



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111971091 A

(43) 申请公布日 2020.11.20

(21) 申请号 201980025575.X

(22) 申请日 2019.04.12

(30) 优先权数据

1806084.8 2018.04.13 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.10.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/059420 2019.04.12

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2019/197609 EN 2019.10.17

(71) 申请人 柏林化学股份公司

地址 德国柏林

(72) 发明人 D·贝拉罗萨 C·卡利斯

A·贝拉卡尼 C·罗尔弗

J·E·奥克罗伊德 M·比纳其

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 钱文字 陈扬扬

(51) Int.Cl.

A61P 35/02 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书4页 说明书67页

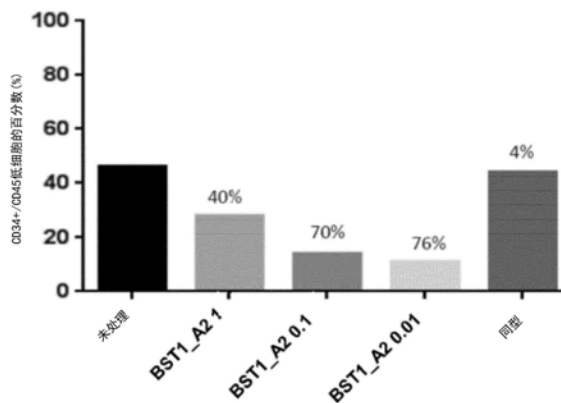
序列表27页 附图13页

(54) 发明名称

预防或治疗骨髓发育不良综合征的抗BST1抗体

(57) 摘要

本发明涉及使用针对BST1的抗体或其抗原结合部分预防或治疗骨髓发育不良综合征 (MDS) 的方法。



1. 一种抗BST1抗体或其抗原结合部分,其包含:

(a) 包含以下的重链可变区:

i) 包含SEQ ID NO:10的第一vhCDR;

ii) 包含选自SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:51的序列的第二vhCDR;和

iii) 包含SEQ ID NO:14的第三vhCDR;和

(b) 包含以下的轻链可变区:

i) 包含SEQ ID NO:16的第一vLCDR;

ii) 包含SEQ ID NO:18的第二vLCDR;和

iii) 包含SEQ ID NO:20的第三vLCDR;

其用于预防或治疗骨髓发育不良综合征(MDS)。

2. 一种抗BST1抗体或其抗原结合部分,其用于预防或治疗骨髓发育不良综合征(MDS)。

3. 如权利要求2所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分,其中该抗BST1抗体或其抗原结合部分:

(a) 与包括包含选自由SEQ ID NO:1、2、46和52组成的群组的氨基酸序列的重链可变区及包含选自由SEQ ID NO:3、4、49和53组成的群组的氨基酸序列的轻链可变区的抗体竞争结合至BST1;或

(b) 结合BST1上的表位,其由包括包含选自由SEQ ID NO:1、2、46及52组成的群组的氨基酸序列的重链可变区及包含选自由SEQ ID NO:3、4、49及53组成的群组的氨基酸序列的轻链可变区的抗体识别。

4. 如权利要求3所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分,其中:

(i) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列,较佳SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列;和/或

(ii) 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列,较佳SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列。

5. 如权利要求2所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分,其中所述抗BST1抗体或其抗原结合部分包含:

(a) 包含以下的重链可变区:

i) 包含SEQ ID NO:10的第一vhCDR;

ii) 包含选自SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:51的序列的第二vhCDR;和

iii) 包含SEQ ID NO:14的第三vhCDR;和

(b) 包含以下的轻链可变区:

i) 包含SEQ ID NO:16的第一vLCDR;

ii) 包含SEQ ID NO:18的第二vLCDR;和

iii) 包含SEQ ID NO:20的第三vLCDR;

任选地,其中上述SEQ ID NO中的任一或多者独立地包含一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、添加或缺失。

6. 如权利要求5所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分,其中SEQ ID NO:10、12、51、14、16、18或20中的任一或多者独立地包含一个、两个、三个、四个或五个保守氨基酸

