的值之间的任何长度,诸如50、51、52、53等;100、101、102、103等;150、151、152、153等;包括200-500、500-1,000等的所有整数。本文所述的多核苷酸序列可以在一端或两端通过天然序列中未发现的其它核苷酸延伸。该附加序列可以由在编码本文中所述的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸的任一端或在编码本文中所述的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸的两端的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷酸组成。

[0223] 在另一个实施方案中,提供了能够在中等至高度严格条件下与编码本文所提供的抗体或其抗原结合片段、或其变体、或其片段、或其互补序列的多核苷酸序列杂交的多核苷酸。杂交技术在分子生物学领域是众所周知的。为了说明的目的,用于测试如本文所提供的多核苷酸与其它多核苷酸杂交的合适的适度严格条件包括在 $5\times$ SSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH8.0)的溶液中预洗涤;在 50°C - 60°C , $5\times$ SSC下杂交过夜;然后用含有0.1% SDS的 $2\times$ 、 $0.5\times$ 和 $0.2\times$ SSC在 65°C 下各自洗涤两次持续20分钟。本领域技术人员将理解,杂交的严格性可以容易地进行操作,诸如通过改变杂交溶液的盐含量和/或进行杂交的温度。例

如,在另一个实施方案中,合适的高度严格杂交条件包括上文所述的那些,不同之处在于杂交温度升高了,例如升高至60℃-65℃或65℃-70℃。

[0224] 在某些实施方案中,上述多核苷酸(例如多核苷酸变体、片段和杂交序列)编码与本文中所述的双触角Lewis抗原结合的抗体或其抗原结合片段。在其它实施方案中,此类多核苷酸编码与本文公开的Lewis抗原结合至少约50%、至少约70%,和在某些实施方案中,至少约90%的抗体或其抗原结合片段、或其变体,以及本文中具体阐述的抗体或其抗原结合片段(例如,抗体hBBC.10.1)。在其它实施方案中,此类多核苷酸编码以比本文具体阐述的抗体或其抗原结合片段更大的亲和力(例如,其定量结合至少约105%、106%、107%、108%、109%或110%)与本文所公开的Lewis抗原结合的抗体或其抗原结合片段、或其变体,以及本文具体阐述的抗体或其抗原结合片段。

[0225] 如本文中别处所述的,本公开的抗体或其抗原结合片段的三维结构的确定可以通过常规方法进行,使得可以虚拟地模拟一个或多个氨基酸的所选择的天然或非天然氨基酸的取代、添加、缺失或插入,以确定如此衍生的结构变体是否保留了目前所公开的物种的空间填充性质。本领域技术人员已知多种计算机程序用于确定抗体或其抗原结合片段内的适当氨基酸取代(或编码氨基酸序列的适当多核苷酸),从而例如保持亲和力或获得更好的亲和力。参见,例如,Donate等人,1994Prot.Sci.3:2378;Bradley等人,Science 309:1868-1871(2005);Schueler-Furman等人,Science 310:638(2005);Dietz等人,Proc.Nat.Acad.Sci.美国,103:1244(2006);Dodson等人,Nature 450:176(2007);Qian等人,Nature 450:259(2007);Raman等人,Science 327:1014-1018(2010);Marcos等人,2017Science 355:201,以及其中所引用的参考文献。

[0226] 不考虑编码序列本身的长度,本文中所述的多核苷酸或其片段可以与其它DNA序列(如启动子、聚腺苷酸化信号、其它限制性酶位点、多克隆位点、其它编码区段等)组合,使得它们的总长度可以显著变化。因此,考虑可以使用几乎任何长度的核酸片段,其中总长度优选地受到制备的容易性和在预期的重组DNA方案中用途的限制。例如,考虑具有以下总长度的说明性多核苷酸片段是有用的:约10,000、约5000、约3000、约2,000、约1,000、约500、约200、约100,约50个碱基对等(包括所有中间长度)。

[0227] 如下所述的,当比较多核苷酸序列时,如果两个序列中的核苷酸序列在比对最大对应时是相同的,则认为两个序列是“相同的”。在两个序列之间的比较通常通过在比较窗口上比较序列以识别和比较序列相似性的局部区域来进行。如本文中所使用的,“比较窗口”是指至少约20个连续位置的区段(常为30至约75个、40至约50个)通,其中序列可以在两个序列最优地比对后与相同数量的连续位置的参照序列进行比较。

[0228] 用于比较的序列的最佳比对可以使用生物信息学软件(DNASTAR, Inc. 麦迪逊, WI)的DNASTAR® Lasergene套件中的Megalign程序,使用默认参数进行。该程序体现了在以下参考文献中描述的几个比对方案:Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins-Matrices for detecting distant relationships. Dayhoff, M.O. (编辑)Atlas of Protein Sequence and Structure, 国家生物医学研究基金会(National Biomedical Research Foundation), 华盛顿, 第5卷, 补充3, 第345-358页;Hein J., Unified Approach to Alignment and Phylogenesis, 第626-645页(1990);Methods in Enzymology 第183卷, 学术出版社公司(Academic Press, Inc.), 圣地亚哥, CA;Higgins, D.G. 和Sharp,

P.M., CABIOS 5:151-153 (1989); Myers, E.W. 和 Muller W., CABIOS 4:11-17 (1988); Robinson, E.D., Comb.Theor 11:105 (1971); Santou, N.Nes, M., Mol.Biol.Evol.4:406-425 (1987); Sneath, P.H.A. 和 Sokal, R.R., Numerical Taxonomy-the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, 弗里曼出版社 (Freeman Press), 旧金山, CA (1973); Wilbur, W.J. 和 Lipman, D.J., Proc.Natl.Acad., Sci.美国, 80:726-730 (1983)。

[0229] 可替代地, 用于比较的序列的最佳比对可以通过以下进行: Smith 和 Waterman, Add.APL.Math 2:482 (1981) 的局部同一性算法, Needleman 和 Wunsch, J.Mol.Biol.48:443 (1970) 的同一性比对算法, by the search for similarity methods of Pearson 和 Lipman, Proc.Natl.Acad.Sci.美国 85:2444 (1988) 的搜索相似性方法, 这些算法的计算机化实施 (威斯康星州麦迪逊, 575 Science Dr., 遗传学计算机组 (GCG) 威斯康星州遗传学软件包 (the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) 中的 GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA 和 TFASTA), 或检查。

[0230] 适于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的一个优选实例是 BLAST 和 BLAST 2.0 算法, 其分别描述于 Altschul 等人, Nucl.Acids Res.25:3389-3402 (1977) 和 Altschul 等人, J.Mol.Biol.215:403-410 (1990)。BLAST 和 BLAST 2.0 可以被用于例如与本文中所述的参数一起来确定两个或更多个多核苷酸之间的序列同一性百分比。用于进行 BLAST 分析的软件可通过国家生物技术信息中心 (the National Center for Biotechnology Information) 公开获得。在一个说明性实例中, 对于核苷酸序列, 可以使用参数 M (匹配残基对的奖励分数; 总是 >0) 和 N (不匹配残基的惩罚评分; 总是 <0) 来计算累积评分。当累积比对评分从其最大实现值下降量 X 时; 由于一个或多个负评分残基比对的积累, 累积评分变为零或更低时; 或者到达任一序列的末端时, 停止单词命中在每个方向上的扩展。BLAST 算法参数 W、T 和 X 确定比对的灵敏度和速度。BLASTN 程序 (对于核苷酸序列) 使用 11 的字长 (W) 和 10 的期望值 (E) 作为默认值, 以及 BLOSUM62 评分矩阵 (参见 Henikoff 和 Henikoff, Proc.Natl.Acad.Sci.美国, 89:10915 (1989)) 比对, (B) 为 50, 预期值 (E) 为 10, M = 5, N = -4, 并且比较两条链。

[0231] 在某些实施方案中, 通过在至少 20 个位置的比较窗口上比较两个最佳比对的序列来确定“序列同一性百分比”, 其中与用于两个序列的最佳比对的参照序列 (其不包含添加或缺失) 相比, 比较窗口中的多核苷酸序列的部分可以包含 20% 或更少 (通常 5% 至 15%、或 10% 至 12%) 的添加或缺失 (即缺口)。通过确定在两个序列中存在相同核酸碱基的位置数目以产生匹配位置的数目, 将匹配位置的数目除以参照序列中的位置总数 (即, 窗口大小), 并将结果乘以 100 以产生序列同一性的百分比, 来计算百分比。

[0232] 本领域普通技术人员将理解, 由于遗传密码的简并性, 存在许多编码如本文中所述的抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。一些此类多核苷酸与编码本文中所述的抗体或其抗原结合片段的天然或原始多核苷酸序列的核苷酸序列具有最小的序列同一性。尽管如此, 由于密码子使用上的差异而变化的多核苷酸也明确地被本公开考虑。在某些实施方案中, 已经针对哺乳动物表达进行了密码子优化的序列被特别考虑。密码子优化可以使用已知的技术和工具进行, 例如使用 GenScript® OptimumGene™ 工具。密码子优化的序列包括部分密码子优化的序列 (即, 至少一个密码子被优化以用于在宿主细胞中表达) 和完全密码子优化的那些序列。

[0233] 因此,在另一个实施方案中,诱变方法(如位点特异性诱变)可以被用于制备本文中所述的抗体或其抗原结合片段的变体和/或衍生物。通过这种方法,可以通过对编码多肽序列的潜在多核苷酸进行诱变来进行多肽序列的特异性修饰。这些技术提供了直接的方法来制备和测试序列变体,例如,通过将一个或多个核苷酸序列变化引入到多核苷酸中而并入一个或多个前述考虑。

[0234] 位点特异性诱变允许通过使用编码所期望突变的DNA序列的特定寡核苷酸序列以及足够数量的相邻核苷酸以提供足够大小和序列复杂性的引物序列,在被遍历的缺失连接的两侧形成稳定的双链体,来形成突变。在所选择的多核苷酸序列中可以使用突变来改进、更改、降低、修饰或改变多核苷酸本身的性质,和/或更改所编码多肽的性质、活性、组成、稳定性或初级序列。

[0235] 在某些实施方案中,本发明的发明人考虑对编码本文所公开的抗体或其抗原结合片段、或其变体的多核苷酸序列进行诱变,以更改所编码多肽的一种或多种性质(如与根据本公开的Lewis抗原的结合亲和力)。位点特异性诱变技术是本领域熟知的,并且被广泛用于产生多肽和多核苷酸的变体。例如,经常使用位点特异性诱变来更改DNA分子的特定部分。在此类实施方案中,使用包含长度通常为约14至约25个核苷酸左右的引物,其中在序列连接的两侧上的约5至约10个残基被更改。

[0236] 如本领域技术人员所理解的,位点特异性诱变技术经常使用单链和双链形式存在的噬菌体载体。用于定点诱变的典型载体包括诸如M13噬菌体的载体。这些噬菌体易于商购获得。消除了将目的基因从质粒转移到噬菌体的步骤的双链质粒也常规用于定点诱变。

[0237] 通常,通过首先获得单链载体或将双链载体的两条链解链开来进行本发明的定点诱变,所述双链载体在其序列中包括编码所期望肽的DNA序列。通常通过合成制备带有所期望突变序列的寡核苷酸引物。然后将该引物与单链载体一起退火,并使其经受DNA聚合酶(如大肠杆菌(E.coli)聚合酶I Klenow片段),以完成带有突变的链的合成。因此,形成异源双链体,其中一条链编码原始的非突变序列,第二条链携带所期望的突变。然后使用该异源双链载体转化合适的细胞(如大肠杆菌细胞),并选择包括有突变序列排列的重组载体的克隆。

[0238] 使用定点诱变制备选择的编码肽的DNA片段的序列变体提供了产生潜在有用物种的方法,并且不意味着是限制性的,因为存在可以获得肽的序列变体和编码它们的DNA序列的其它方式。例如,可以用诱变剂(如羟胺)处理编码所期望肽序列的重组载体,以获得序列变体。关于这些方法和方案的具体细节在以下参考文献的教导中发现:Maloy等人,1994; Segal, 1976; Prokop和Bajpai, 1991; Kuby, 1994; 和Maniatis等人, 1982, 出于该目的各自通过引用并入本文。

[0239] 如本文中所使用的,术语“寡核苷酸定向诱变程序”是指模板依赖性过程和载体介导的增殖,其导致特定核酸分子相对于其初始浓度的浓度增加,或导致可检测信号(如扩增)浓度的增加。如本文中所使用的,术语“寡核苷酸定向诱变程序”旨在指涉及引物分子的模板依赖性延伸的过程。术语模板依赖性过程是指RNA或DNA分子的核酸合成,其中新合成的核酸链的序列由互补碱基配对的公知规则决定(参见,例如,Watson, 1987)。通常,载体介导的方法包括将核酸片段引入DNA或RNA载体,克隆扩增载体和回收所扩增的核酸片段。此类方法的实例由美国专利第4,237,224号提供,其通过引用整体特别并入本文中。

[0240] 在另一种生产多肽变体的方法中,可以使用如美国专利第5,837,458号中所述的递归序列重组。在该方法中,进行重组和筛查或选择的迭代循环以“进化”具有例如增加的结合亲和力的单个多核苷酸变体。某些实施方案还提供质粒、载体、转录物或表达盒形式的构建体,其包含如本文所述的至少一种多核苷酸。

[0241] 术语“载体”用于指用于将编码信息转移至宿主细胞的任何分子(例如,核酸、质粒或病毒)。术语“表达载体”指适合宿主细胞转化并含有指导和/或控制插入的异源核酸序列表达的核酸序列的载体。编码抗体或其抗原结合片段的表达载体包括病毒载体,诸如慢病毒载体或 γ -逆转录病毒载体。病毒载体包括逆转录病毒、腺病毒、细小病毒(例如腺伴随病毒)、冠状病毒、如正粘病毒的负链RNA病毒(例如流感病毒)、弹状病毒(例如狂犬病和水疱性口炎病毒)、副粘病毒(例如麻疹和仙台病毒)、正链RNA病毒(如小核糖核酸病毒和甲病毒),以及双链DNA病毒,其包括腺病毒、疱疹病毒(例如,1型和2型单纯疱疹病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)、巨细胞病毒)和痘病毒(例如,牛痘、禽痘和金丝雀痘)。其它病毒包括例如诺沃克病毒、披膜病毒、黄病毒、呼肠孤病毒、乳多空病毒、嗜肝DNA病毒和肝炎病毒。逆转录病毒的实例包括禽类白血病-肉瘤病毒、哺乳动物C-型病毒、B-型病毒、D型病毒,HTLV-BLV组、慢病毒、泡沫病毒(Coffin, J.M., 逆转录病毒:病毒及其复制,《基础病毒学》(Retroviridae: The viruses and their replication, In Fundamental Virology), 第三版, B.N. Fields等人编辑, Lippincott-Raven Publishers, 费城, 1996)。

[0242] 如本文中所使用的,“慢病毒载体”意指用于基因递送的基于HIV的慢病毒载体,其可以是整合或非整合的,具有相对大的包装能力,并且可以转导一系列不同的细胞类型。慢病毒载体通常在三种(包装、包膜和转移)或更多种质粒瞬时转染到生产细胞后产生。与HIV一样,慢病毒载体通过病毒表面糖蛋白与细胞表面上受体的相互作用进入靶细胞。在进入时,病毒RNA经历由病毒逆转录酶复合物介导的逆转录。逆转录产物是双链线性病毒DNA,它是病毒整合到感染细胞的DNA中的底物。

[0243] 根据某些相关实施方案,提供了包含如本文中所述的一种或多种构建体的重组宿主细胞;编码抗体或其抗原结合片段或其变体的核酸;以及产生所编码的产物的方法,所述方法包括表达编码其的核酸。表达可以方便地通过在适当条件下培养含有核酸(例如,在本公开的载体中核酸)的重组宿主细胞来实现。在通过表达产生之后,可以使用任何合适的技术分离和/或纯化抗体或其抗原结合片段,然后根据期望使用。

[0244] 用于在多种不同的宿主细胞中克隆和表达多肽的系统是众所周知的。合适的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、酵母和杆状病毒系统。本领域可用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾细胞(例如HEK细胞,如HEK293-c18细胞)、NS0小鼠黑素瘤细胞和许多其它细胞。常见的,优选的细菌宿主是大肠杆菌。

[0245] 肽在原核细胞(如大肠杆菌)中的表达在本领域中是充分确立的。关于综述,参见例如Pluckthun, A. Bio/Technology 9:545-551(1991)。作为产生抗体或其抗原结合片段的选项,本领域技术人员也可以在真核细胞中培养表达,参见最近的综述,例如Ref, M.E. Curr. Opin. Biotech. 4:573-576; Trill J.J. 等人, (1995) Curr. Opin. Biotech 6:553-560。

[0246] 可以选择或构建合适的载体,其含有合适的调控序列,包括启动子序列、终止子序列、聚腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因和合适的其它序列。适当时,载体可以是质粒、

病毒(例如噬菌体或噬菌粒)。进一步的细节参见,例如,《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual):第2版,Sambrook等人,1989,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)。用于操作核酸的许多已知的技术和方案(例如制备核酸构建体、诱变、测序,将DNA引入细胞和基因表达以及分析蛋白质)详细描述于《分子生物学最新实验方法》(Current Protocols in Molecular Biology),第二版,Ausubel等人编辑,John Wiley&Sons,1992,或其随后的更新。

[0247] 术语“宿主细胞”用于指已经将编码一种或多种本文中所述抗体及其抗原结合片段的核酸序列引入或能够引入其中的细胞,以及进一步表达或能够表达所选目的基因(如编码任何本文中所述的抗体或抗原结合片段的基因)。该术语包括亲本细胞的后代,无论后代在形态上还是在遗传组成上与原始亲本是否相同,只要所选择的基因存在即可。因此,还考虑了一种方法,其包括将此类核酸导入宿主细胞。引入可以采用任何可用的技术。对于真核细胞,合适的技术可以包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染和使用逆转录病毒或其它病毒(例如牛痘病毒)转导,或者对于昆虫细胞为杆状病毒。对于细菌细胞,合适的技术可以包括氯化钙转化、电穿孔和使用噬菌体的转染。在引入之后,例如通过在表达基因的条件下培养宿主细胞,引起或允许核酸的表达。在一个实施方案中,核酸整合到宿主细胞的基因组(例如染色体)中。根据标准技术,可以通过包含促进与基因组重组的序列来促进整合。

[0248] 在某些实施方案中,本发明还提供了一种方法,其包括在表达系统中使用如上所述的构建体,以便表达如本文中所述的特定多肽(如抗体或其抗原结合片段)。术语“转导”用于指通常通过噬菌体将基因从一种细菌转移到另一种细菌。“转导”也指通过逆转录病毒获得和转移真核细胞序列。术语“转染”用于指细胞摄取外来或外源DNA,并且当外源DNA已经被引入细胞膜中时,细胞被“转染”。许多转染技术在本领域中是公知的,并且在本文中公开。参见例如Graham等人,1973,Virology 52:456;Sambrook等人,2001,分子克隆,实验室手册(MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL),冷泉港实验室;Davis等人,1986,《分子生物学的基本方法》(BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY),Elsevier;和Chu等人,1981,Gene 13:197。此类技术可以被用于将一个或多个外源DNA部分引入合适的宿主细胞。

[0249] 如本文中所使用的,术语“转化”是指细胞遗传特性的变化,并且当细胞被修饰含有新DNA时,细胞已被转化。例如,在细胞从其天然状态被遗传修饰的情况下,细胞被转化。转染或转导后,转化DNA可以通过物理整合到细胞的染色体中而与细胞的DNA重组,或者可以作为游离型元件瞬时维持而不被复制,或者可以作为质粒独立复制。当DNA随着细胞的分裂而复制时,认为细胞已经被稳定地转化。当与生物材料(如核酸分子、多肽、宿主细胞等)结合使用时,术语“天然存在的”或“天然的”是指在自然界中发现且不被人操纵的物质。类似地,如本文中所使用的“非天然存在的”或“非天然的”是指在自然界中未发现或由人进行结构修饰或合成的物质。

[0250] 应当理解,除非特别相反地指出,否则本发明的几个实施方案的实施将采用本领域技术范围内的病毒学、免疫学、微生物学、分子生物学和重组DNA技术中的常规方法,并且为了说明的目的,下面描述其中的许多。文献中对此类技术进行了充分的解释。参见,例如,《分子生物学的当前方案或免疫学的当前方案》(Current Protocols in Molecular Biology or Current Protocols in Immunology),John Wiley&Sons,纽约,N.Y. (2009);

Ausubel等人,《分子生物学中的短方案》(Short Protocols in Molecular Biology),第3版,Wiley&Sons,1995;Sambrook和Russell,《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)(第3版,2001);Maniatis等人,《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)(1982);《DNA克隆:实用方法》(DNA Cloning: A Practical Approach),第I&II卷(D.Glover编辑);《寡核苷酸合成》(Oligonucleotide Synthesis)(N.Gait编辑,1984);《核酸杂交》(Nucleic Acid Hybridization)(B.Hames&S.Higgins编辑,1985);《转录和翻译》(Transcription and Translation)(B.Hames&S.Higgins编辑,1984);《动物细胞培养》(Animal Cell Culture)(R.Freshney编辑,1986);Perbal,分子克隆实用指南(A Practical Guide to Molecular Cloning)(1984)和其它类似参考文献。

[0251] 某些目前所公开的实施方案涉及针对碳水化合物限定的抗原结构的特异性免疫结合活性(例如抗体结合活性)的检测和表征。本领域技术人员将理解,有多种方法来产生和测试碳水化合物特异性免疫试剂,包括同源碳水化合物抗原的精细结构表征。此类技术的非限制性实例描述于Haji-Ghassemi等人,2015Glybiol.25:920;Dingjan等人,2015Mol.Immunol.67(2Pt A):75-88;Soliman等人,2017Curr.Opin.Struct.Biol.44:1-8;和Hakomori,2001Adv.Exp.Med.Biol.491:369-402;以及在其中所引用的参考文献中。也可在这和其它地方发现碳水化合物限定的抗原的来源及其制备、分离和结构表征的方法的描述。本文公开了此类方法的示例性和非限制性应用,并且本公开不旨在被如此限制,并且还考虑了结构上限定的碳水化合物抗原的合成制备,其包括通过利用本领域已知作为糖基转移酶的生物合成酶的精细特异性。参见,例如,Wu等人,Universal phosphatase-coupled glycosyltransferase assay,Glycobiology 21(6):727-733,2011;Becker等人,Fucose: biosynthesis and biological function in mammals,Glycobiology 13(7):41R-53R,2003;de Vries等人,Fucosyltransferases:structure/function studies,Glycobiology 11(10):119R-128R,2001。

[0252] 标准技术可以被用于重组DNA、寡核苷酸合成和组织培养和转化(例如,电穿孔、脂转染)。酶促反应和纯化技术可以根据制造商的说明书或如本领域通常实现的或如本文所述的进行。

[0253] 这些和相关的技术和程序通常可以根据本领域熟知的常规方法进行,并且如在本说明书全文中所引用和讨论的各种一般和更具体的参考文献中所述的。除非提供具体的定义,否则与本文所述的分子生物学、分析化学、合成有机化学以及医药和药物化学的实验室程序和技术相关使用的命名法是本领域熟知和常用的那些。如本文进一步所述的,标准技术可以被用于重组技术、分子生物学、微生物学、化学合成、化学分析、药物制备、制剂和递送以及治疗患者。

[0254] 组合物

[0255] 在某些方面,本公开提供抗体及其抗原结合片段,以及其变体和包含它们的组合物。在某些实施方案中,提供了分离的抗体,其包含具有SEQ ID NO:10中所示氨基酸序列的免疫球蛋白重链和具有SEQ ID NO:11中所示氨基酸序列的免疫球蛋白轻链。

[0256] 在某些实施方案中,提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其包含:免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,所述免疫球蛋白重链可变区包含SEQ ID NO:35中所示的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链可变区包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列,其中所

述抗体或其抗原结合片段能够特异性结合至：

[0257] 包含 $\text{Fuc}_4(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc})_2[\text{I}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}]_2[\text{II}]$ 的双触角 Le^B/Le^B 抗原，

[0258] 包含 $\text{Fuc}_4(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc})_2[\text{III}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}]_2[\text{IV}]$ 的双触角 Le^Y/Le^Y 抗原，

[0259] 包含 $\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc})[\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc})][\text{V}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}][\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}][\text{VI}]$ 的双触角 Le^B/Le^Y 抗原，

[0260] 和包含 $\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc})[\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc})][\text{VII}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}][\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}]$

[0261] [VIII]的双触角 Le^Y/Le^B 抗原，

[0262] 并且其中所述抗体或其抗原结合片段不特异性结合至：包含 $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNAc}[\text{IX}]$ 的单触角 Le^X 抗原、或包含 $[\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNAc}]_2[\text{X}]$ 的双触角 Le^X 抗原、或包含 $\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}[\text{XI}]$ 的单触角 Le^A 抗原、或包含 $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}[\text{XII}]$ 的单触角2型H抗原、或包含 $(\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc})_2[\text{XIII}]$ 的双触角2型H抗原、或包含 $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}[\text{XIV}]$ 的单触角1型H抗原。

[0263] 在其它实施方案中，分离的抗体或其抗原结合片段包含：(a) 免疫球蛋白重链可变区，其包含重链互补决定区1(VH CDR1)、重链互补决定区2(VH CDR2)、重链互补决定区3(VH CDR3)，所述重链互补决定区1(VH CDR1)包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列，所述重链互补决定区2(VH CDR2)包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列，所述重链互补决定区3(VH CDR3)包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列；和(b) 免疫球蛋白轻链可变区，其包含轻链互补决定区1(VL CDR1)、轻链互补决定区2(VL CDR2)和轻链互补决定区3(VL CDR3)，所述轻链互补决定区1(VL CDR1)包含SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列，所述轻链互补决定区2(VL CDR2)包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列，所述轻链互补决定区3(VL CDR3)包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列；其中所述抗体或其抗原结合片段能够特异性结合至：

[0264] 包含 $\text{Fuc}_4(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc})_2[\text{I}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}]_2[\text{II}]$ 的双触角 Le^B/Le^B 抗原，

[0265] 包含 $\text{Fuc}_4(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc})_2[\text{III}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}]_2[\text{IV}]$ 的双触角 Le^Y/Le^Y 抗原，

[0266] 包含 $\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc})[\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc})][\text{V}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}][\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}][\text{VI}]$ 的双触角 Le^B/Le^Y 抗原，

[0267] 和包含 $\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc})[\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc})][\text{VII}]$ 或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}][\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}]$

[0268] [VIII]的双触角 Le^Y/Le^B 抗原，

[0269] 并且其中所述抗体或其抗原结合片段不特异性结合至：包含 $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNAc}[\text{IX}]$ 的单触角 Le^X 抗原、或包含 $[\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNAc}]_2[\text{X}]$ 的双触角 Le^X 抗原、或包含 $\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}[\text{XI}]$ 的单触角 Le^A 抗原、或包含 $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}[\text{XII}]$ 的单触角2型H抗原、或包含 $(\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc})_2[\text{XIII}]$ 的双触角2型H抗原、或包含 $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}[\text{XIV}]$ 的单触角1型H抗原。

[0270] 在某些目前所公开的实施方案中，分离的抗体或其抗原结合片段是单克隆的。

[0271] 在某些目前所公开的实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段是人源化的。

[0272] 在某些实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段选自:Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段、单链Fv(ScFv)抗体和双体抗体。

[0273] 在某些其它实施方案中,提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其包含免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,所述免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:35中所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:5中所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,其中所述抗体或其抗原结合片段能够特异性结合至:

[0274] 包含Fuc₄(Galβ1→3GlcNAc)₂[I]或[Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc]₂[II]的双触角Le^B/Le^B抗原,

[0275] 包含Fuc₄(Galβ1→4GlcNAc)₂[III]或[Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc]₂[IV]的双触角Le^Y/Le^Y抗原,

[0276] 包含Fuc₂(Galβ1→3GlcNAc)[Fuc₂(Galβ1→4GlcNAc)][V]或[Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc][Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc][VI]的双触角Le^B/Le^Y抗原,

[0277] 和包含Fuc₂(Galβ1-4GlcNAc)[Fuc₂(Galβ1-3GlcNAc)][VII]或[Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc][Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc]

[0278] [VIII]的双触角Le^Y/Le^B抗原,

[0279] 并且其中所述抗体或其抗原结合片段不特异性结合至:包含Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAc[IX]的单触角Le^X抗原、或包含[Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAc]₂[X]的双触角Le^X抗原、或包含Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc[XI]的单触角Le^A抗原、或包含Fucα1-2Galβ1-4GlcNAc[XII]的单触角2型H抗原、或包含(Fucα1-2Galβ1-4GlcNAc)₂[XIII]的双触角2型H抗原、或包含Fucα1-2Galβ1-3GlcNAc[XIV]的单触角1型H抗原。

[0280] 在某些实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段包含:(a)免疫球蛋白重链可变区,其包含重链互补决定区1(VH CDR1)、重链互补决定区2(VH CDR2)、重链互补决定区3(VH CDR3),所述重链互补决定区1包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列;所述重链互补决定区2(VH CDR2)包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列;所述重链互补决定区3(VH CDR3)包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列;和(b)免疫球蛋白轻链可变区,其包含轻链互补决定区1(VL CDR1)、轻链互补决定区2(VL CDR2)和轻链互补决定区3(VL CDR3),所述轻链互补决定区1(VL CDR1)包含SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列;所述轻链互补决定区2(VL CDR2)包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列;所述轻链互补决定区3(VL CDR3)包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列具有至少

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0281] 在其它实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段包含如下(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)或(vi)、或它们的任意组合:(i)包含SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列的变体的VH CDR1,其中变异由根据Kabat编号在第33位处的Y→A取代组成;(ii)包含SEQ ID NO:4中所示氨基酸序列的变体的VH CDR3,其中变异由根据Kabat编号在第104位处的Y→A取代组成;(iii)包含SEQ ID NO:4中所示氨基酸序列的变体的VH CDR3,其中变异由根据Kabat编号在第106位处的H→A取代组成;(iv)包含SEQ ID NO:6中所示氨基酸序列的变体的VL CDR1,其中变异由根据Kabat编号在第30位处的Y→A取代组成;(v)包含SEQ ID NO:7中所示氨基酸序列的变体的VL CDR2,其中变体由根据Kabat编号在第50位处的G→A取代组成;或(vi)包含SEQ ID NO:8中所示氨基酸序列的变体的VL CDR3,其中变异由根据Kabat编号在第93位处的T→S取代组成。

[0282] 在本文所述的任何实施方案中,与包含具有SEQ ID NO:27中所示氨基酸序列的VL结构域和具有SEQ ID NO:28中所示氨基酸序列的VH结构域的BBC抗体相比,分离的抗体或其抗原结合片段可以具有与单触角Lewis B抗原或单触角Lewis Y的减少的(例如,以统计学上显著的方式降低)结合。

[0283] 在某些其它实施方案中,提供了分离的抗体或抗原结合片段,其包含如本文所述的CDR(即,分别与SEQ ID NO:2、3、4、6、7和8具有至少90%同一性的CDR,其包括具有本文所述氨基酸取代的那些CDR变体),并且包含免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,所述免疫球蛋白重链可变区包含与SEQ ID NO:35中所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,或由与SEQ ID NO:35中所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列组成;所述免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:5中所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,或由免疫球蛋白轻链可变区包含与SEQ ID NO:5中所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列组成。

[0284] 抗体或其抗原结合片段(如本文中所述的那些)包括但不限于scFv,在某些实施方案中,可以包含在能够特异性结合如本文中所述的Lewis抗原的融合蛋白中。在一些实施方案中,融合蛋白能够在宿主细胞(例如T细胞、NK细胞或NK-T细胞)的表面表达,并且包含细胞外组分和细胞内组分,所述细胞外组分包含如本文所公开的抗体或其抗原结合片段,所述细胞内组分包含效应结构域,所述效应结构域在接收适当信号(例如,来自以下的效应结构域:CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、CD25、CD27、CD28、CD79A、CD79B、CARD11、DAP10、FcR α 、FcR β 、FcR γ 、Fyn、HVEM、ICOS、Lck、LAG3、LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、Wnt、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slp76、pT α 、TCR α 、TCR β 、TRIM、Zap70、PTCH2或它们的任意组合)时能够直接或间接地促进细胞(例如,免疫系统细胞,诸如T细胞)中的免疫应答,其中所述细胞外组分和所述细胞内组分通过跨膜结构域(例如,CD8跨膜结构域、CD4跨膜结构域、CD27跨膜结构域或CD28跨膜结构域)连接,并且所述细胞内组分任选地包含共刺激结构域或其部分,所述共刺激结构域或其部分选自CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134),或它们的组合。在某些实施方案中,包含本公开的抗体或抗原结合片段的融合蛋白的细胞外组分包含衍生自免疫球蛋白蛋白的多肽;例如,IgG4铰链-CH2-

CH3。

[0285] 在这些实施方案和相关的实施方案中,抗原结合片段可以包含本文中所述的抗原结合片段(如scFv),并且细胞外组分还可以包含含有铰链的连接区;例如,在嵌合抗原受体分子(CAR)中,其可以在宿主细胞(如T细胞、NK细胞或NK-T细胞)的细胞表面上表达,以用于细胞免疫疗法。CAR分子和涉及原则描述于例如:Sadelain等人,Cancer Discov.,3(4):388(2013);Harris和Kranz,Trends Pharmacol.Sci.,37(3):220(2016);Stone等人,Cancer Immunol.Immunother.,63(11):1163(2014);Xu等人,2018Oncotarget 9:13991;Androulla等人,2018Curr.Pharm.Biotechnol.第19卷(2018年4月);Wu等人,2016Expert Opin.Biol.Ther.16:1469;Ren等人,2017Protein Cell 8:634;所述CAR分子、CAR设计和CAR设计原理通过引用整体并入本文中。

[0286] 本文还提供了包含本公开的抗体或其抗原结合片段的抗体缀合物以及与其连接的有效载荷分子。作为背景,特异性靶向抗原的单克隆抗体可以被用作载体分子以将治疗或可检测的有效载荷分子递送至抗原表达位点(例如表达抗原的肿瘤细胞)。通过抗体缀合物与抗原的结合可以允许例如将细胞毒性有效载荷或可检测部分靶向递送至患病细胞或组织以用于疾病(例如癌症)的治疗、或检测、成像或监测。在某些实施方案中,抗体缀合物被靶细胞内化,所述靶细胞在抗体缀合物结合后或一经结合时表达抗原。内化到靶细胞的细胞溶质或溶酶体区室可以允许有效负载分子的选择性释放,例如引起对靶细胞的细胞毒性损伤。

[0287] 可以使用各种技术将有效载荷分子偶联至抗体或其抗原结合片段以形成本公开的抗体缀合物。在一些实施方案中,抗体缀合物包含通过连接子共价连接于抗体或其抗原结合片段的有效载荷分子。用于包含细胞毒性剂或抗增殖剂的抗体缀合物(例如抗体药物缀合物)中的连接子通常是落入两个组中的一个中的有机化合物,所述两个组根据有效载荷分子从载体分子释放的机制来组织。可切割的连接子被设计成根据靶细胞的固有性质选择性地被降解或切割:三种类型的可剪切的连接子是蛋白酶敏感性连接子(由此通过存在于肿瘤细胞溶酶体中的蛋白酶切割连接子(例如包含缬氨酸-瓜氨酸或苯丙氨酸-赖氨酸二肽或四肽(例如,GFLG或ALAL)的连接子)以释放有效载荷分子);pH-敏感性连接子,其含有酸不稳定基团,所述酸不稳定基团相对于细胞溶质pH,通过核内体和溶酶体区室的较低pH选择性地被水解;和谷胱甘肽敏感连接子,其包含被细胞内谷胱甘肽还原的二硫桥键。不可切割的连接子依赖于抗体缀合物的非特异性降解以释放有效载荷分子。

[0288] 公开了特异性连接子、有效载荷、连接子化学和相关机制和方法被公开于Nareshkumar等人,Pharm.Res.32:3526-3540(2015),所述组合物、方法和技术通过引用整体并入本文中。在某些实施方案中,抗体缀合物包含选自可切割连接子和不可切割连接子的连接子。在其它实施方案中,所述连接子是选自蛋白酶敏感性连接子、pH敏感性连接子或谷胱甘肽敏感性连接子的可切割连接子。在具体实施方案中,可切割连接子是包含缬氨酸-瓜氨酸二肽的蛋白酶敏感性连接子。

[0289] 可以使用任何合适的技术或机制将连接子与抗体或其抗原结合片段连接或偶联。在一些实施方案中,连接子包含马来酰亚胺基团(任选地PEG化的),其能够与抗体或其抗原结合片段的铰链区中的还原性二硫桥键反应。载体分子(即抗体或其抗原结合片段)上适于与连接子缀合的其它位点可以使用重组技术引入或工程化,如引入半胱氨酸残基或非天然

氨基酸用于位点特异性缀合。用于引入此类修饰的方法包括,例如,PCT公开第W02012/032181号中的实施例6.3-7中所述的方法。

[0290] 在一些实施方案中,连接子还包含自拆解基团(也被称为自脱落(self-immolative group)基团或自脱落间隔区),以帮助选择性切割反应。在某些实施方案中,所述自拆解基团是对氨基苯甲醇(PABC)。

[0291] 用于产生抗体缀合物的点击化学包括描述于Meyer等人,Bioconjug.Chem.27(12):2791-2807(2016)中的那些,并且通过引用整体并入本文中。

[0292] 在本文中所述的任何一种抗体缀合物中,有效载荷分子可以选自治疗剂和可检测的指示剂。适用于癌症治疗的治疗剂包括描述于Parslow等人,Biomedicines 4:14(2016)中的那些,其有效载荷和ADC设计原则通过引用并入本文中。在某些实施方案中,有效载荷分子是治疗剂,其选自靶向微管蛋白的抗有丝分裂剂、基于肽的毒素、吡咯并苯并二氮杂(PBD)二聚体、抗生素(例如,加利车霉素)、嘧啶合成抑制剂(例如,5-氟尿嘧啶)、抗代谢物(例如,甲氨蝶呤)、DNA烷化剂和拓扑异构酶抑制剂(例如,阿霉素)。在其它实施方案中,有效载荷分子选自美登木素生物碱、澳瑞他汀、一甲基澳瑞他汀E(MMAE)和一甲基澳瑞他汀F(MMAF)。

[0293] 在其它实施方案中,有效载荷分子是可检测的指示剂。适用于抗体缀合物的可检测指示剂,以及相关的标记策略和成像技术(例如,PET、MRI、NIR),包括在Frieese和Wu,Mol.Immunol.67(200):142-152(2015)和Moek等人,J.Nucl.Med.58:83S-90S(2017)中公开的那些,其全部通过引用并入本文中。在某些实施方案中,可检测指示剂选自:放射性核素、染料、放射性金属、荧光部分、MRI造影剂、微泡、碳纳米管、金颗粒、氟脱氧葡萄糖、酶、发色团和不透射线标志物。在具体实施方案中,可检测的指示剂是选自以下的放射性核素: ^{68}Ga 、 ^{64}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{89}Zr 、 ^{124}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{131}I 、 ^{76}Br 、 ^{78}Zr 、 ^{18}F 和 ^{124}T 。在某些此类实施方案中,抗体缀合物还包含选自以下的放射性核素螯合剂:马来酰亚胺标记的DOTA、N-羟基琥珀酰亚胺-DOTA和去铁胺(DFO)。

[0294] 本文还提供了包含本公开的抗体、其抗原结合片段或抗体缀合物的药物组合物;和药物载体。

[0295] 在另一方面,本公开提供了编码如本文中所述的抗体或抗原结合片段的分离的多核苷酸,所述多核苷酸包括与本文所公开的特定核苷酸序列相比,具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的序列变体。在某些实施方案中,编码本公开的抗体或抗原结合片段(例如,包括scFv、Fab、F(ab')₂片段、Fv片段或双体抗体)的多核苷酸,或编码抗体或抗原结合片段的一部分(例如,重链、轻链、VH、VL或CDR)的多核苷酸,与SEQ ID NOs:12-22或37中的任一个相比,具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。在某些实施方案中,多核苷酸经密码子优化以在宿主细胞(例如哺乳动物细胞)中表达。在任何上述实施方案中,多核苷酸可以在重组载体中提供。在某些实施方案中,载体包含与编码抗体或其抗原结合片段的多核苷酸可操作地连接的表达控制序列。在某些这样的实施方案中,载体(例如重组载体)是表达载体,其中表达控制序列包含启动子。

[0296] 在另一方面,提供了包含如本文所述的重组载体或表达载体的宿主细胞。在相关方面,提供了用于产生抗体或其抗原结合片段的方法,所述抗体或其抗原结合片段能够特异性结合:

[0297] 包含 $\text{Fuc}_4(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc})_2$ [I]或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}]_2$ [II]的双触角 Le^B/Le^B 抗原,

[0298] 包含 $\text{Fuc}_4(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc})_2$ [III]或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}]_2$ [IV]的双触角 Le^Y/Le^Y 抗原,

[0299] 包含 $\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc})[\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc})]$ [V]或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}][\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}]$ [VI]的双触角 Le^B/Le^Y 抗原,

[0300] 和包含 $\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc})[\text{Fuc}_2(\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc})]$ [VII]或 $[\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}][\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}]$

[0301] [VIII]的双触角 Le^Y/Le^B 抗原,

[0302] 并且其中所述抗体或其抗原结合片段不特异性结合至:包含 $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNAc}$ [IX]的单触角 Le^X 抗原、或包含 $[\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNAc}]_2$ [X]的双触角 Le^X 抗原、或包含 $\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}$ [XI]的单触角 Le^A 抗原、或包含 $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ [XII]的单触角2型H抗原、或包含 $(\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc})_2$ [XIII]的双触角2型H抗原、或包含 $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}$ [XIV]的单触角1型H抗原,

[0303] 其中所述方法在足以由宿主细胞表达编码所述抗体或其抗原结合片段的多核苷酸的条件和时间下培养本公开的宿主细胞,从而获得包含所述抗体或其抗原结合片段的培养物;和从所述培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

[0304] 用于检测和治疗疾病的方法和用途

[0305] 在某些实施方案中,目前所公开的抗体、其抗原结合片段和抗体缀合物可用于检测或治疗以如本文所述的Lewis抗原的表达(例如,过表达)为特征的疾病的方法中。

[0306] 如医学领域的技术人员所理解的,术语“治疗(treat/treatment)”是指对象(即,患者、宿主,其可以是人或非人动物)的疾病、病症或病况的医学管理(参见,例如,Stedman的医学词典(Medical Dictionary))。通常,合适的剂量和治疗方案提供足以提供治疗或预防益处的量的抗体、其抗原结合片段或抗体缀合物中的一种或多种。由治疗性治疗或预防性(prophylactic/preventative)方法产生的治疗性或预防性益处包括例如改善的临床结果,其中目的是预防或延缓或以其它方式降低(例如,相对于未治疗的对照以统计学显著的方式降低)不期望的生理变化或病症,或预防、延缓或以其它方式降低此类疾病或病症的扩展或严重性。治疗对象的有益或期望的临床结果包括减轻、减少或减缓由待治疗的疾病或病症引起或与待治疗的疾病或病症相关的症状;减少症状的发生;提高生活质量;较长的无病状态(即,降低基于其进行疾病诊断的对象将呈现的症状的可能性或倾向);缩小疾病的程度;稳定(即,不恶化)疾病状态;延迟或减缓疾病进展;改善或缓和疾病状态;和缓解(不论是部分的还是全部的),不论是可检测的还是不可检测的;或总体生存期。

[0307] “治疗”还可以意指当与如果对象没有接受治疗的预期生存期相比时延长生存期。需要本文所述的方法和组合物的对象包括已经患有疾病或病症的那些对象,以及倾向于患有疾病或病症或处于发展成疾病或病症的风险中的对象。需要治疗以降低疾病或病症的发生或复发的可能性或需要预防性治疗的对象可以包括其中疾病、病况或病症的严重程度降

低或部分或完全避免或不完全或完全预防(例如,降低疾病或病症的发生或复发的可能性,其可以包括但不必需要绝对预防)的对象。如实施例中所所述的,本文所述的组合物(和包含所述组合物的制剂)和方法所提供的临床益处可以通过设计和进行体外测定来评估,在向其施用所述组合物的对象中的临床前研究和临床研究旨在是有益的。

[0308] 例如,在某些实施方案中,提供了用于治疗或检测癌症(即,如本文中所述的表达Lewis抗原的癌症)的方法,其中所述方法包括向有需要的对象施用本公开的药物组合物。如本文中所使用的,“癌症”是指以患病细胞的异常或不受控制的增殖(例如,过度增殖)为特征的病况,其特征可以为从第一组织或部位到身体内的一个或多个相邻或远处组织或部位的恶性扩散。

[0309] 在该方法的具体实施方案中,对象患有或疑似患有选自以下的癌症:胃癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌、淋巴瘤、肝癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、子宫癌和鳞状细胞癌。在其它实施方案中,癌症选自:胃腺癌、粘液性胃腺癌、未分化的胃腺癌、印戒细胞胃癌、结肠腺癌、浸润性乳腺导管癌、肝细胞癌、肺腺癌、鳞状细胞癌、转移性淋巴结腺癌、粘液性卵巢腺癌、胰腺导管腺癌、胰腺乳头状腺癌、前列腺腺癌和子宫内膜样癌。以纯的形式或以适当的药物组合物的形式的本文所述的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物的施用可以通过任何可接受的用于提供类似用途的试剂的施用方式进行。药物组合物可以通过将抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与适当的生理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合来制备,并且可以配制成含有气态形式的固体、半固体、液体或微粒(例如微滴)的制剂,例如片剂、胶囊、粉末、颗粒、油膏、溶液、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶、微球体和气溶胶。此外,其它药物活性成分(包括如本文中别处所述的其它免疫抑制剂)和/或合适的赋形剂(如盐)、缓冲剂和稳定剂可以但不一定存在于组合物中。

[0310] 治疗的精确剂量和持续时间可以是正在治疗的病况或疾病的函数,并且可以使用已知的测试方案或通过在本领域已知的模型系统中测试组合物并从中外推来凭经验确定。还可以进行受控的临床试验。剂量也可随待减轻的病况的严重程度而变化。药物组合物通常被配制和施用以发挥治疗上有用的作用,同时使不期望的副作用最小化。组合物可以施用一次,或者可以分成多个较小的剂量以一定的时间间隔施用。对于任何特定的对象,可以根据个体需要随时间调整具体的剂量方案。

[0311] 组合物的“有效量”是指在剂量和所需的时间段足以实现如本文所述的所期望的临床结果或有益治疗的量。有效量可以在一次或多次施用中递送。如果施用于已知或已证实具有疾病或疾病状态的对象,则术语“治疗量”可以被用于涉及治疗,而“预防有效量”可用于描述向易患疾病或处于发展成疾病或疾病状态(例如,复发)的风险对象施用作为减少(例如,相对于未治疗状态的统计学显著方式)疾病或疾病状态发生的可能性和/或严重程度的有益和/或保护性过程的有效量。以相对于未治疗状态的统计学上显著的方式),疾病或疾病状态的发生和/或严重性的可能性。