取代。

7. 如权利要求6所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分,其中SEQ ID NO:10、12、51、14、16、18或20中的任一或多个者独立地包含一个或两个保守氨基酸取代。

8. 如权利要求5至7中任一项所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分,其中该抗BST1抗体或其抗原结合部分包含:

(a) 与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:46具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%氨基酸序列一致性的重链可变区,和/或

(b) 与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:49具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%氨基酸序列一致性的轻链可变区。

9. 如权利要求5至8中任一项所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分,其中所述抗BST1抗体或其抗原结合部分包含:

(a) 与SEQ ID NO:73具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%氨基酸序列一致性的重链,和

(b) 与SEQ ID NO:75具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%氨基酸序列一致性的轻链。

10. 如权利要求2所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分,其中所述抗BST1抗体或其抗原结合部分包含:

(a) 包含以下的重链可变区:

i) 包含SEQ ID NO:9的第一vhCDR;

ii) 包含SEQ ID NO:11的第二vhCDR;和

iii) 包含SEQ ID NO:13的第三vhCDR;和

(b) 包含以下的轻链可变区:

i) 包含SEQ ID NO:15的第一vlCDR;

ii) 包含SEQ ID NO:17的第二vlCDR;和

iii) 包含SEQ ID NO:19的第三vlCDR;

任选地,其中上述SEQ ID NO中的任一或多个者独立地包含一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、添加或缺失。

11. 如权利要求10所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分,其中SEQ ID NO:9、11、13、15、17或19中的任一或多个者独立地包含一个、两个、三个、四个或五个保守氨基酸取代。

12. 如权利要求11所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分,其中SEQ ID NO:9、11、13、15、17或19中的任一或多个者独立地包含一个或两个保守氨基酸取代。

13. 如权利要求10至12中任一项所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分,其中该抗BST1抗体或其抗原结合部分包含:

(a) 与SEQ ID NO:1具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%氨基酸序列一致性的重链可变区,和/或

(b) 与SEQ ID NO:3具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%氨基酸序列一致性的轻链可变区。

14. 如权利要求2所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分,其中该抗BST1抗体或

其抗原结合部分包含：

(a) 包含以下的重链可变区：

- i) 包含SEQ ID NO:56的第一vhCDR；
- ii) 包含SEQ ID NO:57的第二vhCDR；和
- iii) 包含SEQ ID NO:58的第三vhCDR；和

(b) 包含以下的轻链可变区：

- i) 包含SEQ ID NO:59的第一v1CDR；
- ii) 包含SEQ ID NO:60的第二v1CDR；和
- iii) 包含SEQ ID NO:61的第三v1CDR；

任选地，其中上述SEQ ID NO中的任一或多者独立地包含一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、添加或缺失。

15. 如权利要求14所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分，其中SEQ ID NO:56、57、58、59、60或61中的任一或多者独立地包含一个、两个、三个、四个或五个保守氨基酸取代。

16. 如权利要求15所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分，其中SEQ ID NO:56、57、58、59、60或61中的任一或多者独立地包含一个或两个保守氨基酸取代。

17. 如权利要求14至16中任一项所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分，其中该抗BST1抗体或其抗原结合部分包含：

(a) 与SEQ ID NO:52具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%氨基酸序列一致性的重链可变区，和/或

(b) 与SEQ ID NO:53具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%氨基酸序列一致性的轻链可变区。

18. 如前述权利要求中任一项所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分，其中所述抗BST1抗体是人类IgG1单克隆抗体。

19. 如权利要求1至17中任一项所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分，其中该抗BST1抗体或其抗原结合部分是抗体片段，较佳选自由以下组成的群组：单抗体、结构域抗体及纳米抗体。

20. 如权利要求1至17中任一项所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分，其中该抗BST1抗体或其抗原结合部分是抗体模拟物，较佳选自由以下组成的群组：亲和抗体、DARPin、Anticalin、亲和体、万能抗体和Duocalin。

21. 如权利要求1至20中任一项所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分，其中该抗BST1抗体或其抗原结合部分经无岩藻糖化或去岩藻糖化。

22. 如权利要求1至21中任一项所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分，其中该抗BST1抗体或其抗原结合部分诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。

23. 如权利要求1至22中任一项所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分，其中所述抗BST1抗体或其抗原结合部分是去岩藻糖化的人源化单克隆抗体。

24. 如权利要求1至23中任一项所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体是双特异性抗体或多特异性抗体，所述抗体特异性结合至包含BST1的第一抗原和选自由CD3抗原及CD5抗原组成的群组的第二抗原。

25. 一种药物组合物,其包含如权利要求1至24中任一项所定义的抗BST1抗体或其抗原结合部分,和一或多种药学上可接受的稀释剂、赋形剂或运载体,其用于预防或治疗MDS。

26. 一种预防或治疗患者的MDS的方法,其包括向有需要的患者给予治疗有效量的如权利要求1至24中任一项所定义的抗BST1抗体或其抗原结合部分。

27. 一种如权利要求1至24中任一项所定义的抗BST1抗体或其抗原结合部分的用途,其用于制备用于预防或治疗MDS的药物。

28. 如权利要求1至24中任一项所主张而使用的抗BST1抗体或其抗原结合部分,如权利要求25所主张而使用的药物组合物,如权利要求26所主张的方法,或如权利要求27所主张的用途,其中所述抗BST1抗体或其抗原结合部分或组合物用于向患者给予或被给予所述患者,其中所述患者骨髓中少于20%的有核细胞是骨髓母细胞。

预防或治疗骨髓发育不良综合征的抗BST1抗体

[0001] 本发明涉及使用针对BST1的抗体或其抗原结合部分预防或治疗骨髓发育不良综合征 (MDS) 的方法。

[0002] 白血病及淋巴瘤属于影响血液、骨髓及淋巴系统的一大类肿瘤；这些肿瘤被称为造血及淋巴组织的肿瘤。

[0003] 淋巴瘤是从淋巴细胞发展的一组血细胞肿瘤。征兆及症状可包括淋巴结肿大、发热、淋透性多汗、非刻意性体重减轻、瘙痒及连续感觉疲倦。淋巴瘤存在多种亚型：两种主要淋巴瘤类别是霍奇金氏淋巴瘤 (Hodgkin's lymphoma, HL) 及非霍奇金淋巴瘤 (NHL)。世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 收录两种其他类别的淋巴瘤类型：多发性骨髓瘤和免疫增殖性疾病。约90%的淋巴瘤是非霍奇金淋巴瘤。

[0004] 白血病是通常开始于骨髓中且会产生高数目的异常白细胞的一组癌症。症状包括出血及瘀伤问题、感觉疲倦、发热及感染风险增加。这些症状发生是由于缺乏正常血细胞。诊断典型地通过血液测试或骨髓活检进行。存在四种主要白血病类型：急性淋巴母细胞性白血病 (ALL)、急性骨髓白血病 (AML)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 及慢性骨髓白血病 (CML)，以及多种不太常见的类型。

[0005] AML是造血干细胞的异质疾病，其特征为在周边血液和/或骨髓中存在未成熟的白血病细胞 (称为“母细胞 (blast cell)”)。值得注意地，AML中的骨髓母细胞的数量是所有细胞的 $\geq 20\%$ 。母细胞不受控增殖造成发展贫血、嗜中性球减少症及血小板减少症，此转而引起最终导致患者死亡的主要临床症状及并发症 (也即无力、感染、出血)。另外，AML在一些情况下可涉及中枢神经系统，且尽管不太常见，但也涉及其他非血液部位。

[0006] AML的诊断包括骨髓穿刺 (经或不经活检)；对骨髓及周边血液的流式细胞测量术；细胞遗传学分析；和预后及治疗可能相关的一些分子畸变的评估。在后者当中，影响FMS样酪氨酸激酶3 (FLT3) 及异柠檬酸去氢酶-2 (IDH2) 的突变特别相关，因为其由已经批准用于治疗AML的特定药物靶向。