[0312] 在各种实施方案中,本公开的抗体缀合物包含如本文中所述的可检测的有效载荷,并且可以被用于体内、体外或离体检测疾病(如癌症)。在这些实施方案和其它实施方案的某些中,本文中所述的抗体(即,一种或多种抗体)或其抗原结合片段与可直接或间接检测的可检测标记缀合(例如,共价)。在本公开中,所公开的单克隆抗体、其抗原结合片段和抗体缀合物中的任一种可连接至可检测标记(例如,除了抗体缀合物的可检测或治疗性有

效载荷分子之外)。在“直接检测”中,仅使用一种可检测抗体,即初级可检测抗体。因此,直接检测意味着与可检测标记缀合的抗体本身可以被检测,而不需要添加第二种抗体(次级抗体)。

[0313] “可检测标记”是可以产生指示样品中标记的存在和/或浓度的可检测(例如视觉电子或其它)信号的分子或材料。当与肽缀合时,可检测标记可以被用于定位和/或定量特定肽所结合的靶。因此,可以通过检测由可检测标记产生的信号来检测样品中靶标的存在和/或浓度。可以直接或间接检测可检测标记,并且可以组合使用与不同的特异性抗体缀合的几种不同的可检测标记来检测一种或多种靶标。

[0314] 可直接检测的可检测标记的实例包括荧光染料和放射性物质以及金属颗粒。相反,间接检测需要在应用初级抗体后应用一种或多种另外的抗体,即次级抗体。因此,通过检测次级抗体或结合剂与初级可检测抗体的结合来进行检测。需要添加次级结合剂或抗体的初级可检测结合剂或抗体的实例包括酶可检测结合剂和半抗原可检测结合剂或抗体。

[0315] 在一些实施方案中,可检测标记与包含第一结合剂的核酸聚合物缀合(例如,在ISH、WISH或FISH过程中)。在其它实施方案中,可检测标记缀合至包含第一结合剂的抗体(例如,在IHC过程中)。

[0316] 在本公开的方法中使用的可与抗体、抗原结合片段和抗体缀合物缀合的可检测标记的实例包括荧光标记、酶标记、放射性同位素、化学发光标记、电化学发光标记、生物发光标记、聚合物、聚合物颗粒、金属颗粒、半抗原和染料。

[0317] 荧光标记的实例包括5-(和6)-羧基荧光素、5-或6-羧基荧光素、6-(荧光素)-5-(和6)-甲酰氨基己酸、异硫氰酸荧光素、若丹明、四甲基若丹明和染料(如Cy2、Cy3和Cy5),任选地取代的香豆素(包括AMCA、PerCP)、藻胆蛋白(包括R-藻红蛋白(RPE)和别藻红蛋白(APC))、德克萨斯红、普林斯顿红、绿色荧光蛋白(GFP)及其类似物,以及R-藻红蛋白或别藻红蛋白的缀合物、无机荧光标记(如基于半导体材料的颗粒,如包被的CdSe纳米晶体)。

[0318] 聚合物颗粒标记的实例包括可以嵌入荧光染料的聚苯乙烯、PMMA或二氧化硅的微粒或胶乳颗粒,或含有染料、酶或底物的聚合物胶束或胶囊。

[0319] 金属颗粒标记的实例包括金颗粒和可以通过银染转化的包被的金颗粒。半抗原的实例包括DNP、异硫氰酸荧光素(FITC)、生物素和异羟基洋地黄毒苷。酶促标记的实例包括辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(ALP或AP)、 β -半乳糖苷酶(GAL)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、 β -N-乙酰基葡萄糖胺酰胺酶、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶、转化酶、黄嘌呤氧化酶、萤火虫荧光素酶和葡萄糖氧化酶(GO)。常用于辣根过氧化物酶的底物的实例包括3,3'-二氨基联苯胺(DAB)、具有镍增强的二氨基联苯胺、3-氨基-9-乙基吡啶(AEC)、联苯胺二盐酸盐(BDHC)、Hanker-Yates试剂(HYR)、Indophane blue (IB)、四甲基联苯胺(TMB)、4-氯-1-萘酚(CN)、 α -萘酚派洛宁(α -NP)、邻联茴香胺(OD)、5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸酯(BCIP)、硝基蓝四唑(NBT)、2-(对碘苯基)-3-对硝基苯基-5-苯基四唑氯化物(INT)、四硝基蓝四唑(TNBT)、5-溴-4-氯-3-吡啶氧基- β -D-半乳糖苷/铁氰化铁(BCIG/FF)。

[0320] 碱性磷酸酶常用底物的实例包括萘酚-AS-B 1-磷酸盐/坚牢红TR(NABP/FR)、萘酚-AS-MX-磷酸盐/坚牢红TR(NAMP/FR)、萘酚-AS-B1-磷酸盐/坚牢红TR(NABP/FR)、萘酚-AS-MX-磷酸盐/坚牢红TR(NAMP/FR)、萘酚-AS-B1-磷酸盐/新品红(NABP/NF)、溴氯吡啶基磷酸酯/硝基蓝四唑(BCIP/NBT)、5-溴-4-氯-3-吡啶基-b--d-吡喃半乳糖苷(BCIG)。

[0321] 发光标记的实例包括鲁米诺、异鲁米诺、吖啶酯、1,2-二氧杂环丁烷和吡啶并哒嗪。电化学发光标记的实例包括钌衍生物。放射性标记的实例包括碘、钴、硒、氚、碳、硫和磷的放射性同位素。

[0322] 可检测标记可以连接到本文所述的抗体、抗原结合片段和抗体缀合物,或连接到特异性结合目的生物标志物的任何其它分子(例如抗体、核酸探针或聚合物)。此外,本领域普通技术人员将理解,可检测标记也可与第二、和/或第三、和/或第四、和/或第五结合剂或抗体等缀合。此外,本领域技术人员将理解,用于表征目的生物标志物的每种另外的结合剂或抗体可以用作信号扩增步骤。可以使用例如光学显微镜、荧光显微镜、电子显微镜(其中可检测物质是例如染料、胶体金颗粒、发光体试剂)目视检测生物标志物。还可以使用分光光度计检测与生物标志物结合的视觉上可检测的物质。在可检测物质是放射性同位素的情况下,可以通过放射自显影在视觉上进行检测或使用闪烁计数器不可视地进行检测。参见,例如Larsson,1988,《免疫细胞化学:理论与实践》(Immunocytochemistry:Theory and Practice), (CRC出版社,波卡拉顿,Fla.);《分子生物学方法》(Methods in Molecular Biology)第80卷,1998,John D.Pound(编辑)(Humana Press,托托瓦,N.J.)。

[0323] 在某些实施方案中,本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物用于检测或诊断如本文所述的与Lewis抗原的表达相关的疾病的方法,其中所述方法包括使所述抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与来自疑似患有所述疾病或处于患所述疾病的风险中的对象的样品接触,并检测抗体:抗原复合物的形成和/或检测样品中的所述抗体、抗原结合片段或抗体缀合物特异性结合。在某些实施方案中,样品包含血液(例如,外周血)、组织、肿瘤或它们的任意组合。在某些实施方案中,诊断或检测方法是离体或体外进行的。

[0324] 体内检测具有可检测有效载荷或可检测标记的抗体缀合物的方法包括描述于/公开于以下中的那些方法:Friese和Wu,Mol.Immunol.67(200):142-152(2015)以及Moek等人,J.Nucl.Med.58:83S-90S(2017),所有通过引用并入本文。在某些实施方案中,检测抗体、抗原结合片段或抗体缀合物包括进行正电子发射断层摄影术(PET)、磁共振成像(MRI)、近红外成像(NRI)、x-射线计算机断层摄影术(CT)、单光子发射计算机断层摄影术(SPECT)、光学成像、超声波检查或它们的任意组合。

[0325] 优选的施用方式取决于待治疗的病况的性质,其在某些实施方案中将是指有害的或临床上不期望的病况,其程度、严重性、发生可能性和/或持续时间可以根据本文所提供的某些方法降低(例如,相对于适当的对照情况(如未治疗的对照)以统计学上显著的方式减少)。在施用后,以下的量被认为是有效的:可检测地减少、抑制、至少部分地防止、降低此类病况发生的严重性或可能性、或延迟此类病况发生的严重性或可能性,例如肿瘤负荷的部分或完全减少或转移性扩散的部分或完全减少。相关领域的技术人员将熟悉可以指示施用本文所述的组合物的临床适当性和/或可以使其适应的许多诊断、手术和/或其他临床标准。参见,例如,Hanahan和Weinberg,2011Cell 144:646;Hanahan和Weinberg 2000Cell 100:57;Cavallo等人你,2011Canc.Immunol.Immunother.60:319;Kyrigideis等人你,2010J.Carcinog.9:3;Park等人,2009Molec.Therap.17:219;Cheever等人,2009Clin Cancer Res15(17):5323-5337;Lu等人,2013Curr.Pharm.Biotechnol.14:714-22;Layke等人,2004Am.Fam.Physician 69:1133049;Bunn,2012Arch.Pathol.Lab.Med.136:1478-81;Manne等人,2005Drug Discov.Today10:965;Schmoll等人(编辑),2009ESMO癌症诊断和治

疗评估手册(ESMO Handbook of Cancer Diagnosis and Treatment Evaluation),CRC出版社,波卡拉顿,FL;Faix,2013Crit.Rev.Clin.Lab.Sci.50(1):23-36(“败血症的生物标志物(Biomarkers of Sepsis)”);Wiersinga等人,2014Virulence 5(1):36-44(“宿主对败血症的天然免疫应答(Host innate immune responses to sepsis)”);Hotchkiss等人,2013Nat.Rev.Immunol.13:862;Aziz等人,2013J.Leukoc.Biol.93(3):329;Beyrau等人,2012Open Biol.2:120134;Fry,2012Amer.Surg.78:1;Kellum等人,2007Arch.Intern.Med.167(15):1655;Remick,2007Am.J.Pathol.170(5):1435;Hotchkiss等人,2003New Engl.J.Med.348:138-150;Humar等人,器官移植图集(Atlas of Organ Transplantation),2006,Springer;Kuo等人,综合移植图集(Comprehensive Atlas of Transplantation),2004Lippincott,Williams&Wilkins;Gruessner等人,活体供体器官移植(Living Donor Organ Transplantation),2007McGraw-Hill Professional;Antin等人,干细胞和骨髓移植手册(Manual of Stem Cell and Bone Marrow Transplantation),2009剑桥大学出版社(Cambridge University Press);Wingard等人(编辑),造血干细胞移植:临床医生手册(Hematopoietic Stem Cell Transplantation:A Handbook for Clinicians),2009美国血库协会(American Association of Blood Banks);以及其中所引用的参考文献。

[0326] 因此,施用这些和相关药物组合物的典型途径包括但不限于口服、局部、经皮、吸入、肠胃外、舌下、口腔、直肠、阴道和鼻内。如本文中所使用的,术语肠胃外包括皮下注射、静脉内、肌内、胸骨内注射或输注技术。根据本发明的某些实施方案的药物组合物被配制允许其中包含的活性成分在向患者施用所述组合物时是生物可利用的。将施用于对象或患者的组合物可以采取一个或多个剂量单位的形式,其中例如片剂可以是单一剂量单位,并且本文所述的气溶胶形式的抗体、其抗原结合片段或抗体缀合物的容器可以容纳多个剂量单位。制备此类剂型的实际方法是本领域技术人员已知的或将是显而易见的;例如,参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版(Philadelphia College of Pharmacy and Science,2000)。在任何情况下,待施用的组合物将含有治疗有效量的本公开的抗体、其抗原结合片段或抗体缀合物,用于根据本文的教导治疗目的疾病或病况。在某些实施方案中,施用包括通过选自以下的途径施用:静脉内、肠胃外、胃内、胸膜内、肺内、直肠内、皮内、腹膜内、肿瘤内、皮下、口服、局部、经皮、颅内、鞘内、鼻内和肌内。

[0327] 药物组合物可以是固体或液体的形式。在一个实施方案中,载体是颗粒的,使得组合物是例如片剂或粉末形式。载体可以是液体,组合物可以是例如口服油、可注射液体或气溶胶,其可用于例如吸入施用。当用于口服施用时,药物组合物优选为固体或液体形式,其中半固体、半液体、混悬液和凝胶形式包括在本文认为是固体或液体的形式中。

[0328] 作为用于口服施用的固体组合物、可以将药物组合物配制成粉末、颗粒、压缩片剂、丸剂、胶囊、口香糖、薄片等。此类固体组合物通常含有一种或多种惰性稀释剂或可食用载体。此外,可以存在一种或多种以下物质:粘合剂,诸如羧甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,诸如淀粉、乳糖或糊精;崩解剂,诸如海藻酸、海藻酸钠、Primogel、玉米淀粉等;润滑剂,诸如硬脂酸镁或Sterotex;助流剂,诸如胶体二氧化硅;甜味剂,例如蔗糖或糖精;调味剂,诸如薄荷、水杨酸甲酯或橙调味剂;和着色剂。当药物组合物为胶囊(例如明胶胶囊)形式时,除了上述类型的物质之外,它还可以含有液体载体(如聚

乙二醇或油)。

[0329] 药物组合物可以是液体形式,例如酏剂、糖浆、溶液、乳液或混悬液。作为两个实例,液体可以用于口服施用或通过注射递送。当旨在用于口服施用时,优选的组合物除本发明化合物外,还含有一种或多种甜味剂、防腐剂、染料/着色剂和增味剂。在旨在通过注射施用的组合物中,可以包括表面活性剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、缓冲剂、稳定剂和等渗剂中的一种或多种。

[0330] 液体药物组合物,无论它们是溶液、混悬液或其它类似形式,都可以包括一种或多种以下佐剂:无菌稀释剂,诸如注射用水、盐水溶液,优选生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠、不挥发油(如合成的甘油单酯或甘油二酯,其可以用作溶剂或悬浮介质)、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它溶剂;抗菌剂,诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如乙二胺四乙酸;缓冲剂,诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及用于调节张力的试剂,诸如氯化钠或右旋糖。肠胃外制剂可以被封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。生理盐水是优选的佐剂。可注射的药物组合物优选是无菌的。

[0331] 用于肠胃外或口服施用的液体药物组合物应含有一定量的本文所公开的抗体、其抗原结合片段或抗体缀合物,从而获得合适的剂量。通常,该量是组合物中抗体或抗原结合片段的至少0.01%。当旨在用于口服施用时,该量可以变化为组合物重量的0.1%至约70%。某些口服药物组合物含有约4%至约75%的抗体、其抗原结合片段或抗体缀合物。在某些实施方案中,制备根据本发明的药物组合物和制剂,使得在稀释前肠胃外剂量单位含有0.01-10重量%的抗体、其抗原结合片段或抗体缀合物。

[0332] 药物组合物可以旨在用于局部施用,在这种情况下,载体可以适当地包含溶液、乳液、油膏或凝胶基质。例如,所述基质可以包含以下中的一种或多种:矿脂、羊毛脂、聚乙二醇、蜂蜡、矿物油、稀释剂(如水和醇)以及乳化剂和稳定剂。增稠剂可以存在于局部施用的药物组合物中。如果旨在用于经皮施用,则组合物可以包括经皮贴剂或离子电渗疗法装置。药物组合物可以旨在用于直肠施用,例如以栓剂的形式,其将在直肠中融化并释放药物。用于直肠施用的组合物可以含有油质基质作为合适的无刺激性赋形剂。这种基质包括但不限于羊毛脂、可可脂和聚乙二醇。

[0333] 药物组合物可以包括改变固体或液体剂量单位的物理形式的各种材料。例如,组合物可以包括在活性成分周围形成包衣壳的材料。形成包衣壳的材料通常是惰性的,并且可以选自例如糖、虫胶和其它肠溶衣剂。可替代地,可以将活性成分包封在明胶胶囊中。固体或液体形式的药物组合物可以包括与本发明的抗体、其抗原结合片段或抗体缀合物结合的试剂,从而有助于化合物的递送。可以在该能力中起作用的合适试剂包括单克隆抗体或多克隆抗体、一种或多种蛋白或脂质体。药物组合物可以基本上由可以作为气溶胶施用的剂量单位组成。术语气溶胶用于表示从胶体性质的那些到由加压包装组成的系统的多种系统。递送可以通过液化或压缩气体或通过分配活性成分的合适的泵系统进行。气溶胶可以在单相、双相或三相系统中递送以递送活性成分。气溶胶的递送包括必需的容器、活化剂、阀、子容器等,它们一起可以形成试剂盒。本领域普通技术人员在不进行过度实验的情况下可以确定优选的气溶胶。

[0334] 药物组合物可以通过制药领域熟知的方法制备。例如,旨在通过注射施用的药物

组合物可以通过将包含如本文中所述的抗体、其抗原结合片段或抗体缀合物以及任选的盐、缓冲剂和/或稳定剂中的一种或多种的组合物与无菌蒸馏水组合以形成溶液来制备。可以添加表面活性剂以促进均匀溶液或混悬液的形成。表面活性剂是与肽组合物非共价相互作用以促进抗体、其抗原结合片段或抗体缀合物在水性递送系统中溶解或均匀悬浮的化合物。

[0335] 组合物以治疗有效量施用,所述治疗有效量将根据多种因素(包括所用的具体化合物的活性;化合物的代谢稳定性和作用时间;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;施用方式和施用时间;排泄率;药物组合;特定病症或病况的严重性;和接受治疗的对象)而变化。通常,治疗有效日剂量(对于70kg哺乳动物)为约0.001mg/kg(即0.07mg)至约100mg/kg(即7.0g);优选治疗有效剂量(对于70kg哺乳动物)为约0.01mg/kg(即0.7mg)至约50mg/kg(即3.5g);更优选治疗有效剂量(对于70kg哺乳动物)为约1mg/kg(即70mg)至约25mg/kg(即1.75g)。

[0336] 包含本公开的抗体、其抗原结合片段或抗体缀合物的组合物也可以与一种或多种其它治疗剂施用同时、在一种或多种其它治疗剂施用之前或在一种或多种其它治疗剂施用之后施用。此类组合疗法可以包括施用含有本发明化合物和一种或多种另外的活性剂的单一药物剂量制剂,以及施用包含本发明的抗体、其抗原结合片段或抗体缀合物以及在其自身单独的药物剂量制剂中的每种活性剂的组合物。例如,如本文中所述的抗体、其抗原结合片段或抗体缀合物和其它活性剂可以在单一口服剂量组合物(如片剂或胶囊中)一起向患者施用,或者在单独的口服剂量制剂中施用每种试剂。类似地,如本文中所述的抗体、其抗原结合片段或抗体缀合物和其它活性剂可以在单一肠胃外剂量组合物(如在盐水溶液或其它生理学上可接受的溶液)中一起向患者施用,或在单独的肠胃外剂量制剂中施用每种药剂。在使用单独的剂量制剂的情况下,包含抗体和一种或多种另外的活性剂的组合物可以在基本上相同的时间(即同时)施用,或以单独的交错时间(即顺序地和以任何顺序)施用;组合疗法应理解为包括所有这些方案。

[0337] 因此,在某些实施方案中,还考虑本公开的抗体、其抗原结合片段或抗体缀合物与一种或多种其它治疗剂组合施用。此类治疗剂可以在本领域中被接受作为如本文中所述的特定疾病状态(如癌症)的标准治疗。所考虑的示例性治疗剂包括细胞因子、生长因子、类固醇、NSAID、DMARD、抗炎药、化学治疗剂、免疫检查点抑制剂、干扰RNA、刺激性免疫检查点分子的激动剂、靶向癌症的另一种抗体、抗原结合片段或抗体缀合物、或其它活性和辅助试剂。

[0338] 如本文中所使用的,术语“免疫抑制剂(immune suppression agent/immunosuppression agent)”是指提供抑制信号以帮助控制或抑制免疫应答的一种或多种细胞、蛋白质、分子、化合物或复合物。例如,免疫抑制剂包括那些分子:部分或完全阻断免疫刺激;降低、预防或延迟免疫活化;或增加、激活或上调免疫抑制。靶向(例如,用免疫检查点抑制剂)的示例性免疫抑制剂包括PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG3、CTLA4、B7-H3、B7-H4、CD244/2B4、HVEM、BTLA、CD160、TIM3、GAL9、KIR、PVR1G(CD112R)、PVRL2、腺苷、A2aR、免疫抑制细胞因子(例如IL-10、IL-4、IL-1RA、IL-35)、IDO、精氨酸酶、VISTA、TIGIT、LAIR1、CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5、Treg细胞或它们的任意组合。

[0339] 免疫抑制剂抑制剂(也被称为免疫检查点抑制剂)可以是化合物、抗体、抗体片段

或融合多肽(例如,Fc融合,如CTLA4-Fc或LAG3-Fc)、反义分子、核酶或RNAi分子或低分子量有机分子。在本文所公开的任意实施方案中,方法可意包括单独或以任意组合施用本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与一种或多种以下免疫抑制组分中的任一种的抑制剂。

[0340] 在某些实施方案中,本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与PD-1抑制剂组合使用,所述PD-1抑制剂例如为PD-1-特异性抗体,诸如匹地珠单抗、纳武单抗、派姆单抗、MEDI0680(以前为AMP-514)、AMP-224、BMS-936558或它们的抗原结合片段、或它们的任意组合。在其它实施方案中,本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与PD-L1特异性抗体组合使用,所述PD-L1特异性抗体诸如BMS-936559、德瓦鲁单抗(MEDI4736)、阿特殊单抗(RG7446)、阿维鲁单抗(MSB0010718C)、MPDL3280A或它们的抗原结合片段、或它们的任意组合。

[0341] 在某些实施方案中,本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与LAG3抑制剂(如LAG525、IMP321、IMP701、9H12、BMS-986016或它们的任意组合)组合使用。

[0342] 在某些实施方案中,本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与CTLA4的抑制剂组合使用。在具体实施方案中,本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与CTLA4特异性抗体或其结合片段组合使用,所述CTLA4特异性抗体或其结合片段诸如伊匹木单抗、曲美木单抗、CTLA4-Ig融合蛋白(例如阿巴西普、贝拉西普)或它们的任意组合。

[0343] 在某些实施方案中,本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与B7-H3特异性抗体或其抗原结合片段(如恩布珠单抗(MGA271)、376.96或两者)组合使用。B7-H4抗体结合片段可以是scFv或其融合蛋白,如例如描述于Dangaj等人,Cancer Res.73:4820,2013,以及描述于美国专利第9,574,000号和PCT专利公开第W0 2016/40724A1号和第W0 2013/025779A1号中的那些。

[0344] 在某些实施方案中,本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与CD244的抑制剂组合使用。在某些实施方案中,本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与BLTA、HVEM、CD160的抑制剂或它们的任意组合组合使用。抗CD160抗体描述于例如PCT公开第W02010/084158号中。

[0345] 在某些实施方案中,本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与TIM3的抑制剂组合使用。在某些实施方案中,本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与Ga19的抑制剂组合使用。

[0346] 在某些实施方案中,本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与腺苷信号传导的抑制剂(例如诱饵腺苷受体)组合使用。在某些实施方案中,本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与A2aR的抑制剂组合使用。

[0347] 在某些实施方案中,本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与KIR的抑制剂(如利鲁单抗(BMS-986015))组合使用。在某些实施方案中,本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与抑制性细胞因子(通常为除TGF β 以外的细胞因子)或Treg发育或活性的抑制剂组合使用。

[0348] 在某些实施方案中,本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与IDO抑制剂组合使用,所述IDO抑制剂诸如:左旋-1-甲基色氨酸、epacadostat(INCB024360;Liu等人,Blood 115:3520-30,2010)、依布硒啉(Terentis等人,Biochem.49:591-600,2010)、吡啶莫德、

NLG919 (Mautino等人, 2013年美国癌症研究协会第104届年会 (American Association for Cancer Research 104th Annual Meeting 2013); 2013年4月6-10日)、1-甲基-色氨酸(1-MT)-替拉扎明、或它们的任意组合。

[0349] 在某些实施方案中, 本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与精氨酸酶抑制剂组合使用, 所述精氨酸酶抑制剂诸如: N(ω)-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)、N- ω -羟基-去甲-1-精氨酸(去NOHA)、L-NOHA、2(S)-氨基-6-硼杂己酸(ABH)、S-(2-硼代乙基)-L-半胱氨酸(BEC)、或它们的任意组合。

[0350] 在某些实施方案中, 本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与VISTA的抑制剂(如CA-170(Curis, 列克星敦市, Mass.))。

[0351] 在某些实施方案中, 本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与TIGIT的抑制剂(如例如COM902(Compugen, 加拿大安大略省多伦多市))、CD155的抑制剂(如例如COM701(Compugen))、或两者组合使用。

[0352] 在某些实施方案中, 本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与PVRIG、PVRL2或两者的抑制剂组合使用。抗PVRIG抗体描述于例如PCT公开第WO 2016/134333号中。抗PVRL2抗体描述于例如PCT公开第WO 2017/021526号中。

[0353] 在某些实施方案中, 本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与LAIR1抑制剂组合使用。

[0354] 在某些实施方案中, 本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5的抑制剂或它们的任意组合组合使用。

[0355] 在某些实施方案中, 本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与增加刺激性免疫检查点分子的活性(即, 是激动剂)的试剂组合使用。例如, 本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物可以与以下组合使用: CD137(4-1BB)激动剂(如例如乌瑞芦单抗)、CD134(OX-40)激动剂(如例如MEDI6469、MEDI6383或MEDI0562)、来那度胺、泊马度胺、CD27激动剂(如例如CDX-1127)、CD28激动剂(如例如TGN1412、CD80或CD86)、CD40激动剂(如例如CP-870、893、rhuCD40L或SGN-40)、CD122激动剂(如例如IL-2)、GITR的激动剂(如例如在PCT专利公开号第WO 2016/054638号中所述的人源化单克隆抗体)、ICOS(CD278)的激动剂(如例如GSK3359609、mAb 88.2、JTX-2011、Icos 145-1、Icos314-8或它们的任意组合)。在本文所公开的任意实施方案中, 方法可以包括单独或以任意组合施用本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物与刺激性免疫检查点分子的一种或多种激动剂(包括前述的任意一种)。

[0356] 在某些实施方案中, 组合疗法包含本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物和第二疗法, 所述第二疗法包含以下中的一种或多种: 特异性针对癌症表达的癌抗原(即相同或不同的抗原)的另一种抗体、其抗原结合片段或抗体缀合物、放射治疗、手术、化学治疗剂、细胞因子、RNAi、或它们的任意组合。

[0357] 在某些实施方案中, 组合治疗方法包括施用本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物, 并进一步施用放射治疗或手术。放射疗法在本领域中是众所周知的, 并且包括X-射线疗法(如 γ -辐射)和放射性药物疗法。适于在对象中治疗给定癌症的手术和手术技术是本领域普通技术人员熟知的。质子疗法综述于Thariat等人, Bull.Cancer pii:S0007-4551(1)300001-8(2018)。

[0358] 在某些实施方案中, 组合治疗方法包括施用本公开的抗体、抗原结合片段或抗体

缀合物并且进一步施用化学治疗剂。化学治疗剂包括但不限于染色质功能抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、微管抑制药物、DNA损伤剂、抗代谢物(如叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和糖修饰类似物)、DNA合成抑制剂、DNA相互作用剂(如嵌入剂)和DNA修复抑制剂。示例性的化学治疗剂包括但不限于以下组:抗代谢物/抗癌剂,诸如嘧啶类似物(5-氟尿嘧啶、氟尿苷、卡培他滨、吉西他滨和阿糖胞苷)和嘌呤类似物、叶酸拮抗剂和相关抑制剂(巯嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁和2-氯脱氧腺苷(克拉屈滨));抗增殖/抗有丝分裂剂,其包括天然产物如长春花生物碱(长春花碱、长春新碱和长春瑞滨),微管破坏剂如紫杉烷(紫杉醇、多西他赛),长春新碱,长春花碱,诺考达唑,埃博霉素和长春瑞滨,表鬼臼毒素(依托泊苷、替尼泊苷),DNA损伤剂(放线菌素、安吡啶、蒽环类、博来霉素、白消安、喜树碱、卡铂,苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、癌得星、更生霉素、道诺霉素、阿霉素、表柔比星、六甲基三聚氰胺奥沙利铂、异磷酰胺、美法仑、美录瑞塔明(merchlorehtamine)、丝裂霉素、米托蒽醌、亚硝基脲、普卡霉素、甲基苄肼、紫杉醇、泰索帝、替莫唑胺、替尼泊苷、三亚乙基硫代磷酰胺和依托泊苷(VP16));抗生素,诸如更生霉素(放线菌素D)、道诺霉素、阿霉素(亚德里亚霉素)、伊达比星、蒽环类、米托蒽醌、博来霉素、普卡霉素(光辉霉素)和丝裂霉素;酶(全身性代谢L-天冬酰胺并剥夺不具有合成其自身天冬酰胺能力的细胞);抗血小板剂;抗增殖/抗有丝分裂烷化剂,诸如氮芥(二氯甲基二乙胺、环磷酰胺和类似物、美法仑,苯丁酸氮芥)、乙烯亚胺和甲基蜜胺(六甲蜜胺和噻替派)、烷基磺酸盐-白消安、亚硝基脲(卡莫司汀(BCNU)和类似物、链脲菌素)、三氮烯-达卡巴嗪(trazenes—dacarbazine,DTIC);抗增殖/抗有丝分裂抗代谢物,诸如叶酸类似物(甲氨蝶呤);铂配位络合物(顺铂、卡铂)、甲基苄肼、羟基脲、米托坦、氨鲁米特;激素、激素类似物(雌激素、它莫昔芬、戈舍瑞林、比卡鲁胺、尼鲁米特)和芳香酶抑制剂(来曲唑、阿那曲唑);抗凝剂(肝素、合成肝素盐和凝血酶的其他抑制剂);纤维蛋白溶解剂(如组织纤溶酶原激活物、链激酶和尿激酶)、阿司匹林、双嘧达莫、噻氯匹定、氯吡格雷、阿昔单抗;抗迁移剂;抗分泌剂(布雷菲德菌素(breveldin));免疫抑制剂(环孢霉素、他克莫司(FK-506)、西罗莫司(雷帕霉素)、硫唑嘌呤,麦考酚酸酯);抗血管生成化合物(TNP470、染料木黄酮)和生长因子抑制剂(血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂、成纤维细胞生长因子(FGF)抑制剂);血管紧张素受体阻滞剂;一氧化氮供体;反义寡核苷酸;抗体(曲妥珠单抗、利妥昔单抗);嵌合抗原受体;细胞周期抑制剂和分化诱导剂(维甲酸);mTOR抑制剂、拓扑异构酶抑制剂(阿霉素(亚德里亚霉素)、安吡啶、喜树碱、道诺霉素、更生霉素、eniposide、表柔比星、依托泊苷、伊达比星、伊立替康(CPT-11)和米托蒽醌、拓扑替康、伊立替康)、皮质类固醇(可的松、地塞米松、氢化可的松、甲基泼尼松龙(methylprednisolone)、强的松和泼尼松龙(prednisolone));生长因子信号转导激酶抑制剂;线粒体功能障碍诱导剂;毒素,诸如霍乱毒素、蓖麻毒蛋白、假单胞菌外毒素、百日咳博德特氏菌腺苷酸环化酶毒素或白喉毒素、和半胱天冬酶活化剂;以及染色质破坏剂。

[0359] 细胞因子可以被用于操纵宿主免疫应答以达到抗癌活性。参见,例如,Floros& Tarhini, Semin. Oncol. 42(4):539-548, 2015。用于促进免疫抗癌或抗肿瘤应答的细胞因子包括,例如, IFN- α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-24和GM-CSF,单独或与本公开的抗体、抗原结合片段、或抗体缀合物的组合。

[0360] 细胞免疫疗法(包括涉及表达特异性针对癌症抗原的天然或重组TCR和CAR的T细胞、NK细胞或NK-T细胞,并且包括此类细胞过继转移至受体)是癌症的新兴治疗方式(参见,

例如, Bonini和Mondino, Eur. J. Immunol. 45 (9) : 2457-69 (2015) 以及Metha和Rezvani, Front. Immunol. 9:283 (2018))。在某些实施方案中, 接受本公开的抗体、抗原结合片段或抗体缀合物(或药物组合物)的对象已经或正在(即同时发生、同时或相继)接受靶向癌症的细胞免疫疗法。

[0361] 本文还提供了用于治疗、检测或诊断如本文中所述的以Lewis抗原的表达(例如过表达)为特征的疾病的目前所公开的抗体、抗原结合片段、抗体缀合物、多核苷酸、载体、宿主细胞和组合物中的任一种。在某些实施方案中, 所述疾病是癌症, 诸如本文所公开的任意癌症。在某些实施方案中, 抗体、抗原结合片段、抗体缀合物或组合物用于本文中所述的任意组合疗法中。

[0362] 本文还提供了用于制备用于治疗以如本文中所述的Lewis抗原的表达(例如过表达)为特征的疾病的药物的目前所公开的抗体、抗原结合片段、抗体缀合物、多核苷酸、载体、宿主细胞和组合物中的任一种。在某些实施方案中, 所述疾病是癌症, 诸如本文中所公开的任意癌症。在某些实施方案中, 药物包含本文中所述的任意组合疗法或用于本文中所述的任意组合疗法。

[0363] 除非内容另外清楚地指出, 本说明书和所附权利要求书中所使用的单数形“一个/种(a/an)”、和“所述”包括复数引用。此外, 可替代方案(例如“或”)的使用应理解为意指可替代方案中的一个、两个或它们的任意组合。

[0364] 在本说明书中, 除非上下文另有要求, 否则词语“包含(comprise)”、“具有(have)”或诸如“具有(has/having)”、“包含(comprises/comprising)”的变型将被理解为暗示包括所陈述的元素或整体、或元素或整数的组, 但不排除任意其它元素或整数、或元素或整数的组。在本说明书中, 除非另有说明, 否则任意浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应理解为包括所述范围内的任意整数的值, 以及在适当时包括其分数(如整数的十分之一和百分之一)。此外, 除非另有说明, 本文所述的与任意物理特征相关的任意数字范围(如聚合物亚单元、尺寸或厚度)应理解为包括所述范围内的任意整数。

[0365] 如本文中所述的, 除非另有说明, 术语“约”意指不超过所示范围、值或结构的±20%, 或在某些实施方案中不超过所示范围、值或结构的50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、10%、9%、8%、7%、6%或5%。

[0366] 此外, 应理解, 衍生自本文中所述的结构和取代基的各种组合的各化合物或化合物组由本申请公开至如同各化合物或化合物组单独阐述的相同程度。因此, 具体结构或具体取代基的选择在本公开的范围之内。

[0367] 术语“基本上由……组成”不等同于“包含”并且是指权利要求的指定材料或步骤, 或不实质性影响所要求保护的的主题的基本特性的那些材料或步骤。

[0368] 除非另有明确说明, 本说明书中的每一个实施方案都将被必要地应用到每一个其它的实施方案中。

实施例

[0369] 实施例1

[0370] 嵌合BBC抗体的产生

[0371] 抗体可变区cDNA的分离

[0372] 表达鼠IMH2/BBC抗体的杂交瘤细胞得自S.Hakomori博士(Cancer Research 52: 3739-3745(1992)),所述鼠IMH2/BBC抗体包含具有SEQ ID NO:27中所示氨基酸序列的VL结构域和具有SEQ ID NO:28中所示氨基酸序列的VH结构域。为了制备用于cDNA合成的RNA,首先通过低速离心(300g,5分钟)收集 9×10^6 个杂交瘤细胞,然后根据制造商的方案使用“总RNA小量制备纯化试剂盒”TM(GeneMarkTM,GMbiolab Co.Ltd.,中国台湾省台中市)进行RNA分离。然后使用SMART RACE cDNA扩增试剂盒TM(Takara/BD Biosciences-Clontech,帕洛阿尔托,CA)从纯化的RNA克隆编码IMH2的抗体基因,与供应商推荐的方案相比具有微小的修饰。

[0373] 简而言之,在第一链cDNA合成和dC加尾之后,使用试剂盒提供的引物和基于已知小鼠k链序列在恒定区中设计的特异性引物,通过两轮PCR分离特异性编码IMH2的轻链可变区的cDNA。第一PCR按以下进行:在94℃下30秒和在72℃下1分钟的5个循环;随后在94℃下30秒、在67℃下30秒和在72℃下1分钟的5个循环。加入二十七(27)个额外的PCR反应循环(包括在94℃下30秒、在62℃下30秒和在72℃下1分钟)以确保成功扩增。然后进行第二套PCR以进一步提高保真度,所述第二嵌套式PCR包括以下步骤:在94℃下预热5分钟的步骤,接着在94℃下30秒、在54℃下30秒和在72℃下1分钟的35个循环,以及在72℃下3分钟的最终延伸步骤。

[0374] 重链基因的克隆策略略有不同。首先,用小鼠IgG3-特异性引物从RNA到恒定结构域1(CH1)制备用于PCR反应的单链cDNA模板。然后通过如下单轮PCR进行基因分离:在94℃下预热5分钟,包括在94℃下30秒、在62℃下30秒、在72℃下1分钟的35个PCR反应循环,随后在NUP引物(SMARTTM RACE扩增试剂盒,Clontech,帕洛阿尔托,CA)和小鼠CH1结构域的嵌套式引物存在下于72℃下5分钟的最终延伸步骤。然后使用PCR纯化试剂盒(GeneMarkTM GMbiolab Co.Ltd.)纯化编码轻链和重链片段可变区的cDNA,并导入yT&A克隆载体(Yeastern BiotechTM,中国台湾省台北市)中进行阳性克隆鉴定和序列确定。

[0375] 抗体表达质粒的构建

[0376] 为了构建用于产生本文中被称为“BBC”抗体的抗体的表达质粒,使用PCR引物和在上述yT&A载体中克隆的抗体基因仅制备编码成熟(无前导肽)重链可变区和轻链可变区的cDNA。如下进行PCR:在94℃下预热5分钟,包括在94℃下30秒、在65℃下30秒、在72℃下60秒的35个PCR反应循环,以及在72℃下3分钟的最终延伸步骤。在PCR反应过程中,在VH cDNA的5' (NheI) 和3' (ApaI) 末端以及VL cDNA的5' (NheI) 和3' (BsiWI) 末端掺入限制性内切酶识别序列以促进随后的表达质粒工程化。然后将扩增的cDNA片段依次用限制性酶ApaI/NheI消化重链和NheI/BsiWI消化轻链基因。凝胶纯化后,回收的VH和VL cDNA在相同的限制性酶克隆位点处与pGNX-RhcG1(VH)或pGNX-Rhck载体(VL)连接,分别获得表达载体pGNX-RhcG1-BBC和pGNX-Rhck-BBC。使用多克隆位点上游的引物确认插入的cDNA序列。

[0377] 抗体的瞬时产生

[0378] 为了瞬时产生嵌合BBC抗体,在聚乙烯亚胺存在下,用编码重链和轻链的pGNX-RhcG1-BBC和pGNX-Rhck-BBC表达质粒共转染HEK293-c18细胞。在转染后第7天结束时收集培养物上清液用于分析。

[0379] 实施例2

[0380] 人源化BBC抗体的产生

[0381] 为了产生BBC抗体的人源化形式(如上文实施例1中所述的),选择同源人抗体序列(人受体)进行CDR移植。简而言之,通过搜索NCBI蛋白数据库以定位与BBC抗体的重链(SEQ ID NO:28)可变区和轻链(SEQ ID NO:27)可变区表现出最高同源性的序列来鉴定潜在的人受体序列。选择人受体构架CAD89404.1(Vh)和AAS01771.1(VI)(图1)。然而,将非人CDR序列直接插入人受体框架可能导致结合亲和力的丧失。结合亲和力可以在将框架残基从人受体转移回非人供体序列后恢复。优选的反向突变通过维持原始CDR构象来恢复结合亲和力。

[0382] 为了恢复CDR移植后的结合亲和力,首先基于BBC晶体结构数据,使用AccelrysDiscovery Studio™(BIOVIA,圣地亚哥,CA)软件建立抗体的3-D模型。然后通过如下检查结构预测关键氨基酸的反向突变:

[0383] 1. 计算人源化框架上变化的残基的突变能量(稳定性)。突变能量的正值对应于突变的去稳定作用,反之亦然。

[0384] 2. 检查框架残基和CDR区之间的空间距离。考虑最接近CDR的残基(在4Å内)。

[0385] 3. 检查位于重链可变区和轻链可变区界面的残基。这些残基有助于重链和轻链的组装,因此可能对抗体结构有显著影响。

[0386] 最初选择基于预测标准的十(10)个有影响的位置(轻链中的3个和重链中的7个)进行反向突变。此外,所选择的人重链模板的第70位(根据Kabat编号)的甲硫氨酸(M)残基似乎是不常见的基序,因此在该位点被高度保守的异亮氨酸(I)替代(图1;反向突变的残基(人受体→hBBC.8),在下表3中加划线表示;Met→Ile残基在表3中用粗斜体加下划线表示,在图1中用框表示。这些氨基酸转化产生“hBBC.8”人源化抗体。

[0387] 引入另外的变化以进一步改善抗体。首先,在小鼠和人序列之间变化的hBBC.8轻链中有两个位置(R66和F71)突变以产生“hBBC.9”(含有F71Y突变)和“hBBC.10”(含有F71Y和R66G突变)(图2A;在表3中,残基是粗体的和斜体的,没有加下划线)。图2B显示了BBC与产生的人源化变体hBBC.9和hBBC.10与AGS细胞的结合。简而言之,AGS人胃癌细胞系(ATCC CRL-1739;ATCC,马纳萨斯,VA)定期保存在F12培养基中,并补充10%透析的胎牛血清。为了进行细胞结合研究,将100μl PBS中的大约 3×10^5 个细胞与等体积的稀释抗体混合。在室温下孵育1小时后,向每个样品中加入2ml PBS以漂洗掉未结合的抗体。离心后,将回收的细胞沉淀直接重悬于200μl荧光素(FITC)-AffiniPure™山羊抗人IgG(在PBS中1:200稀释的Fc γ片段特异性)(Jackson ImmunoResearch,West Grove,PA,Cat.109-095-098)。室温孵育30分钟后,重复PBS洗涤以消除未结合的次级抗体。将收集的细胞重新悬浮在200μl PBS中,并在BD FACSCanto™流式细胞仪系统(BD Biosciences,圣何塞,CA)上分析。进行进一步分析以鉴定潜在的免疫原性序列。

[0388] 重链或轻链中的其它突变产生其它变体“hBBC.9.1”和“hBBC.10.1”(在下表3中,残基是粗体和加下划线的,无斜体)。具体地,分析BBC抗体和hBBC.8抗体以及模拟的抗原/抗体复合物的晶体结构。鉴定轻链CDR区和重链CDR区中的几个残基(根据Kabat编号指定的位置)进行单位点氨基酸替换。通过两轮PCR反应用特定设计的引物进行在抗体轻链或重链基因的指定位置的氨基酸转换。为了便于将突变的抗体cDNA片段插入表达载体,在PCR反应过程中,在每个末端掺入限制性位点(cDNA链为5'NheI和3'ApaI,轻链cDNA为5'NheI和3'BsiWI)。第二次PCR反应后产生DNA片段,用NheI/ApaI或NheI/BsiWI切割,并分别连接到用于重链和轻链基因构建的pGNX-RhcG1和pGNX-Rhck载体的相同位点。表1显示了突变位点和

变化。

[0389] 表1.hBBC.8的单位点突变

轻链位置	位置和原始氨基酸	变化的氨基酸
CDR1	E27	A
	Y30	A
	N31	A
	T34	S、V
CDR2	G50	A
	S53	A
CDR3	Q89	A
	T93	A、S、V、D

[0390]

重链位置	位置和原始氨基酸	变化的氨基酸
CDR1	S31	A
	Y33	A
CDR2	Y54	A
	S55	T
	N57	A、D、Q、Y、W
	S61	A
CDR3	Y104	A
	D105	A
	H106	A

[0391] 在AGS细胞结合测定中,许多突变体展现出等于或大于嵌合抗体(BBC)的1/2活性的体外结合活性(图2C,也参见表2)。此外,如表2中所示的,在ELISA测定中,一些突变体通过与单价Lewis B结构的降低的交叉反应性(与BBC相比等于或小于1/8强度)还展现出特异性改善。单价Lewis B是在正常人组织中表达的血型抗原。

[0392] 表2.BBC CDR突变体的结合活性

轻链位置	原始氨基酸和位置	突变的氨基酸	AGS	Le ^B
			结合活性	ELISA
CDR1	Y30	A	=	
	R32	A	-	
CDR2	G50	A	=	-
CDR3	W92	A	-	-
	T93	S	=	-
重链位置	原始氨基酸和位置	变化的氨基酸	AGS	Le ^B
			结合活性	ELISA
CDR1	Y33	A	=	
	T34	A	-	
CDR2	S55	T	+	-
CDR3	Y104	A	=	-
	H106	A	=	-

[0394] (=) 相对于BBC, 结合活性没有变化

[0395] (-) 相对于BBC, 结合活性降低

[0396] (+) 相对于BBC, 结合活性增加

[0397] 由于hBBC.8与BBC相比显示出大约1/3AGS细胞结合活性(图2B), 并且在异种移植小鼠模型中展现出非常好的肿瘤抑制(参见实施例6), 这些单个氨基酸替换的抗体突变体具有展示抗肿瘤活性的潜力。在表1中总结了这些所分析的克隆的位置和氨基酸替换。为了进一步确认其亲和力和/或特异性提高的能力, 选择总共七(7)个单一突变位点(表2)在人源化抗体模板中进行评估。这些包括测试其对抗体与AGS细胞结合的影响的5个单残基取代(轻链中的三个和重链中的两个)(图2C), 测试其对抗体结合特异性(与纯化的Le^B相比对AGS细胞)影响的两个重链单残基取代, 和类似分析的2个重链双残基替换(图2D)。

[0398] 在图2E中显示了在亲和性(AGS细胞结合测定)和特异性(Lewis bELISA测定)方面构建为原始嵌合形式的各种人源化BBC形式的进一步比较。

[0399] hBBC.9的Epibase分析(应用蛋白质服务(Applied Protein Services), Lonza Biologics, 英国剑桥)预测重链区域中的区域具有强烈的免疫原性风险。为了最大程度地减少潜在的免疫原性问题, 在重链框架3区中添加了6个其他氨基酸变化(第78、80、82-84和86位), 以匹配这些位置的参照人源化抗体(图3)。这些转换为“hBBC.10.1FQ”提供了重链框架。表3中总结了该实施例中所述的各种重链和轻链可变区的氨基酸序列。