[0007] 视患者的年龄及健康而定，AML可用标准化疗 (主要基于核苷类似物阿糖胞苷及蒽环霉素诸如道诺霉素或埃达霉素) 或低甲基化剂 (诸如地西他滨及阿扎胞苷) 治疗。具体地，地西他滨及阿扎胞苷均由欧洲药物管理局 (European Medicines Agency) 批准用于一线治疗不符合标准化疗和/或同种异体造血干细胞移植 [allo-HSCT] 条件的患者的AML，但两者均未由美国食品及药物管理局 (United States Food and Drug Administration) 批准用于AML。同种异体造血干细胞移植 (allo-HSCT) 也可提供为所选病例中的巩固策略。视疾病特征而定，蛋白激酶抑制剂米哚妥林 (Midostaurin) 可与道诺霉素及阿糖胞苷组合使用。

[0008] 骨髓发育不良综合征 (MDS) 是主要存在于老年人中的纯系造血干细胞失调，特征在于低效造血导致血液血细胞减少且三分之一的病例进展为AML。病理生理学是多步过程，涉及细胞遗传学变化和/或基因突变及在晚期的普遍基因高甲基化。

[0009] MDS的诊断基于血液及骨髓检查显示血液血细胞减少、细胞过多骨髓伴发育不良、有或无过量未成熟的骨髓细胞 (母细胞)。与AML形成对比，MDS的诊断及预后检查 (work-up) 需要骨髓活检。

[0010] MDS的预后很大程度上基于骨髓母细胞百分比、血细胞减少的数目及程度以及细胞遗传学异常。具体地,应注意,在MDS中,患者骨髓中少于20%的有核细胞是骨髓母细胞。(20%是AML诊断的临限值)。

[0011] MDS的治疗视疾病的风险记分而定。患有较低风险MDS的患者基本上用支持性护理治疗以管理症状性贫血,该症状性贫血通常是此组MDS的主要临床特征。除支持性护理外,可开处来那度胺或红血球是刺激剂。仅在临床显著嗜中性球减少症或血小板减少症或母细胞计数增加的情况下,考虑其他策略用于一线治疗较低风险MDS;此类策略可基于低甲基化剂或免疫抑制治疗。

[0012] Allo-HSCT是用于患有高风险MDS的患者的最高准则治疗,是唯一的治愈性选项。尽管如此,由于年龄和/或共患病,大多数MDS患者实际上并非allo-HSCT的候选者。对于这些后述患者,低甲基化剂是建议的但又并非治愈性治疗选项。具体地,与AML形成对比,地西他滨并未由欧洲药物管理局批准用于治疗MDS。

[0013] 因此显而易见,AML及MDS是具有不同诊断检查、准则、预后及治疗选项以及算法的两种独特病症。虽然一些治疗(例如一些低甲基化剂)为两种病症共享且批准用于两种病症,但此类广谱治疗亦为许多肿瘤及癌症共享。此外,此类药物治疗的转归在MDS与AML之间大大不同:例如,阿扎胞苷前线治疗的中值总存活期在患有AML及MDS的患者中分别为10.4个月及20.5个月。因此仍需要对MDS的更好且更靶向性治疗。

[0014] 骨髓基质抗原1(BST1),亦称为ADP-核糖基环化酶2及CD157,是脂质锚定的双功能胞外酶,其催化核糖核苷酸环化及水解。其产生能够活化钙释放及蛋白质磷酸化的核苷酸第二信使环状ADP-核糖及ADP-核糖(FEBS Lett.1994,356(2-3):244-8)。其能够以旁分泌方式支持前B细胞的生长,此可能经由NAD⁺代谢物的产生(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1994,91:5325-5329;J Biol Chem.2005,280:5343-5349)。

[0015] BST1及其同源物CD38似乎充当受体,产生经由兰尼碱(ryanodine)受体诱导胞内Ca²⁺释放的第二信使代谢物(Biochem.Biophys.Res.Commun.1996,228(3):838-45)。其也可经由CD11b整合素发挥作用以经由PI-3激酶路径影响Ca²⁺释放(J Biol Regul Homeost Agents.2007;21(1-2):5-11)。W02013/003625公开抗BST1抗体及其用于治疗各种癌症的用途。

[0016] 现已发现,BST1表达于与MDS特定相关的细胞(诸如单核细胞及母细胞)上。本发明提供针对BST1的抗体或其抗原结合部分,其用于治疗MDS。

[0017] 在一个实施方式中,本发明提供一种抗BST1抗体或其抗原结合部分,其用于治疗MDS。本发明还提供本文所公开的所有抗BST1抗体及其抗原结合部分的分离的形式,其用于治疗MDS。

[0018] 在又一实施方式中,本发明提供一种抗BST1抗体或其抗原结合部分,其:

[0019] (a) 与包括包含选自SEQ ID NO:1、2、46及52组成的群组的氨基酸序列的重链可变区及包含选自SEQ ID NO:3、4、49及53组成的群组的氨基酸序列的轻链可变区的抗体竞争结合至BST1;或

[0020] (b) 结合BST1上由包括包含选自SEQ ID NO:1、2、46及52组成的群组的氨基酸序列的重链可变区及包含选自SEQ ID NO:3、4、49及53组成的群组的氨基酸序列的轻链可变区的抗体识别的表位,

- [0021] 其用于治疗骨髓发育不良综合征 (MDS)。
- [0022] 较佳地,该重链可变区包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:46,更佳SEQ ID NO:46中所述的氨基酸序列。较佳地,该轻链可变区包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:49,更佳SEQ ID NO:49中所述的氨基酸序列。
- [0023] 由以上抗体识别的表位见于SEQ ID NO:44的多肽序列内。
- [0024] 在又一实施方式中,本发明提供一种抗BST1抗体或其抗原结合部分,其包含:
- [0025] (a) 包含以下的重链可变区:
- [0026] i) 包含SEQ ID NO:10的第一vhCDR;
- [0027] ii) 包含选自SEQ ID NO:12及SEQ ID NO:51的序列的第二vhCDR;和
- [0028] iii) 包含SEQ ID NO:14的第三vhCDR;和
- [0029] (b) 包含以下的轻链可变区:
- [0030] i) 包含SEQ ID NO:16的第一vLCDR;
- [0031] ii) 包含SEQ ID NO:18的第二vLCDR;和
- [0032] iii) 包含SEQ ID NO:20的第三vLCDR;
- [0033] 任选地,其中以上SEQ ID NO中的任一或多者独立地包含一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、添加或缺失,其用于治疗骨髓发育不良综合征 (MDS)。
- [0034] 在一些实施方式中,SEQ ID NO:10、12、51、14、16、18或20中的任一或多者独立地包含一个、两个、三个、四个或五个保守氨基酸取代。在其他实施方式中,SEQ ID NO:10、12、51、14、16、18或20中的任一或多者独立地包含一个或两个保守氨基酸取代。
- [0035] 在又一实施方式中,本发明提供一种抗BST1抗体或其抗原结合部分,其包含:
- [0036] (a) 包含以下的重链可变区:
- [0037] i) 包含SEQ ID NO:9的第一vhCDR;
- [0038] ii) 包含SEQ ID NO:11的第二vhCDR;和
- [0039] iii) 包含SEQ ID NO:13的第三vhCDR;和
- [0040] (b) 包含以下的轻链可变区:
- [0041] i) 包含SEQ ID NO:15的第一vLCDR;
- [0042] ii) 包含SEQ ID NO:17的第二vLCDR;和
- [0043] iii) 包含SEQ ID NO:19的第三vLCDR;
- [0044] 任选地其中以上SEQ ID NO中的任一或多者独立地包含一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、添加或缺失,其用于治疗骨髓发育不良综合征 (MDS)。
- [0045] 在一些实施方式中,SEQ ID NO:9、11、13、15、17或19中的任一或多者独立地包含一个、两个、三个、四个或五个保守氨基酸取代。在其他实施方式中,SEQ ID NO:9、11、13、15、17或19中的任一或多者独立地包含一个或两个保守氨基酸取代。
- [0046] 在又一实施方式中,本发明提供一种抗BST1抗体或其抗原结合部分,其包含:
- [0047] (a) 包含以下的重链可变区:
- [0048] i) 包含SEQ ID NO:56的第一vhCDR;
- [0049] ii) 包含SEQ ID NO:57的第二vhCDR;和
- [0050] iii) 包含SEQ ID NO:58的第三vhCDR;和
- [0051] (b) 包含以下的轻链可变区:

- [0052] i) 包含SEQ ID NO:59的第一v1CDR;
- [0053] ii) 包含SEQ ID NO:60的第二v1CDR;和
- [0054] iii) 包含SEQ ID NO:61的第三v1CDR;
- [0055] 任选地其中以上SEQ ID NO中的任一或多个者独立地包含一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、添加或缺失,其用于治疗骨髓发育不良综合征(MDS)。
- [0056] 在一些实施方式中,SEQ ID NO:56、57、58、59、60或61中的任一或多个者独立地包含一个、两个、三个、四个或五个保守氨基酸取代。在其他实施方式中,SEQ ID NO:56、57、58、59、60或61中的任一或多个者独立地包含一个或两个保守氨基酸取代。
- [0057] 在一些实施方式中,用于本发明的抗BST1抗体或其抗原结合部分包含:
- [0058] (a) 与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:46具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%氨基酸序列一致性的重链可变区,及
- [0059] (b) 与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:49具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%氨基酸序列一致性的轻链可变区。
- [0060] 在又一实施方式中,分离的抗BST1抗体或其抗原结合部分包含如SEQ ID NO:2所代表的重链可变区序列及如SEQ ID NO:4所代表的轻链可变区序列。在另一实施方式中,分离的抗BST1抗体或其抗原结合部分包含如SEQ ID NO:46所代表的重链可变区序列及如SEQ ID NO:49所代表的轻链可变区序列。
- [0061] 在一些实施方式中,用于本发明的抗BST1抗体或其抗原结合部分包含:
- [0062] (a) 与SEQ ID NO:1具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%氨基酸序列一致性的重链可变区,及
- [0063] (b) 与SEQ ID NO:3具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%氨基酸序列一致性的轻链可变区。
- [0064] 在又一实施方式中,分离的抗BST1抗体或其抗原结合部分包含如由SEQ ID NO:1所表示的重链可变区序列及如由SEQ ID NO:3所表示的轻链可变区序列。
- [0065] 在一些实施方式中,用于本发明的抗BST1抗体或其抗原结合部分包含:
- [0066] (a) 与SEQ ID NO:52具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%氨基酸序列一致性的重链可变区,及
- [0067] (b) 与SEQ ID NO:53具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%氨基酸序列一致性的轻链可变区。
- [0068] 在又一实施方式中,分离的抗BST1抗体或其抗原结合部分包含如由SEQ ID NO:52所表示的重链可变区序列及如由SEQ ID NO:53所表示的轻链可变区序列。
- [0069] 在一些实施方式中,用于本发明的抗BST1抗体或其抗原结合部分包含:
- [0070] (a) 与SEQ ID NO:73具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%氨基酸序列一致性的重链,及
- [0071] (b) 与SEQ ID NO:75具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%氨基酸序列一致性的轻链。
- [0072] 在一个实施方式中,前述抗体中的任一者拥有Fc结构域。在一些实施方式中,该Fc结构域是人类的。在其他实施方式中,该Fc结构域是变异的人类Fc结构域。在另一实施方式中,本文所述的抗体中的任一者是单克隆抗体。