[0400] 表3. 抗体VH和VL区的氨基酸序列

[0401]

抗体	轻链可变区	重链可变区
IMH2/BBC	DIQMTQSSSSFSVSLGDRV TITCT ASEDIYNRL TWYQQ KPGNVPRLLIS GATSLDTG VPSRFSGSRSGKDYSIT SLQTEDVATYYC QQYWTT PWTFGGGTRLEIK (SEQ ID NO:27)	DVQLQESGPDLVKPSQSLSL TCTVTGYSIT SGYTWHWIRQ FPGNTLEWLGY IHYSGNTKY SPSLKSRLSVTRDTSKNQFF LQLNSVTTEDTATYYCG REA LRGYDHGFWFTYWGQGLTV TV (SEQ ID NO:28)
人受体	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITC RASQG ISNYLAWYQQ KPGKVPKLLIY AAS TLQSG VPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDVATYYC QKYN SA PYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:29)	QVQLQESGPGLVKPSQTL TCTVSGGSIS SGAYYWSWIR QHPGKGLEWIGY IYYSGTTY YNPSLKSRLMS RDTSKNQF SLKLSSVTA ADTAVYYCARG PYYDSRPFPDPWGQGLVT V (SEQ ID NO:30)
hBBC.8	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCT ASEDIYNRL TWYQQ KPGKVPRLIS GATSLDTG VPSRFSGSRSGTDFLTIS LQPEDVATYYC QQYWTP WTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:31)	QVQLQESGPGLVKPSQTL TCTVSGYSIT SGYTWHWIRQ HPGKGLEWLG IHYSGNTKY SPSLKSRLS /SRDTSKNQFFL KLSSVT TEDTAVYYCGREAL RGYDHGFWFTYWGQGLVT V (SEQ ID NO:32)
hBBC.9	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCT ASEDIYNRL TWYQQ KPGKVPRLIS GATSLDTG VPSRFSGSRSGTDYTLTIS SLQPEDVATYYC QQYWTT PWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:33)	(hBBC.8 重链可变区(SEQ ID NO:32))
hBBC.9.1	(hBBC.9 轻链可变区(SEQ ID NO:33))	QVQLQESGPGLVKPSQTL TCTVSGYSIT SGYTWHWIRQ HPGKGLEWLG IHYTGNTKY SPSLKSRLS /SRDTSKNQFFL KLSSVT TEDTAVYYCGREAL RGADHGFWFTYWGQGLVT V (SEQ ID NO:34)

[0402]

抗体	轻链可变区	重链可变区
hBBC.10	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCT ASE DIYNRLTWYQQ KPGKVPRLISGATSLDTG VPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDVATYYC QQYWTT PWTF GQGTKLEIK (SEQ ID NO:5)	(hBBC.8 重链可变区(SEQ ID NO:32))
hBBC.10.1	(hBBC.10 轻链可变区(SEQ ID NO:5))	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTL TCTVSGYSIT SGYT WHWIRQ HPGKGLEWLG YIHYT GNTKY SPSLKS RLSISRDTSKNQFFL KLSSVTTEDTAVYYCGREAL RGYDAG FWFTYWGQGTLLV V (SEQ ID NO:35)
hBBC.10.1F Q	(hBBC.10 轻链可变区(SEQ ID NO:5))	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTL TCTVSGYSIT SGYT WHWIRQ HPGKGLEWLG YIHYT GNTKY SPSLKS RLSISRDTSKNTFY QMNS LTTEDTAVYYCGREAL RGYDAG FWFTYWGQGTLLV V (SEQ ID NO:1)

[0403] 实施例3

[0404] 鉴定HBBC表位的表征

[0405] BBC和本文中所述的变体被设计为聚糖结合单克隆抗体。基于母体IMH2 (BBC) 抗体的公开的特异性数据 (Ito等人, Cancer Res. 52:3739, 1992), 假设产生的BBC抗体的靶表位与Le^B抗原和Le^Y抗原相关。使用hBBC.10.1进行以下表位表征研究, 在以下实施例和附图中也被称为“hBBC”。

[0406] 免疫纯化

[0407] 分离来自结肠直肠癌细胞系Colo-205的GSL衍生聚糖并使用BBC进行免疫纯化。如图4A和图4B中所示的, 将未结合的级分和洗脱的级分中的聚糖过甲基化并用MALDI-MS分析进行表征。未结合级分的聚糖图谱与输入聚糖图谱相似, 表明来自COLO 205的大多数GSL衍生的聚糖不与BBC结合。然而, 在洗脱的 (BBC-结合的) 级分中, Fuc₄ (LacNAc)₃Lac聚糖仅通过BBC纯化。具体地, 令人惊讶地发现, 基于在MS/MS实验中对I-分支抗原上观察到的Le^B指纹片段和Le^Y指纹片段, hBBC纯化的聚糖携带双触角Le^{B/Y} (即, Le^B/Le^B、Le^B/Le^Y或Le^Y/Le^Y), 而未结合级分中的聚糖是线性结构 (可能是Le^B-Le^A-Le^A-Lac)。该结果表明I抗原上的双触角Le^{B/Y}是BBC的表位。

[0408] 该结果还得到来自细胞系NCI-N87和SW1116的GSL衍生聚糖的BBC结合聚糖的免疫纯化的支持, 所述细胞系NCI-N87和SW1116被选择用于I抗原上双触角Le^{B/Y}的糖脂表达。如预期的, BBC结合到四岩藻糖化的GSL衍生的聚糖Fuc₄ (LacNAc)₃Lac上, 而不是单岩藻糖化的、双岩藻糖化的和三岩藻糖化的聚糖上 (图5A-图5B)。通过MSMS测序, 确认了NCI-N87和SW1116 GSL的BBC结合聚糖是携带I抗原的双触角Le^{B/Y} (图6A和图6B)。

[0409] 除了 $\text{Fuc}_4(\text{LacNAc})_3\text{Lac}$ 之外,纯化了一组来自NCI-N87和SW1116的GSL衍生的聚糖,其特征在于多个岩藻糖基化(四个岩藻糖残基是BBC结合的最低要求)。使用MSMS对NCI-N87 GSL的两种显性BBC-结合聚糖 $\text{Fuc}_4(\text{LacNAc})_4\text{Lac}$ 和 $\text{Fuc}_6(\text{LacNAc})_{4\rightarrow5}\text{Lac}$ 进行测序,并确定为具有双触角或三触角 Le^Y 的携带I抗原的聚糖(图7A和图7B)。此外,当用BBC免疫纯化来自AGS细胞系的释放的N-聚糖时,发现富集的N-聚糖是具有双或三触角 Le^Y 的结构(图8A和图8B)。该结果与富集的I抗原一致。

[0410] 这些数据显示 $\text{Le}^{B/Y}$ 是BBC的结合单位。然而,单触角 $\text{Lewis}^{B/Y}$ 不足以提供与BBC的强结合。具有完全末端岩藻糖化的独特的I抗原和N-聚糖提供了多价 $\text{Le}^{B/Y}$,其被指示为BBC的强结合表位。还对hBBC进行了可比较的免疫纯化研究,并显示出与BBC相似的聚糖富集特异性(数据未显示),这表明hBBC和BBC共享相似的表位。

[0411] 等温滴定量热法

[0412] 进行等温滴定量热法(ITC)以分析hBBC与 $\text{Le}^Y\text{-Gal}$ 、 $\text{Le}^B\text{-Gal}$ 、 $\text{Le}^A\text{-Gal}$ 和 $\text{Le}^X\text{-Gal}$ 的一组线性聚糖,以及 $\text{Le}^Y/\text{Le}^Y\text{-ASGP}$ 、 $\text{Le}^X/\text{Le}^X\text{-ASGP}$ 、H-ASGP、 $\text{Le}^Y/\text{Le}^Y\text{-I}$ 抗原和 $\text{Le}^Y/\text{Le}^B\text{-I}$ 抗原的分支聚糖之间的结合亲和力。BR96抗体(描述于美国专利第5,491,088A号中;变体描述于美国专利第5,792,456A号)被包括作为对照。因为由hBBC免疫纯化实验表征的聚糖以有限量存在,所以各种 Le^B 和 Le^Y 相关聚糖获自商业来源(Elycityl SA,克洛尔,法国)或根据本领域已建立的方法(例如,Wu等人,2011Glycobiology 21(6):727-733;Becker等人,2003Glycobiology 13(7):41R-53R;de Vries等人,2001Glycobiology 11(10):119R-128R)在内部进行酶促合成的。

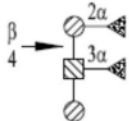
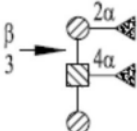
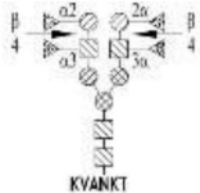
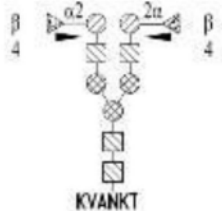
[0413] 简而言之,对于等温滴定量热法(ITC),内部制备过滤的PBS pH7.2,并且在一次ITC注射循环内使用相同批次的缓冲液。在50 μM 蛋白质浓度的过滤的PBS pH7.2缓冲液中预交换mAb。聚糖抗原的量通过高性能阴离子交换用脉冲安培检测(HPAEC-PAD,例如Rothenhofer等人,2015J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.988:106)来定量,以半乳糖为计算标准的单糖分析。将定量的聚糖抗原溶于过滤的PBS pH7.2(与mAb溶液制备相同的批次),每次注射使用60 μL 溶液。

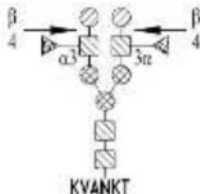
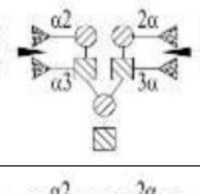
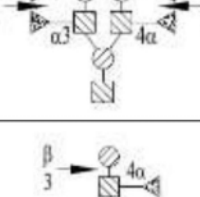
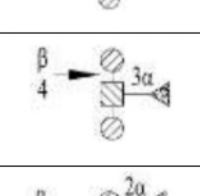
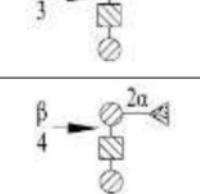
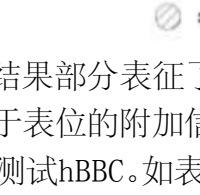
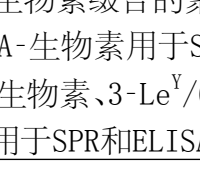
[0414] 在MicroCal iTC200系统(Malvern Instruments Ltd,莫尔文,英国)上进行ITC实验。在将mAb溶液(50 μM)加载到iTC200的样品池中之后,将系统温度设定为25 $^{\circ}\text{C}$ 。在系统温度达到25 $^{\circ}\text{C}$ 之后,将聚糖抗原溶液加载到注射器中并缓慢降低到mAb填充的样品池中。实验参数如下:注射#:20;池温度:25 $^{\circ}\text{C}$;参照功率:6 $\mu\text{cal/s}$;初始延迟:60s;样品细胞浓度:50 μM ;搅拌速度:750rpm,注射器浓度输入,测得聚糖抗原浓度。注射参数如下:注射体积:2 μL ;持续时间:4s;间隔:150s;填充时间:5s;并且将第一注射体积调节至1 μL 。当确认所有设置时,开始实验,并通过Origin对iTC200的所得数据进行处理。滴定曲线用One Set of Sites拟合模型进行拟合,重复100次迭代,得到最佳拟合结果。因此计算K和 K_D 。

[0415] 图9A、图9B、图10A-图10C和图11A-图11F显示了各种聚糖抗原与hBBC抗体的ITC滴定图。在图12A-图12C中显示了各种聚糖抗原与BR96抗体的ITC滴定图。简而言之,ITC分析显示hBBC对 $\text{Le}^B\text{-Gal}$ ($K_D=26.2\mu\text{M}$)比 $\text{Le}^Y\text{-Gal}$ ($K_D=80.6\mu\text{M}$)具有更高的特异性结合亲和力。此外,hBBC对双触角结构($\text{Le}^Y/\text{Le}^Y\text{-ASGP}$ 、 $\text{Le}^Y/\text{Le}^Y\text{-I}$ 抗原和 $\text{Le}^Y/\text{Le}^B\text{-I}$ 抗原)显示出比对单链 $\text{Le}^Y\text{-Gal}$ 抗原更强的结合亲和力。hBBC对 $\text{Le}^Y/\text{Le}^Y\text{-ASGP}$ 、 $\text{Le}^Y/\text{Le}^Y\text{-I}$ 抗原和 $\text{Le}^B/\text{Le}^Y\text{-I}$ 抗原的结合亲和力似乎相似,表明对于双触角聚糖表位, Le^Y 和 Le^B 侧链对特异性结合具有相当的贡

献。此外,如图11A-F中所示的,缺少四岩藻糖化LacNAc部分的聚糖抗原,无论是单链还是双触角形式($\text{Le}^X\text{-Gal}$ 、 $\text{Le}^A\text{-Gal}$ 、I型H抗原、II型H抗原、H-ASGP和 $\text{Le}^X/\text{Le}^X\text{-ASGP}$),都没有显示出与hBBC的特异性结合。这些结果表明,具有I型或II型连接的四岩藻糖化LacNAc对于hBBC的特异性结合是必需的。总之,与免疫纯化数据一致,ITC结果显示hBBC结合包括含有 Le^Y 和/或 Le^B 的结构的表位(表4;聚糖描述如下:空心圆=Gal;实心圆=Man;实心正方形=GlcNAc;闭合三角形=Fuc)。与双触角 $\text{Le}^Y/\text{Le}^Y\text{-I}$ 抗原和双触角 $\text{Le}^Y/\text{Le}^Y\text{-ASGP}$ (图12A-图12C)相比,BR96对照显示类似于对单链 $\text{Le}^Y\text{-Gal}$ 的结合亲和力略高,表明BR96在单链和双触角 Le^Y 聚糖之间没有特异性选择性。因此,与BR96相比,hBBC具有独特的表位特异性。

[0416] 表4.等温滴定量热法结果

抗原结构	抗原名称	hBBC	BR96
	Le ^Y -Gal	$K_D = 80.6 \mu\text{M}$	$K_D = 5.68 \mu\text{M}$
	Le ^B -Gal	$K_D = 26.2 \mu\text{M}$	n/a
	Le ^Y /Le ^Y -ASGP	$K_D = 25.9 \mu\text{M}$	$K_D = 10.66 \mu\text{M}$
	H-ASGP	未检测到特异性结合	n/a

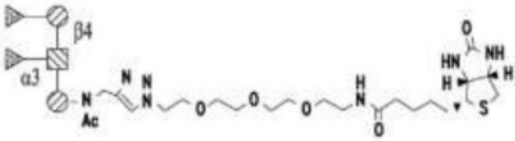
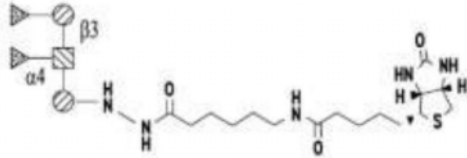
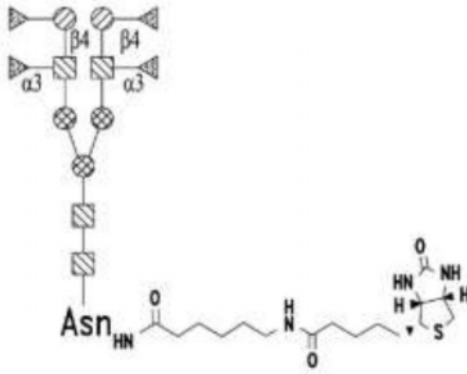
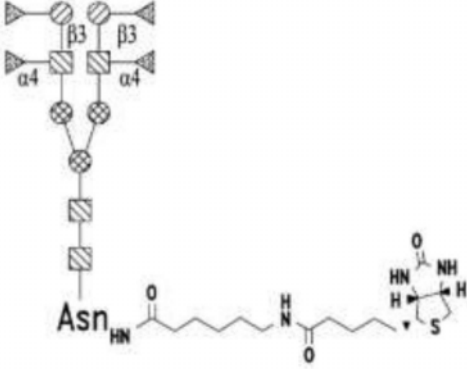
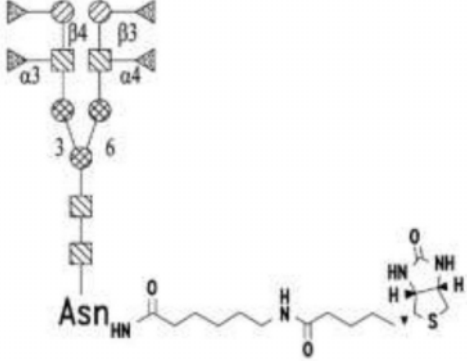
抗原结构	抗原名称	hBBC	BR96
	Le ^X /Le ^X -ASGP	未检测到特异性结合	n/a
	Le ^Y /Le ^Y -I 抗原	K _D = 30.0 μM	K _D = 5.99 μM
	Le ^Y /Le ^B -I 抗原	K _D = 40 μM	n/a
	Le ^A -Gal	未检测到特异性结合	n/a
	Le ^X -Gal	未检测到特异性结合	n/a
	I 型 H 抗原	未检测到特异性结合	n/a
	II 型 H 抗原	未检测到特异性结合	n/a

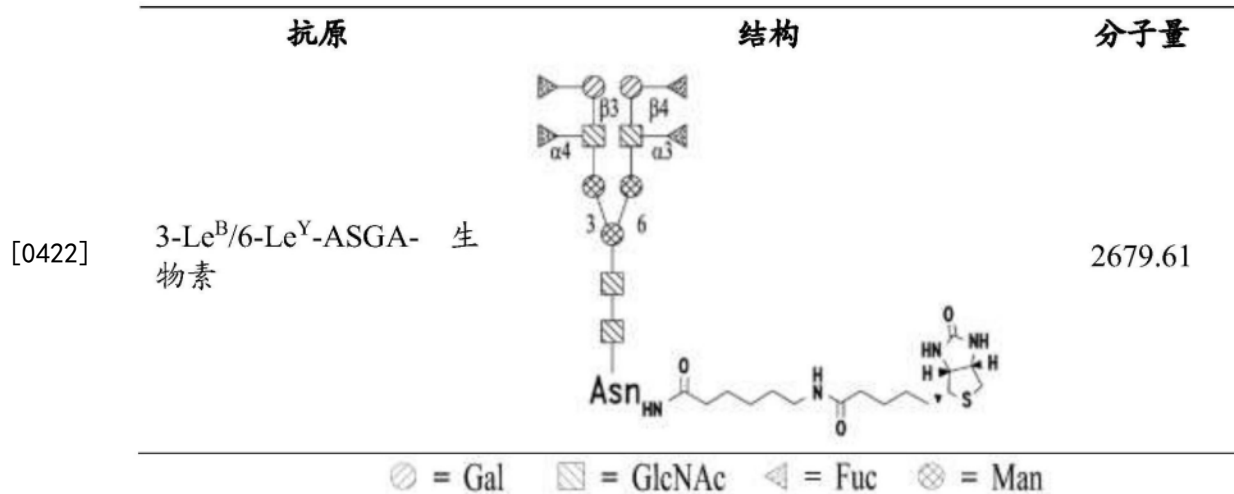
 = Gal
 = GlcNAc
 = Fuc
 = Man

[0418]

[0419] 这些结果部分表征了hBBC表位。然而,自由流动的hBBC和固定化聚糖之间的相互作用提供了关于表位的附加信息;因此,在表面等离子体共振 (SPR) 和ELISA实验中,用一系列固定的聚糖测试hBBC。如表5中所示的(与表4中相同的聚糖描述),利用链霉亲和素包被的分析表面和生物素缀合的聚糖($\text{Le}^Y\text{-Gal-生物素}$ 、 $\text{Le}^B\text{-Gal-生物素}$ 、 $\text{Le}^Y/\text{Le}^Y\text{-ASGA-生物素}$ 和 $\text{Le}^B/\text{Le}^B\text{-ASGA-生物素}$ 用于SPR; $\text{Le}^Y\text{-Gal-生物素}$ 、 $\text{Le}^B\text{-Gal-生物素}$ 、 $\text{Le}^Y/\text{Le}^Y\text{-ASGA-生物素}$ 、 $\text{Le}^B/\text{Le}^B\text{-ASGA-生物素}$ 、 $3\text{-Le}^Y/6\text{-Le}^B\text{-ASGA-生物素}$ 和 $3\text{-Le}^B/6\text{-Le}^Y\text{-ASGA-生物素}$ 用于ELISA)。

[0420] 表5. 用于SPR和ELISA的聚糖抗原的结构和MW

抗原	结构	分子量
Le ^Y -Gal-sp3-生物素		1361.4
Le ^B -Gal-LC-生物素		1191.25
Le ^Y /Le ^Y -ASGA-生物素		2679.61
[0421]		
Le ^B /Le ^B -ASGA-生物素		2679.61
3-Le ^Y /6-Le ^B -ASGA 生物素		2679.61



[0423] 表面等离子体共振

[0424] hBBC对Le^Y-Gal-生物素、Le^B-Gal-生物素和Le^Y/Le^Y-ASGA-生物素的结合亲和力通过在链霉亲和素包被的芯片上的表面等离子体共振 (SPR) 来分析。简而言之, Biacore T100 与HBS-EP+缓冲液 (GE Healthcare) 一起被用作运行缓冲液。将生物素化的聚糖稀释至10pM, 并根据标准程序固定在传感器芯片SA (GE Healthcare) 上。将聚糖以10μL/min的流速固定60s。用Zeba脱盐旋转柱 (7K MWC0, 0.5mL, ThermoFisher) 将hBBC或BR96缓冲液交换至HBS-EP+缓冲液, 并用HBS-EP+缓冲液连续稀释至480、240、120、60和30nM。进行单循环动力学分析。抗体以30μL/min的流速与聚糖缔合150s, 并解离300s。用2M MgCl₂以50μL/min的流速再生芯片120s。使用Biacore T200评估软件 (GE Healthcare) 评估数据。两态反应被用于曲线拟合, 并且获得ka、kd和KD的最佳拟合值 (表6)。图13A和图13B提供了显示hBBC和BR96与多种聚糖抗原结合的SPR传感图。

[0425] 表6. SPR结果总结

抗原名称	hBBC	BR96
Le ^Y -Gal-生物素	40 ~ 59μM	270nM
Le ^B -Gal-生物素	2.3 ~ 3.1μM	n/a
Le ^Y /Le ^Y -ASGA-生物素	2 ~ 3μM	1μM
Le ^B /Le ^B -ASGA-生物素	1μM	n/a

[0427] SPR表明, 与单链Le^Y-Gal-生物素相比, 双触角Le^Y/Le^Y-ASGA-生物素对hBBC呈现出更高的亲和力, 这与ITC结果一致。此外, 与单链Le^B-Gal-生物素相比, 双触角Le^B/Le^B-ASGA-生物素对hBBC呈现出更高的亲和力, 这也与Le^Y抗原的观察趋势一致。hBBC对Le^B-Gal-生物素呈现出高于对Le^Y-Gal-生物素的亲和力, 这与ITC结果相当。SPR还显示, hBBC对Le^B/Le^B-ASGA-生物素的结合亲和力高于Le^Y/Le^Y-ASGA-生物素, 这与hBBC对基于Le^B的抗原比对基于Le^Y的抗原具有更高的亲和力的观察结果一致。从Le^B/Le^B-ASGA和Le^Y/Le^Y-ASGA获得的hBBC的可比较KD值进一步表明, hBBC与多岩藻糖基化 (即二价Lewis B结构或Lewis Y结构) 特异性缔合。值得注意的是, 尽管从两种抗原中获得了相似的KD值, 但hBBC对Le^B/Le^B-ASGA的应答 (传感图) 比对Le^B-Gal的应答更强。Le^B/Le^B-ASGA似乎是与hBBC亲和力最高的结构。

[0428] 通过比较, BR96对Le^Y-Gal-生物素和Le^Y/Le^Y-ASGA-生物素的亲和力略高, 与结构相似的抗原Le^Y/Le^Y-ASGP的ITC结果相当。总之, SPR数据与ITC实验数据高度一致。

[0429] 间接ELISA

[0430] 为了通过ELISA评估抗体结合亲和力,将生物素化的聚糖抗原在PBS缓冲液中稀释至适当的浓度。为了通过ELISA评估抗体结合亲和力,将生物素化的聚糖抗原在PBS缓冲液中稀释至足够的浓度。将100 μ L稀释的抗原溶液施加到包被有链霉亲和素的96孔测定板,并在37 $^{\circ}$ C的振荡器中孵育3.5小时。用PBST(在PBS缓冲液中的0.05%吐温-20)洗涤板以去除过量的聚糖抗原。将在稀释液(PBS缓冲液中的0.1%BSA)中连续滴定的初级抗体施加到测定板上,并在37 $^{\circ}$ C的振荡器中孵育1小时。随后进行PBST洗涤,将100 μ L缀合HRP的抗人IgG抗体溶液(SouthernBiotech,在稀释剂中以1:15,000稀释)在摇床中的测定板中于37 $^{\circ}$ C孵育1小时。洗去过量的次级抗体后,施加100 μ L TMB试剂并在37 $^{\circ}$ C下孵育15min,然后用50 μ L的0.5N HCl淬灭。在VERSA max酶标仪(Molecular Devices)中在450nm处检测OD值,并减去650nm处的OD值。数据在Softmax Pro(Molecular Devices)中处理。

[0431] Le^Y/Le^Y -ASGA相对于 Le^Y -Gal

[0432] 在 Le^Y -Gal-生物素包被的和 Le^Y/Le^Y -ASGA-生物素包被的链霉亲和素包被的ELISA板上测试了hBBC和BR96的结合活性。包被抗原的量如图14A和图14B中所示。hBBC对 Le^Y/Le^Y -ASGA的结合比对 Le^Y -Gal的结合强得多。BR96显示出与hBBC相反的模式,因为它结合 Le^Y -Gal的能力比 Le^Y/Le^Y -ASGA好得多。总之,间接ELISA提供了与ITC和SPR实验相似的结合亲和力结果。

[0433] Le^B/Le^B -ASGA相对于 Le^Y/Le^Y -ASGA和 Le^B -Gal

[0434] 接下来,测试了hBBC在 Le^B/Le^B -ASGA-生物素、 Le^Y/Le^Y -ASGA-生物素和 Le^B -Gal-生物素包被的链霉亲和素包被的ELISA板上的结合。包被抗原的量如图15中所示。间接ELISA的结果是,hBBC显示出对 Le^B/Le^B -ASGA的结合明显强于对 Le^Y/Le^Y -Gal和 Le^B -Gal的结合。

[0435] 抗原结合ELISA

[0436] 开发了抗原结合ELISA以评估hBBC对不同聚糖抗原的相对结合亲和力。简而言之,将hBBC连续滴定并施加到已用不同聚糖抗原包被的链霉亲和素官能化的96孔测定板上。用与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的人IgG特异性抗体检测hBBC与聚糖抗原的结合,然后在TMB试剂中显色。使用酶标仪在450nm处的吸光度与与其抗原结合的hBBC量成正比。通过将OD绘制为hBBC浓度的函数来确定相对亲和力。

[0437] 抗原制备

[0438] 生物素化的Lewis Y戊糖、 Le^Y -Gal-sp3-生物素,购自Elicityl(法国克洛尔)。Lewis B戊糖购自Elicityl,并进一步进行了内部生物素化处理(Le^B -Gal-LC-生物素)。其他四种生物素化的聚糖: Le^Y/Le^Y -ASGA-生物素、 Le^B/Le^B -ASGA-生物素、3- $\text{Le}^Y/6$ - Le^B -ASGA-生物素(Le^Y/Le^B -ASGA-生物素)和3- $\text{Le}^B/6$ - Le^Y -ASGA-生物素(Le^B/Le^Y -ASGA-生物素)是通过一系列酶促糖基化反应,然后进行化学生物素化反应合成的(表5)。通过薄层色谱(TLC)和电喷雾电离质谱(ESI-MS)分析生物素化的聚糖,以确保纯度至少达到95%,并且不含未缀合的生物素。HPAEC-PAD单糖分析被用于生物素化聚糖的定量。

[0439] 抗体

[0440] hBBC被用于抗原结合ELISA。

[0441] ELISA

[0442] 将生物素化的聚糖抗原在PBS缓冲液中稀释至18.7nM。将100 μ L稀释的抗原溶液施

加到包被有链霉亲和素的96孔测定板,并在37℃的振荡器中孵育3.5小时。用PBST(在PBS缓冲液中的0.05%吐温-20)洗涤板以去除过量的聚糖抗原。将在稀释液(PBS缓冲液中的0.1%BSA)中连续滴定的初级抗体加到测定板上,并在37℃的振荡器中孵育1小时。PBST洗涤后,将100μL HRP缀合的抗人IgG抗体溶液(SouthernBiotech,在稀释剂中以1:10,000稀释)在摇床上于测定板中在37℃孵育1小时。洗去多余的次级抗体后,施加100μL TMB试剂并在37℃下孵育15min,然后用50μL的0.5N HCl淬灭。在VERSA max酶标仪(Molecular Devices)中在450nm处检测OD值,并减去650nm处的OD值。数据在Softmax Pro(Molecular Devices)中处理。

[0443] 结果

[0444] 数据如图16A中所示。在抗原结合ELISA中,当hBBC与Le^B/Le^B-ASGA、Le^Y/Le^Y-ASGA、3-Le^Y/6-Le^B-ASGA-生物素和3-Le^B/6-Le^Y-ASGA-生物素结合时,OD值在低抗体浓度(0.4-4μg/mL)的窄范围内增加,而hBBC与Le^Y-Gal和Le^B-Gal的结合显然较弱,表明在一种聚糖中存在二价Le^Y、Le^B、Le^B/Le^Y或Le^Y/Le^B,提供了单个Lewis^{Y/B}部分更高的对hBBC的结合亲和力。

[0445] 抗原结合亲和力的直接比较:hBBC.10.1相对于BBC

[0446] 实验的目的是通过抗原结合ELISA比较hBBC.10.1和祖先BBC抗体的抗原亲和力。

[0447] 抗原制备

[0448] 生物素化的Lewis^Y戊糖、Le^Y-Gal-sp3-生物素,购自Elicityl。Lewis^B戊糖购自Elicityl,并进一步进行了内部生物素化处理(Le^B-Gal-LC-生物素)。其他四种生物素化的聚糖:Le^Y/Le^Y-ASGA-生物素、Le^B/Le^B-ASGA-生物素、3-Le^Y/6-Le^B-ASGA-生物素(Le^Y/Le^B-ASGA-生物素)和3-Le^B/6-Le^Y-ASGA-生物素(Le^B/Le^Y-ASGA-生物素)是通过一系列酶促糖基化反应,然后进行化学生物素化反应合成的(表5)。通过TLC和ESI-MS分析生物素化的聚糖,以确保纯度至少达到95%,并且不含未缀合的生物素。HPAEC-PAD单糖分析被用于生物素化聚糖的定量。

[0449] 抗体

[0450] BBC和hBBC.10.1被用于抗原结合ELISA。

[0451] 抗原结合ELISA

[0452] 将96孔EvenCoatTM链霉亲和素微孔板(R&D Biosystems,MN,目录号:CP004)与各种生物素化的聚糖在PBS中以3.73pmol/孔的量在4℃孵育过夜。用PBS/0.05%吐温20(Sigma,目录号:P1379-500mL)洗涤3次后,将100μL稀释的BBC或hBBC.10.1抗体添加到抗原包被的孔中,然后在37℃孵育1hr。将孔用PBS/0.05%吐温20洗涤3次,然后与100μL的10000×稀释的小鼠抗人IgG(Fc)-HRP(Southern Biotech,目录号:9040-05)一起在37℃温育1hr。洗涤后,加入100μL SureBlueTM反向TMB(KPL,目录号:53-00-03)在37℃下显色15分钟。加入0.5N HCl终止反应。在VERSAMAXTM酶标仪(Molecular Devices,圣何塞,CA)上以650nm的参照波长在450nm的波长读取吸光度,并通过SoftmaxProTM软件(Molecular Devices)处理数据。

[0453] 结果:

[0454] BBC(图16B)和hBBC.10.1(图16C)的抗原结合ELISA显示,与BBC相比,hBBC.10.1对单链聚糖抗原(Le^B-Gal和Le^Y-Gal)的亲和力较低,并且两种抗体均具有对双触角聚糖抗原(Le^B/Le^B-ASGA、Le^Y/Le^Y-ASGA、3-Le^Y/6-Le^B-ASGA和3-Le^B/6-Le^Y-ASGA)具有高亲和力。这些数据表明,hBBC.10.1具有比BBC更好的单链和双触角抗原之间的结合选择性。

[0455] 总结

[0456] 在该实施例中描述的表位表征实验表明, hBBC与癌细胞系衍生的双和三触角的 $\text{Le}^{\text{Y/B}}$ I抗原特异性结合, 并且双触角和三触角 Le^{Y} N-聚糖特异性结合。此外, hBBC识别的表位包含双岩藻糖基化的LacNAc骨架。双触角 $\text{Le}^{\text{B}}/\text{Le}^{\text{B}}$ -ASGA是与hBBC具有最强结合亲和力的抗原。与单链 Le^{B} -Gal和 Le^{Y} -Gal抗原相比, 双触角 $\text{Le}^{\text{Y}}/\text{Le}^{\text{Y}}$ -ASGA, $\text{Le}^{\text{Y}}/\text{Le}^{\text{B}}$ -ASGA和 $\text{Le}^{\text{B}}/\text{Le}^{\text{Y}}$ -ASGA也显示出对hBBC的高亲和力。同样, 无论抗原是单链结构还是双触角结构, 仅基于 Le^{B} 的抗原对hBBC的亲和力均高于仅基于 Le^{Y} 的抗原。最后, hBBC的结合行为(动力学)和表位不同于BR96。

[0457] 实施例4**[0458] HBBC在靶细胞中的内在化**

[0459] 抗体可以被用作载体, 将功能性有效载荷递送到所期望的部位。例如, 一些癌症疗法使用抗原特异性抗体通过内吞作用将细胞毒性药物(即抗体-药物缀合物或ADC)递送至肿瘤细胞, 也被称为内在化。一些当前的ADC包括在溶酶体区室中切割的可切割的连接子, 从而在内化之后选择性地释放药物, 具有增加药物在血清中的稳定性的额外益处。

[0460] 为了测试hBBC是否有效地内化到癌细胞中, 进行了以下实验。首先, 在常规内化测定中, 将hBBC抗体添加到培养的AGS胃癌细胞中, 并在4℃下进行1hr的结合, 以允许特异性抗体/受体相互作用, 但阻止内吞作用。然后, 洗去非特异性结合的抗体, 将细胞移至37℃以允许正常的内吞作用。在0min和30min, 将细胞固定, 并使用Alexa488缀合的抗人IgG抗体检测hBBC(图17, 左图)。F-肌动蛋白用鬼笔环肽若丹明标记(右图; 共分布的染色显示为黄色荧光信号)。如图17中所示的, hBBC在0min时将细胞膜染色, 然后在37℃孵育(30min, 透性化的细胞)后进行内在化并定位在细胞核周围的细胞溶质囊泡中。通过非透性化对照进一步证实了细胞溶质信号, 其中仅可以检测到微弱的膜信号(30min, 非透性化的细胞)。这些数据表明, hBBC在30分钟内有效地内化到AGS细胞中。

[0461] 在第二个实验中, 检查了hBBC的实时细胞内定位。简而言之, 将hBBC抗体添加至AGS细胞, 并在37℃下孵育4或8小时以促进内在化。然后固定细胞, 并使用Alexa488缀合的抗人IgG抗体检查hBBC的实时定位(图18, 左图显示抗人IgG)。溶酶体用抗Lamp-1抗体标记, 然后用标记的抗兔IgG抗体标记(显示在中间图中)。如图18中所示的, 在孵育4或8小时后, hBBC与Lamp-1共定位(合并; 右图), 表明内部化的hBBC定位在溶酶体区室中。此外, hBBC可以稳定在溶酶体区室中, 至少8小时没有明显降解。这些结果表明, hBBC具有用作靶向抗原的缀合物(如ADC)的效用。

[0462] 实施例5**[0463] 人体组织样品中的HBBC免疫染色**

[0464] 获得健康和癌变的组织样品, 并根据标准方案在福尔马林固定的石蜡包埋的组织切片上进行hBBC 10.1的免疫染色。表7和表8分别总结了健康组织和癌组织的染色结果。

[0465] 表7. 各种人类正常组织的hBBC.10.1免疫染色。

[0466]

组织	hBBC 10.1_2μg/ml
胰腺	± (3/3)
舌(唾液腺组织)	+ (3/3)
喉	++ (3/3)
食管	± (3/3)
胃	+ (3/3)
小肠	+++ (3/3)
结肠	-
垂体	-
乳腺	-

[0467]

组织	hBBC 10.1_2μg/ml
大脑	-
小脑	-
肾上腺	-
甲状旁腺	-
卵巢	-
睾丸	-
脾脏	-
扁桃体	-
胸腺	-
骨髓	-
肺脏	-
心脏	-
肝脏	-
肾脏	-
前列腺	-
子宫	-
子宫颈	-
横纹肌	-
皮肤	-
神经	-
大网膜	-
子宫内膜	-

[0468]

表8. 人癌组织中的hBBC免疫染色。

[0469]

器官	病理诊断	类型	阳性率		
胃	腺癌	恶性的	57/175	32.6%	33.2%
	粘液性腺癌		6/17	35.3%	
	未分化的腺癌		1/2	50.0%	
	印戒细胞癌		1/2	50.0%	
结肠	腺癌	恶性的	11/23	47.8%	44.0%
	粘液性腺癌		0/2	0.0%	
乳腺	浸润性导管癌	恶性的	1/23	4.3%	4.2%
	小叶和导管混合癌		0/1	0.0%	
肝脏	肝细胞癌	恶性的	1/40	2.5%	2.5%
肺脏	腺癌	恶性的	3/15	20.0%	20.0%
	鳞状细胞癌		2/10	20.0%	
淋巴结	转移性腺癌	转移	13/40	32.5%	32.5%

[0470]

器官	病理诊断	类型	阳性率		
卵巢	浆液性腺癌	恶性的	0/33	0.0%	5.0%
	粘液性腺癌		2/6	33.3%	
	子宫内膜样腺癌		0/1	0.0%	
胰腺	导管腺癌	恶性的	11/24	45.8%	48.0%
	乳头状腺癌		1/1	100.0%	
前列腺	腺癌	恶性的	1/25	4.0%	4.0%
子宫	子宫内膜样腺癌	恶性的	10/40	25.0%	25.0%
其它	鳞状细胞癌	恶性的	1/32	3.1%	3.1%

[0471] 另外,各种人类癌细胞系用hBBC.10.1染色以确定表位表达模式。结果总结在表9中。

[0472] 表9.人癌细胞系上的hBBC表位表达。

[0473]

类型	细胞系	hBBC.10.1 结合
胃癌	AGS	+++
	TSGH9201	+
	NCI-N87	++
	KATO III	-
	MKN45	-
	MKN74	-
	MKN7	-
	LOVO	-
结肠癌	Colon 205	-
	Colon 201	+
	SW1116	+++
	DLD-1	++
	LS 174T	+
	HT-29	-
	T84	-
乳腺癌	MCF-7	++
	MDA-MB231	-
	MDA-MB453	-
	T47D	-
卵巢癌	NIH OVCAR-3	+
	SW626	+
	SK-OV-3	-
	ES-2	-
胰腺癌	SU.86.86	-
	EBC-1	-
	PABC-1	-
肺癌	NCI-H146	+
	NCI-H209	-
皮肤癌	A431	-

[0474] 实施例6

[0475] 结肠癌异种移植模型中hBBC的抗肿瘤活性

[0476] 进行了一系列体内动物研究,以评估hBBC在异种移植SCID模型中的肿瘤抑制作用,其中包括从胃癌细胞系AGS、TSGH9201和结肠癌细胞系COLO 201、COLO 205、DLD-1引入人癌细胞。hBBC.10.1已显示与除COLO 205以外的所有细胞系的强至中等结合水平(实例5的表9)。hBBC.10.1被用于所有异种移植研究,BR96被用作对照。

[0477] hBBC.10.1在DLD-1和COLO 205异种移植模型中的体内抗肿瘤活性

[0478] 这项研究的目的是检查高剂量的hBBC.10.1在DLD-1和COLO 205异种移植模型中的肿瘤抑制作用。简而言之,人结肠癌细胞系DLD-1和COLO 205获自美国典型培养物保藏中心(the American Type Culture Collection, ATCC, 马纳萨斯, VA, 美国)。使细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)的RPMI 1640培养基中生长,并将细胞培养物保持在37℃5%CO₂气氛的加湿培养箱中。将第5-8代的细胞用于肿瘤接种。

[0479] 无特异性病原体(SPF)的雌性CB17严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠购自BioLASC0(中国台湾省),在进行任何实验操作前,并使其适应环境至少一周。在12:12小时的明暗循

环中,将小鼠放在温度受控的环境 ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$),湿度为 $50 \pm 10\%$ 的单独通风的笼中 (IVC)。所有实验均遵循相关的法规和动物保护法进行。

[0480] 将癌细胞以 5×10^6 个/ $200\mu\text{L}$ 的细胞密度重悬于含有 50%BD 基质胶 (Matrigel) (目录号:354248) 的冰冷无血清培养基中,并皮下注射到 6-8 周龄的 SCID 小鼠的侧腹区。每周用游标卡尺 (Laser Tools and Technics (LTT), 中国台湾省新竹市, $150 \times 0.05\text{mm}$) 测量肿瘤大小,并将肿瘤重量估算为“重量 (mg) = (宽度² × 长度) $\text{mm}^3/2$ ” (Ito 等人, (1992) Cancer Res. 52:3739)。当肿瘤重量达到 150-200mg 时,将小鼠随机分为 9 组 (每组 $n=6$), 每组具有可比较的肿瘤大小,并开始抗体治疗。荷瘤 SCID 小鼠每周一次以 50mg/kg 腹膜内注射 hBBC.10.1 (批次:17001),持续 6 周。腹膜内注射盐水的荷瘤 SCID 小鼠用作阴性对照。

[0481] DLD-1 和 COLO 205 异种移植实验的结果分别显示在图 19A 和图 19B 中。相对于对照, hBBC.10.1 能够有效抑制 DLD-1 肿瘤生长,但不能有效抑制 COLO 205 肿瘤生长。这些数据与观察到的 hBBC.10.1 结合 DLD-1 细胞而不结合 COLO 205 的能力一致。

[0482] hBBC 在胃腺癌异种移植模型中的抗肿瘤活性

[0483] 这项研究的目的是在 AGS 异种移植模型中比较 hBBC.10.1 和 BR96 在 0.008 至 1mg/kg 的低剂量范围下的抗肿瘤功效。简而言之,人胃腺癌细胞系 AGS (CRL-1739) 获自美国典型培养物保藏中心 (ATCC, 马纳萨斯, VA, 美国)。AGS 细胞在补充有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 Ham's F-12K 培养基中生长,并将细胞培养物在 37°C 下 5% CO_2 气氛的加湿培养箱中维持。5-8 代的 AGS 细胞被用于肿瘤接种。

[0484] 无特异性病原体 (SPF) 的雌性 CB17 严重联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠购自 BioLASCO (中国台湾省),在进行任何实验操作前,并使其适应环境至少一周。在 12:12 小时的明暗循环中,将小鼠放在温度受控的环境 ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$),湿度为 $50 \pm 10\%$ 的单独通风的笼中 (IVC)。所有实验均遵循相关的法规和动物保护法进行。

[0485] 将 AGS 细胞以 5×10^6 个/ $200\mu\text{L}$ 的细胞密度重悬于含有 50%BD 基质 (目录号:354248) 的冰冷无血清培养基中,并皮下注射到 6-8 周龄的 SCID 小鼠的侧腹区。每周用游标卡尺 (Laser Tools and Technics (LTT), 中国台湾省新竹市, $150 \times 0.05\text{mm}$) 测量肿瘤大小,并将肿瘤重量估算为“重量 (mg) = (宽度² × 长度) $\text{mm}^3/2$ ” (Ito 等人, (1992) Cancer Res. 52:3739)。当肿瘤重量达到 150-200mg 时,将小鼠随机分为 9 组 (每组 $n=6$), 每组具有可比较的肿瘤大小,并开始抗体治疗。每周一次以 $1, 0.2, 0.04$ 或 0.008mg/kg 的剂量将荷瘤 SCID 小鼠腹膜内注射 hBBC.10.1 (批次:17001) 或 BR96 (批次:17001),持续六周,并以预定剂量的 1.5 倍给予第一剂。腹膜内注射盐水的荷瘤 SCID 小鼠被用作阴性对照。

[0486] hBBC.10.1 治疗和 BR96 治疗的小鼠的结果分别显示在图 20A 和图 20B 中。当以每周 1 和 0.2mg/kg 的剂量施用,与对照相比, hBBC.10.1 和 BR96 均显著抑制肿瘤生长。但是,两种抗体在较低剂量 (0.04 和 0.008mg/kg) 下均未显示抑制作用。出于伦理考虑,当肿瘤负荷大于体重的 10% 时处死小鼠。一些接受生理盐水或更低剂量抗体的小鼠在接种后 60 天达到了这一终点;因此,仅对直到第 60 天产生的数据进行统计分析。相比之下,在施用高剂量 (1 和 0.2mg/kg) hBBC 或 BR96 的 AGS 荷瘤小鼠中,肿瘤的生长被有效地延迟到体重的 10%。10.1。这项剂量应答研究表明, hBBC.10.1 在 AGS 荷瘤小鼠中具有与 BR96 相当的抗肿瘤功效。

[0487] 将 hBBC.10.1 的抗肿瘤功效与本公开的其他产生的 hBBC 抗体的抗肿瘤功效进行比较。在一个实验中,将收获的 AGS 细胞用 PBS 洗涤两次,并以 5×10^6 个/ $200\mu\text{L}$ 的细胞密度重悬

于含有25%BD基质胶TM(BD Biosciences,目录号:354248)的PBS中。之后,将200 μ L的AGS细胞悬浮液皮下注射(5×10^6 个细胞/小鼠)到雌性SCID小鼠(6-8周龄)的侧腹区中。每周用游标卡尺(Laser 150 $\times$ 0.05mm)测量肿瘤大小,并将肿瘤重量估算为“重量(mg)=(宽度² $\times$ 长度)mm³/2”[(Hisashi Ito等人,(1992))。当肿瘤重量达到150-200mg时,将小鼠随机分为6组(每组n=6),每组具有可比较的肿瘤大小,并开始进行抗体治疗。荷瘤SCID小鼠每周两次以0.25mg/kg的剂量腹膜内注射hBBC.8或突变体(hBBC.9、hBBC.9.1、hBBC.10.1),持续6周。此外,以更高的剂量(2mg/kg)测试了hBBC.8。腹膜内注射盐水的荷瘤SCID小鼠被用作阴性对照。数据示于图20C中。虽然hBBC.8、hBBC.9和hBBC.9.1的抗肿瘤作用比hBBC.10.1弱,但仍观察到抗肿瘤作用。在较高剂量(2mg/kg)下观察到hBBC.8具有与hBBC.10.1(0.25mg/kg)相当的抗肿瘤活性。

[0488] 还将hBBC.10.1与hBBC.10.1FQ的抗肿瘤活性进行了比较。简而言之,将收获的AGS细胞用PBS洗涤两次,并以 5×10^6 个/200 μ L的细胞密度重悬于含有25%BD基质胶TM(目录号:354248)的PBS中。之后,将200 μ L的AGS细胞悬浮液皮下注射(5×10^6 个细胞/小鼠)到雌性SCID小鼠(6-8周龄)的侧腹区中。每周用游标卡尺(Laser150 $\times$ 0.05mm)测量肿瘤大小,并将肿瘤重量估算为“重量(mg)=(宽度² $\times$ 长度)mm³/2”[(Hisashi Ito等人,(1992))。当肿瘤重量达到150-200mg时,将小鼠随机分为3组(每组n=8),每组具有可比较的肿瘤大小,并开始进行抗体治疗。荷瘤SCID小鼠每周一次以0.25mg/kg的剂量腹膜内注射hBBC.10.1或hBBC.10.1FQ,持续六周,以预定剂量的1.5倍给予第一次剂量。腹膜内注射盐水的荷瘤SCID小鼠被用作阴性对照。数据(图20D)显示hBBC.10.1FQ具有略强的抗肿瘤活性。

[0489] 在后续实验中,与AGS细胞系细胞(数据未显示)相比,从AGS异种移植肿瘤分离的异种移植AGS(xAGS)细胞显示出表达至少2 $\times$ hBBC表位。与亲代细胞系(数据未显示)相比,xAGS细胞还通过hBBC引发了更有效的ADCC和CDC活性。如图21中所示的,hBBC对靶标xAGS细胞的直接杀伤作用比BR96(PI染色)弱一些。

[0490] hBBC在胃癌异种移植模型中的抗肿瘤活性

[0491] 这项研究的目的是在TSGH 9201异种移植模型中比较hBBC.10.1和BR96在0.04至10mg/kg的低剂量范围下的抗肿瘤功效。简而言之,人胃癌细胞系TSGH 9201(目录号:60146)获自食品工业研究与发展研究所的生物资源保藏和研究中心(the Bioresource Collection and Research Center(BCRC) of the Food Industry Research and Development Institute,FIRDI,中国台湾省新竹市)。通过用抗hBBC(批次:B24)之后为200倍稀释的荧光素(FITC)-AffiniPureTM山羊抗人IgG(Fc γ 片段特异性)(Jackson ImmunoResearch Inc.,West Grove,PA,目录号:109-095-098)的以下染色,通过两轮荧光激活细胞分选(FACS)(BD FACSJAZZTM细胞分选仪,BD Biosciences,新加坡,目录号:655486)富集高表达hBBC表位的TSGH 9201细胞。与亲本TSGH 9201细胞相比,hBBC表位的表达水平在富集细胞中被提高了近4倍,命名为TSGH 9201(2s)(未显示)。亲本和富集细胞均在补充有10%的胎牛血清(FBS)和1mM丙酮酸钠的RPMI-1640培养基(Gibco)中生长。将细胞培养物在37 $^{\circ}$ C下在5%CO₂气氛下的加湿培养箱中维持。将第5-8代的TSGH 9201(2s)细胞用于肿瘤接种。

[0492] 无特异性病原体(SPF)的雌性CB17严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠购自BioLASCO(中国台湾省),在进行任何实验操作前,并使其适应环境至少一周。在12:12小时的明暗循

环中,将小鼠放在温度受控的环境($22\pm 2^{\circ}\text{C}$),湿度为 $50\pm 10\%$ 的单独通风的笼中(IVC)。所有实验均遵循相关的法规和动物保护法进行。

[0493] 将TSGH 9201 (2s) 细胞以 5×10^6 个/200 μL 的细胞密度重悬于含有25%BD基质胶(目录号:354248)的冰冷无血清培养基中,并将200 μL 细胞悬浮液皮下注入6-8周龄的SCID小鼠的侧腹区。每周用游标卡尺(Laser Tools and Technics (LTT),中国台湾省新竹市,150 $\times$ 0.05mm)测量肿瘤大小,并将肿瘤重量估算为“重量(mg) = (宽度² $\times$ 长度)mm³/2”(Ito等人,(1992)Cancer Res.52:3739)。当肿瘤重量达到150-200mg时,将小鼠随机分为3组(每组n=5),每组具有可比较的肿瘤大小,并开始抗体治疗。为了评估hBBC.10.1和BR96的体内功效,每周一次以10mg/kg的腹膜内向荷瘤SCID小鼠注射hBBC.10.1(批次:B24)或BR96(批次:T05),持续六周,以指定剂量的1.5倍给予第一剂量。在第二项比较低剂量hBBC.10.1和BR96的抗肿瘤活性的研究中,每周一次以10、1、0.2或0.04mg/kg向荷瘤SCID小鼠腹膜内注射hBBC.10.1(批次:17001)或BR96(批次:17001),持续六周,以指定剂量的1.5倍给予第一剂量。腹膜内注射盐水的荷瘤SCID小鼠被用作阴性对照。

[0494] 结果显示在图22中。与盐水组相比,hBBC.10.1和BR96均以每周10mg/kg的剂量显著抑制肿瘤生长。

[0495] hBBC.10.1在结肠直肠腺癌异种移植模型中的抗肿瘤活性

[0496] 这项研究的目的是:1)检查hBBC.10.1抑制COLO 201异种移植肿瘤生长的能力;2)比较在COLO 201异种移植模型中hBBC和BR96在0.008至1mg/kg剂量范围内的抗肿瘤活性。

[0497] 简而言之,源自腹水的人结肠直肠腺癌细胞系COLO 201(CCL-224)获自美国典型培养物保藏中心(ATCC,马纳萨斯,VA,美国)。COLO 201细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)和1丙酮酸钠的RPMI-1640培养基(Gibco)中生长。将细胞培养物在37 $^{\circ}\text{C}$ 下在5%CO₂气氛下的加湿培养箱中维持。将第5-8代的COLO 201细胞用于肿瘤接种。

[0498] 无特异性病原体(SPF)的雌性CB17严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠购自BioLASCO(中国台湾省),在进行任何实验操作前,并允许其适应环境至少一周。在12:12小时的明暗循环中,将小鼠放在温度受控的环境($22\pm 2^{\circ}\text{C}$),湿度为 $50\pm 10\%$ 的单独通风的笼中(IVC)。所有实验均遵循相关的法规和动物保护法进行。

[0499] 将COLO 201细胞以 2×10^6 个/200 μL 的细胞密度重悬于冰冷无血清培养基中,并将200 μL 的细胞悬浮液皮下注射到6-8周龄的SCID小鼠的侧腹区。每周用游标卡尺(Laser 150 $\times$ 0.05mm)测量肿瘤大小,并将肿瘤重量估算为“重量(mg) = (宽度² $\times$ 长度)mm³/2”(Ito等人,(1992)Cancer Res.52:3739)。当肿瘤重量达到150-200mg时,将小鼠随机分为对照组和治疗组(每组n=6),每组具有可比较的肿瘤大小,并开始抗体治疗。进行两项研究以评估hBBC抑制COLO 201肿瘤生长的体内功效。

[0500] 在第一项研究中,每周两次以2至50mg/kg的剂量范围向荷瘤SCID小鼠腹膜内注射hBBC.10.1(批次:B26),连续六周,以指定剂量的1.5倍给予第一剂量。首次研究的结果显示在图23中。与盐水组相比,以2-50mg/kg的hBBC.10.1治疗显著抑制了肿瘤的生长。施用hBBC后仅一周(即肿瘤接种后两周),肿瘤迅速萎缩并最终消失。

[0501] 在第二项研究中,对低剂量的hBBC.10.1和BR96的抗肿瘤活性进行了进一步比较。每周一次(第7天开始)以1、0.2、0.04和0.008mg/kg向荷瘤的SCID小鼠腹膜内注射hBBC.10.1(批次:17001)或BR96(批次:17001),持续6周,以指定剂量的1.5倍给予第一剂

量。腹膜内注射盐水的荷瘤SCID小鼠被用作阴性对照。包括纯化的抗体hTKH2.2(批次:1020429)作为阴性对照抗体,它是通过在HEK293细胞中瞬时表达而在内部产生的人源化抗STn抗体。第二项研究的结果显示在图24A和图24B中。与盐水和hTKH2.2对照组相比,每周剂量为1或0.2mg/kg的hBBC.10.1和BR96均显著抑制肿瘤生长,而较低剂量(0.04和0.008mg/kg的hBBC.10.1;0.04mg/kg的BR96)显示出延迟肿瘤生长的作用。出于伦理考虑,当肿瘤负荷大于体重的10%时处死小鼠。一些接受生理盐水或更低剂量的hBBC.10.1或BR96的小鼠在接种后49天达到了这一终点。因此,仅对直到49天之前获得的数据进行统计分析。

[0502] 这项剂量反应研究表明,hBBC.10.1在COL0 201荷瘤小鼠中具有与BR96相当的抗肿瘤功效。

[0503] 实施例7

[0504] HBBC在灵长类动物和人体组织中的免疫染色

[0505] 在来自人和食蟹猴(*Macaca fascicularis*)的相应健康组织上进行了hBBC.10.1免疫染色。简而言之,根据标准方案,使用福尔马林固定的石蜡包埋的组织切片用2 μ g/ml的hBBC.10.1进行染色。结果总结在表10中,并显示出人和食蟹猴组织之间的相似染色模式。

[0506] 表10. 人类和食蟹猴组织的hBBC.10.1免疫染色

[0507]

组织	人	食蟹猴
胰腺	$\pm$ (3/3)	$\pm$ (3/3)
舌(唾液腺组织)	+	-
喉	++ (3/3)	+
食管	$\pm$ (3/3)	-
胃	+	+
小肠	+++ (3/3)	+++ (3/3)
结肠	-	-
垂体	-	-
乳腺	-	-
大脑	-	-
小脑	-	-
肾上腺	-	-
甲状旁腺	-	-
卵巢	-	-
睾丸	-	-
脾脏	-	-
扁桃体	-	-
胸腺	-	-
骨髓	-	-
肺脏	-	-
心脏	-	-
肝脏	-	-

[0508]	组织	人	食蟹猴
	肾脏	-	-
	前列腺	-	-
	子宫	-	-
	子宫颈	-	-
	横纹肌	-	-
	皮肤	-	-
	神经	-	-
	大网膜	-	-
	子宫内膜	-	-

[0509] 实施例8

[0510] 灵长类动物模型中HBBC.10.1的安全性和耐受性研究

[0511] 为了评估单次静脉内 (iv) 弹丸注射后食蟹猴的hbhc.10.1的耐受性和可接受的剂量范围,进行了单剂量耐受性和剂量范围确定研究(非glp)。简而言之,将雄性和雌性食蟹猴(macaca fascicularis)分为四组,每组一只雄性一雌性。第1至4组的动物分别接受的hbhc.10.1剂量水平为0、50、200和300mg/kg。第2和第3组的动物经缓慢静脉注射给药一次。弹丸注射至少持续5分钟。第1组和第4组的动物每20分钟(±1分钟)使用泵和灌注输液管线进行静脉内输注给药一次。给药后大约24小时,进行尸检。尸检期间,记录大体观察和器官重量,并收集组织进行组织病理学检查。将收集到的一些组织加工成载玻片并进行显微镜检查。

[0512] 结果表明hBBC.10.1在食蟹猴中的50-300mg/kg剂量范围具有良好的耐受性。在接受200和300mg/kg的动物的盲肠和/或结肠中观察到最小的出血,可能与测试物品有关。与测试物品相关的其他可能变化是,接受200mg/kg的一只动物的胃慢性和急性炎症,接受200mg/kg的一只动物的十二指肠隐窝中性粒细胞浸润和接受300mg/kg的一只动物回肠的绒毛萎缩。在接受50mg/kg的动物(第2组)中未观察到异常发现。

[0513] 可以将上述各种实施方案组合以提供其他实施方案。本说明书中提及的和/或在申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物通过引用整体并入本文中。如果需要采用各种专利、申请和出版物的概念以提供其他实施方案,则可以修改实施方案的各方面。

[0514] 可以根据以上详细描述对实施方案进行这些和其他变化。通常,在以下权利要求书中,所使用的术语不应解释为将权利要求书限制为说明书和权利要求书中所公开的特定实施方案,而应解释为包括此类权利要求所要求保护的所有可能的实施方案以及等同物的全部范围。因此,权利要求不受公开内容的限制。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 台湾糖联生技医药股份有限公司(GlycoNex, Inc.)
[0003]	张东玄(Chang, Tong-Hsuan)
[0004]	杨玫君(Yang, Mei-Chun)
[0005]	刘亮吟(Liu, Liahng-Yirn)
[0006]	丁志岳(Ting, Jerry)
[0007]	张淑燕(Chang, Shu-Yen)
[0008]	陈彦颖(Chen, Yen-Ying)
[0009]	林俞妤(Lin, Yu-Yu)
[0010]	唐述纶(Tang, Shu-Lun)
[0011]	<120> 治疗性抗体
[0012]	<130> 400100.401W0
[0013]	<140> PCT
[0014]	<141> 2019-05-30
[0015]	<150> US 62/678,890
[0016]	<151> 2018-05-31
[0017]	<160> 51
[0018]	<170> FastSEQ for Windows Version 4.0
[0019]	<210> 1
[0020]	<211> 121
[0021]	<212> PRT
[0022]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0023]	<220>
[0024]	<223> 合成的序列-抗体hBBC.10.1FQ的重链可变(VH)结构域
[0025]	<400> 1
[0026]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[0027]	1 5 10 15
[0028]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
[0029]	20 25 30
[0030]	Tyr Thr Trp His Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
[0031]	35 40 45
[0032]	Leu Gly Tyr Ile His Tyr Thr Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Leu
[0033]	50 55 60
[0034]	Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Phe Tyr
[0035]	65 70 75 80
[0036]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0037]	85 90 95
[0038]	Gly Arg Glu Ala Leu Arg Gly Tyr Asp Ala Gly Phe Trp Phe Thr Tyr
[0039]	100 105 110
[0040]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
[0041]	115 120

[0042]	<210> 2
[0043]	<211> 6
[0044]	<212> PRT
[0045]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0046]	<220>
[0047]	<223> 合成的序列 - 抗体IMH2/BBC、抗体hBBC.8、抗体hBBC.9的重链互补决定区1 (VH CDR1) ,
[0048]	<400> 2
[0049]	Ser Gly Tyr Thr Trp His
[0050]	1 5
[0051]	<210> 3
[0052]	<211> 16
[0053]	<212> PRT
[0054]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0055]	<220>
[0056]	<223> 合成的序列 - 抗体hBBC.9.1、抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的VH CDR2
[0057]	<400> 3
[0058]	Tyr Ile His Tyr Thr Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
[0059]	1 5 10 15
[0060]	<210> 4
[0061]	<211> 14
[0062]	<212> PRT
[0063]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0064]	<220>
[0065]	<223> 合成的序列 - 抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的VH CDR3
[0066]	<400> 4
[0067]	Glu Ala Leu Arg Gly Tyr Asp Ala Gly Phe Trp Phe Thr Tyr
[0068]	1 5 10
[0069]	<210> 5
[0070]	<211> 107
[0071]	<212> PRT
[0072]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0073]	<220>
[0074]	<223> 合成的序列 - 抗体hBBC.10、抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的轻链可变 (VL) 结构域
[0075]	<400> 5
[0076]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0077]	1 5 10 15
[0078]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Thr Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg
[0079]	20 25 30
[0080]	Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Arg Leu Leu Ile
[0081]	35 40 45

[0082]	Ser Gly Ala Thr Ser Leu Asp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0083]	50 55 60
[0084]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0085]	65 70 75 80
[0086]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Trp
[0087]	85 90 95
[0088]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0089]	100 105
[0090]	<210> 6
[0091]	<211> 11
[0092]	<212> PRT
[0093]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0094]	<220>
[0095]	<223> 合成的序列 - 抗体IMH2/BBC、抗体hBBC.8、抗体hBBC.9的轻链互补决定区1 (VL CDR1) ,
[0096]	<400> 6
[0097]	Thr Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg Leu Thr
[0098]	1 5 10
[0099]	<210> 7
[0100]	<211> 7
[0101]	<212> PRT
[0102]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0103]	<220>
[0104]	<223> 合成的序列 - 抗体IMH2/BBC、抗体hBBC.8、抗体hBBC.9、抗体hBBC.9.1、抗体hBBC.10、抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的VL CDR2
[0105]	<400> 7
[0106]	Gly Ala Thr Ser Leu Asp Thr
[0107]	1 5
[0108]	<210> 8
[0109]	<211> 9
[0110]	<212> PRT
[0111]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0112]	<220>
[0113]	<223> 合成的序列 - 抗体IMH2/BBC、抗体hBBC.8、抗体hBBC.9、抗体hBBC.9.1、抗体hBBC.10、抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的VL CDR3
[0114]	<400> 8
[0115]	Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Trp Thr
[0116]	1 5
[0117]	<210> 9
[0118]	<211> 278
[0119]	<212> PRT
[0120]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0121]	<220>
[0122]	<223> 合成的序列 - 在[VL-VH]方向上衍生自抗体hBBC.10.1的单链可变区片段(scFv)
[0123]	<220>
[0124]	<221> VARIANT
[0125]	<222> (113) ... (157)
[0126]	<223> 氨基酸113-157中的任意一个或全部可以存在或不存在
[0127]	<400> 9
[0128]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0129]	1 5 10 15
[0130]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Thr Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg
[0131]	20 25 30
[0132]	Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Arg Leu Leu Ile
[0133]	35 40 45
[0134]	Ser Gly Ala Thr Ser Leu Asp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0135]	50 55 60
[0136]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0137]	65 70 75 80
[0138]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Trp
[0139]	85 90 95
[0140]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
[0141]	100 105 110
[0142]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
[0143]	115 120 125
[0144]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[0145]	130 135 140
[0146]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
[0147]	145 150 155 160
[0148]	Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser
[0149]	165 170 175
[0150]	Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Thr Trp
[0151]	180 185 190
[0152]	His Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Tyr
[0153]	195 200 205
[0154]	Ile His Tyr Thr Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser Arg
[0155]	210 215 220
[0156]	Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu
[0157]	225 230 235 240
[0158]	Ser Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Glu
[0159]	245 250 255
[0160]	Ala Leu Arg Gly Tyr Asp Ala Gly Phe Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
[0161]	260 265 270
[0162]	Gly Thr Leu Val Thr Val

[0163]	275															
[0164]	<210> 10															
[0165]	<211> 453															
[0166]	<212> PRT															
[0167]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[0168]	<220>															
[0169]	<223> 合成的序列 - 抗体hBBC.10.1的全长重链(HC)															
[0170]	<400> 10															
[0171]	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
[0172]	1				5					10					15	
[0173]	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Gly
[0174]				20					25					30		
[0175]	Tyr	Thr	Trp	His	Trp	Ile	Arg	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp
[0176]				35				40					45			
[0177]	Leu	Gly	Tyr	Ile	His	Tyr	Thr	Gly	Asn	Thr	Lys	Tyr	Ser	Pro	Ser	Leu
[0178]		50					55				60					
[0179]	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Phe
[0180]	65					70				75					80	
[0181]	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0182]				85					90					95		
[0183]	Gly	Arg	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Tyr	Asp	Ala	Gly	Phe	Trp	Phe	Thr	Tyr
[0184]				100					105					110		
[0185]	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
[0186]			115					120					125			
[0187]	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
[0188]		130					135					140				
[0189]	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
[0190]	145					150					155				160	
[0191]	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
[0192]				165						170					175	
[0193]	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
[0194]				180					185					190		
[0195]	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
[0196]			195					200					205			
[0197]	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys
[0198]		210					215					220				
[0199]	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
[0200]	225					230					235				240	
[0201]	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
[0202]				245						250					255	
[0203]	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
[0204]				260					265					270		

[0205]	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
[0206]	275	280	285
[0207]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
[0208]	290	295	300
[0209]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
[0210]	305	310	315 320
[0211]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
[0212]	325	330	335
[0213]	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
[0214]	340	345	350
[0215]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
[0216]	355	360	365
[0217]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
[0218]	370	375	380
[0219]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
[0220]	385	390	395 400
[0221]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
[0222]	405	410	415
[0223]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
[0224]	420	425	430
[0225]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
[0226]	435	440	445
[0227]	Leu Ser Pro Gly Lys		
[0228]	450		
[0229]	<210> 11		
[0230]	<211> 214		
[0231]	<212> PRT		
[0232]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0233]	<220>		
[0234]	<223> 合成的序列 - 抗体hBBC.10、抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的全长轻链(LC)		
[0235]	<400> 11		
[0236]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0237]	1 5 10 15		
[0238]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Thr Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg		
[0239]	20 25 30		
[0240]	Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Arg Leu Leu Ile		
[0241]	35 40 45		
[0242]	Ser Gly Ala Thr Ser Leu Asp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0243]	50 55 60		
[0244]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0245]	65 70 75 80		
[0246]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Trp		

[0247]	85	90	95
[0248]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
[0249]	100	105	110
[0250]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
[0251]	115	120	125
[0252]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
[0253]	130	135	140
[0254]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
[0255]	145	150	155
[0256]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
[0257]	165	170	175
[0258]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
[0259]	180	185	190
[0260]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
[0261]	195	200	205
[0262]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0263]	210		
[0264]	<210> 12		
[0265]	<211> 363		
[0266]	<212> DNA		
[0267]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0268]	<220>		
[0269]	<223> 合成的序列 - 抗体hBBC.10.1的重链可变(VH)结构域		
[0270]	<400> 12		
[0271]	caggtgcagc tgcaggaaag cggccccgggc ctggtgaaac cgagccagac cctgagcctg 60		
[0272]	acctgcaccg tgagcggtata tagcattacc agcggctata cctggcattg gattcgccag 120		
[0273]	catccgggca aaggcctgga atggctgggc tatattcatt ataccggcaa caccaaatat 180		
[0274]	agcccagacc tgaaaagccg cctgagcatt agccgcgata ccagcaaaaa ccagttcttc 240		
[0275]	ctgaaactga gcagcgtgac caccgaagat accgcggtgt attattgcgg ccgcgaagcg 300		
[0276]	ctgcgcggct atgatgctgg cttctggttt acctattggg gccaaaggac cctggtgacc 360		
[0277]	gtg 363		
[0278]	<210> 13		
[0279]	<211> 18		
[0280]	<212> DNA		
[0281]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0282]	<220>		
[0283]	<223> 合成的序列 - 抗体IMH2/BBC、抗体hBBC.8、抗体hBBC.9的重链互补决定区1(VH CDR1)		
[0284]	<400> 13		
[0285]	agcggctata cctggcat 18		
[0286]	<210> 14		
[0287]	<211> 48		

- [0288] <212> DNA
- [0289] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0290] <220>
- [0291] <223> 合成的序列 - 抗体hBBC.9.1、抗体hBBC.10和抗体hBBC.10.1FQ的VH CDR2
- [0292] <400> 14
- [0293] tatattcatt ataccgcaa caccaaatat agcccgagcc tgaaaagc 48
- [0294] <210> 15
- [0295] <211> 42
- [0296] <212> DNA
- [0297] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0298] <220>
- [0299] <223> 合成的序列 - 抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的VH CDR3
- [0300] <400> 15
- [0301] gaagcgctgc gcggctatga tgctggcttc tggtttacct at 42
- [0302] <210> 16
- [0303] <211> 321
- [0304] <212> DNA
- [0305] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0306] <220>
- [0307] <223> 合成的序列 - 抗体hBBC.10、抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的轻链可变(VL)结构域
- [0308] <400> 16
- [0309] gatattcaga tgaccagag cccgagcagc ctgagcgca gcgtgggcga tcgcgtgacc 60
- [0310] attacctgca ccgcgagcga agatatttat aaccgcctga cctggtatca gcagaaaccg 120
- [0311] ggcaaagtgc cgcgtctgct gatttctggc gcgaccagcc tggataccgg cgtgccgagc 180
- [0312] cgctttagcg gcagcggcag cggcaccgat tacacctga ccattagcag cctgcagccg 240
- [0313] gaagatgtgg cgacctatta ttgccagcag tattggacca ccccgctggac ctttggccag 300
- [0314] ggcaccaaac tggaattaa a 321
- [0315] <210> 17
- [0316] <211> 33
- [0317] <212> DNA
- [0318] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0319] <220>
- [0320] <223> 合成的序列 - 抗体IMH2/BBC、抗体hBBC.8、抗体hBBC.9的轻链互补决定区1(VL CDR1)
- [0321] <400> 17
- [0322] accgcgagcg aagatatatta taaccgcctg acc 33
- [0323] <210> 18
- [0324] <211> 21
- [0325] <212> DNA
- [0326] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0327] <220>

- [0328] <223> 合成的序列 - 抗体IMH2/BBC、抗体hBBC.8、抗体hBBC.9、抗体hBBC.9.1、抗体hBBC.10、抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的VL CDR2
- [0329] <400> 18
- [0330] ggcgcgacca gcctggatac c 21
- [0331] <210> 19
- [0332] <211> 27
- [0333] <212> DNA
- [0334] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0335] <220>
- [0336] <223> 合成的序列 - 抗体IMH2/BBC、抗体hBBC.8、抗体hBBC.9、抗体hBBC.9.1、抗体hBBC.10、抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的VL CDR3
- [0337] <400> 19
- [0338] cagcagtatt ggaccacccc gtggacc 27
- [0339] <210> 20
- [0340] <211> 834
- [0341] <212> DNA
- [0342] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0343] <220>
- [0344] <223> 合成的序列 - 在[VL-(L)-VH]方向上衍生自抗体hBBC.10.1的单链可变区片段(scFv)
- [0345] <220>
- [0346] <221> misc_feature
- [0347] <222> (337) ... (471)
- [0348] <223> 核苷酸337-471中的任意一个或全部可以存在或不存在。
- [0349] <400> 20
- [0350] gatattcaga tgaccagag cccgagcagc ctgagcgca gcgtgggcga tcgcgtgacc 60
- [0351] attacctgca ccgcgagcga agatatttat aaccgcctga cctggtatca gcagaaaccg 120
- [0352] ggcaaagtgc cgcgtctgct gattttctggc gcgaccagcc tggataccgg cgtgccgagc 180
- [0353] cgcttttagcg gcagcggcag cggcaccgat tacacctga ccattagcag cctgcagccg 240
- [0354] gaagatgtgg cgacctatta ttgccagcag tattggacca ccccgctggac ctttggccag 300
- [0355] ggcaccaaac tggaaattaa aggtggaggc ggttctggtg gaggcggttc tgggtggaggc 360
- [0356] ggttctggtg gaggcggttc tgggtggaggc ggttctggtg gaggcggttc tgggtggaggc 420
- [0357] ggttctggtg gaggcggttc tgggtggaggc ggttctggtg gaggcggttc tcaggtgcag 480
- [0358] ctgcaggaaa gcggcccggg cctggtgaaa ccgagccaga ccctgagcct gacctgcacc 540
- [0359] gtgagcggct atagcattac cagcggctat acctggcatt ggattcgcca gcatccgggc 600
- [0360] aaaggcctgg aatggctggg ctatattcat tataccggca acaccaaata tagcccgagc 660
- [0361] ctgaaaagcc gcctgagcat tagccgcgat accagcaaaa accagttctt cctgaaactg 720
- [0362] agcagcgtga ccaccgaaga taccgcggtg tattattgcg gccgcgaagc gctgcgcggc 780
- [0363] tatgatgctg gcttctggtt tacctattgg ggccaaggca ccctggtgac cgtg 834
- [0364] <210> 21
- [0365] <211> 1362
- [0366] <212> DNA

[0367]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0368]	<220>
[0369]	<223> 合成的序列 - 抗体hBBC.10.1的全长重链(HC)
[0370]	<400> 21
[0371]	caggtgcagc tgcaggaaag cggcccgggc ctggtgaaac cgagccagac cctgagcctg 60
[0372]	acctgcaccg tgagcggcta tagcattacc agcggctata cctggcattg gattcgccag 120
[0373]	catccgggca aaggcctgga atggctgggc tatattcatt ataccggcaa caccaaatat 180
[0374]	agcccagacc tgaaaagccg cctgagcatt agccgcgata ccagcaaaaa ccagttcttc 240
[0375]	ctgaaactga gcagcgtgac caccgaagat accgcggtgt attattgcgg ccgcgaagcg 300
[0376]	ctgcgcggct atgatgctgg cttctggttt acctattggg gccaaaggcac cctggtgacc 360
[0377]	gtgtcgagcg cttccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcacctc ctccaagagc 420
[0378]	acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 480
[0379]	acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540
[0380]	cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 600
[0381]	acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa 660
[0382]	gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgcccagc acctgaactc 720
[0383]	ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc caaaaccca aggacaccct catgatctcc 780
[0384]	cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 840
[0385]	ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 900
[0386]	cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcttcaccg tctgcacca ggactggctg 960
[0387]	aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1020
[0388]	accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc 1080
[0389]	cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc 1140
[0390]	agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1200
[0391]	cctcccgctg tggactccga cggctcctt tctctetaca gcaagctcac cgtggacaag 1260
[0392]	agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgagc tctgcacaac 1320
[0393]	cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga 1362
[0394]	<210> 22
[0395]	<211> 645
[0396]	<212> DNA
[0397]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0398]	<220>
[0399]	<223> 合成的序列 - 抗体hBBC.10.1和抗体hBBC.10.1FQ的全长轻链(LC)
[0400]	<400> 22
[0401]	gatattcaga tgaccagag cccgagcagc ctgagcgca gcgtgggca tcgcgtgacc 60
[0402]	attacctgca ccgcgagcga agatatttat aaccgcctga cctggtatca gcagaaaccg 120
[0403]	ggcaaagtgc cgcgtctgct gattttctggc gcgaccagcc tggataccgg cgtgccgagc 180
[0404]	cgttttagcg gcagcggcag cggcaccgat tacacctga ccattagcag cctgcagccg 240
[0405]	gaagatgtgg cgacctatta ttgccagcag tattggacca ccccgtagc ctttggccag 300
[0406]	ggcaccaaac tggaattaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
[0407]	tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
[0408]	cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactccag 480

[0409]	gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540
[0410]	ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	600
[0411]	ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttaa	645
[0412]	<210>	23
[0413]	<211>	14
[0414]	<212>	PRT
[0415]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0416]	<220>	
[0417]	<223>	合成的序列 - 说明性间隔区氨基酸序列
[0418]	<400>	23
[0419]	Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp	
[0420]	1 5 10	
[0421]	<210>	24
[0422]	<211>	18
[0423]	<212>	PRT
[0424]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0425]	<220>	
[0426]	<223>	合成的序列 - 说明性间隔区氨基酸序列
[0427]	<400>	24
[0428]	Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser	
[0429]	1 5 10 15	
[0430]	Leu Asp	
[0431]	<210>	25
[0432]	<211>	5
[0433]	<212>	PRT
[0434]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0435]	<220>	
[0436]	<223>	合成的序列 - 柔性多连接子氨基酸序列
[0437]	<400>	25
[0438]	Gly Gly Gly Gly Ser	
[0439]	1 5	
[0440]	<210>	26
[0441]	<211>	15
[0442]	<212>	PRT
[0443]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0444]	<220>	
[0445]	<223>	合成的序列 - 柔性多连接子氨基酸序列
[0446]	<400>	26
[0447]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
[0448]	1 5 10 15	
[0449]	<210>	27
[0450]	<211>	107

[0451]	<212>	PRT
[0452]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0453]	<220>	
[0454]	<223>	合成的序列 - 抗体IMH2/BBC的VL结构域
[0455]	<400>	27
[0456]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Ser Phe Ser Val Ser Leu Gly	
[0457]	1 5 10 15	
[0458]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Thr Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg	
[0459]	20 25 30	
[0460]	Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Val Pro Arg Leu Leu Ile	
[0461]	35 40 45	
[0462]	Ser Gly Ala Thr Ser Leu Asp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[0463]	50 55 60	
[0464]	Ser Arg Ser Gly Lys Asp Tyr Ala Leu Ser Ile Thr Ser Leu Gln Thr	
[0465]	65 70 75 80	
[0466]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Trp	
[0467]	85 90 95	
[0468]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys	
[0469]	100 105	
[0470]	<210>	28
[0471]	<211>	121
[0472]	<212>	PRT
[0473]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0474]	<220>	
[0475]	<223>	合成的序列 - 抗体IMH2/BBC的VH结构域
[0476]	<400>	28
[0477]	Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Ser Gln	
[0478]	1 5 10 15	
[0479]	Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly	
[0480]	20 25 30	
[0481]	Tyr Thr Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Thr Leu Glu Trp	
[0482]	35 40 45	
[0483]	Leu Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Leu	
[0484]	50 55 60	
[0485]	Lys Ser Arg Leu Ser Val Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe	
[0486]	65 70 75 80	
[0487]	Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys	
[0488]	85 90 95	
[0489]	Gly Arg Glu Ala Leu Arg Gly Tyr Asp His Gly Phe Trp Phe Thr Tyr	
[0490]	100 105 110	
[0491]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	
[0492]	115 120	

[0493]	<210>	29
[0494]	<211>	107
[0495]	<212>	PRT
[0496]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0497]	<220>	
[0498]	<223>	合成的序列 - 人受体框架AAS01771.1的VL结构域
[0499]	<400>	29
[0500]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0501]	1 5 10 15	
[0502]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr	
[0503]	20 25 30	
[0504]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile	
[0505]	35 40 45	
[0506]	Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[0507]	50 55 60	
[0508]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[0509]	65 70 75 80	
[0510]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr	
[0511]	85 90 95	
[0512]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[0513]	100 105	
[0514]	<210>	30
[0515]	<211>	120
[0516]	<212>	PRT
[0517]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0518]	<220>	
[0519]	<223>	合成的序列 - 人受体框架CAD89404.1的VH结构域
[0520]	<400>	30
[0521]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln	
[0522]	1 5 10 15	
[0523]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly	
[0524]	20 25 30	
[0525]	Ala Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu	
[0526]	35 40 45	
[0527]	Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser	
[0528]	50 55 60	
[0529]	Leu Lys Ser Arg Leu Ser Met Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe	
[0530]	65 70 75 80	
[0531]	Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
[0532]	85 90 95	
[0533]	Cys Ala Arg Gly Pro Tyr Tyr Asp Ser Pro Arg Pro Phe Asp Pro Trp	
[0534]	100 105 110	

[0535]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
[0536]	115 120
[0537]	<210> 31
[0538]	<211> 107
[0539]	<212> PRT
[0540]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0541]	<220>
[0542]	<223> 合成的序列 - 抗体hBBC.8的VL结构域
[0543]	<400> 31
[0544]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0545]	1 5 10 15
[0546]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Thr Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg
[0547]	20 25 30
[0548]	Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Arg Leu Leu Ile
[0549]	35 40 45
[0550]	Ser Gly Ala Thr Ser Leu Asp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0551]	50 55 60
[0552]	Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0553]	65 70 75 80
[0554]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Trp
[0555]	85 90 95
[0556]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0557]	100 105
[0558]	<210> 32
[0559]	<211> 121
[0560]	<212> PRT
[0561]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0562]	<220>
[0563]	<223> 合成的序列 - 抗体hBBC.8、抗体hBBC.9和抗体hBBC.10的VH结构域
[0564]	<400> 32
[0565]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[0566]	1 5 10 15
[0567]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
[0568]	20 25 30
[0569]	Tyr Thr Trp His Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
[0570]	35 40 45
[0571]	Leu Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Leu
[0572]	50 55 60
[0573]	Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
[0574]	65 70 75 80
[0575]	Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0576]	85 90 95

[0577]	Gly Arg Glu Ala Leu Arg Gly Tyr Asp His Gly Phe Trp Phe Thr Tyr
[0578]	100 105 110
[0579]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
[0580]	115 120
[0581]	<210> 33
[0582]	<211> 107
[0583]	<212> PRT
[0584]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0585]	<220>
[0586]	<223> 合成的序列 - 抗体hBBC.9和抗体hBBC.9.1的VL结构域
[0587]	<400> 33
[0588]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0589]	1 5 10 15
[0590]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Thr Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg
[0591]	20 25 30
[0592]	Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Arg Leu Leu Ile
[0593]	35 40 45
[0594]	Ser Gly Ala Thr Ser Leu Asp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0595]	50 55 60
[0596]	Ser Arg Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0597]	65 70 75 80
[0598]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Trp
[0599]	85 90 95
[0600]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0601]	100 105
[0602]	<210> 34
[0603]	<211> 121
[0604]	<212> PRT
[0605]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0606]	<220>
[0607]	<223> 合成的序列 - 抗体hBBC.9.1的VH结构域
[0608]	<400> 34
[0609]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[0610]	1 5 10 15
[0611]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
[0612]	20 25 30
[0613]	Tyr Thr Trp His Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
[0614]	35 40 45
[0615]	Leu Gly Tyr Ile His Tyr Thr Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Leu
[0616]	50 55 60
[0617]	Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
[0618]	65 70 75 80

[0619]	Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0620]	85 90 95
[0621]	Gly Arg Glu Ala Leu Arg Gly Ala Asp His Gly Phe Trp Phe Thr Tyr
[0622]	100 105 110
[0623]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
[0624]	115 120
[0625]	<210> 35
[0626]	<211> 121
[0627]	<212> PRT
[0628]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0629]	<220>
[0630]	<223> 合成的序列 - 抗体hBBC.10.1的VH结构域
[0631]	<400> 35
[0632]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[0633]	1 5 10 15
[0634]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
[0635]	20 25 30
[0636]	Tyr Thr Trp His Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
[0637]	35 40 45
[0638]	Leu Gly Tyr Ile His Tyr Thr Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Leu
[0639]	50 55 60
[0640]	Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
[0641]	65 70 75 80
[0642]	Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0643]	85 90 95
[0644]	Gly Arg Glu Ala Leu Arg Gly Tyr Asp Ala Gly Phe Trp Phe Thr Tyr
[0645]	100 105 110
[0646]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
[0647]	115 120
[0648]	<210> 36
[0649]	<211> 278
[0650]	<212> PRT
[0651]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0652]	<220>
[0653]	<223> 合成的序列 - 在[VH-VL]方向上衍生自抗体hBBC.10.1的单链可变区片段(scFv)
[0654]	<220>
[0655]	<221> VARIANT
[0656]	<222> (127) ... (171)
[0657]	<223> 氨基酸127-171中的任意一个或全部可以存在或不存在。
[0658]	<400> 36
[0659]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[0660]	1 5 10 15

[0661]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
[0662]	20 25 30
[0663]	Tyr Thr Trp His Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
[0664]	35 40 45
[0665]	Leu Gly Tyr Ile His Tyr Thr Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Leu
[0666]	50 55 60
[0667]	Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
[0668]	65 70 75 80
[0669]	Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0670]	85 90 95
[0671]	Gly Arg Glu Ala Leu Arg Gly Tyr Asp Ala Gly Phe Trp Phe Thr Tyr
[0672]	100 105 110
[0673]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[0674]	115 120 125
[0675]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
[0676]	130 135 140
[0677]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
[0678]	145 150 155 160
[0679]	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
[0680]	165 170 175
[0681]	Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
[0682]	180 185 190
[0683]	Thr Cys Thr Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg Leu Thr Trp Tyr Gln
[0684]	195 200 205
[0685]	Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Arg Leu Leu Ile Ser Gly Ala Thr Ser
[0686]	210 215 220
[0687]	Leu Asp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
[0688]	225 230 235 240
[0689]	Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr
[0690]	245 250 255
[0691]	Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly
[0692]	260 265 270
[0693]	Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0694]	275
[0695]	<210> 37
[0696]	<211> 834
[0697]	<212> DNA
[0698]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0699]	<220>
[0700]	<223> 合成的序列 - 在[VH- (L) -VL]方向上衍生自抗体hBBC.10.1的单链可变区片段(scFv)
[0701]	<220>

[0702]	<221> misc_feature
[0703]	<222> (393) ... (513)
[0704]	<223> 核苷酸393-513中的任意一个或全部可以存在或不存在。
[0705]	<400> 37
[0706]	caggtgcagc tgcaggaaag cggcccgggc ctggtgaaac cgagccagac cctgagcctg 60
[0707]	acctgcaccg tgagcggcta tagcattacc agcggctata cctggcattg gattcgccag 120
[0708]	catccgggca aaggcctgga atggctgggc tatattcatt ataccggcaa caccaaatat 180
[0709]	agcccagacc tgaaaagccg cctgagcatt agccgcgata ccagcaaaaa ccagttcttc 240
[0710]	ctgaaactga gcagcgtgac caccgaagat accgcggtgt attattgcgg ccgcgaagcg 300
[0711]	ctgcgcggct atgatgctgg cttctggttt acctattggg gccaaaggac cctggtgacc 360
[0712]	gtgggtggag gcggttctgg tggaggcggg tctggtggag gcggttctgg tggaggcggg 420
[0713]	tctggtggag gcggttctgg tggaggcggg tctggtggag gcggttctgg tggaggcggg 480
[0714]	tctggtggag gcggttctgg tggaggcggg tctgatattc agatgaccca gagcccgagc 540
[0715]	agcctgagcg cgagcgtggg cgatcgcgtg accattacct gcaccgcgag cgaagatatt 600
[0716]	tataaccgcc tgacctggtg tcagcagaaa ccgggcaaag tgccgcgtct gctgatttct 660
[0717]	ggcgcgacca gcctggatac cggcgtgccg agccgcttta gcggcagcgg cagcggcacc 720
[0718]	gattacaccc tgaccattag cagcctgcag ccggaagatg tggcgaccta ttattgccag 780
[0719]	cagtattgga ccaccccggtg gaccttggc cagggcacca aactggaaat taaa 834
[0720]	<210> 38
[0721]	<211> 32
[0722]	<212> PRT
[0723]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0724]	<220>
[0725]	<223> 合成的序列 - hBBC.10.1
[0726]	<400> 38
[0727]	Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Lys
[0728]	1 5 10 15
[0729]	Leu Ser Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg
[0730]	20 25 30
[0731]	<210> 39
[0732]	<211> 32
[0733]	<212> PRT
[0734]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0735]	<220>
[0736]	<223> 合成的序列 - 重链框架区3 hBBC.10.1FQ
[0737]	<400> 39
[0738]	Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln
[0739]	1 5 10 15
[0740]	Met Asn Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg
[0741]	20 25 30
[0742]	<210> 40
[0743]	<211> 32

[0744]	<212>	PRT
[0745]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0746]	<220>	
[0747]	<223>	合成的序列 -重链框架区3 参照1
[0748]	<400>	40
[0749]	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln	
[0750]	1	5 10 15
[0751]	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg	
[0752]	20	25 30
[0753]	<210>	41
[0754]	<211>	32
[0755]	<212>	PRT
[0756]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0757]	<220>	
[0758]	<223>	合成的序列 -重链框架区3 参照2
[0759]	<400>	41
[0760]	Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln	
[0761]	1	5 10 15
[0762]	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg	
[0763]	20	25 30
[0764]	<210>	42
[0765]	<211>	16
[0766]	<212>	PRT
[0767]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0768]	<220>	
[0769]	<223>	合成的序列 - IMH2/hBBC的CDRH2
[0770]	<400>	42
[0771]	Tyr Ile His Tyr Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser	
[0772]	1	5 10 15
[0773]	<210>	43
[0774]	<211>	13
[0775]	<212>	PRT
[0776]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0777]	<220>	
[0778]	<223>	合成的序列 - IMH2/hBBC的CDRH2
[0779]	<400>	43
[0780]	Glu Ala Leu Arg Gly Tyr Asp His Gly Phe Trp Phe Thr	
[0781]	1	5 10
[0782]	<210>	44
[0783]	<211>	121
[0784]	<212>	PRT
[0785]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)

[0786]	<220>
[0787]	<223> 合成的序列 - 人类受体VH 1
[0788]	<400> 44
[0789]	Val Gln Leu Gln Glu Trp Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr
[0790]	1 5 10 15
[0791]	Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Phe Gly
[0792]	20 25 30
[0793]	His Tyr Trp Ser Trp Ile Arg His Tyr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
[0794]	35 40 45
[0795]	Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
[0796]	50 55 60
[0797]	Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
[0798]	65 70 75 80
[0799]	Leu Glu Leu Asn Ser Met Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0800]	85 90 95
[0801]	Ala Arg Ala Gly Gly Ser Ala Ala Gly Thr His Asp Ala Phe Asp Ile
[0802]	100 105 110
[0803]	Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
[0804]	115 120
[0805]	<210> 45
[0806]	<211> 122
[0807]	<212> PRT
[0808]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0809]	<220>
[0810]	<223> 合成的序列 - 人类受体VH 2
[0811]	<400> 45
[0812]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[0813]	1 5 10 15
[0814]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Asn Ser Ser
[0815]	20 25 30
[0816]	Gly Phe Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
[0817]	35 40 45
[0818]	Trp Ile Gly Ser Met Phe Tyr Gly Gly Ser Pro Tyr Asn Asn Pro Ser
[0819]	50 55 60
[0820]	Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
[0821]	65 70 75 80
[0822]	Ser Leu Tyr Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[0823]	85 90 95
[0824]	Cys Ala Arg Ala Phe Asp Tyr Ser Ala Ser Gly Ser Phe Tyr Phe Gly
[0825]	100 105 110
[0826]	Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
[0827]	115 120

[0828]	<210>	46
[0829]	<211>	120
[0830]	<212>	PRT
[0831]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0832]	<220>	
[0833]	<223>	合成的序列 - 人类受体VH 3
[0834]	<400>	46
[0835]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln	
[0836]	1	5 10 15
[0837]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly	
[0838]	20	25 30
[0839]	Ala Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu	
[0840]	35	40 45
[0841]	Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser	
[0842]	50	55 60
[0843]	Leu Lys Ser Arg Leu Ser Met Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe	
[0844]	65	70 75 80
[0845]	Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
[0846]	85	90 95
[0847]	Cys Ala Arg Gly Pro Tyr Tyr Asp Ser Pro Arg Pro Phe Asp Pro Trp	
[0848]	100	105 110
[0849]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	
[0850]	115	120
[0851]	<210>	47
[0852]	<211>	117
[0853]	<212>	PRT
[0854]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0855]	<220>	
[0856]	<223>	合成的序列 - 人类受体VH 4
[0857]	<400>	47
[0858]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	
[0859]	1	5 10 15
[0860]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Ser Gly	
[0861]	20	25 30
[0862]	Gly Thr His Trp Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Gln Gly Leu Glu	
[0863]	35	40 45
[0864]	Trp Leu Gly Tyr Leu Tyr Asn Ser Arg Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser	
[0865]	50	55 60
[0866]	Leu Glu Ser Arg Leu Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe	
[0867]	65	70 75 80
[0868]	Ser Leu Asn Leu Ser Thr Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
[0869]	85	90 95

[0870]	Cys Ala Arg Lys Ser Gly Phe Arg Glu Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly
[0871]	100 105 110
[0872]	Thr Leu Val Thr Val
[0873]	115
[0874]	<210> 48
[0875]	<211> 116
[0876]	<212> PRT
[0877]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0878]	<220>
[0879]	<223> 合成的序列 - 人类受体VH 5
[0880]	<400> 48
[0881]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[0882]	1 5 10 15
[0883]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Thr Ser Ile Ser Thr Gly
[0884]	20 25 30
[0885]	Gly Tyr His Trp Thr Trp Ile Arg Gln Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu
[0886]	35 40 45
[0887]	Trp Leu Gly Tyr Ile Tyr His Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Asn Pro Ser
[0888]	50 55 60
[0889]	Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
[0890]	65 70 75 80
[0891]	Ser Leu Asn Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[0892]	85 90 95
[0893]	Cys Ala Arg Asn Ser Gly Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[0894]	100 105 110
[0895]	Leu Val Thr Val
[0896]	115
[0897]	<210> 49
[0898]	<211> 120
[0899]	<212> PRT
[0900]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0901]	<220>
[0902]	<223> 合成的序列 - 人类受体VH 6
[0903]	<400> 49
[0904]	Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Arg Leu Val Lys Pro Ser Gln
[0905]	1 5 10 15
[0906]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Gly Ala
[0907]	20 25 30
[0908]	Tyr His Trp Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
[0909]	35 40 45
[0910]	Val Gly Tyr Ile Tyr Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Phe Asn Pro Ser Leu
[0911]	50 55 60

[0912]	Lys Ser Arg Ile Ser Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
[0913]	65 70 75 80
[0914]	Leu Lys Met Asn Ser Val Thr Val Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
[0915]	85 90 95
[0916]	Ala Arg Asp Pro Ile Ala Leu Pro Gly Arg Gly Val Phe Asp Tyr Trp
[0917]	100 105 110
[0918]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
[0919]	115 120
[0920]	<210> 50
[0921]	<211> 113
[0922]	<212> PRT
[0923]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0924]	<220>
[0925]	<223> 合成的序列 - 人类受体VH 7
[0926]	<400> 50
[0927]	Leu Glu Gln Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser
[0928]	1 5 10 15
[0929]	Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Trp Asn
[0930]	20 25 30
[0931]	Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile
[0932]	35 40 45
[0933]	Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Leu Ser Leu Arg Ser Arg Ile
[0934]	50 55 60
[0935]	Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Gln Leu Asn
[0936]	65 70 75 80
[0937]	Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Leu Ile Thr
[0938]	85 90 95
[0939]	Thr Thr Thr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
[0940]	100 105 110
[0941]	Val
[0942]	<210> 51
[0943]	<211> 118
[0944]	<212> PRT
[0945]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0946]	<220>
[0947]	<223> 合成的序列 - 人类受体VH 8
[0948]	<400> 51
[0949]	Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
[0950]	1 5 10 15
[0951]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Asn Gly
[0952]	20 25 30
[0953]	Phe Trp Ile Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met

[0954]	35	40	45
[0955]	Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys		
[0956]	50	55	60
[0957]	Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Gln Asn Gln Phe Tyr Leu		
[0958]	65	70	75
[0959]	Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys Ala		
[0960]	85	90	95
[0961]	Cys Arg Ser Tyr Gly Arg Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln		
[0962]	100	105	110
[0963]	Gly Thr Thr Leu Thr Val		
[0964]	115		

BBC	DVQLQESGPD LVKPSQSLSLTCTVTGYSITSG-YTWHWIRQF
1	-VQLQEWGPGLVKPSQTL SLTCTVSGGSINFGHYWSWIRHY
2	QVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCTVSGDSINSSGFYWTWIRQH
3(受体)	QVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCTVSGGSISSGAYYWSWIRQH
4	QVQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGDSISSGGTHWSWIRQL
5	QVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCTVSGTSISTGGYHWTWIRQQ
6	QLQLQESGPRLVKPSQTL SLTCSVSGGSISG-AYHWSWIRQL
7	---LEQSGPSLVKPSQTL SLTCSVTGDSITSG-Y-WNWIRKF
8	EVQLQESGPSLVKPSQTL SLTCSVTGDSITNG-F-WIWIRKF

BBC	PGNTLEWLGYIHYSGNTKYSPSLKSRLSVTRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCGREAL
1	PGKGLEWIGYIYYSGSTYYNPSLKSRLTISADTSKNQFSLELNSMTAADTAVYYCARAGG
2	PGKGLEWIGSMFYGGSPYNNPSLKSRLTISVDTSKNQFSLYLSNVTAADTAVYYCARAFD
3(受体)	PGKGLEWIGYIYYSGTYYNPSLKSRLSMSRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGPY
4	PGQGLEWLGYLYNSRSTYYNPSLESRLTISADTSKNQFSLNLSTVTAADTAVYYCARKSG
5	PGKGLEWLGYIYHSGSSYYNPSLKSRLTISVDTSKNQFSLNLNSVTAADTAVYYCARNSG
6	PGKGLEWVGYYITGNTYFNPSLKSRLISVDTSKNQFSLKMNSVTVADTAMYYCARDPI
7	PGNKLEYMGYISYSGSTYYNLSLRSRLITRDTSKNQYYLQLNSVTTEDTATYYCALITT
8	PGNKLEYMGYISYSGSTYYNPSLKSRLISRDTSKNQFYLLQLNSVTTEDTGTYCACRSY

BBC	RGYDHG---FWFTYWGQGLTVTV
1	SAAGTHD---AFDWGPGTMVTV
2	YSASGSF---YFGSWGQGLTVTV
3(受体)	YDSPRP-----FDPWGQGLTVTV
4	F-----REFDLWGQGLTVTV
5	-----ADFDYWGQGLTVTV
6	ALPGRG-----VFDYWGQGLTVTV
7	-----TT---YAMDYWGQGTTVTV
8	G--RTP---YYDFWGQGTTLTV

图1

BBC	DIQMTQSSSFVSLGDRVITITCTASEDIYNRLTWYQQKPGKVPRLISGATSLDITGVPS
hBBC.8	DIQMTQSPSSLASVGDRTITCTASEDIYNRLTWYQQKPGKVPRLISGATSLDITGVPS
hBBC.9	DIQMTQSPSSLASVGDRTITCTASEDIYNRLTWYQQKPGKVPRLISGATSLDITGVPS
hBBC.10	DIQMTQSPSSLASVGDRTITCTASEDIYNRLTWYQQKPGKVPRLISGATSLDITGVPS
人	DIQMTQSPSSLASVGDRTITCTASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASLTQSGVPS
BBC	RFSGSRSGKDIALSITSLQTEDVATYCCQYWTTPWTFGGGTRLEIK
hBBC.8	RFSGSRSGTDFTLTISLQPEDVATYCCQYWTTPWTFGQGTKLEIK
hBBC.9	RFSGSRSGTDYTLTISLQPEDVATYCCQYWTTPWTFGQGTKLEIK
hBBC.10	RFSGSGSGTDYTLTISLQPEDVATYCCQYWTTPWTFGQGTKLEIK
人	RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYCCQYNSAPYTFGQGTKLEIK

图2A

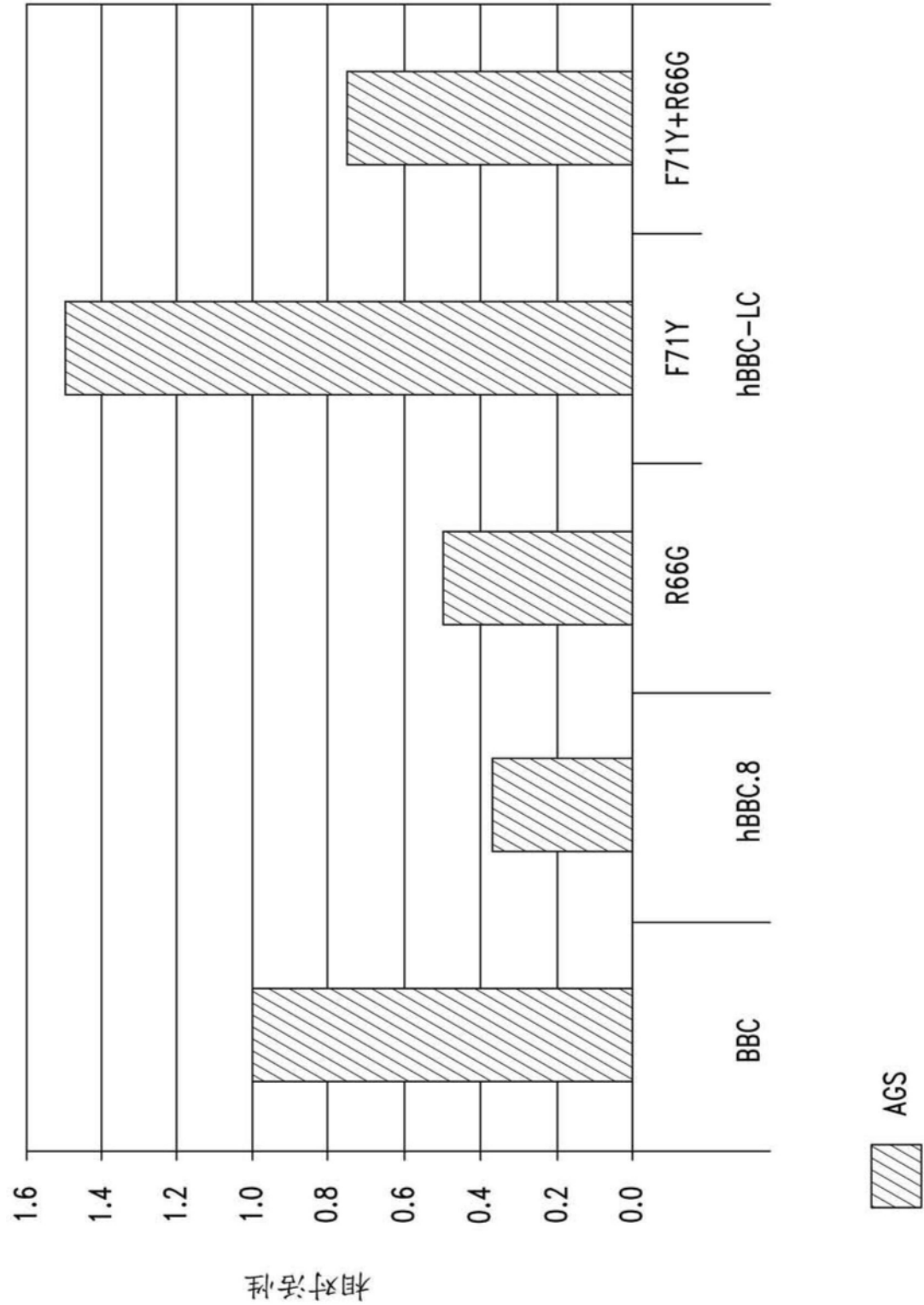


图2B

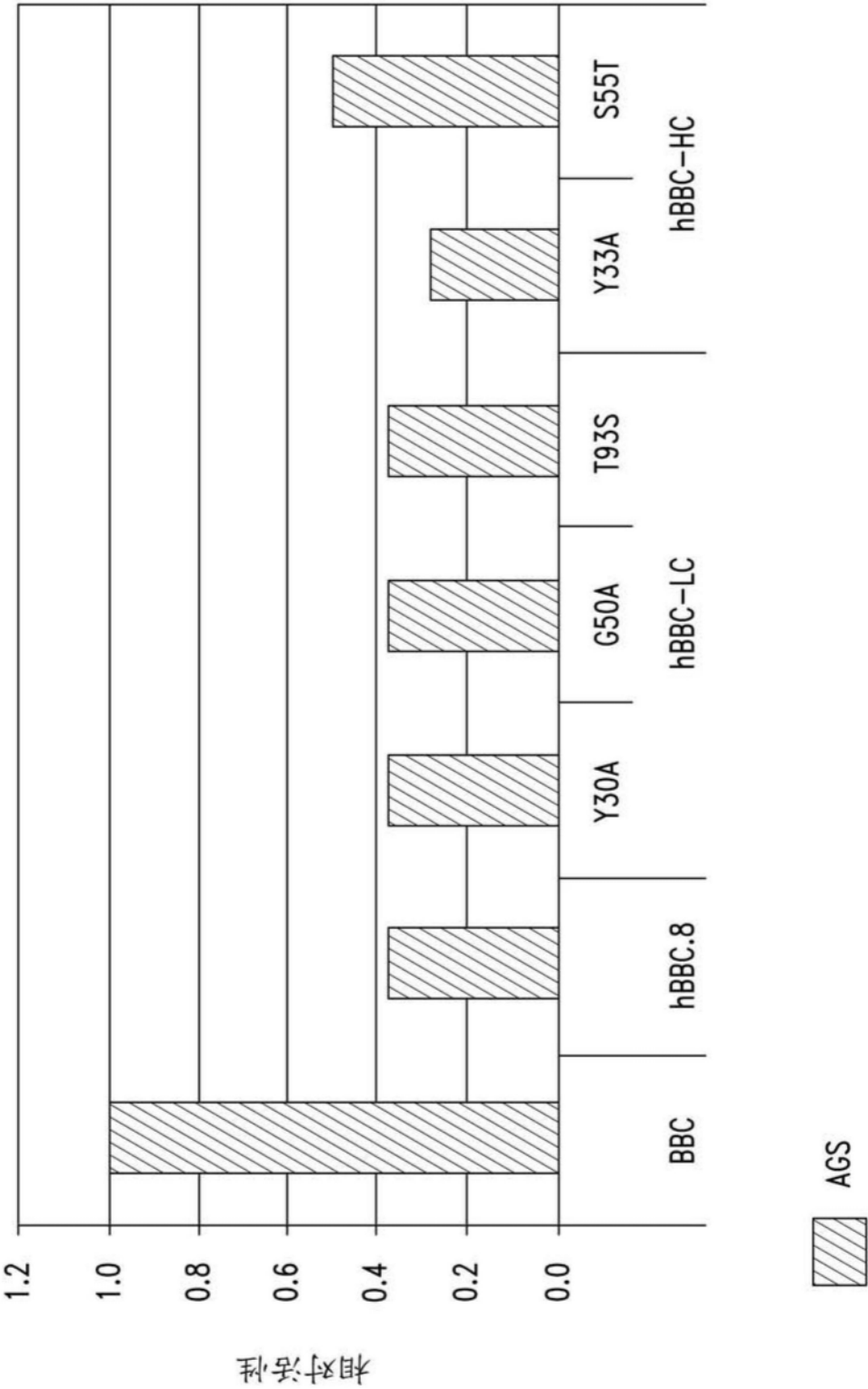


图2C

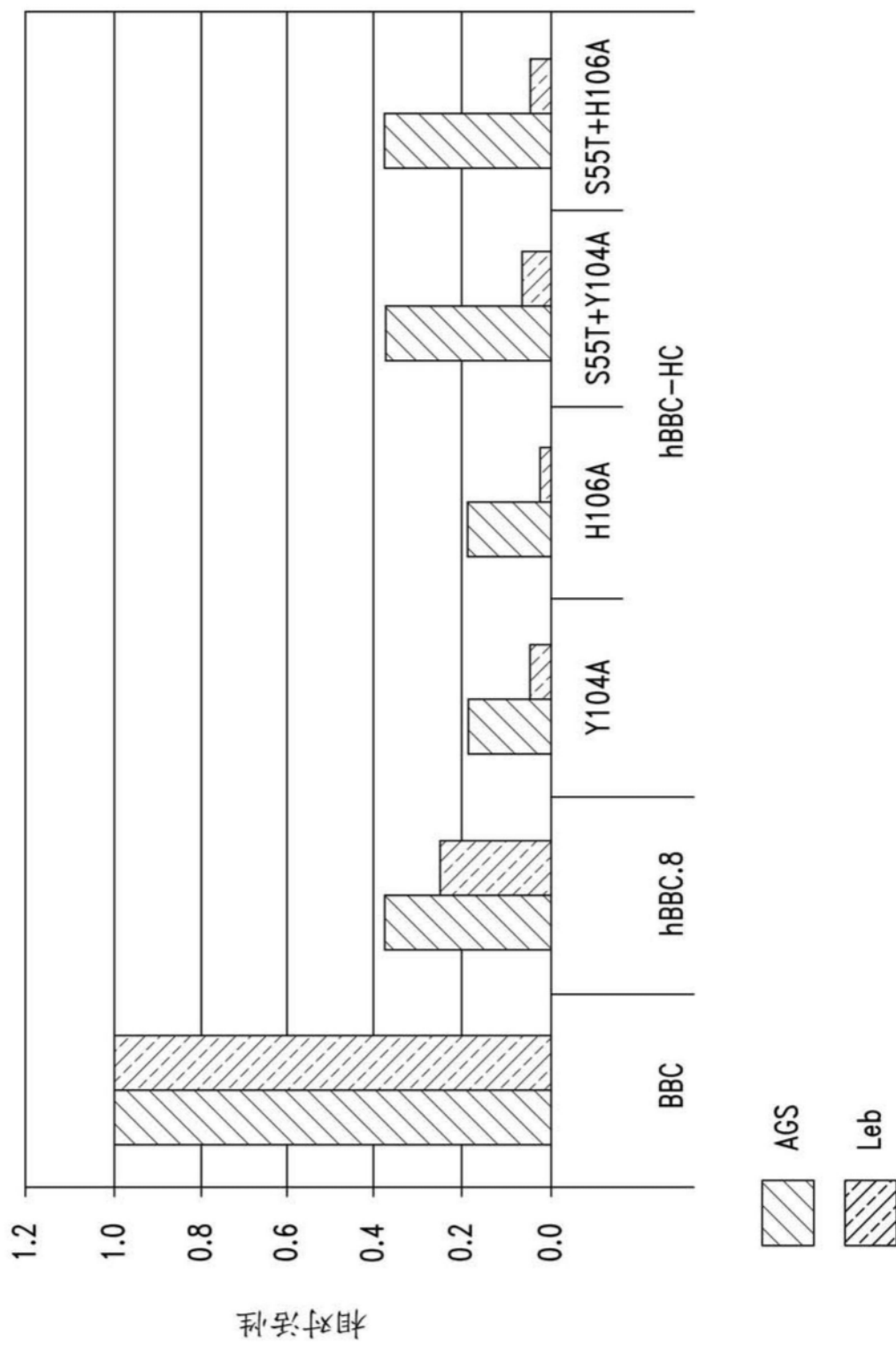


图2D

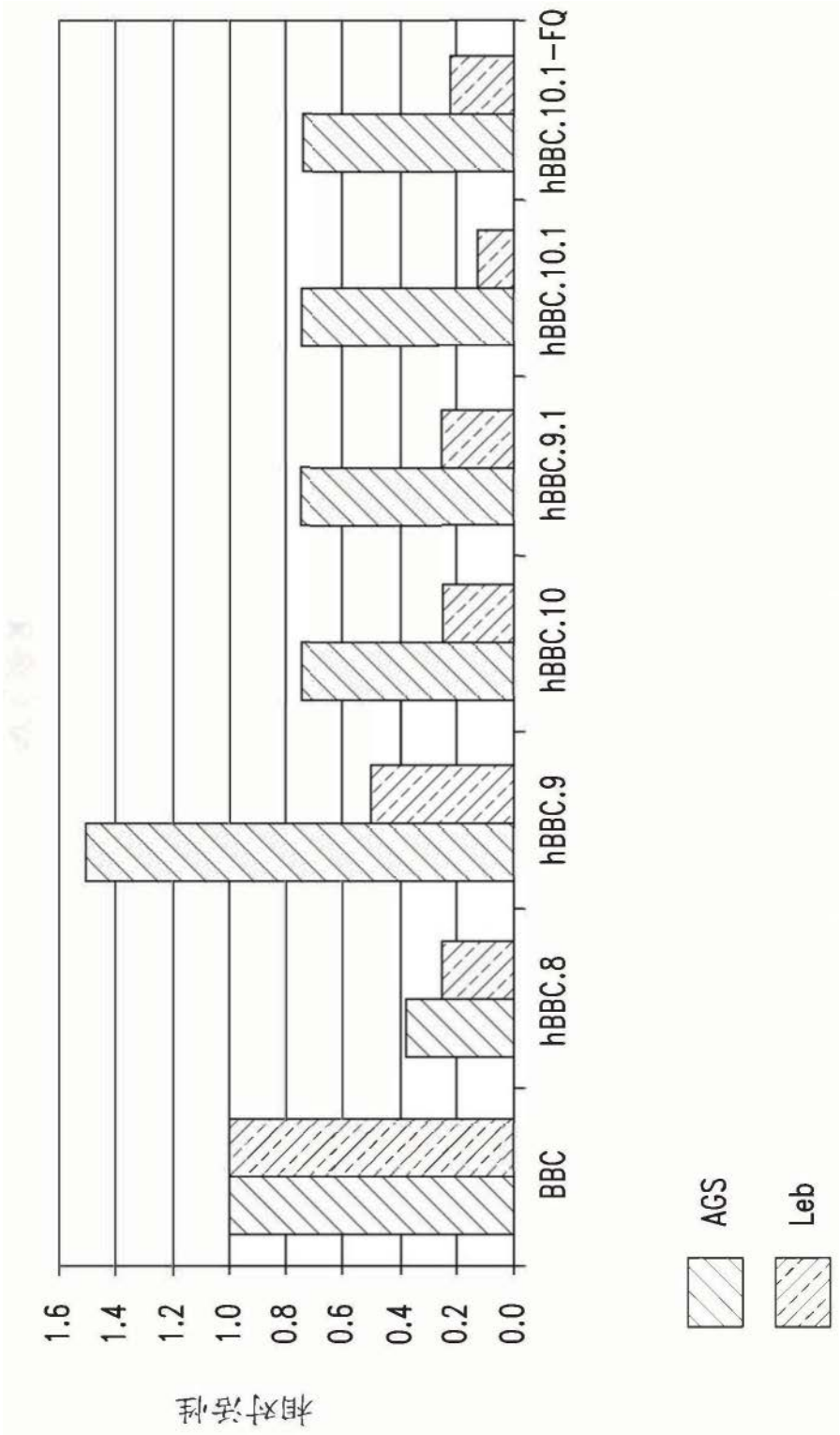


图2E

hBBC.10.1	RLSISRDTSKN[Q][F][L][K][L][S][V][T][T][E][D][T][A][V][Y][Y][C][G][R]
hBBC.10.1FQ	RLSISRDTSKN[T][F][Y][L][Q][M][N][S][V][T][T][E][D][T][A][V][Y][Y][C][G][R]
参照1	RFTISRDDSKN[T][F][Y][L][Q][M][N][S][L][R][A][E][D][T][A][V][Y][Y][C][A][R]
参照2	RFTISADTSKN[T][A][Y][L][Q][M][N][S][L][R][A][E][D][T][A][V][Y][Y][C][S][R]

图3

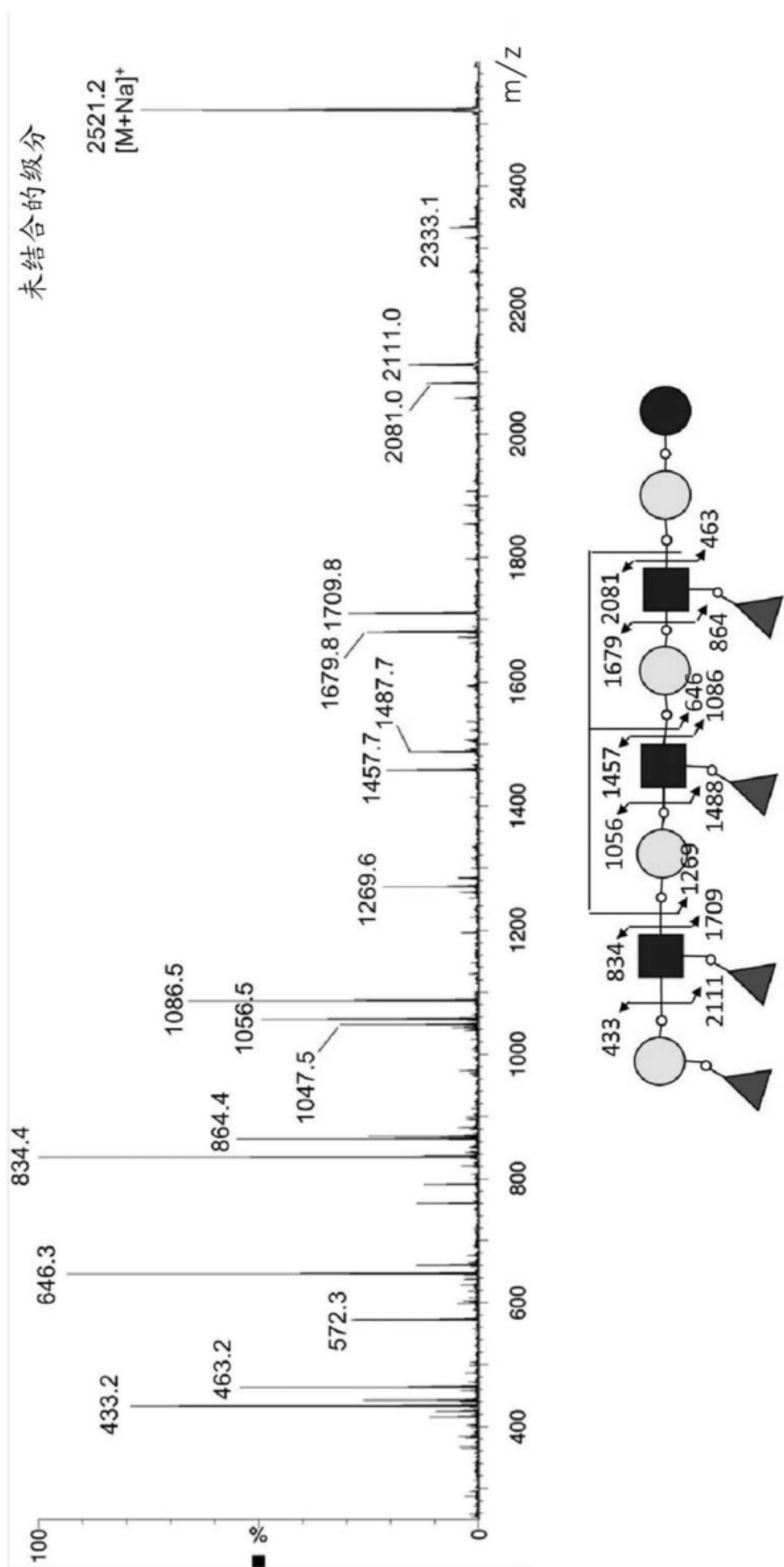


图4A

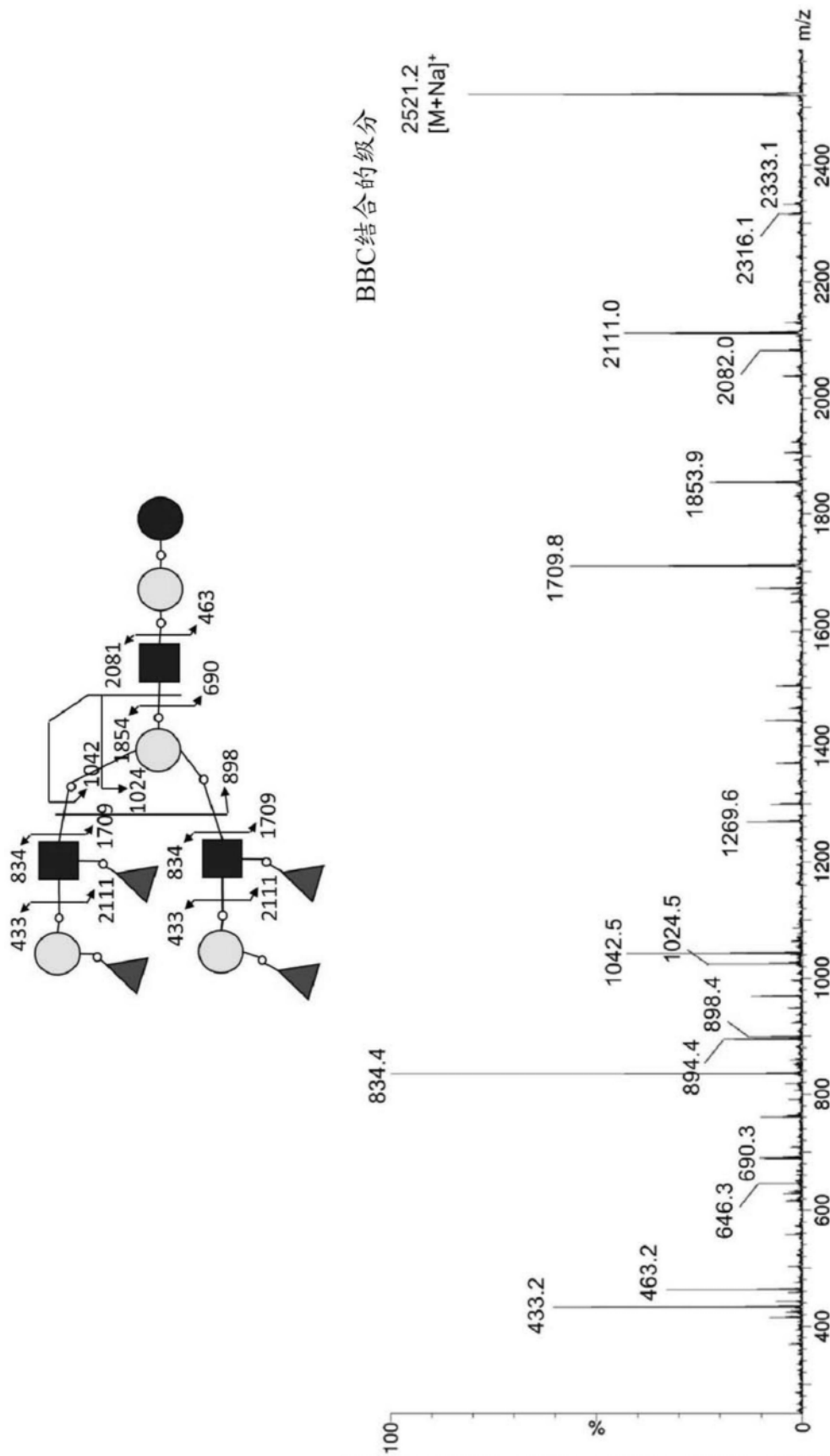


图4B

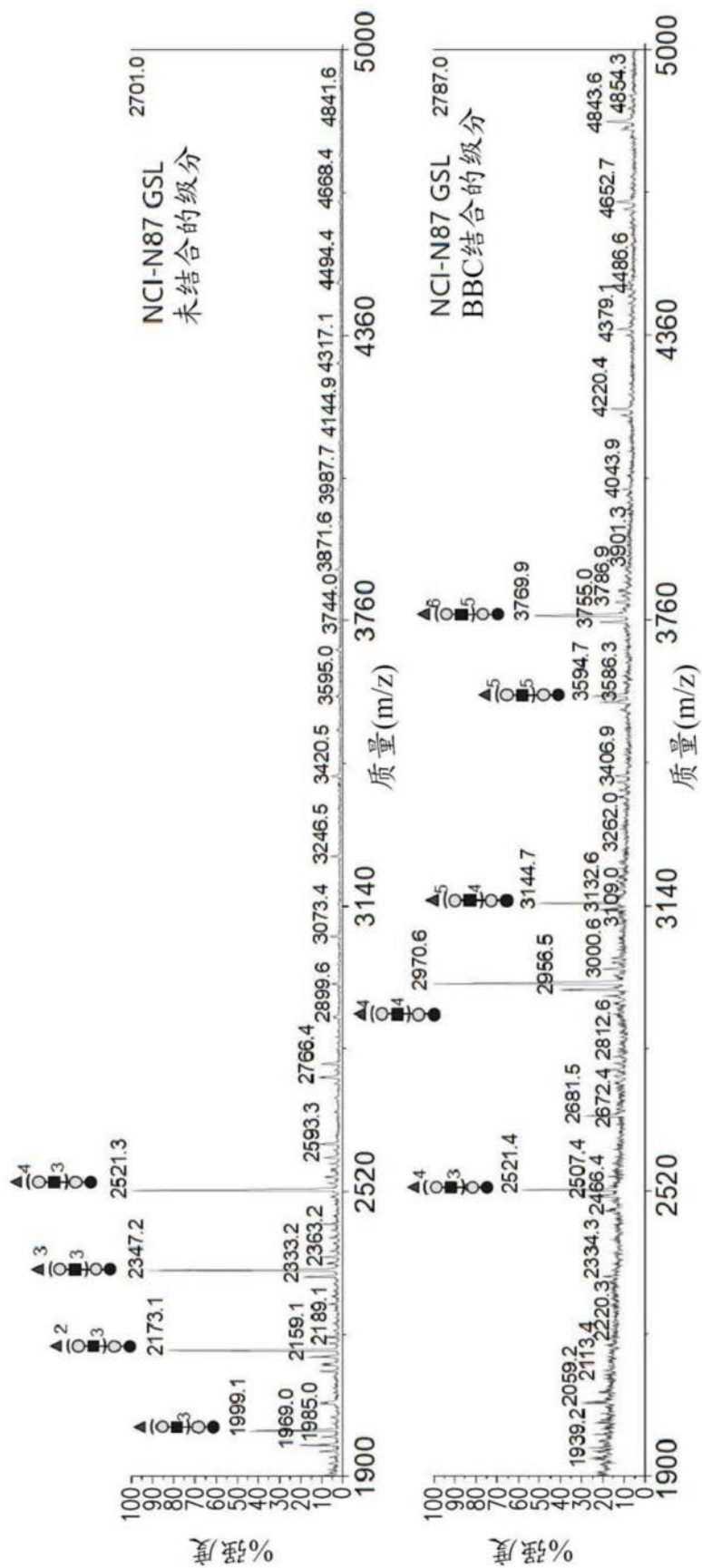


图5A

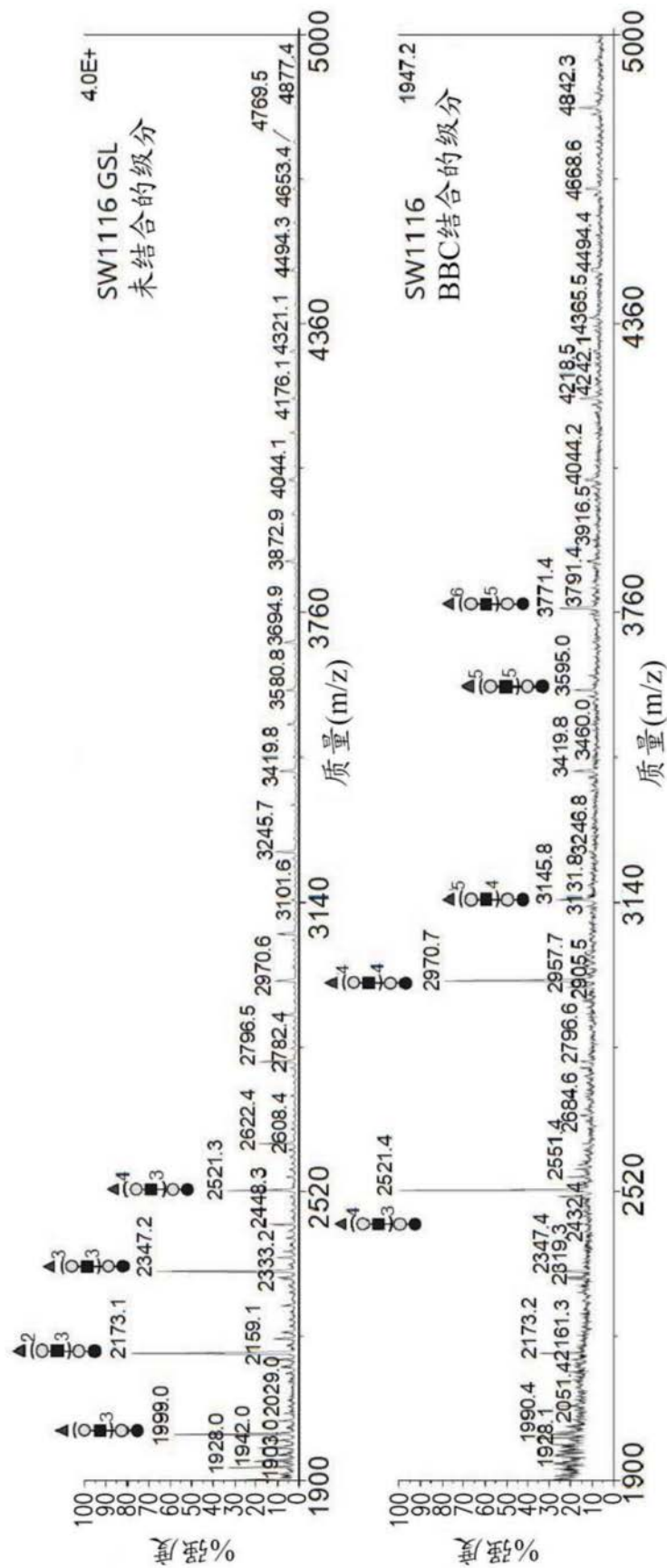


图5B

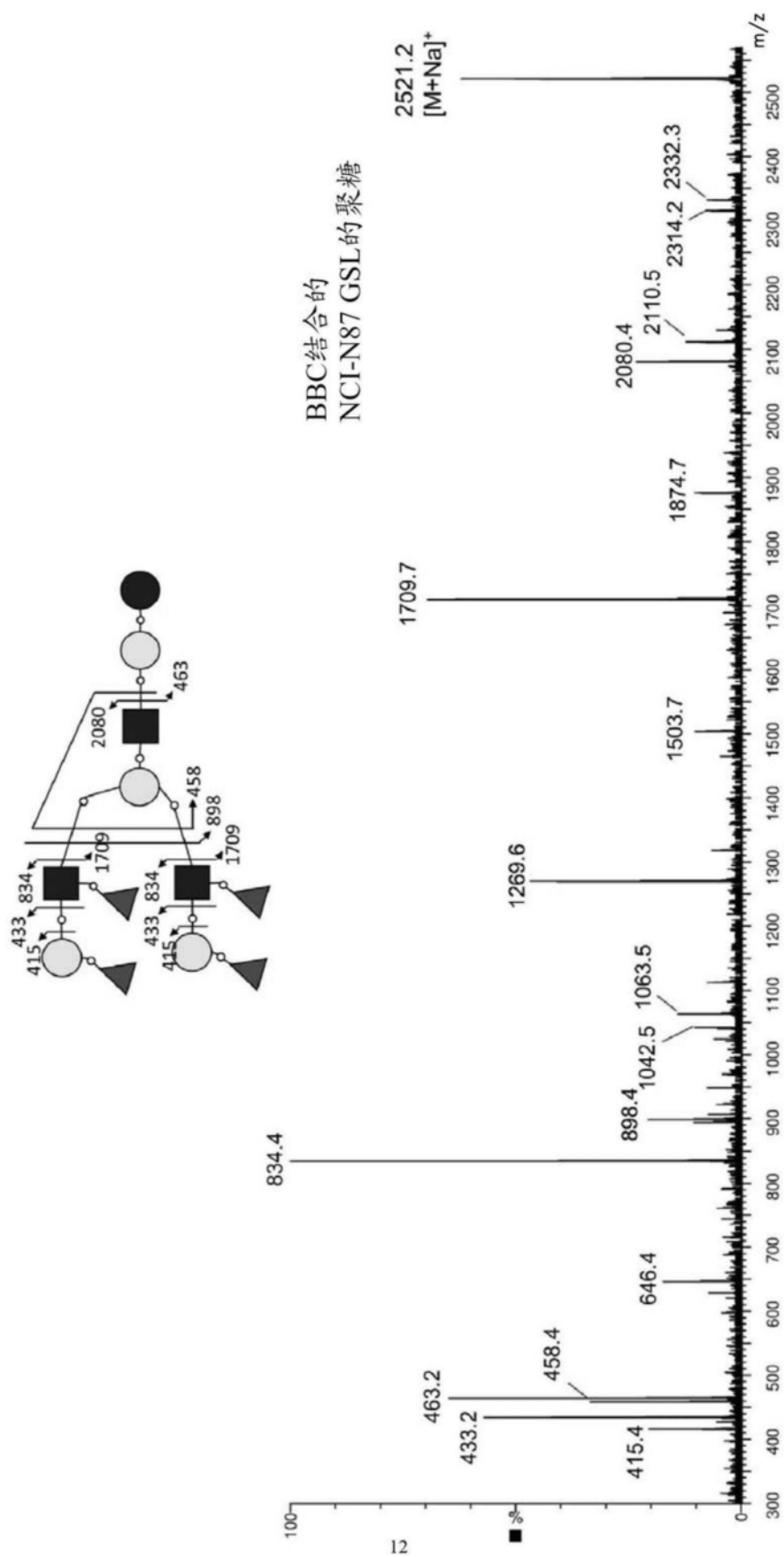


图6A

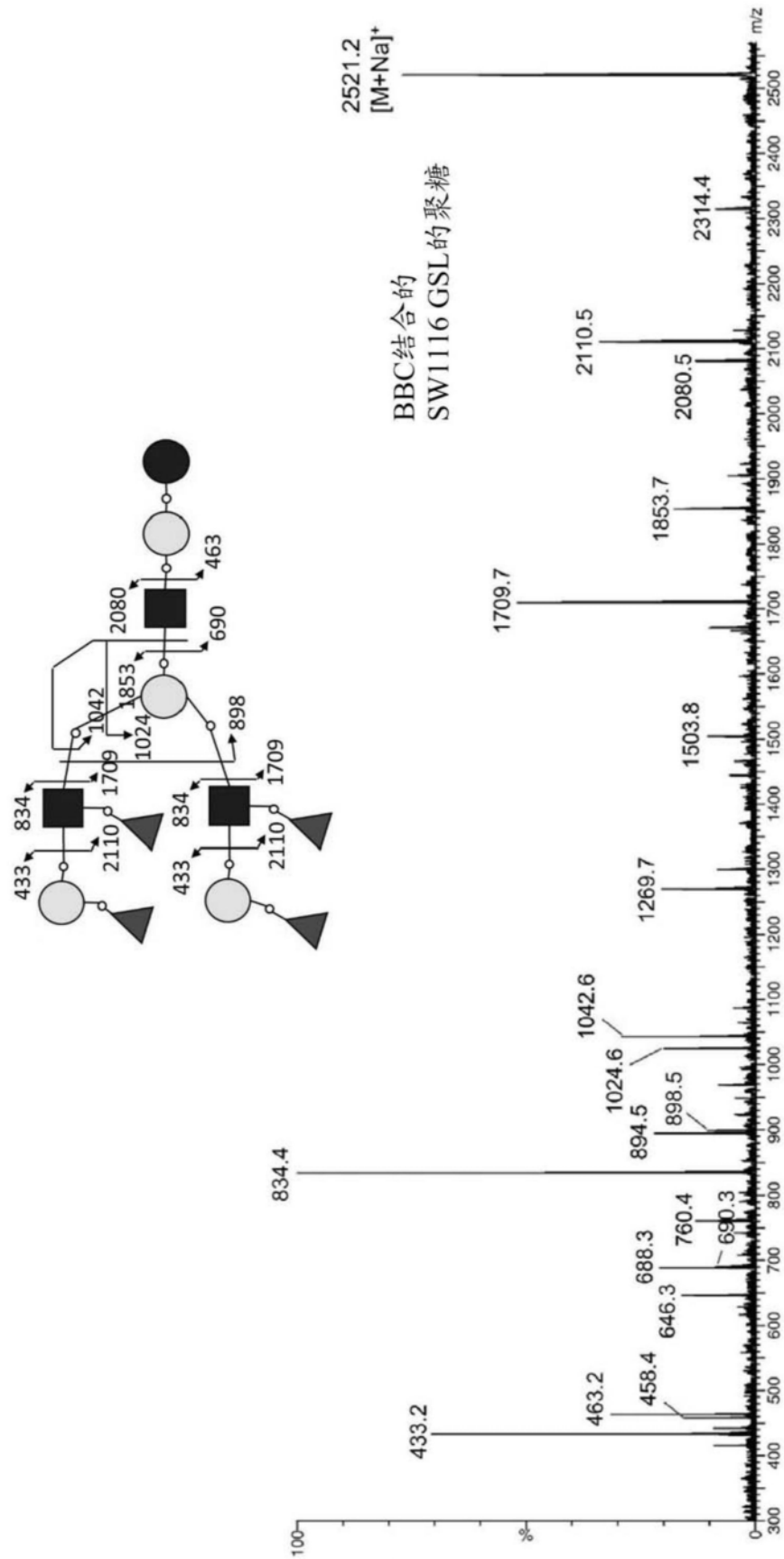


图6B

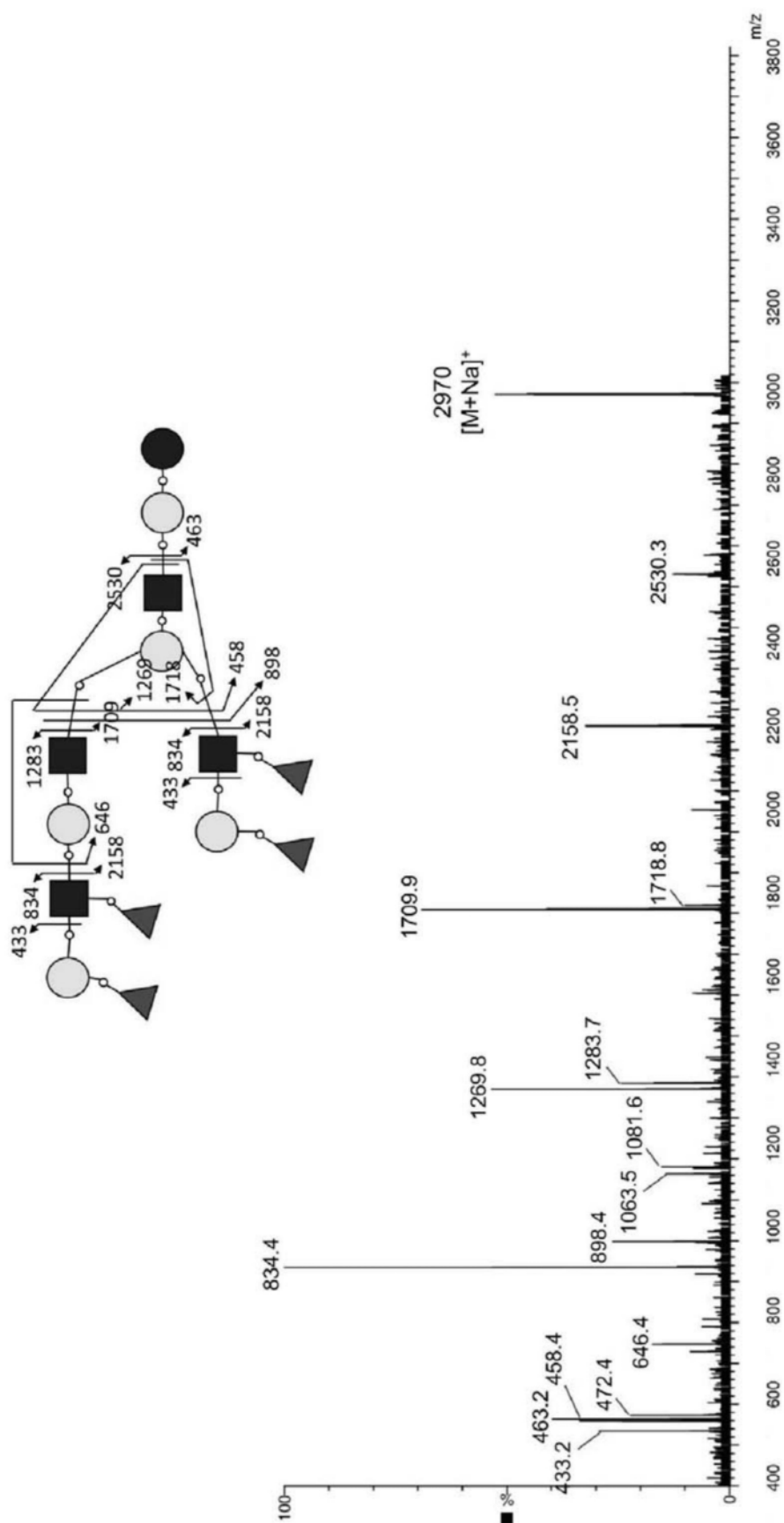


图7A

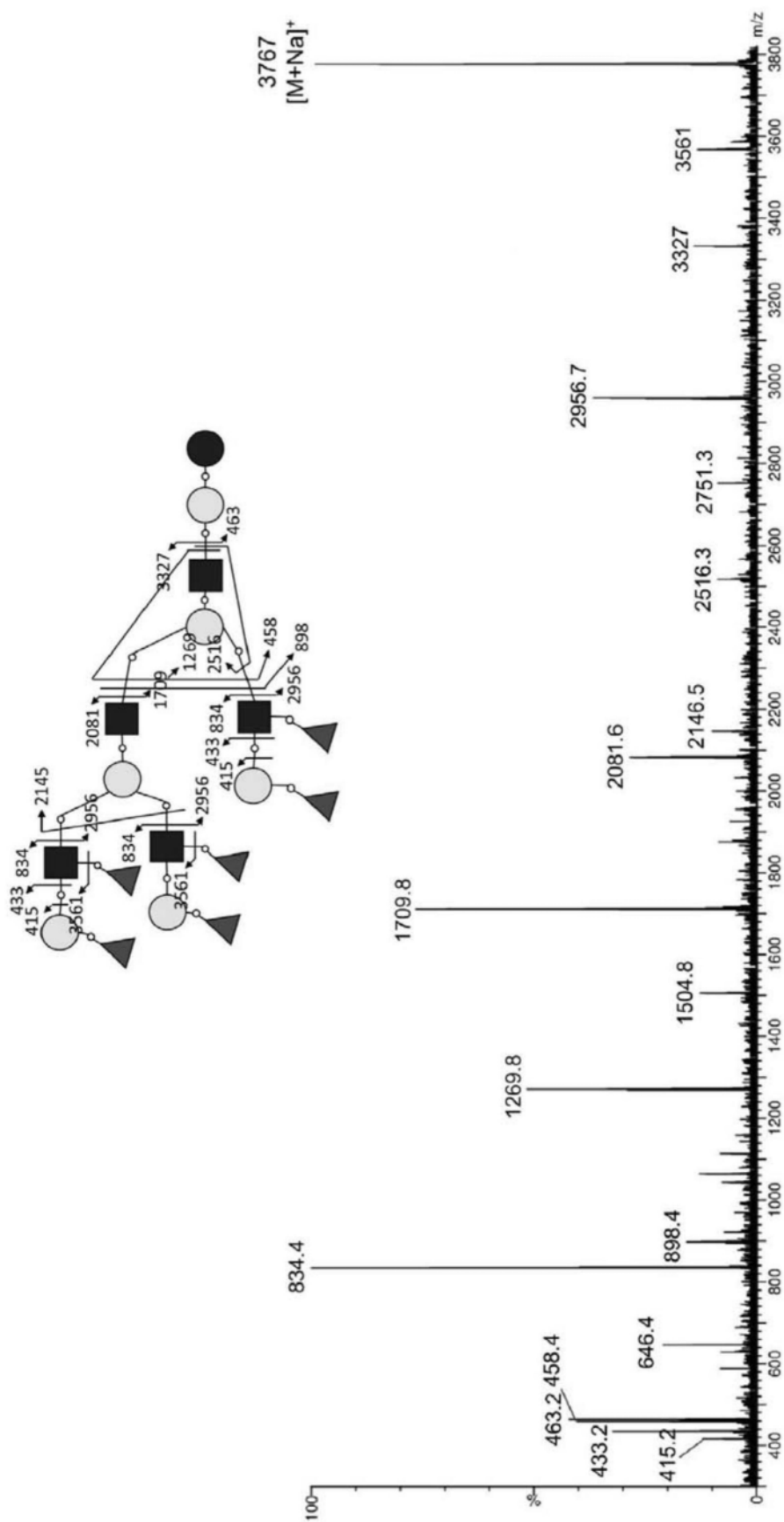


图7B

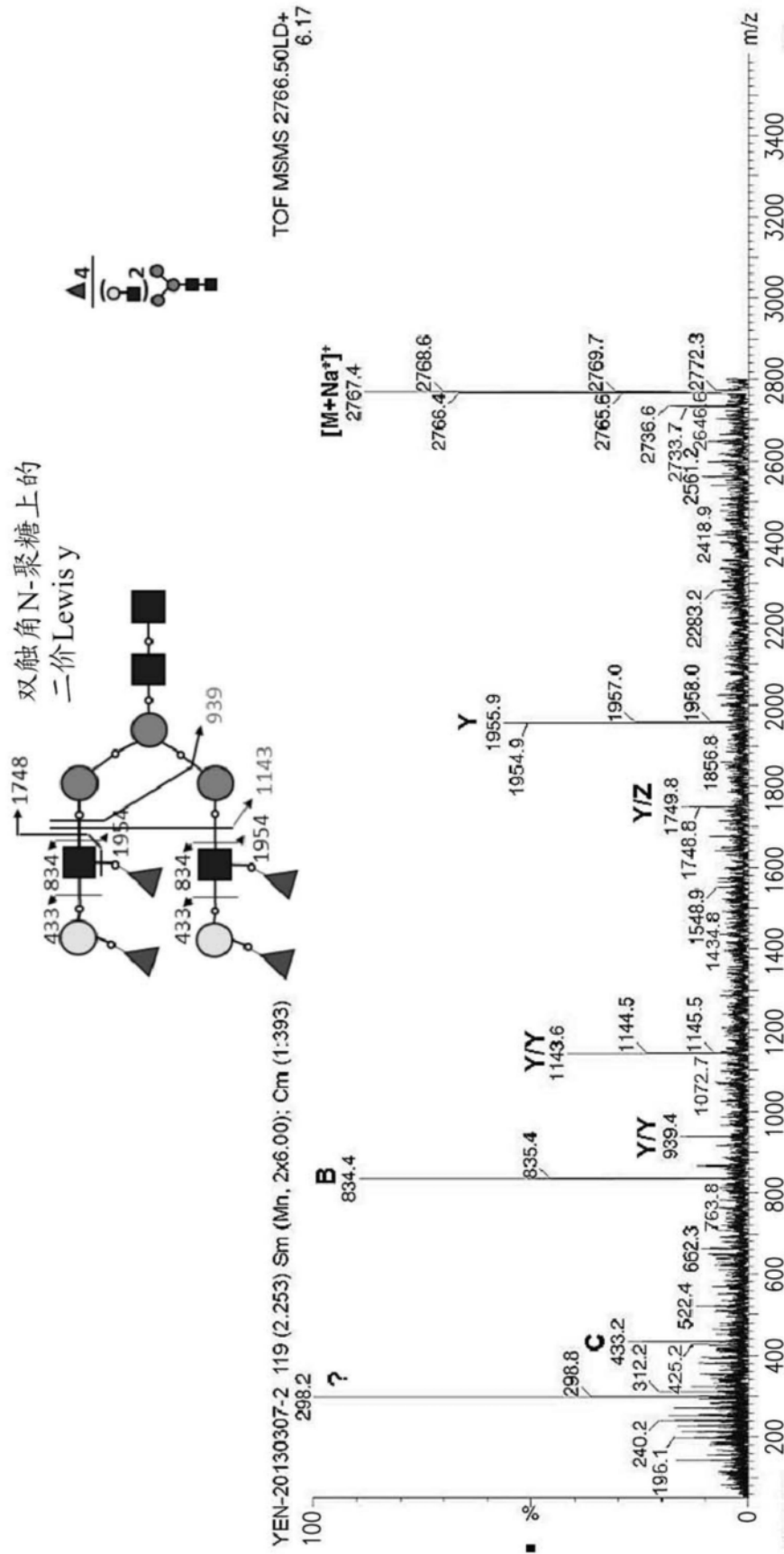


图8A

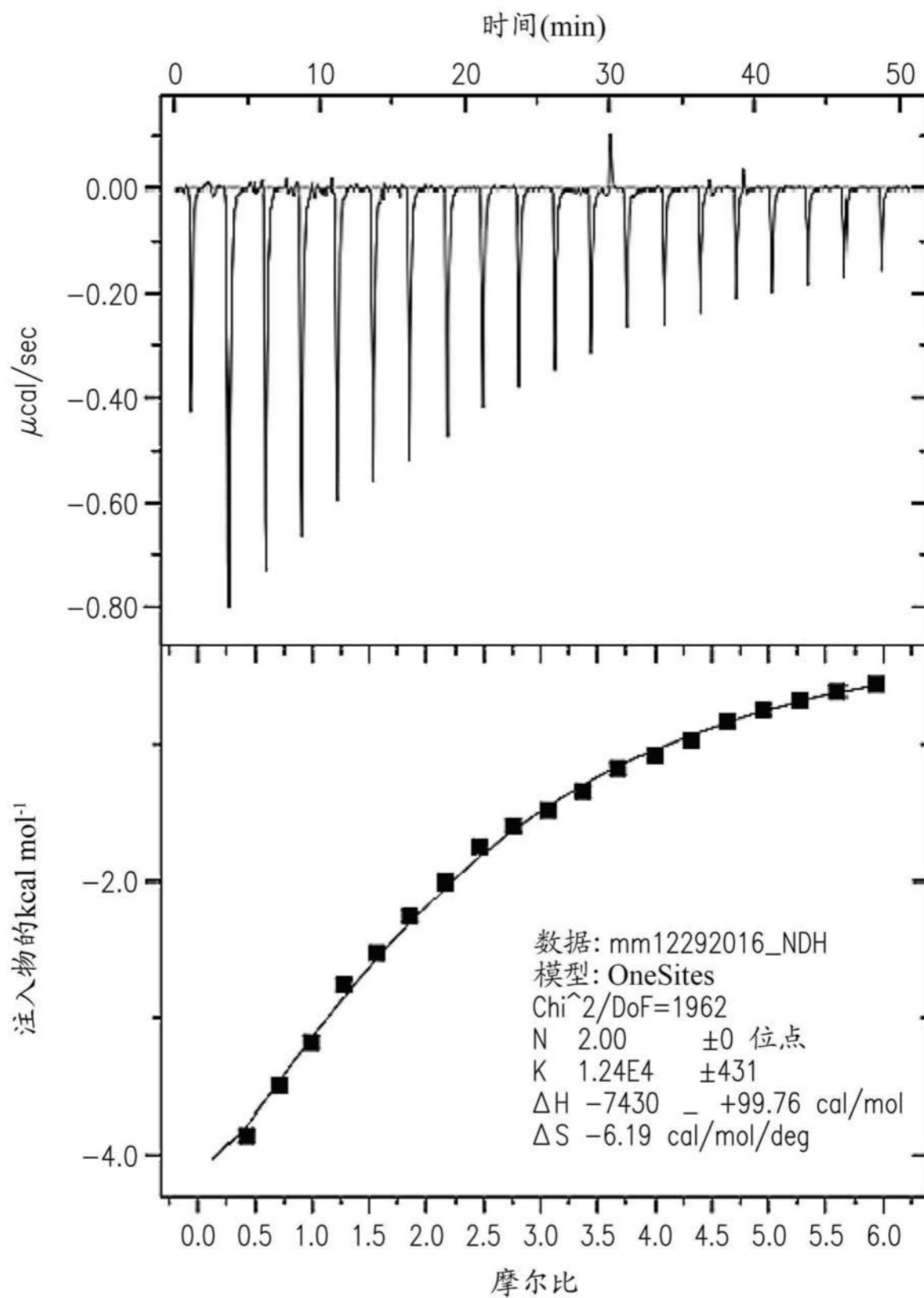


图9A

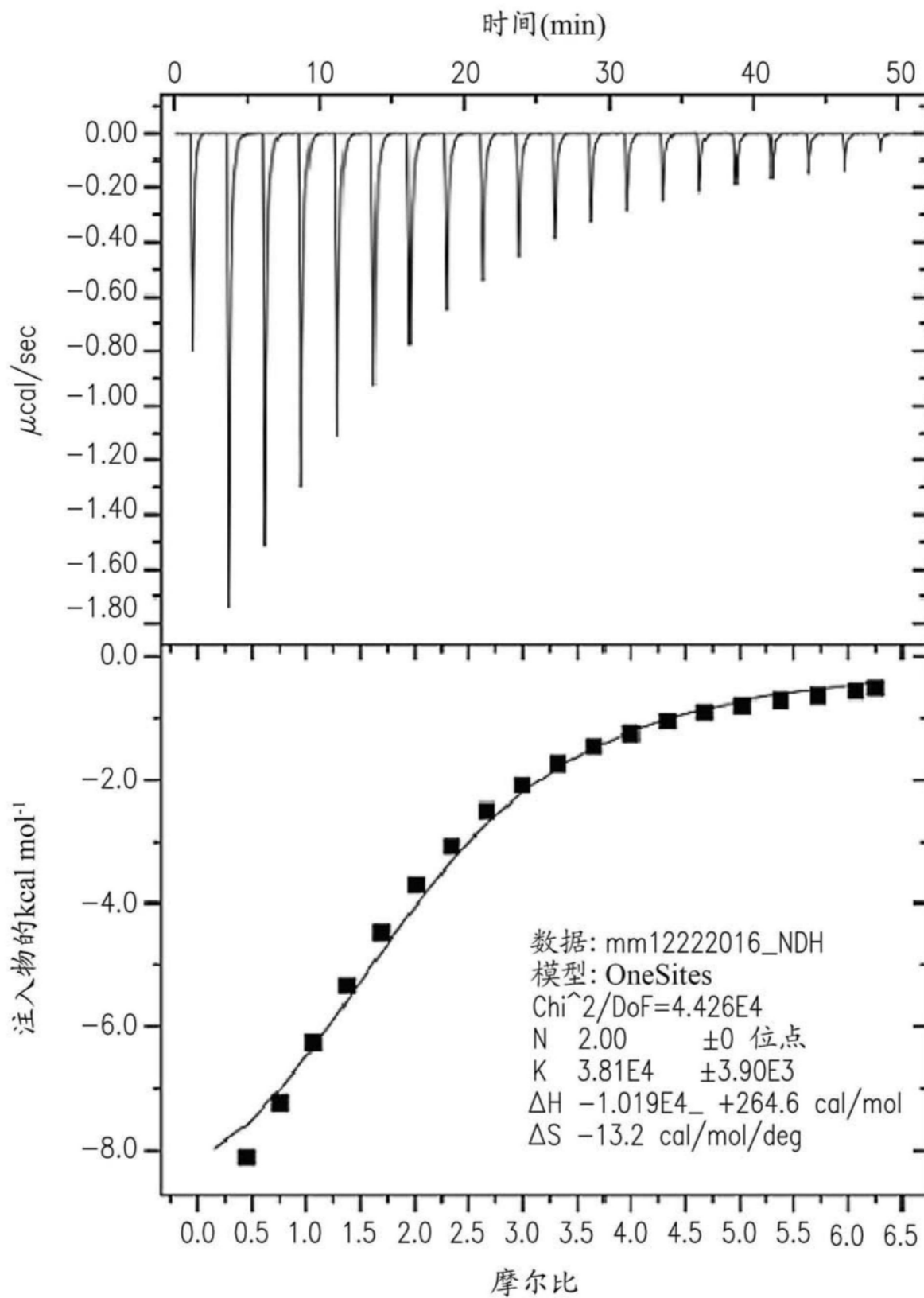


图9B

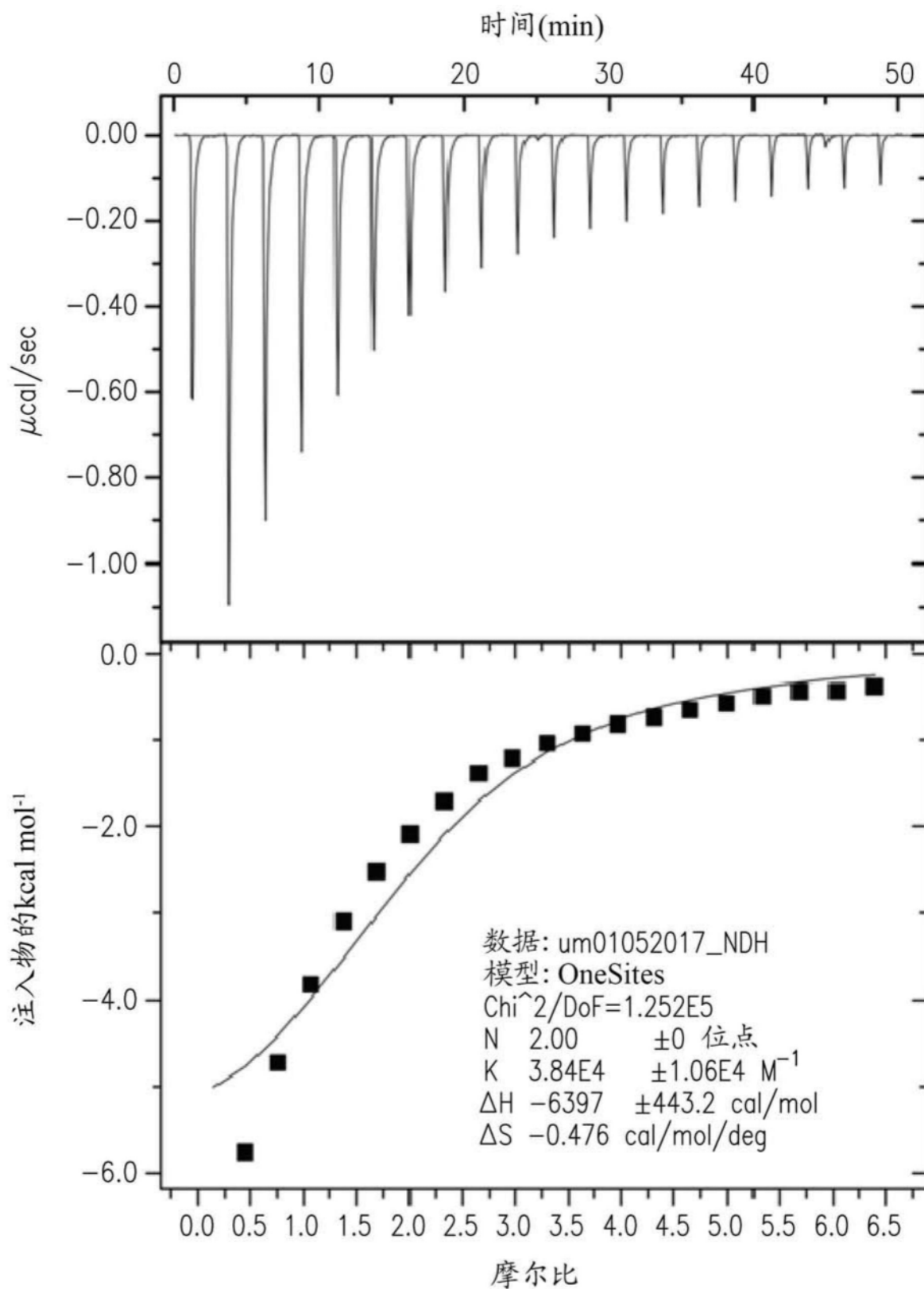


图10A

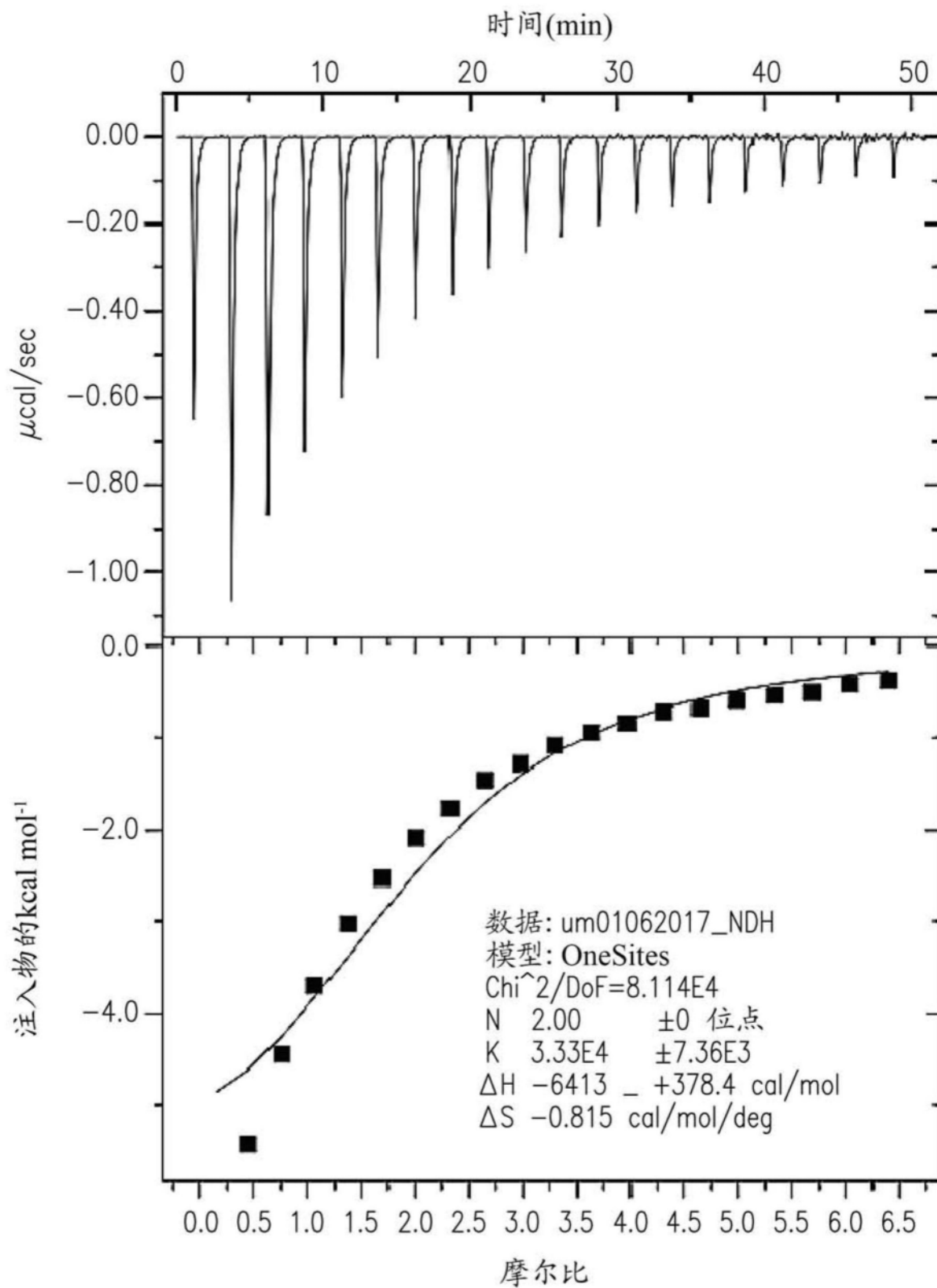


图10B

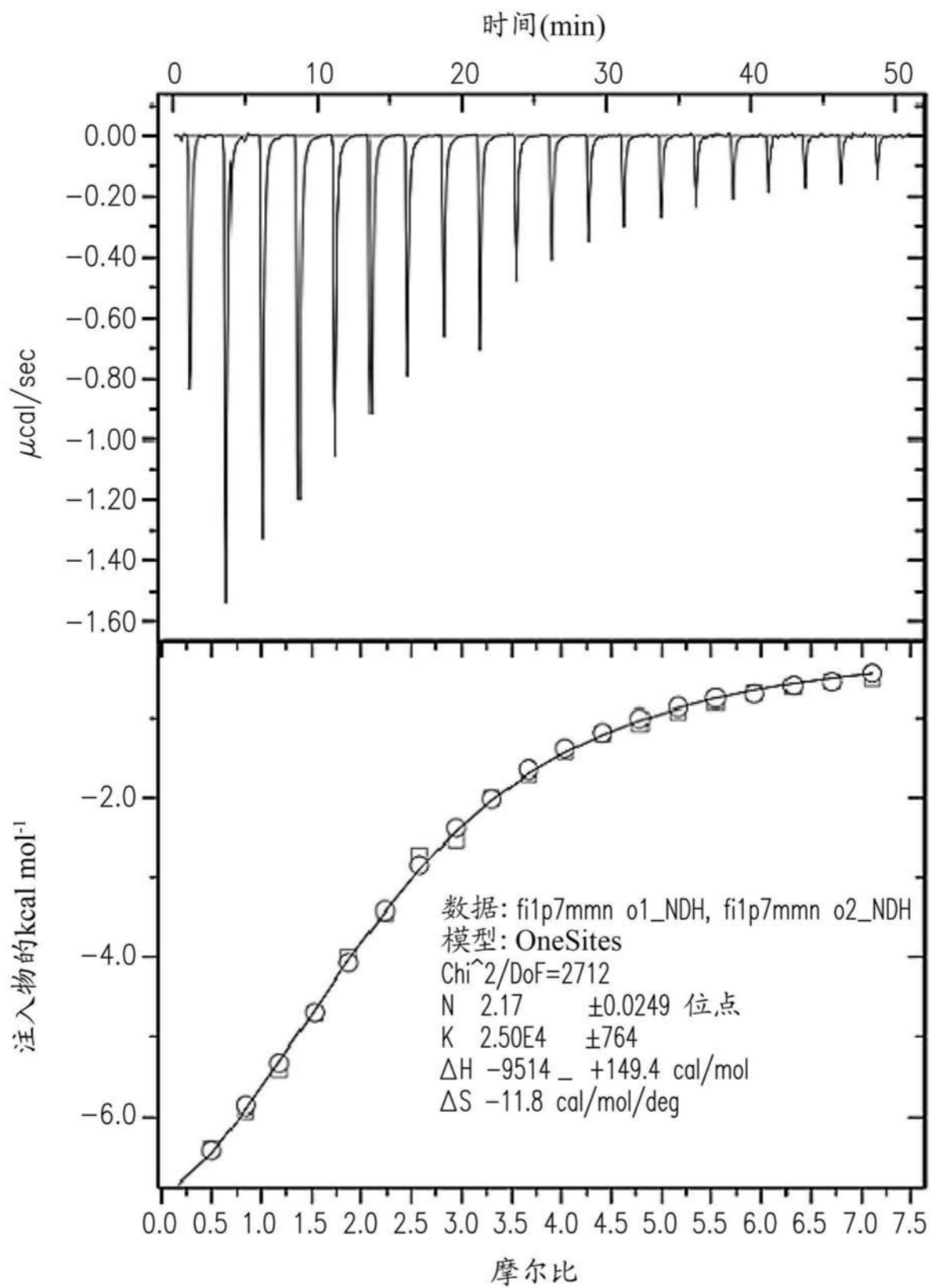


图10C

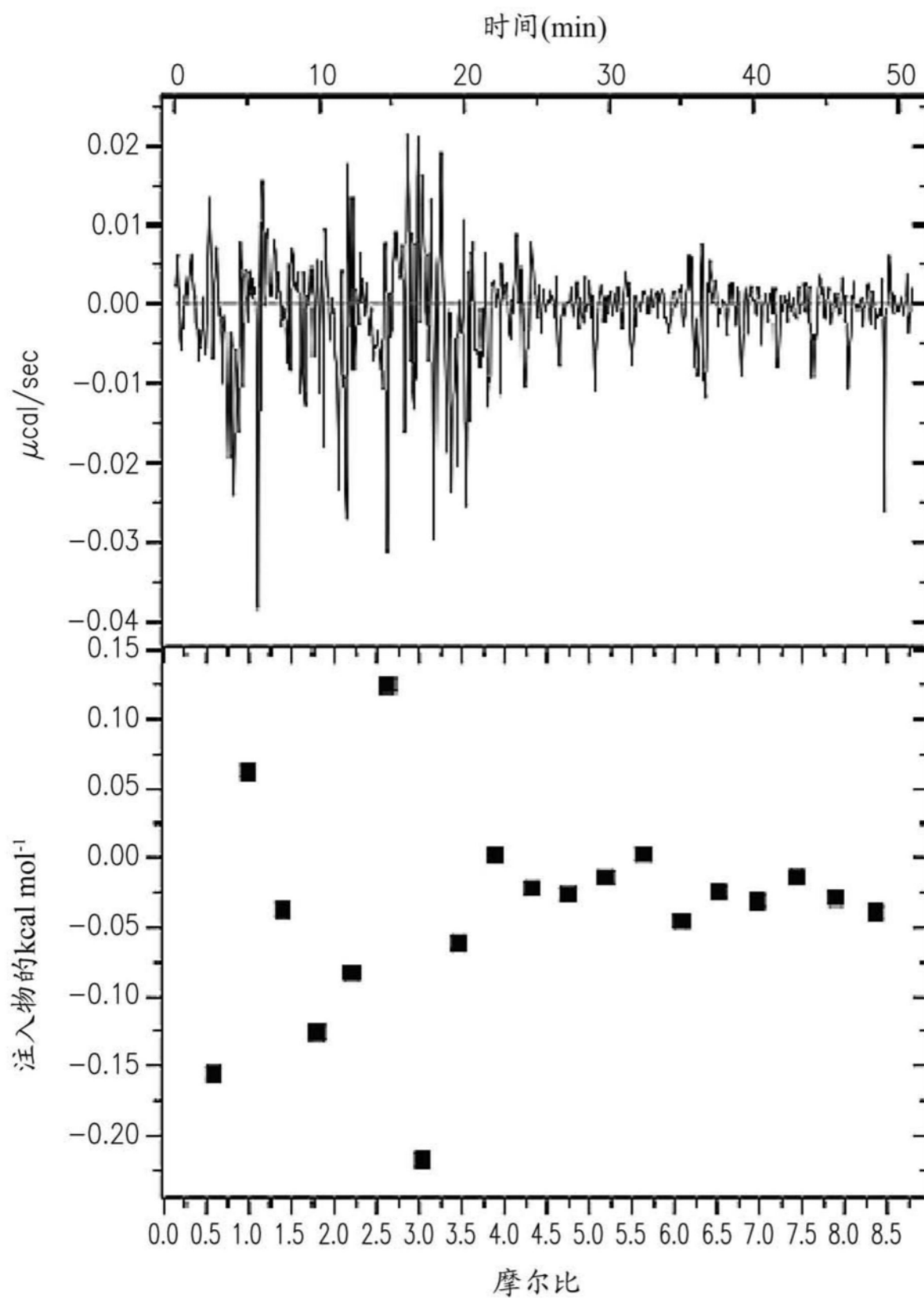


图11A

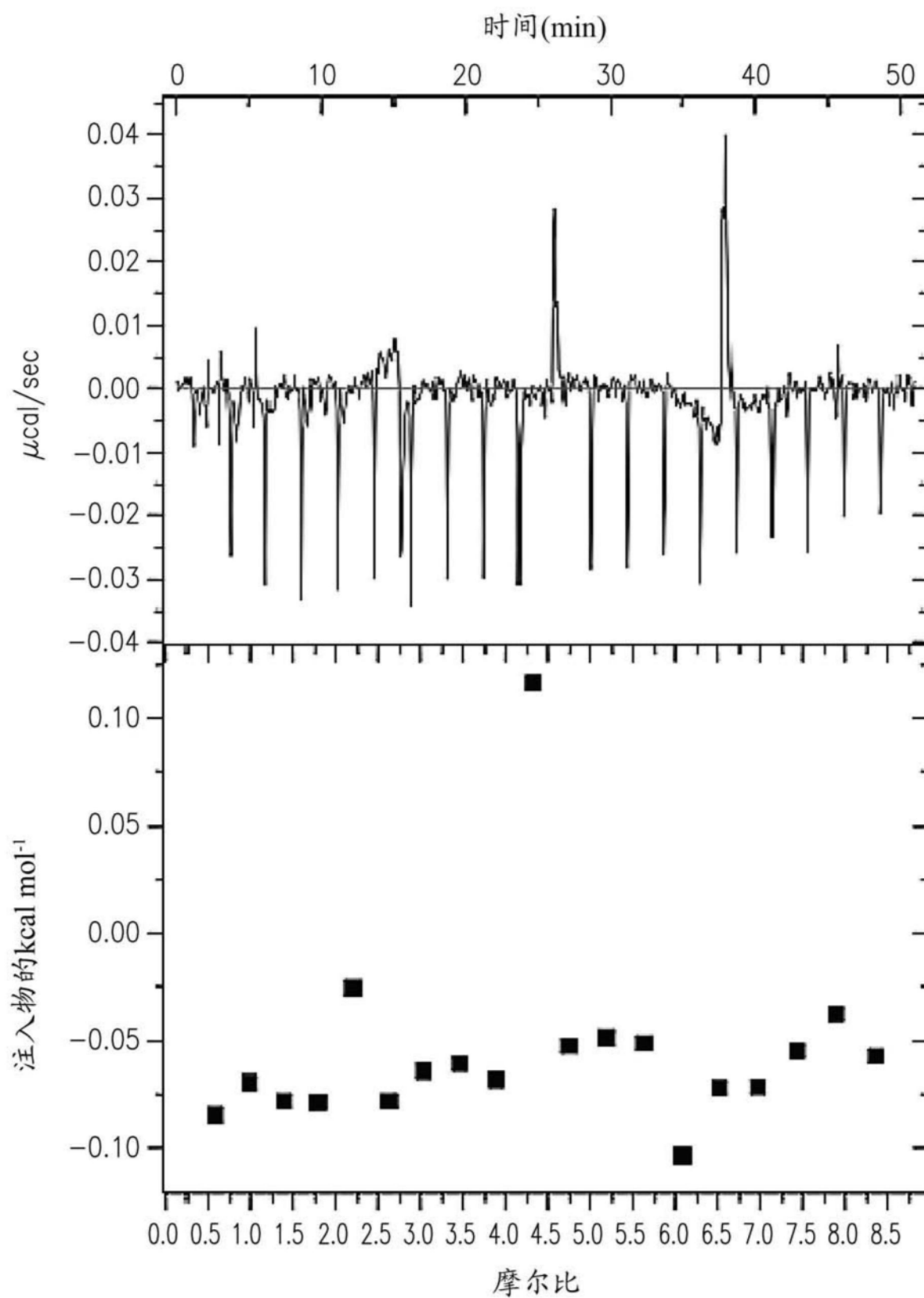


图11B

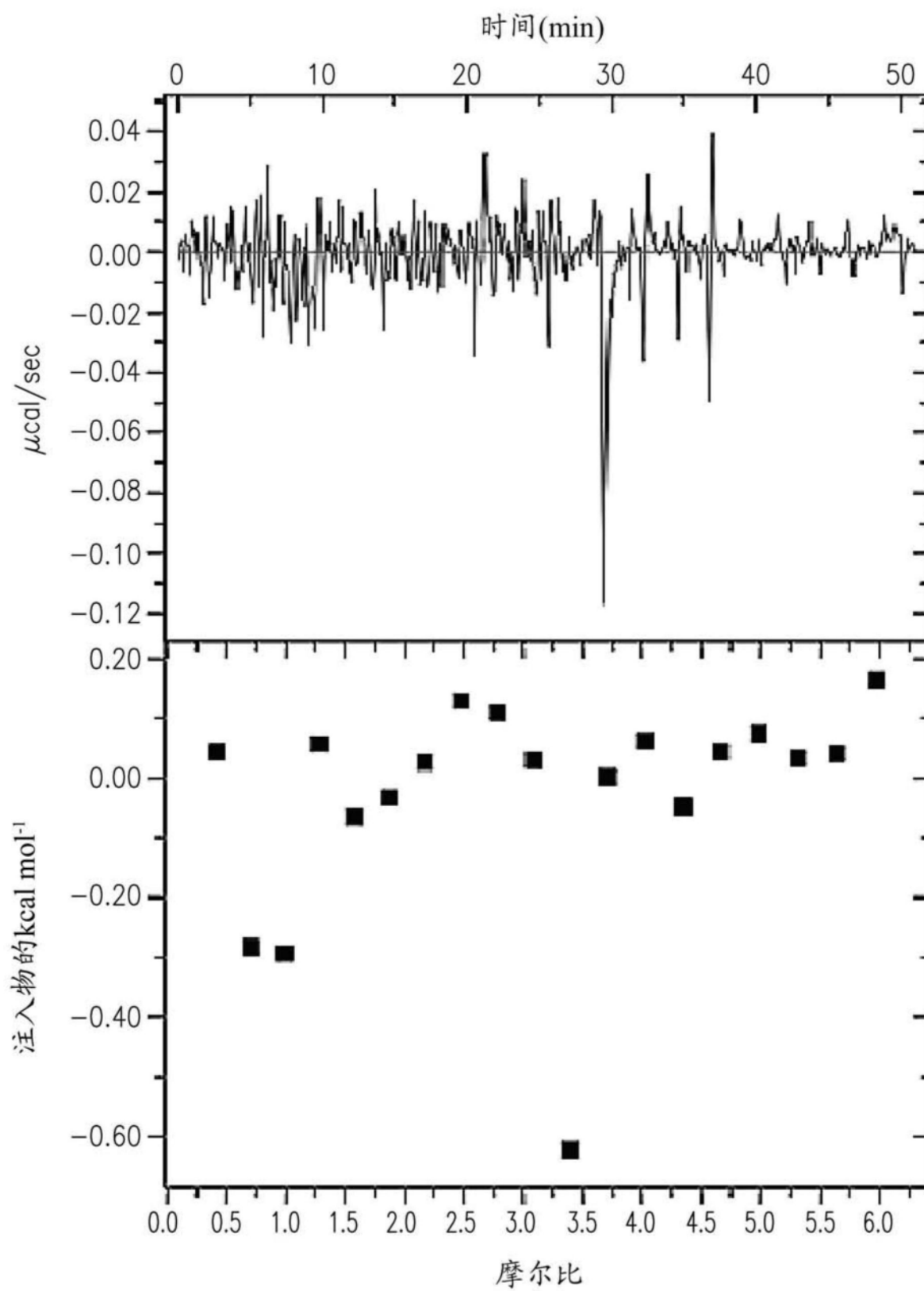


图11C

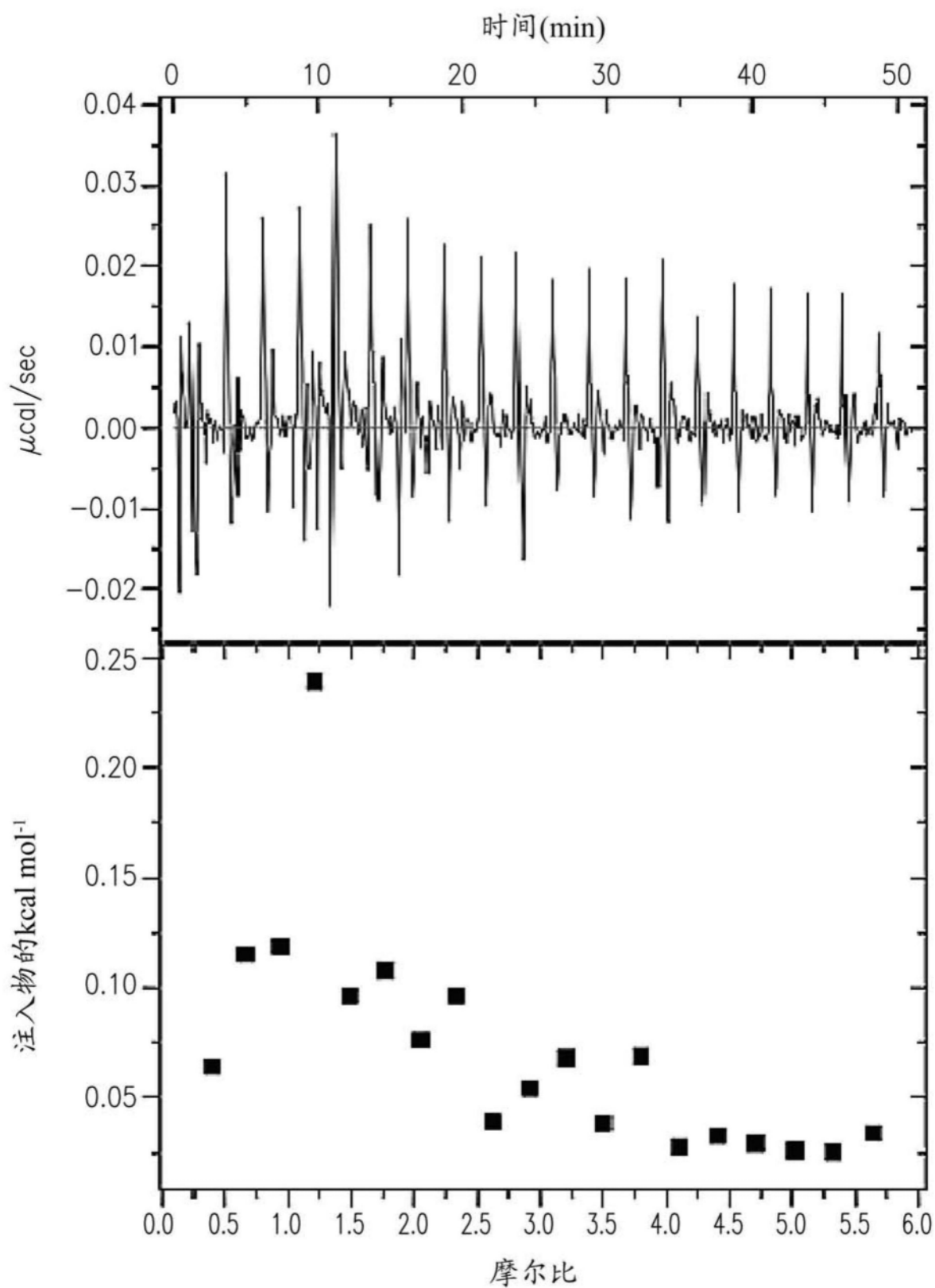


图11D

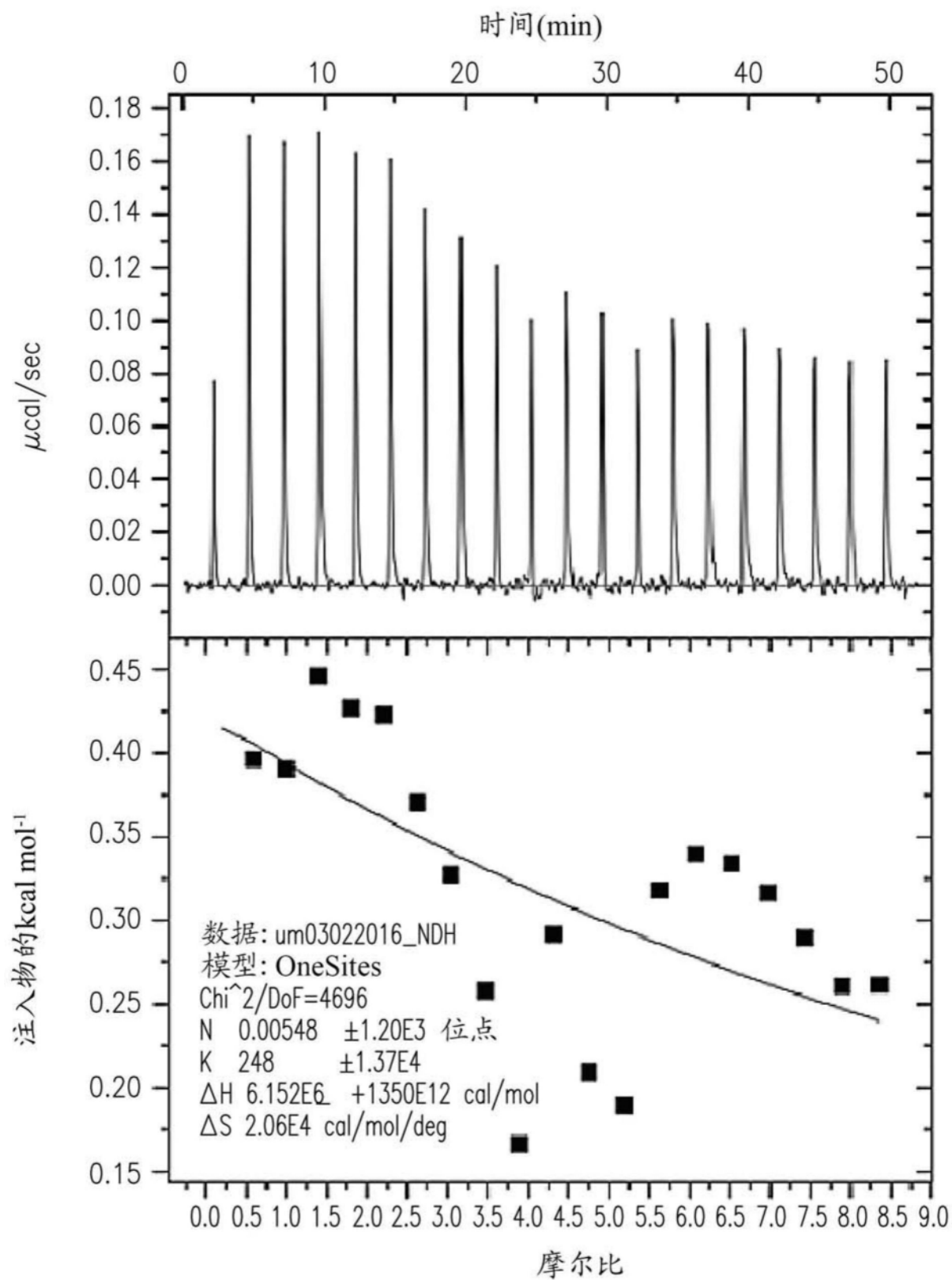


图11E

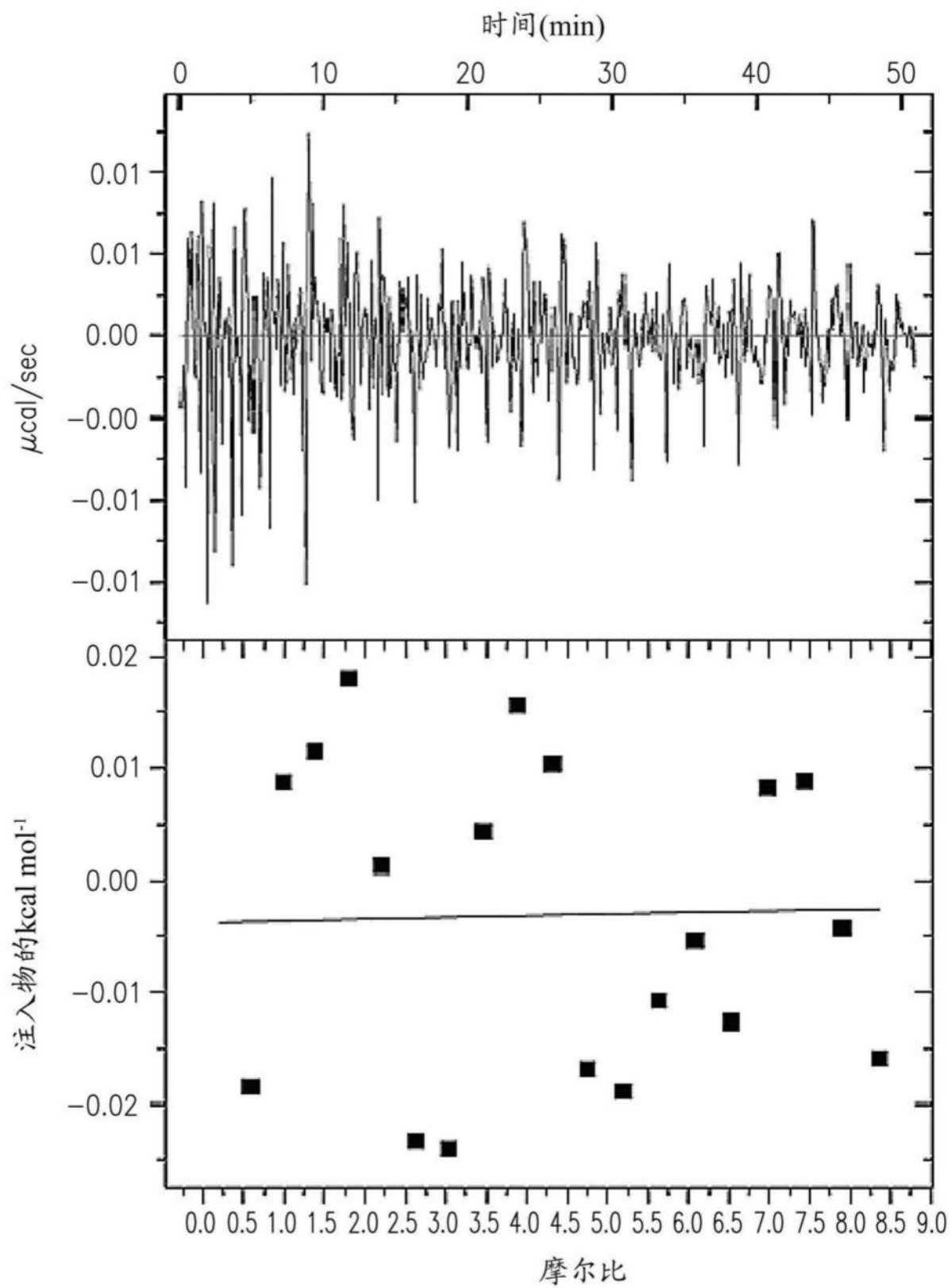


图11F

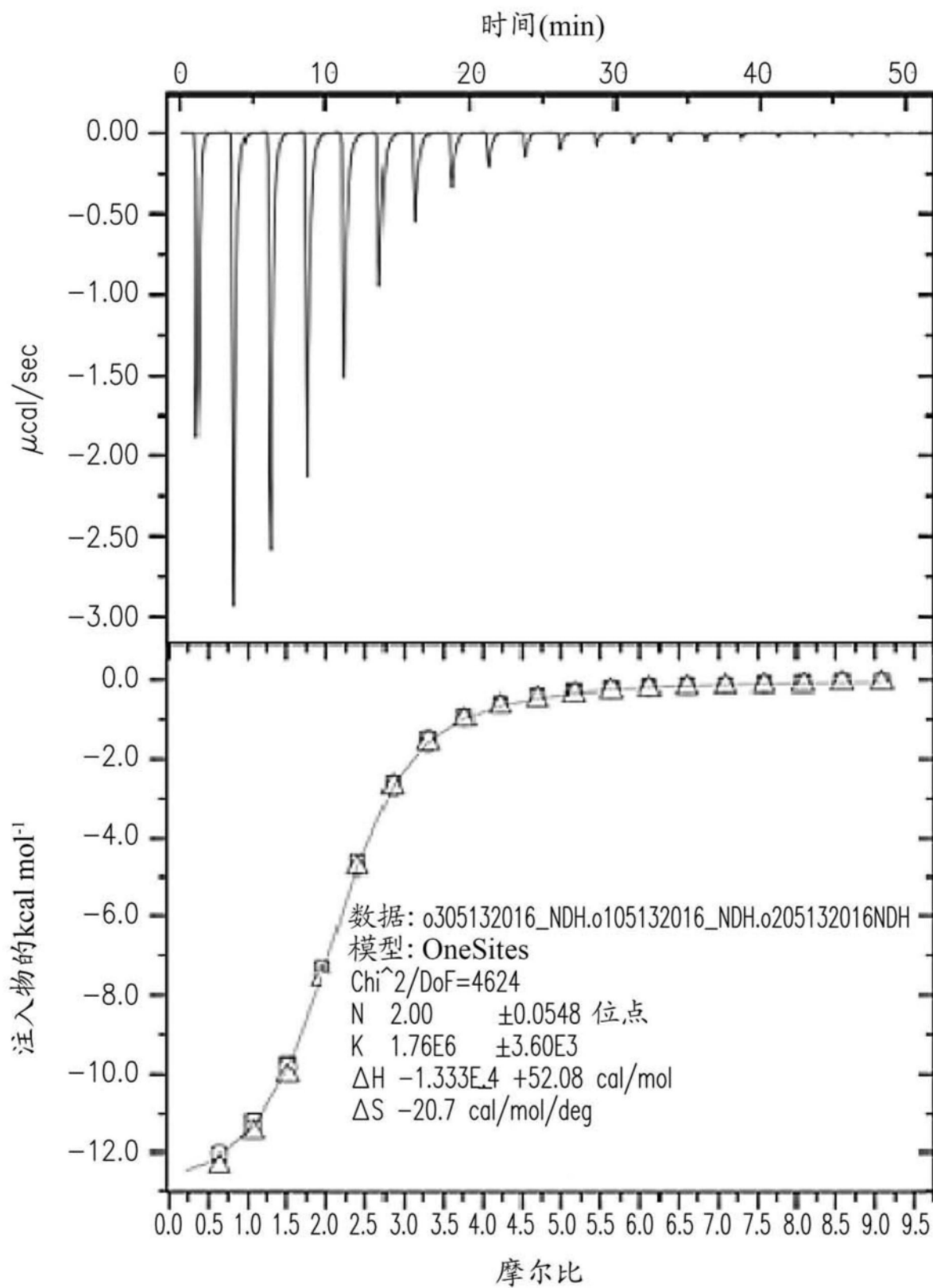


图12A

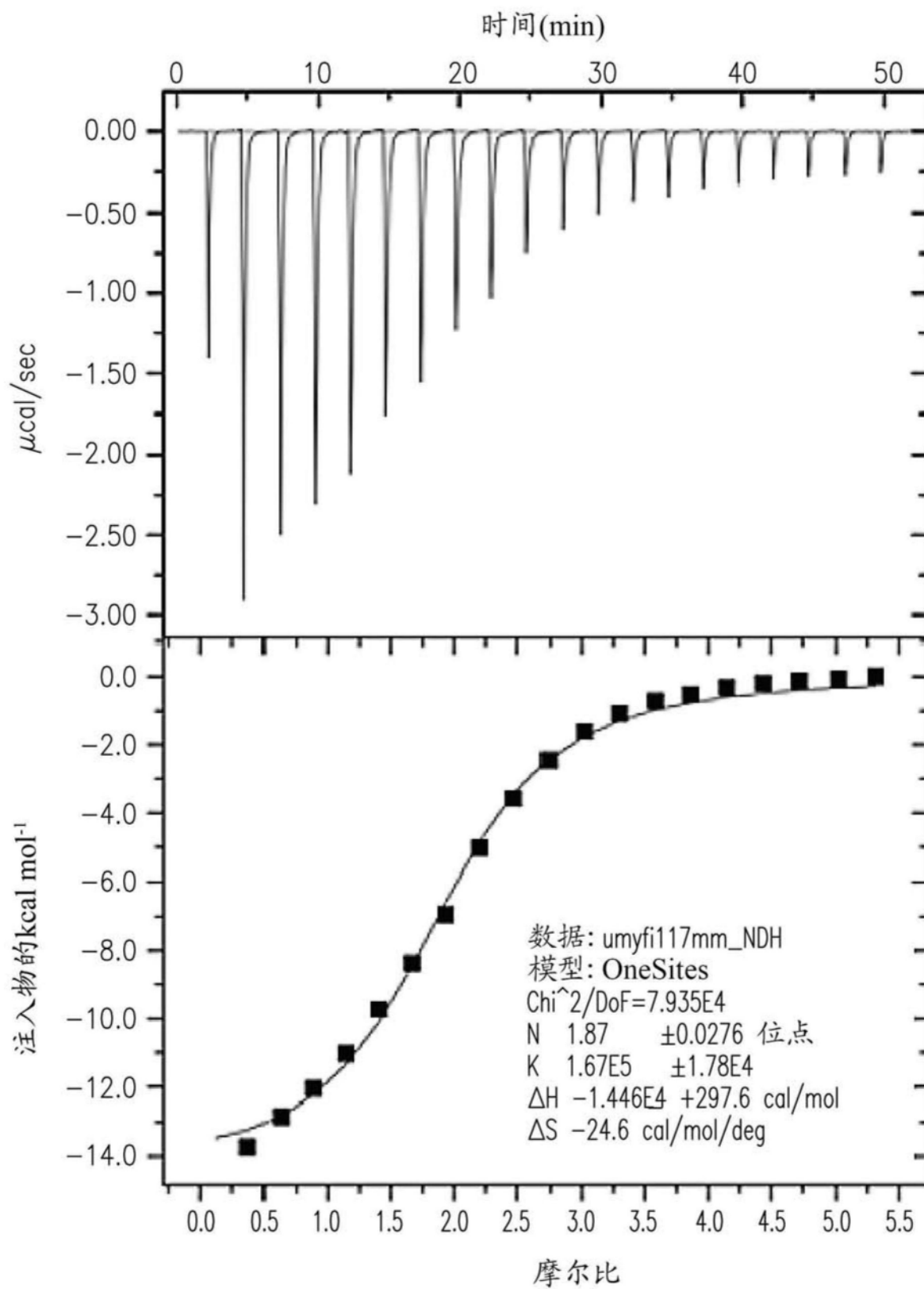


图12B

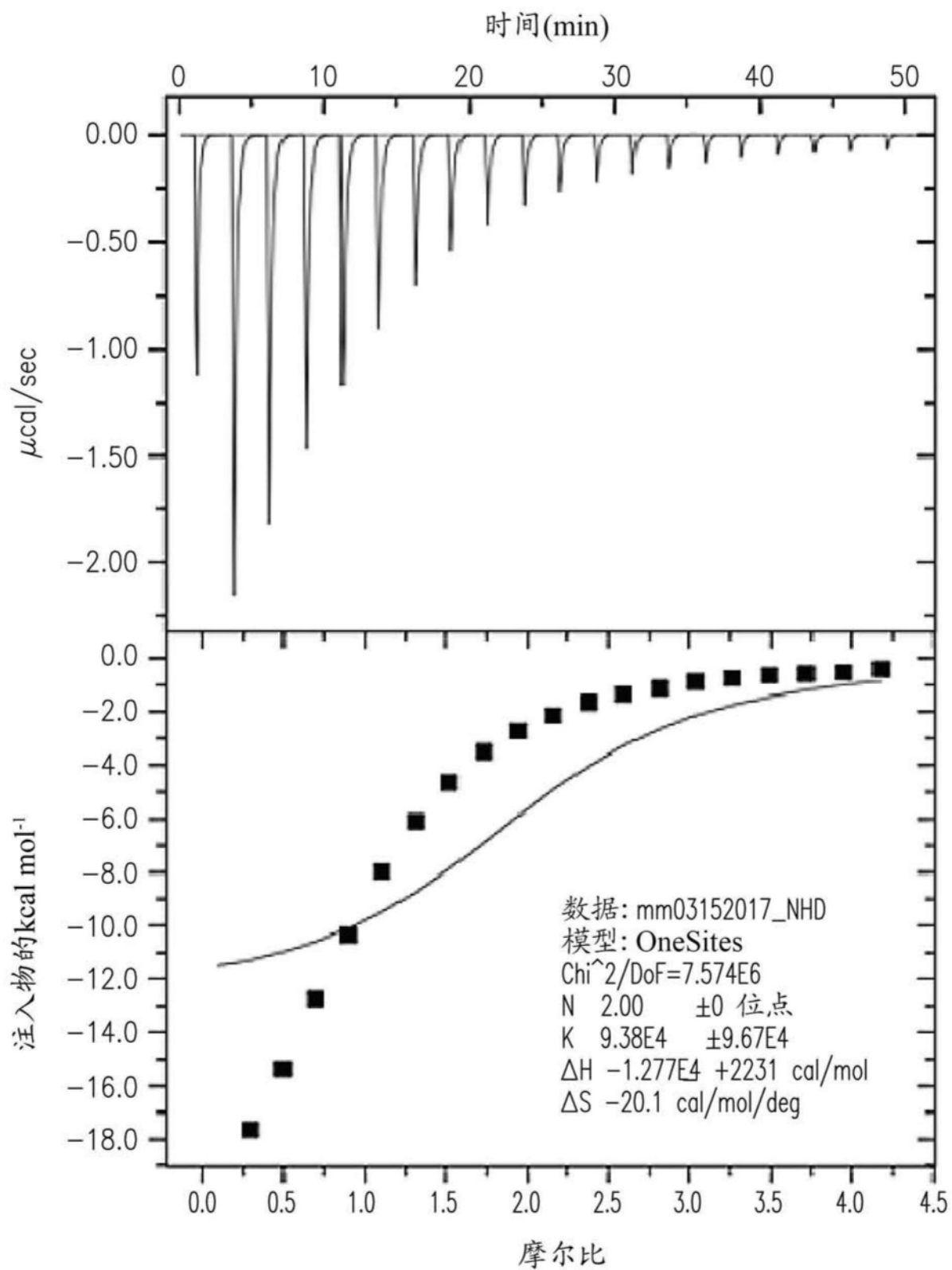


图12C

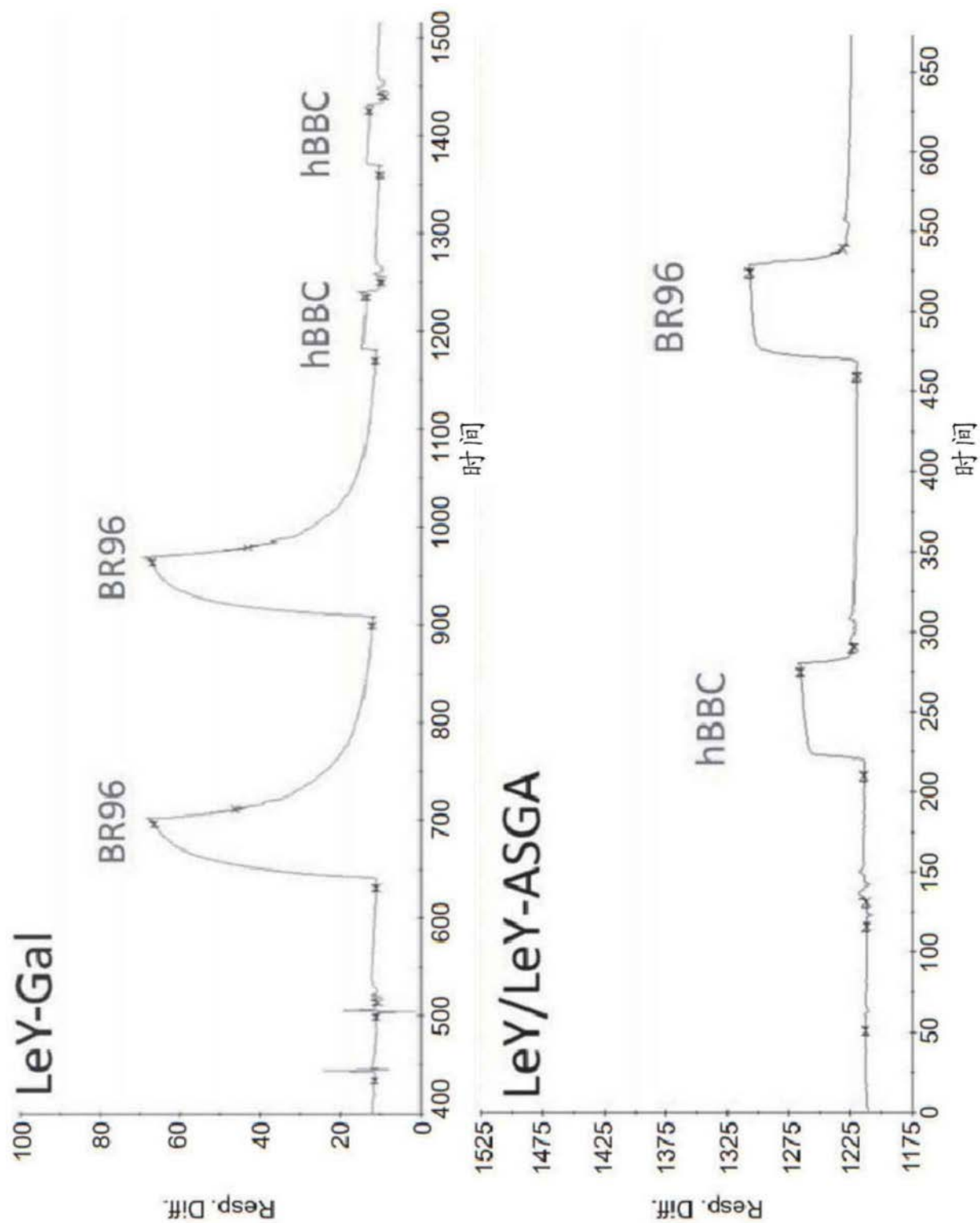


图13A

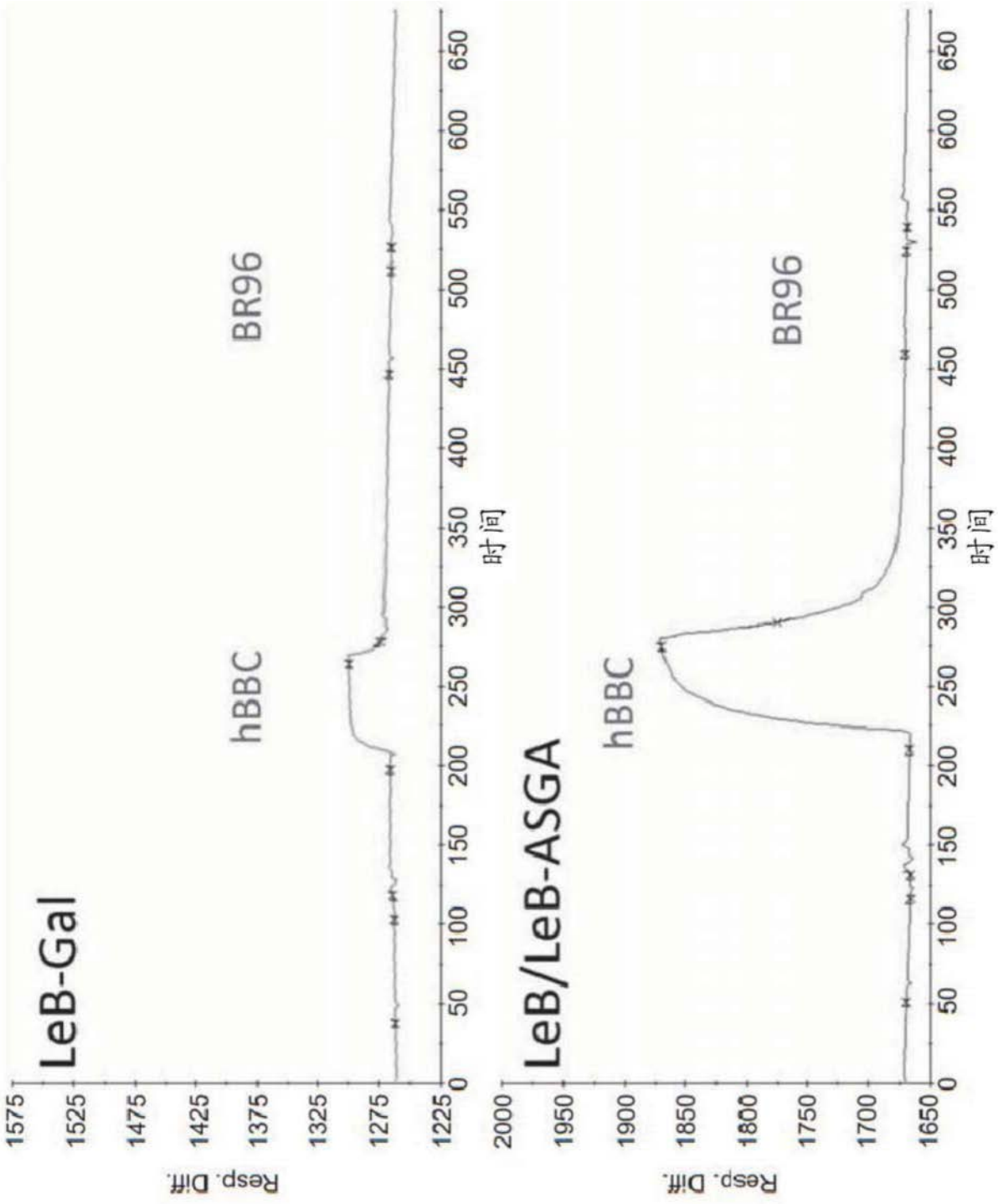


图13B

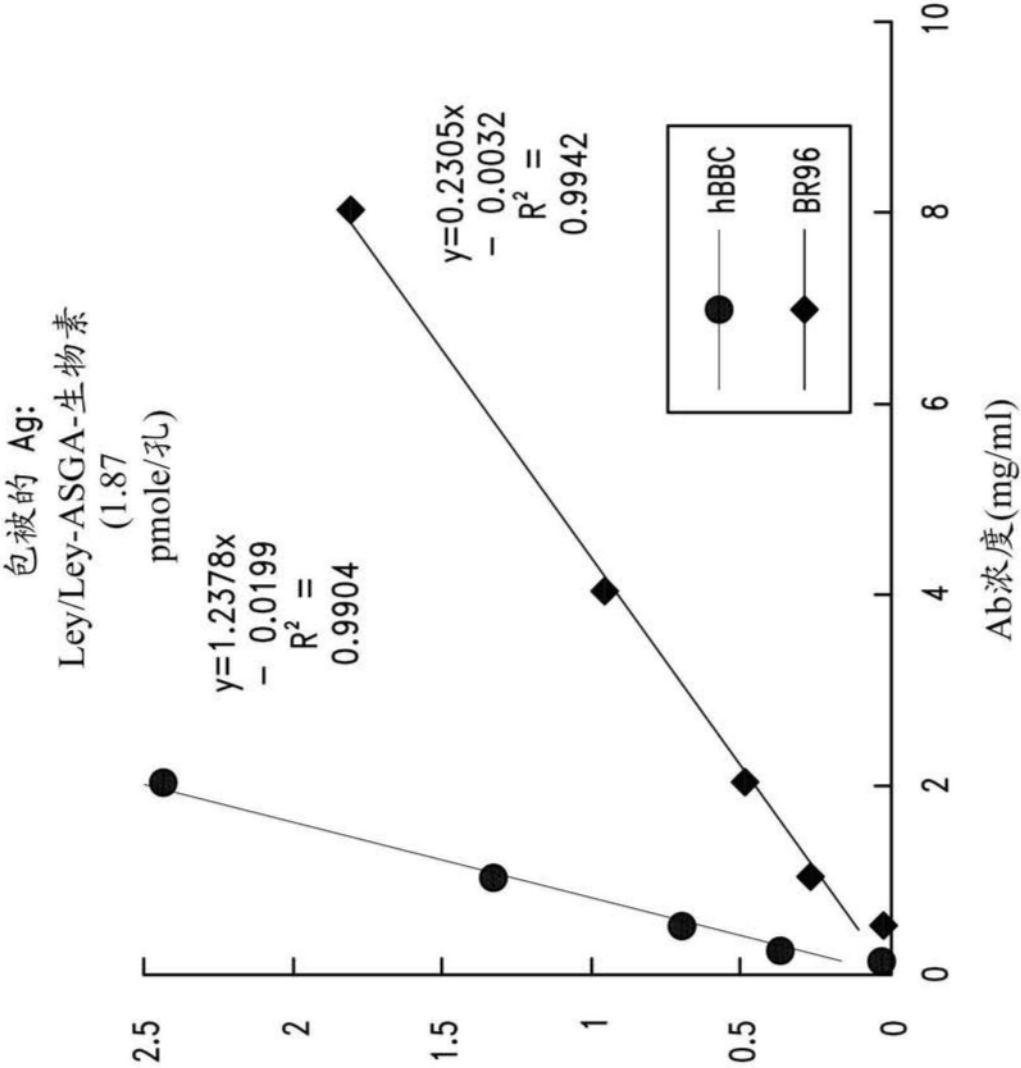


图14A

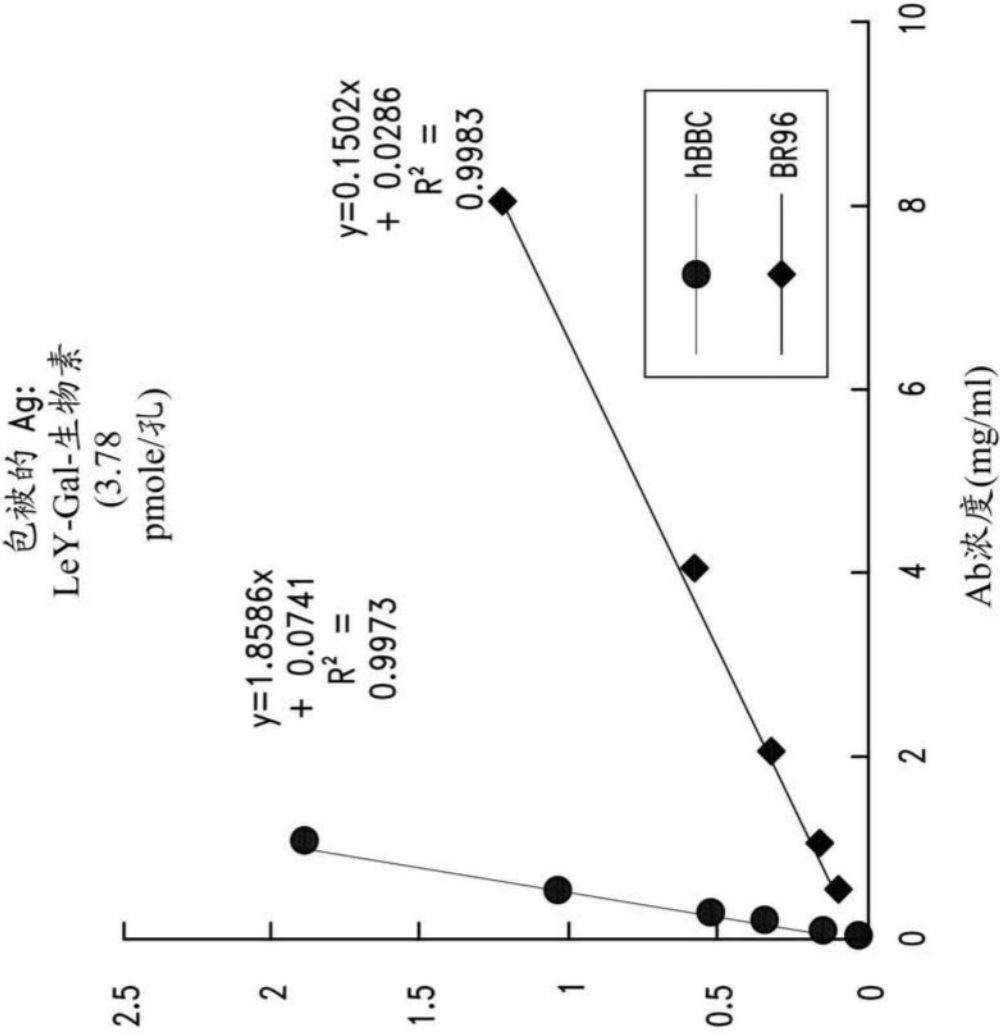


图14B

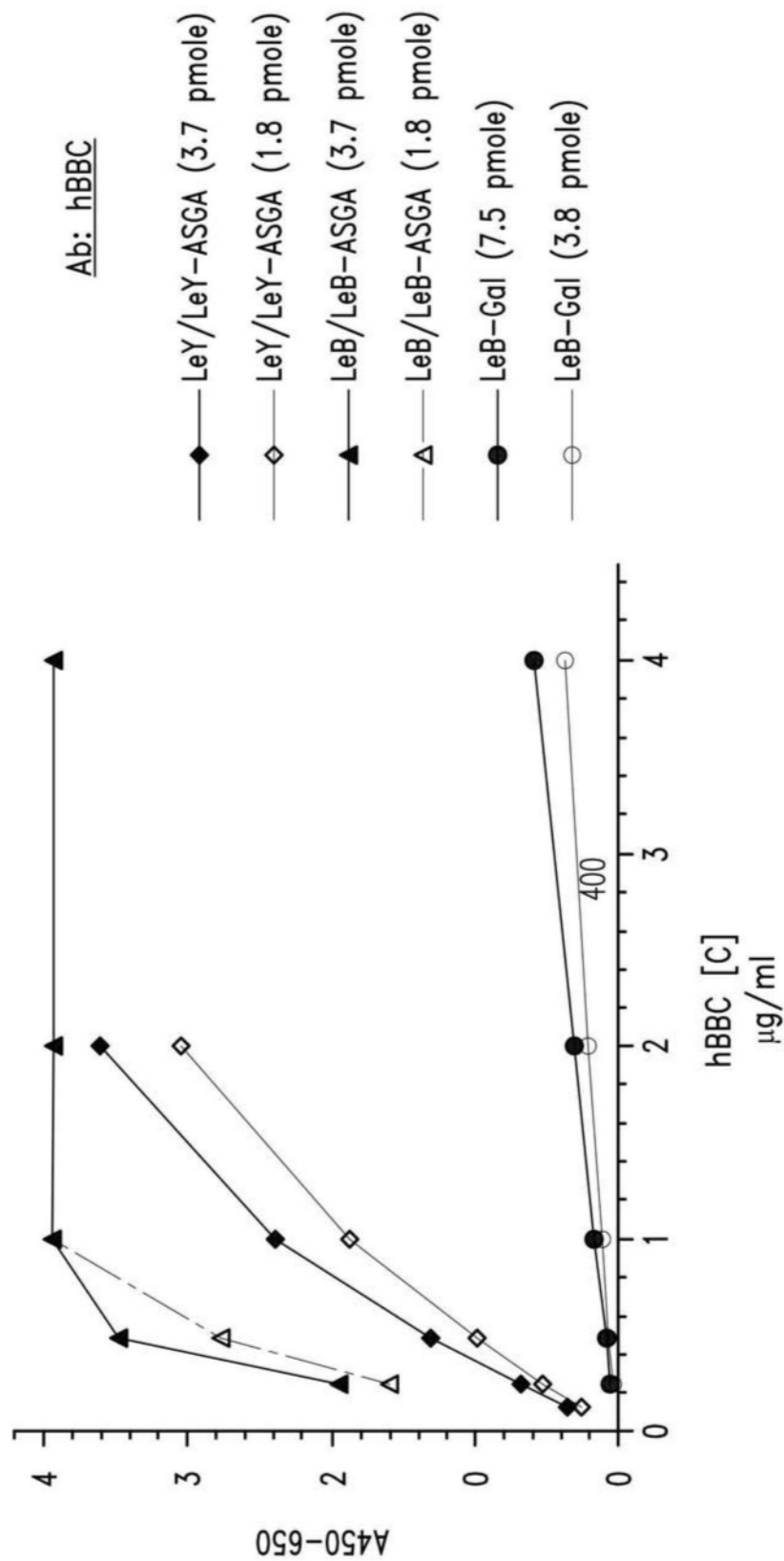


图15

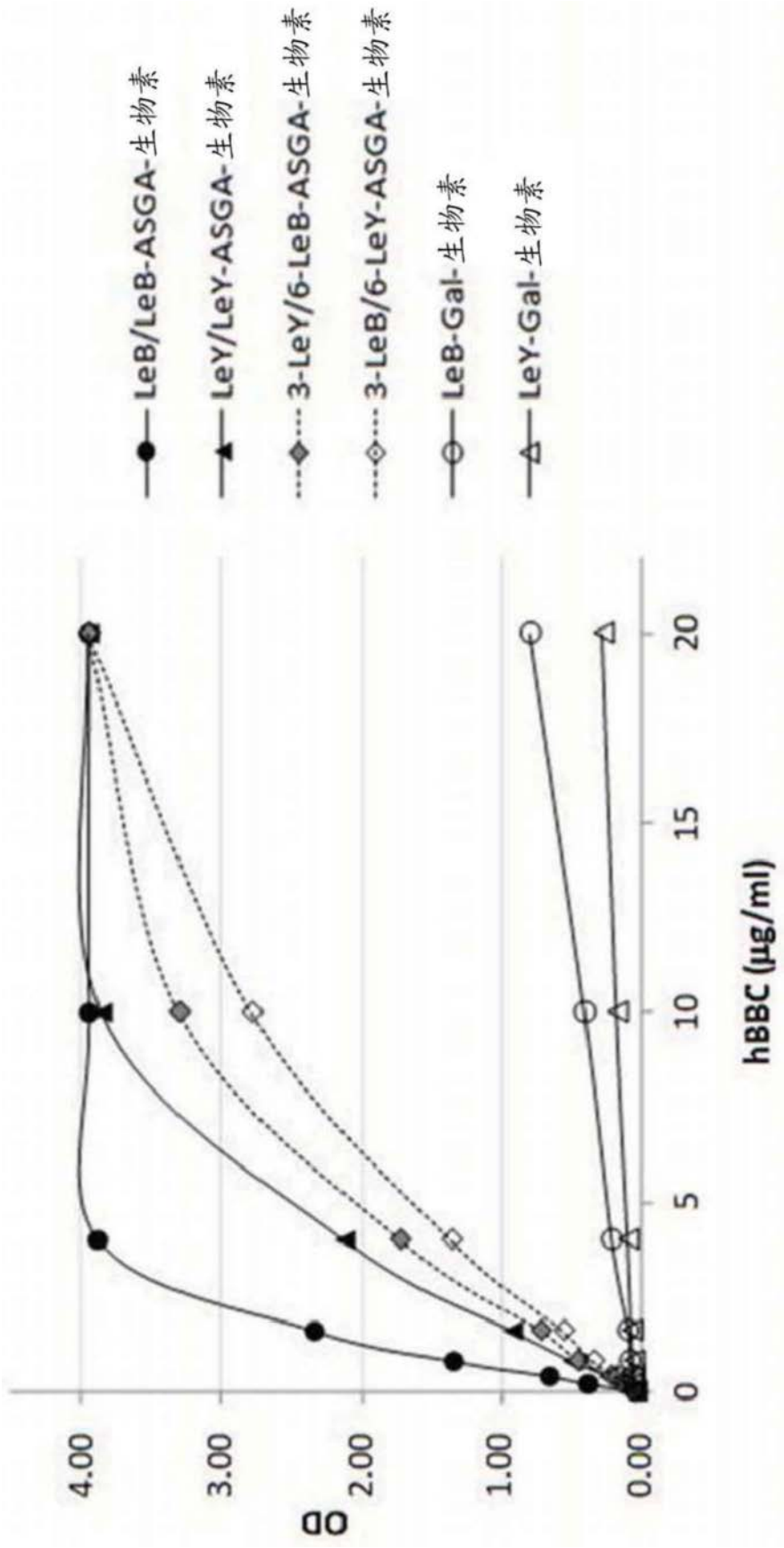


图16A

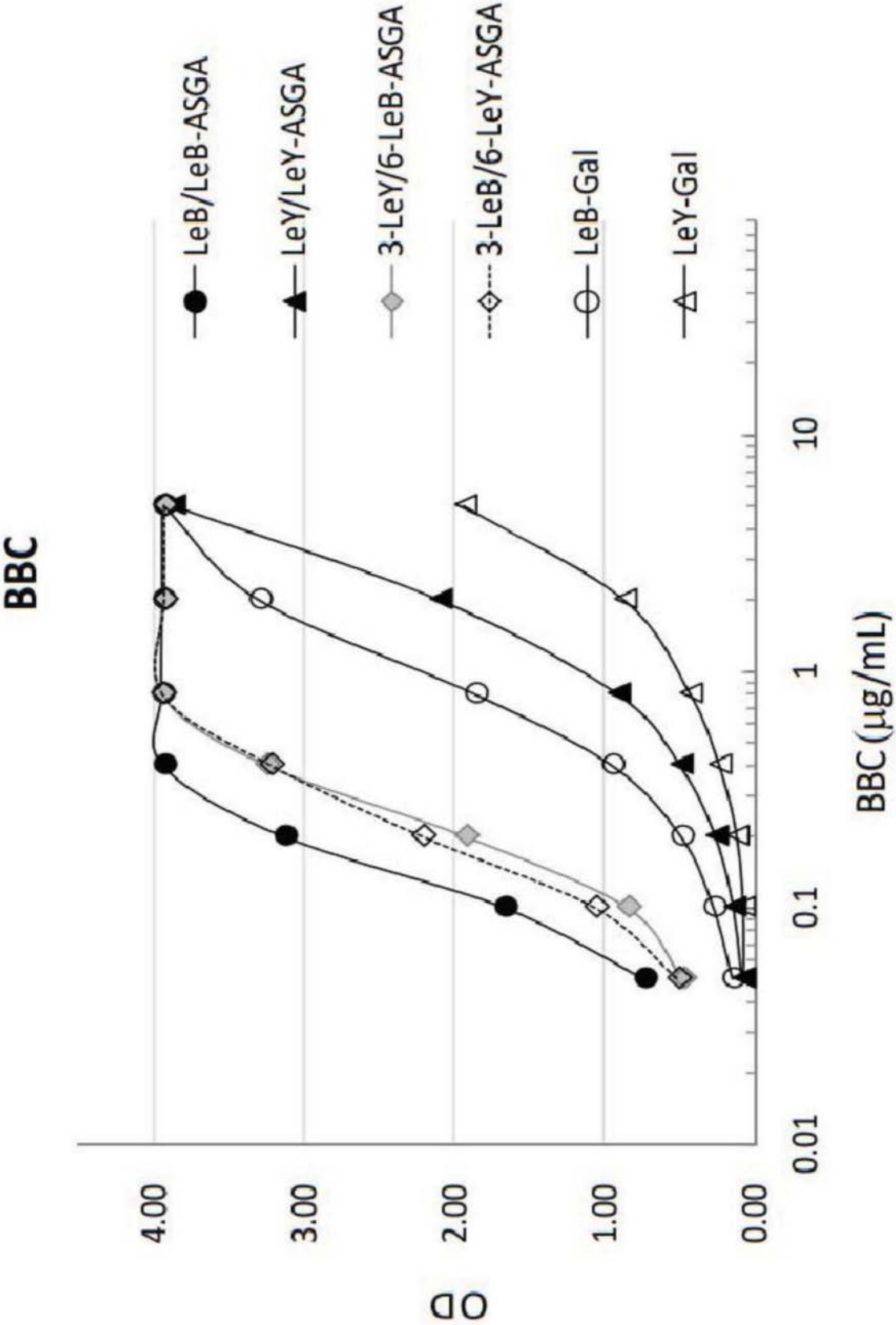


图16B

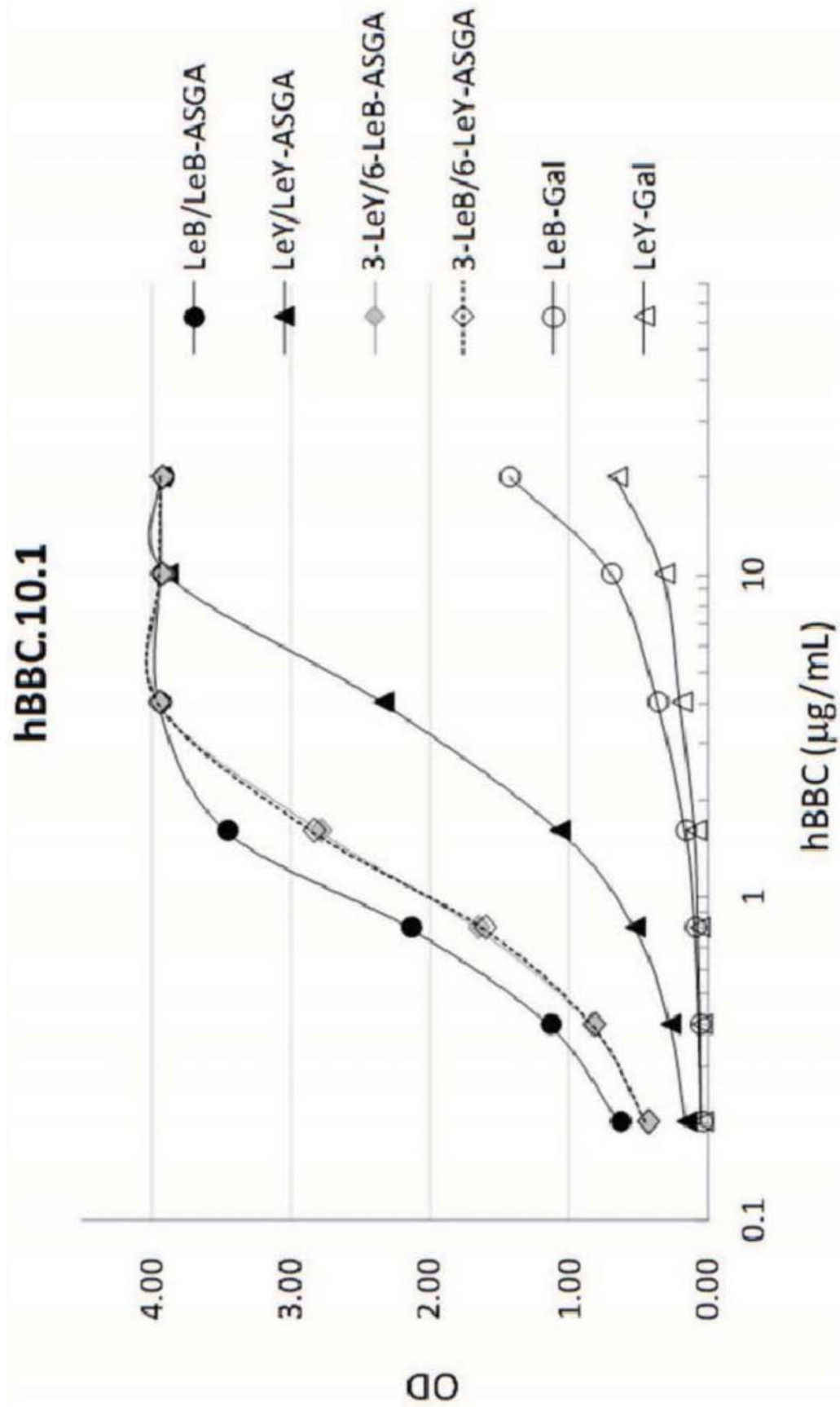


图16C

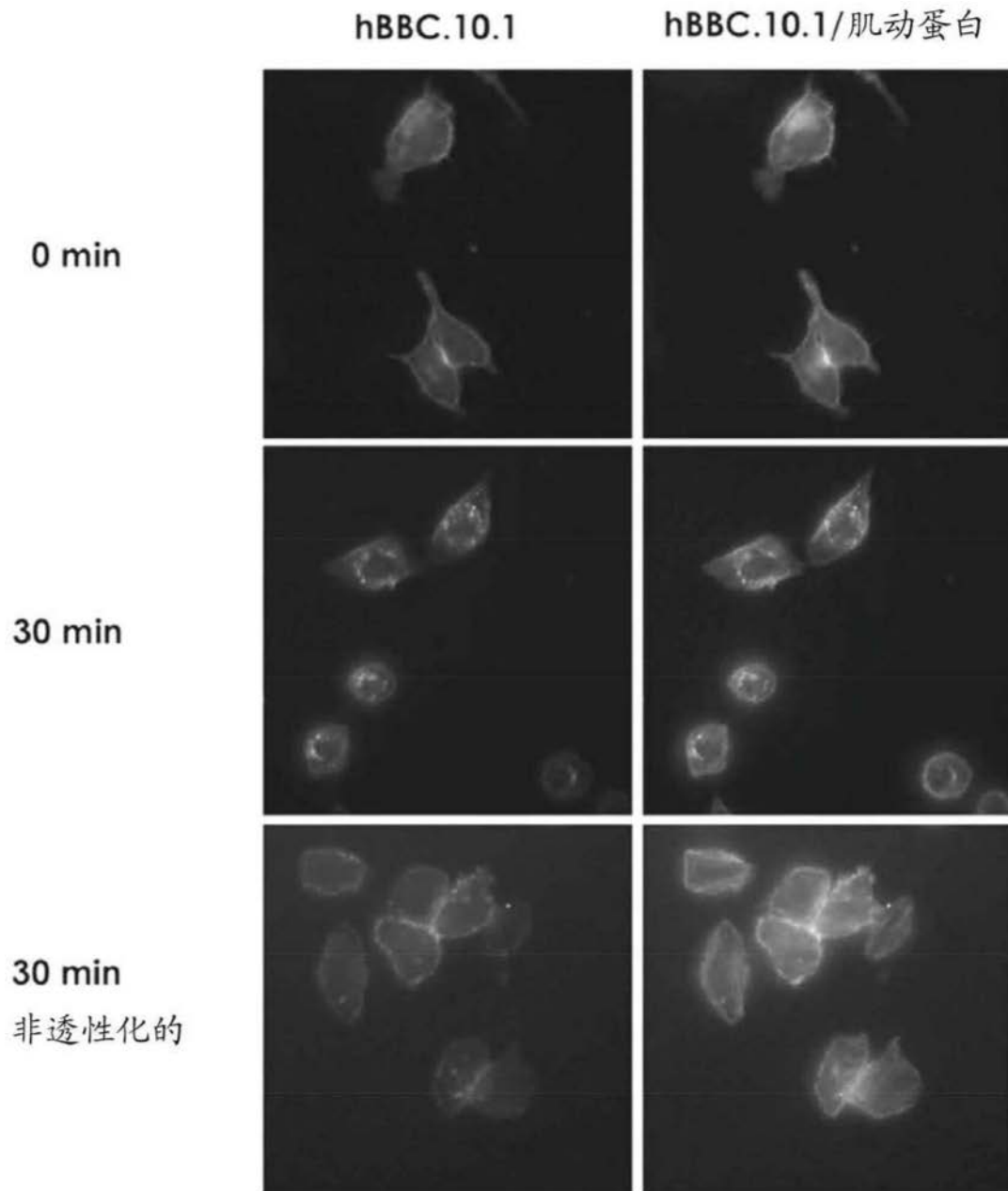


图17

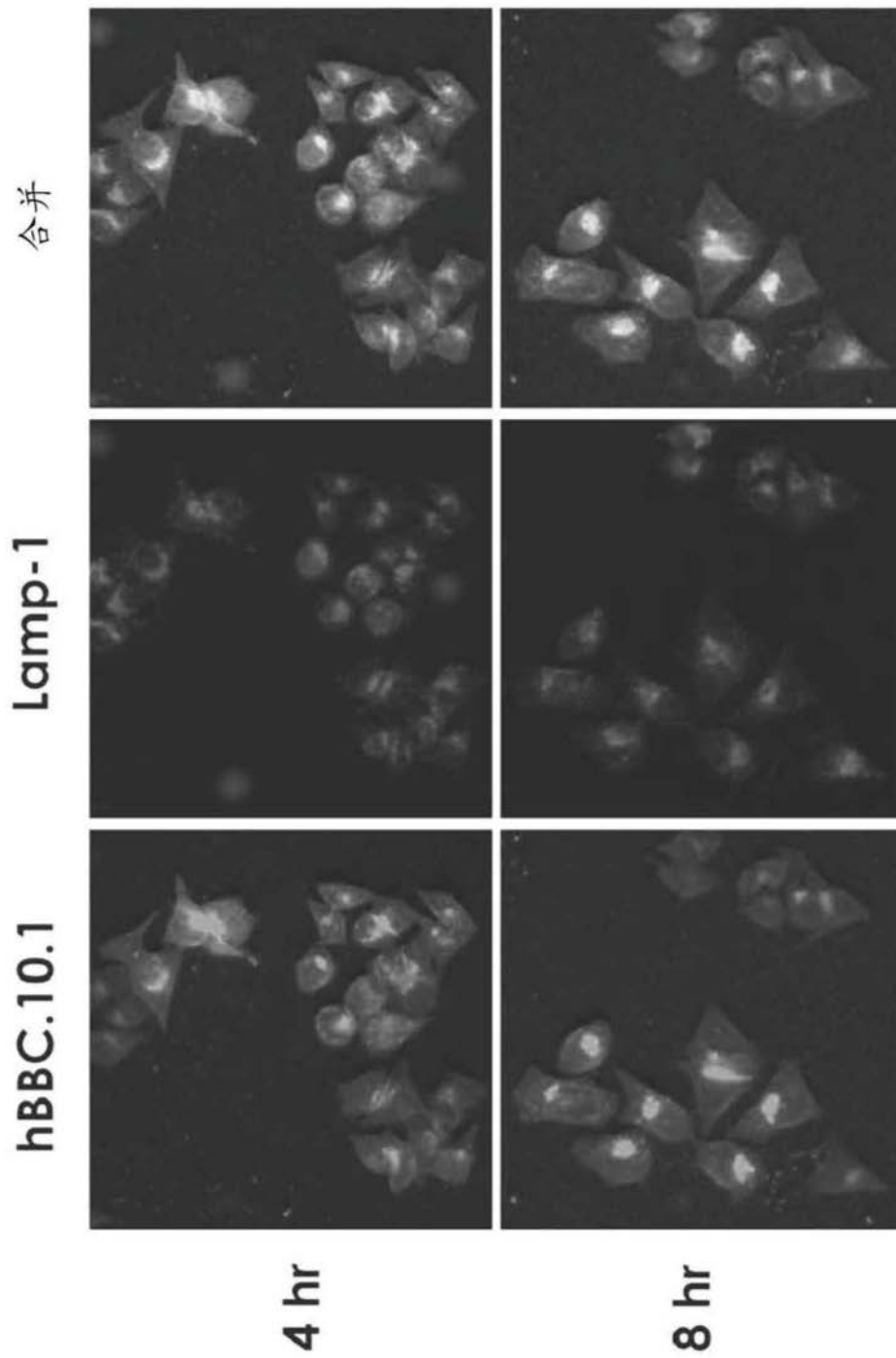


图18

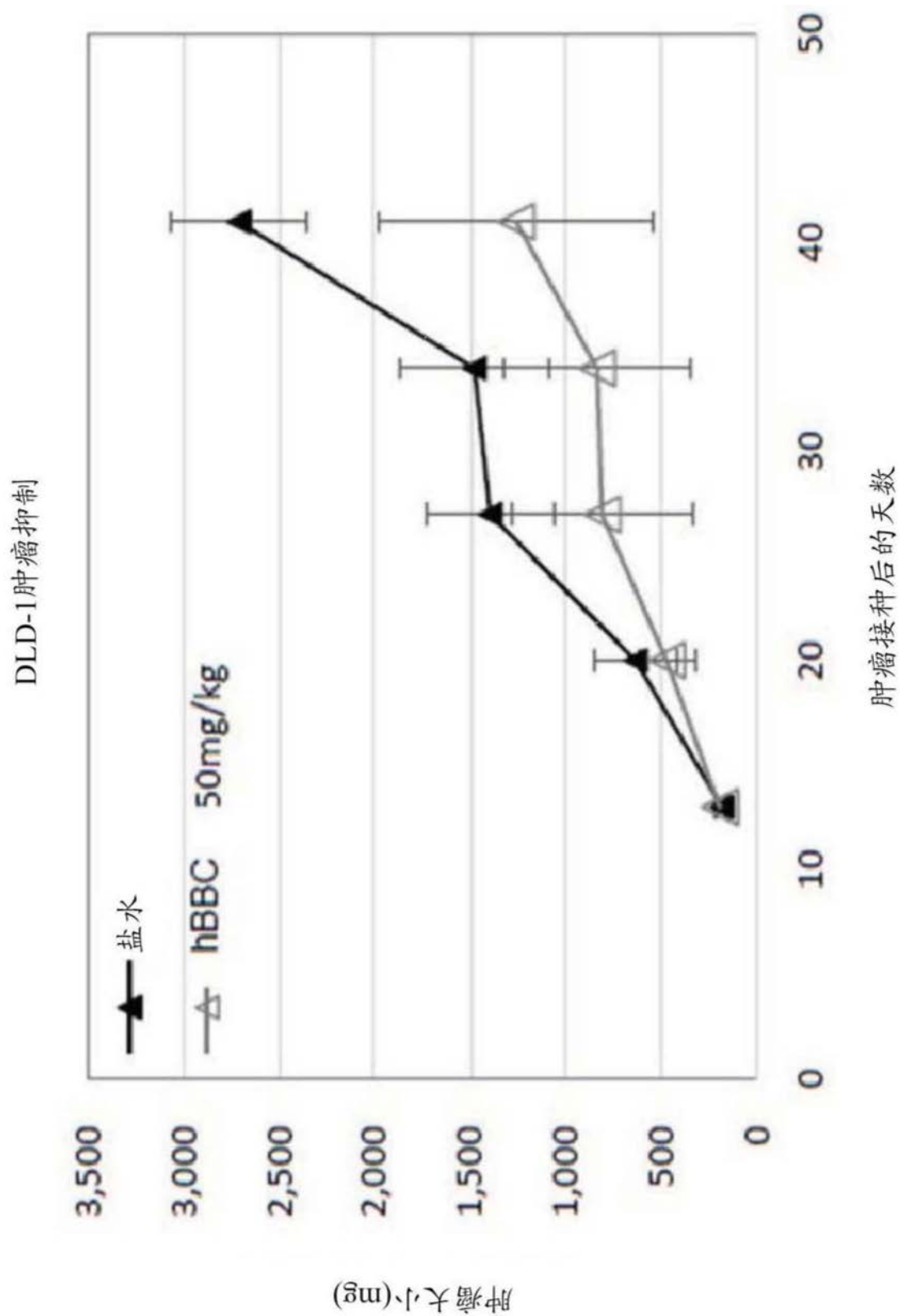


图19A

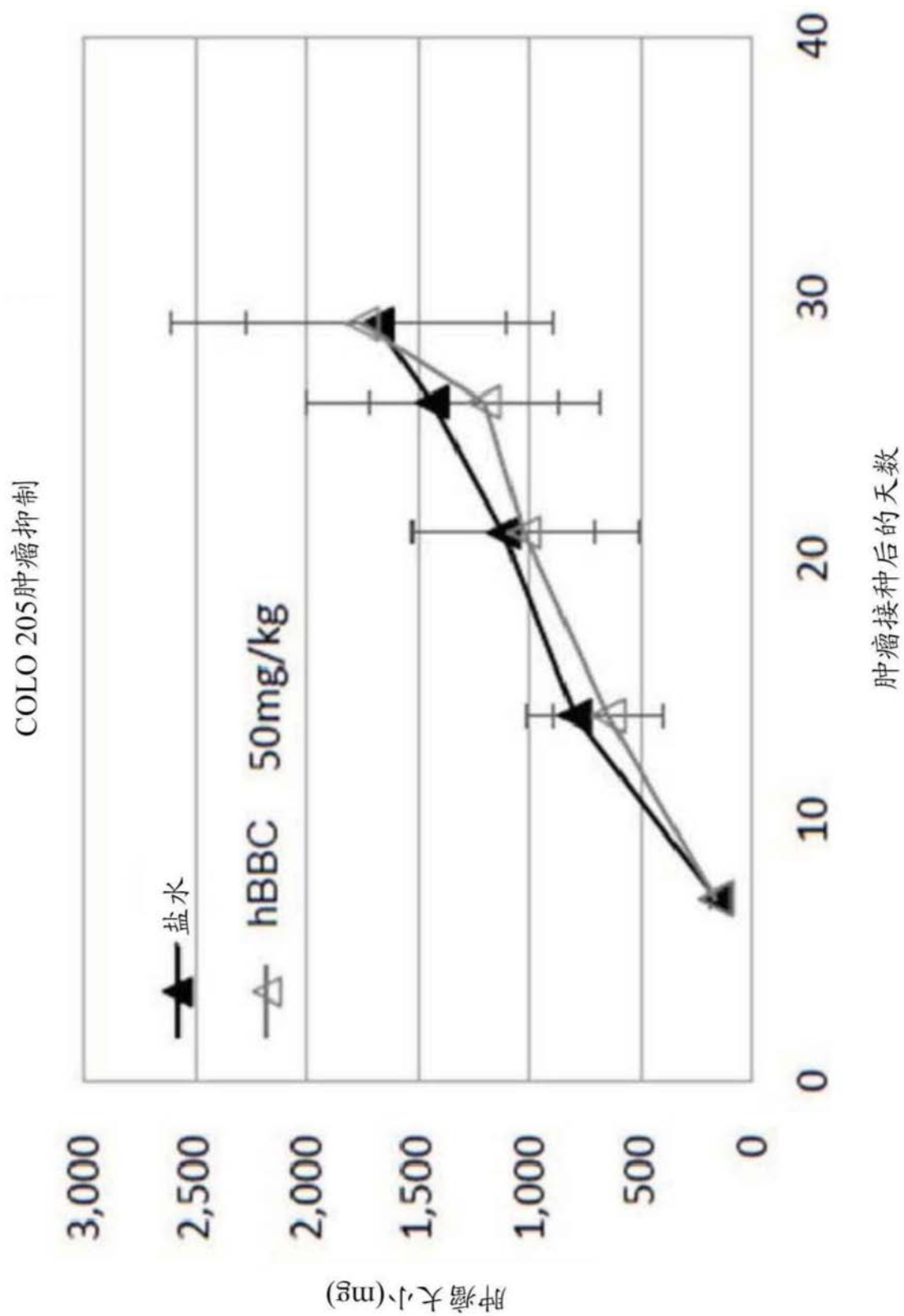


图19B

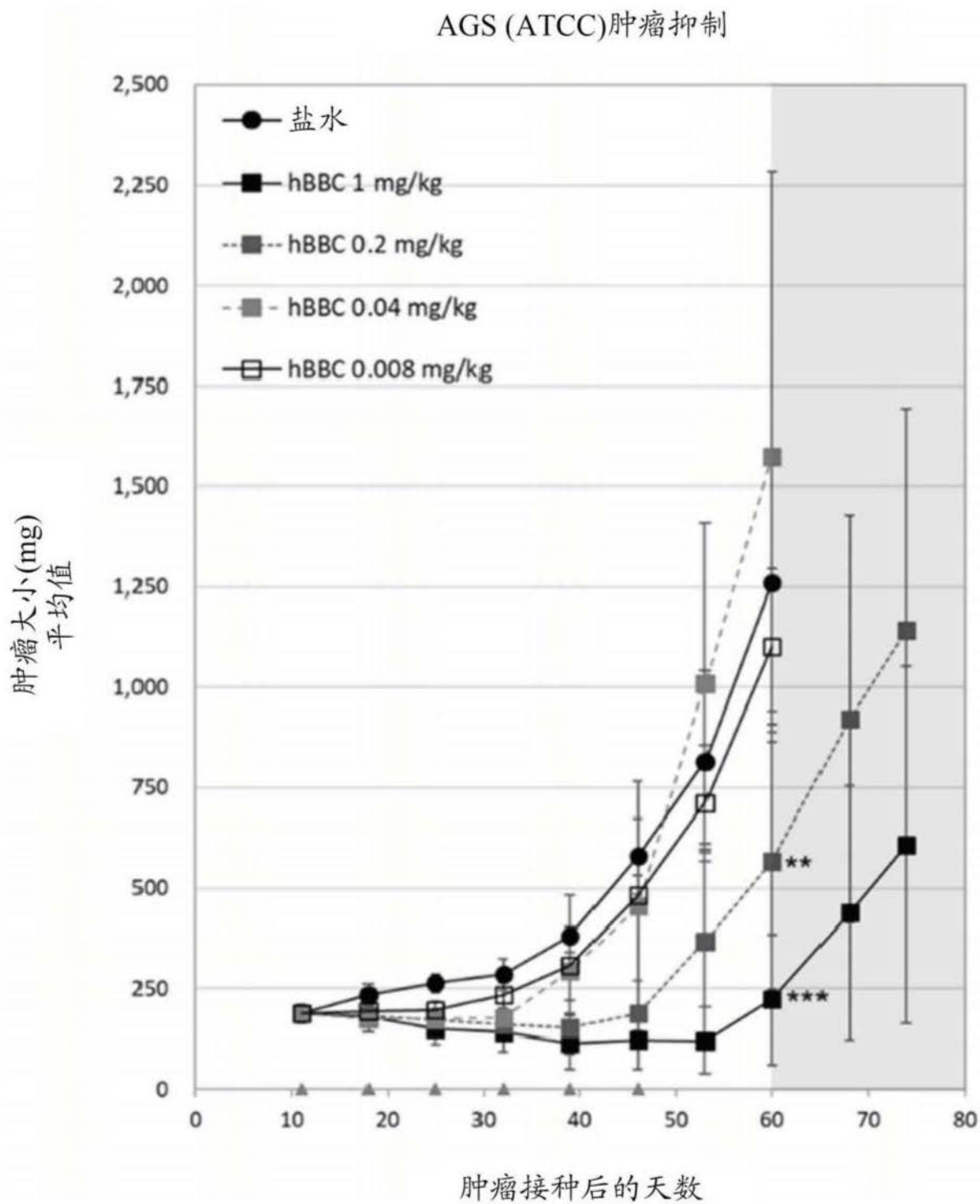


图20A

AGS (ATCC)肿瘤抑制

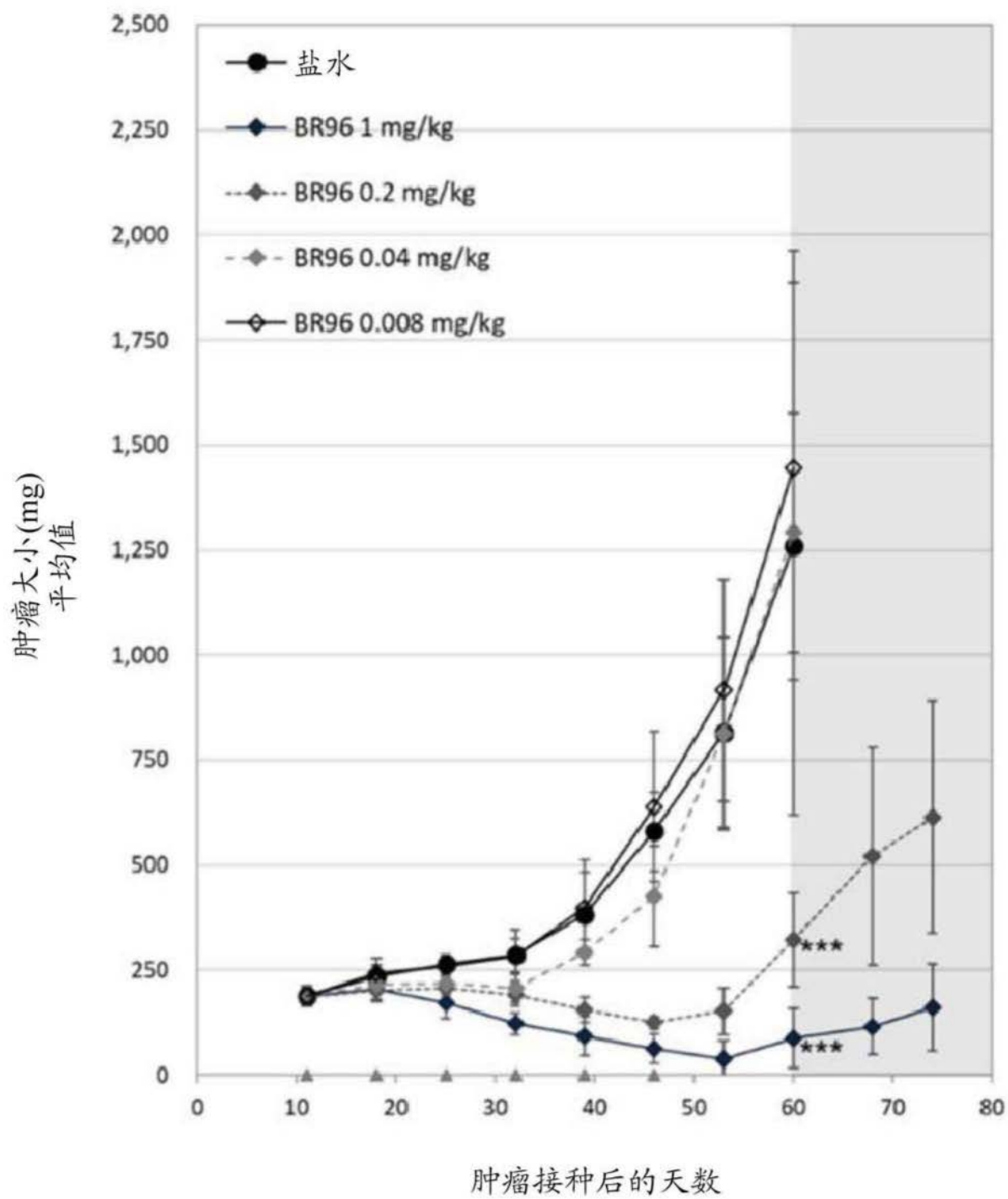


图20B

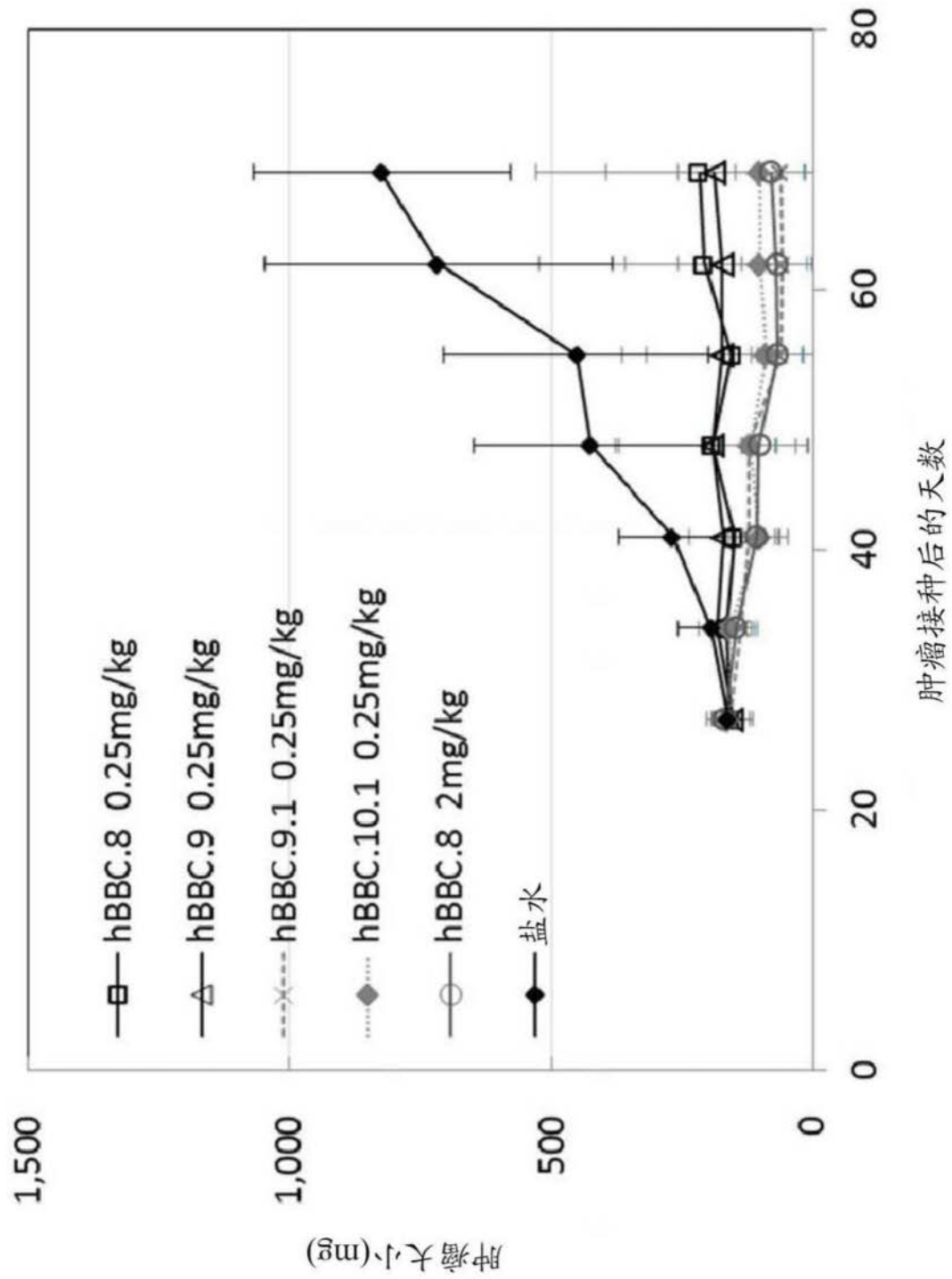


图20C

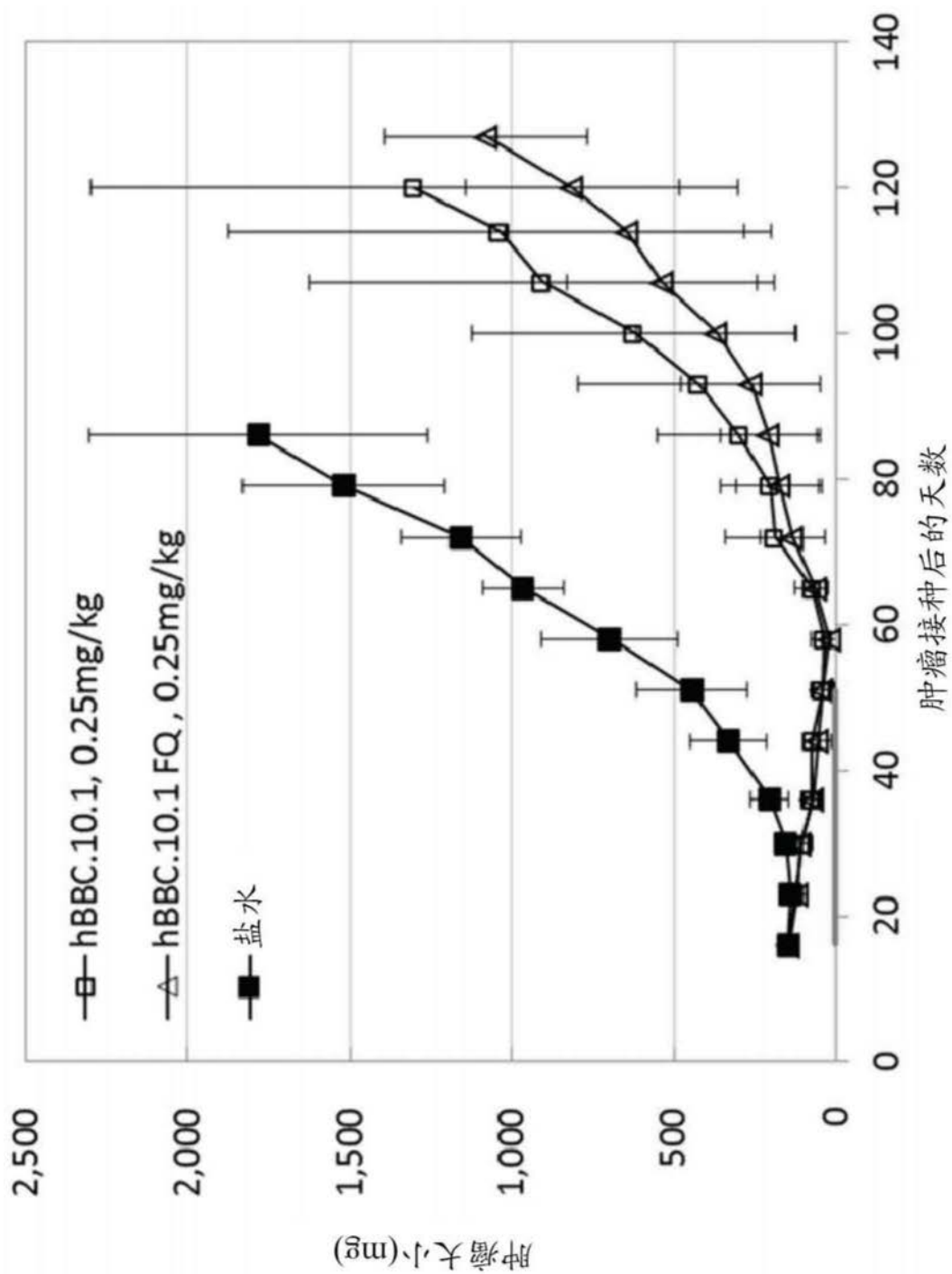


图20D

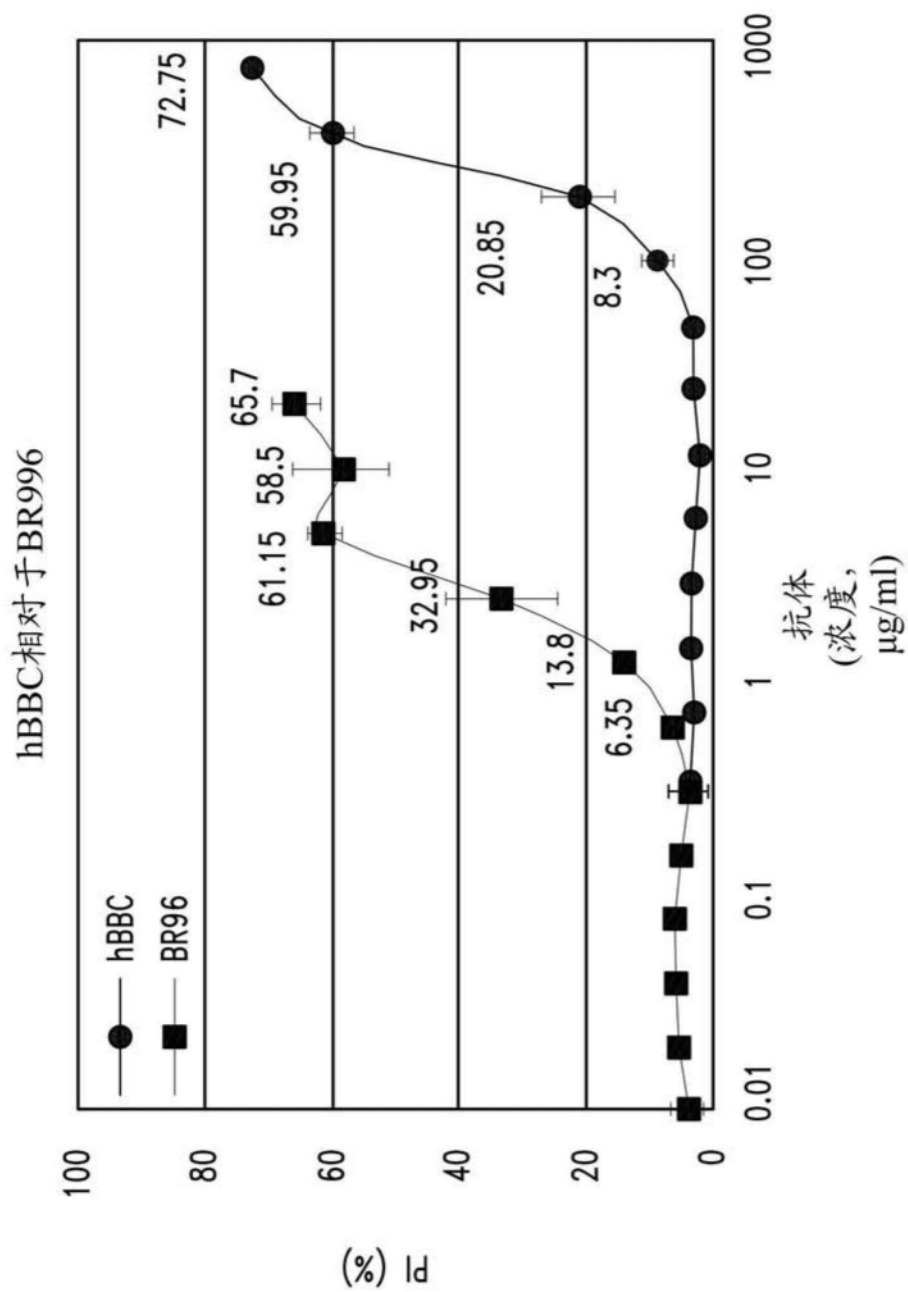


图21

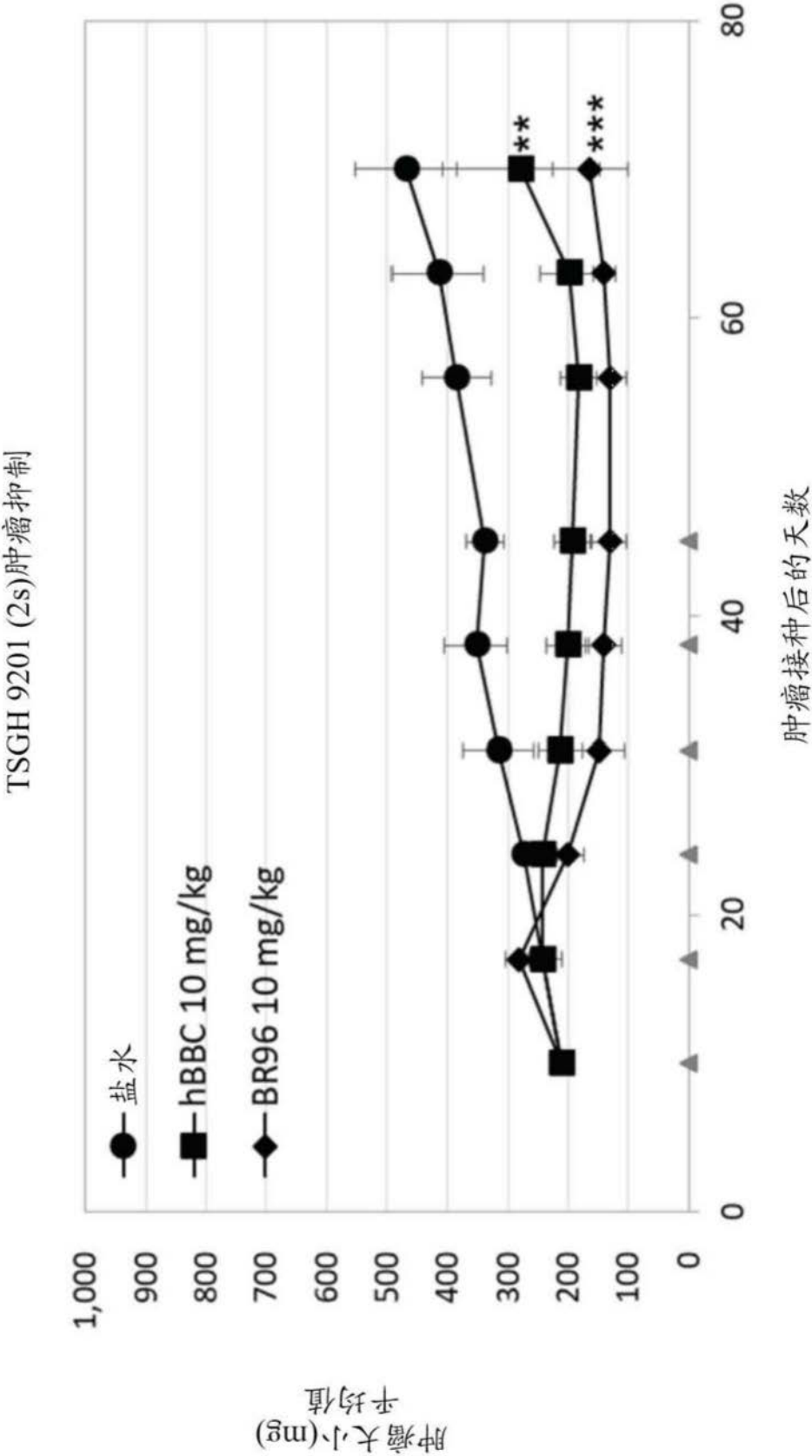


图22

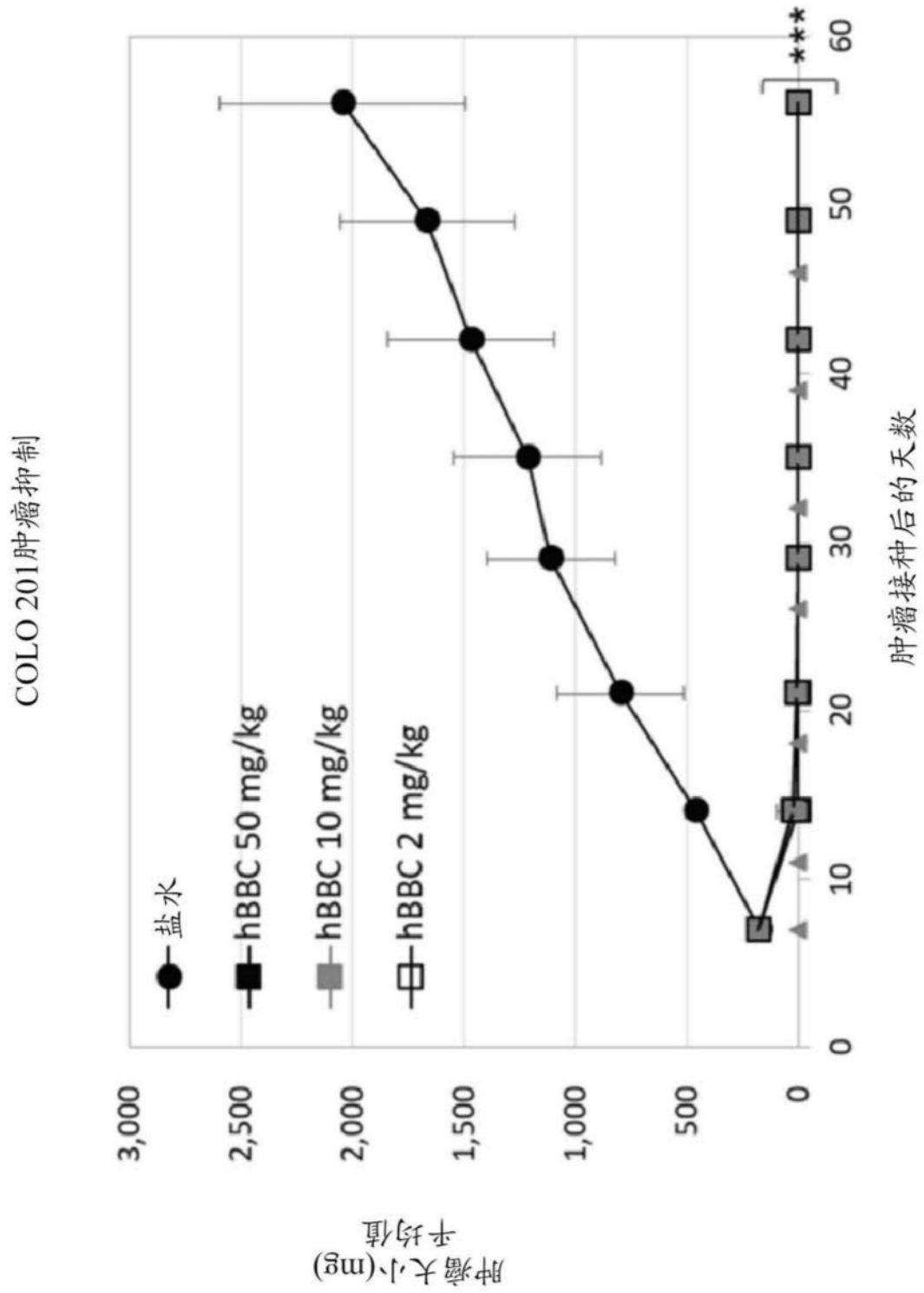


图23

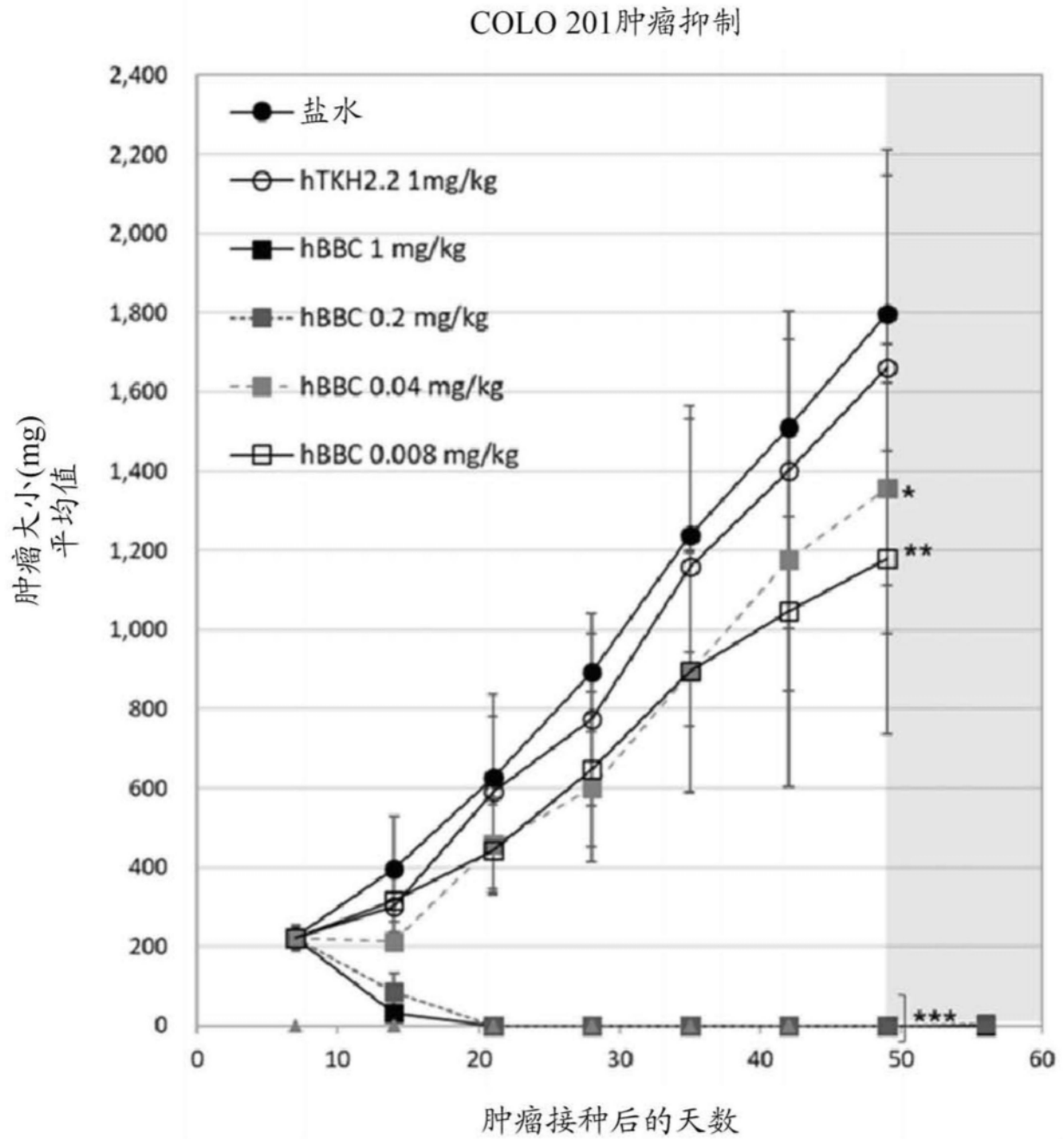


图24A

COLO 201肿瘤抑制

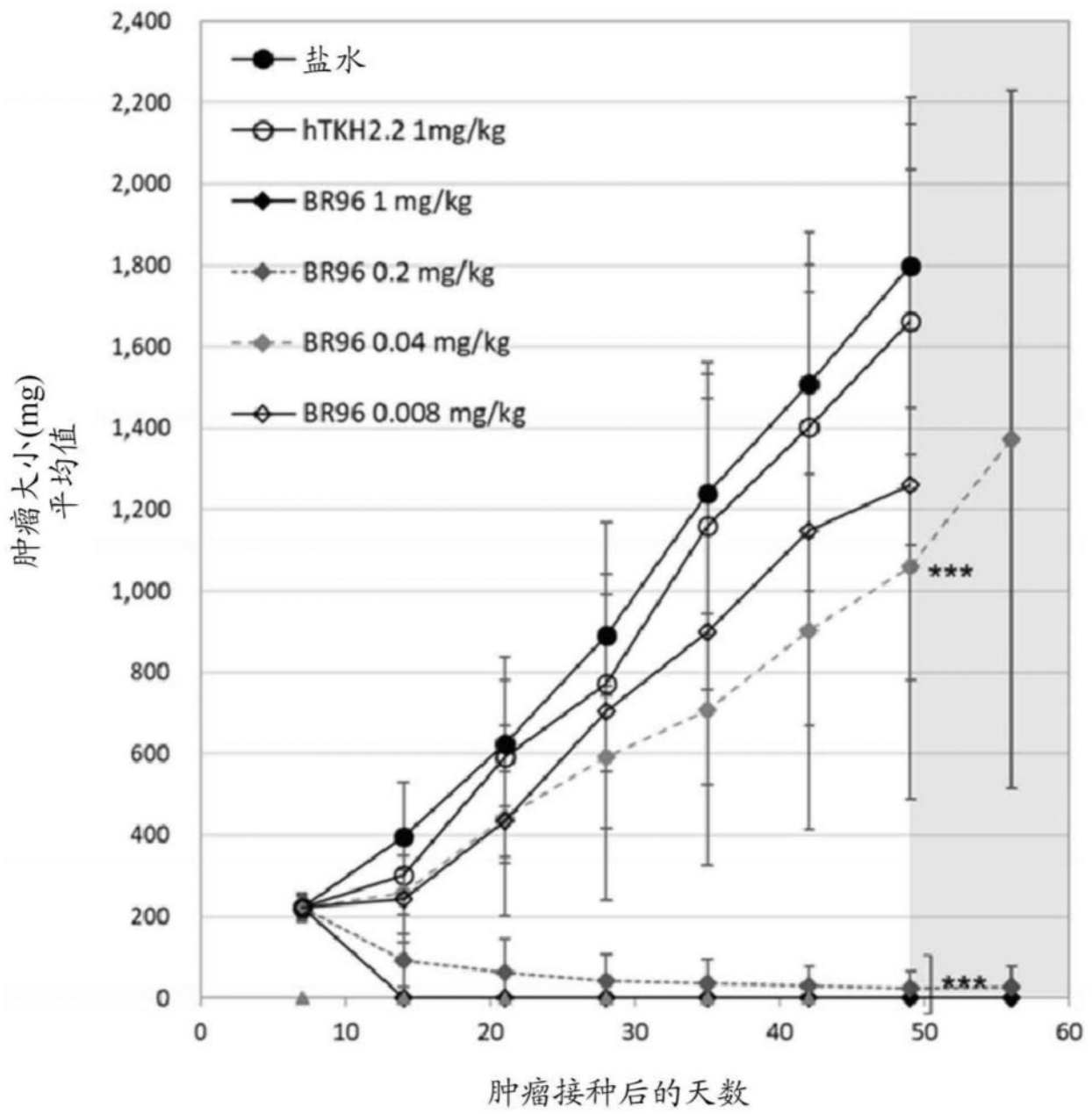


图24B