[0073] 在一个实施方式中,前述抗体或抗原结合部分中的任一者进一步拥有偶联的试剂。在一些实施方式中,偶联的试剂是细胞毒性剂。在其他实施方式中,偶联的试剂是聚合物。在另一实施方式中,聚合物是聚乙二醇(PEG)。在另一实施方式中,PEG是PEG衍生物。

[0074] 在一些实施方式中,分离的抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同型(isotype),较佳IgG1同型的全长抗体。

[0075] 在一些实施方式中,本发明的抗体选自由以下组成的群组:完整抗体、抗体片段、人源化抗体、单链抗体、去岩藻糖化抗体及双特异性抗体,较佳人源化抗体。

[0076] 抗体片段可选自由以下组成的群组:单抗体(UniBody)、结构域抗体及纳米抗体(Nanobody)。

[0077] 在一些实施方式中,本发明的免疫偶联物包含治疗剂。在本发明的另一方面中,治疗剂是细胞毒素或放射性同位素。

[0078] 在一些实施方式中,本发明的抗体是选自由以下组成的群组的抗体模拟物:亲和抗体(Affibody)、DARPin、Anticalin、亲和体(Avimer)、万能抗体(Versabody)及Duocalin。

[0079] 在一些实施方式中,该抗BST1抗体或其抗原结合部分经无岩藻糖化或去岩藻糖化。

[0080] 在一些实施方式中,该抗BST1抗体或其抗原结合部分诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

[0081] 在一些实施方式中,该抗体是双特异性抗体或多特异性抗体,该抗体特异性结合至包含BST1的第一抗原及选自由CD3抗原及CD5抗原组成的群组的第二抗原。

[0082] 在替代性实施方式中,提供一种药物组合物,其包含本发明的抗体或其抗原结合部分及一或多种药学上可接受的稀释剂、赋形剂或运载体,其用于预防或治疗MDS。

[0083] 在其他实施方式中,本发明提供一种预防或治疗患者的MDS的方法,其包含向有需要的患者给予治疗有效量的如本文所定义的抗体或其抗原结合部分。较佳地,该患者是人类。在其他实施方式中,本发明提供一种如本文所定义的抗体或其抗原结合部分的用途,其用于制备用于预防或治疗MDS的药物。较佳地,该MDS是人类MDS。

[0084] 在MDS患者中,该患者的骨髓中的少于20%的有核细胞是骨髓母细胞。在一些较佳实施方式中,待治疗的患者的骨髓中的少于19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、5%或1%的有核细胞是骨髓母细胞。

[0085] 本发明的其他特征及优点将自不应解释为限制性的以下详细描述及实例中显而易见。本申请案通篇引用的全部参考文献、Genbank条目、专利及公开的专利申请案的内容明确以引用的方式并入本文。

附图说明

[0086] 图1a显示A1的重链CDR1区的核苷酸序列(SEQ ID NO:21)与小鼠生殖系V_H1-80核苷酸序列的核苷酸138392-138424(SEQ ID NO:33)的比对结果;A2的重链CDR1区的核苷酸序列(SEQ ID NO:22)与小鼠生殖系V_H 1-39核苷酸序列的核苷酸153362-153394(SEQ ID NO:35)的比对结果。

[0087] 图1b显示A1的重链CDR2区的核苷酸序列(SEQ ID NO:23)与小鼠生殖系V_H1-80核苷酸序列的核苷酸138461-138511(SEQ ID NO:34)的比对结果;A2的重链CDR2区的核苷酸

序列(SEQ ID NO:24)与小鼠生殖系V_H 1-39核苷酸序列的核苷酸153431-153481(SEQ ID NO:36)的比对结果。

[0088] 图2a显示A1的轻链CDR1区的核苷酸序列(SEQ ID NO:27)与小鼠生殖系V_K4-74核苷酸序列的核苷酸496-531(SEQ ID NO:37)的比对结果;A2的轻链CDR1区的核苷酸序列(SEQ ID NO:28)与小鼠生殖系V_K 4-55核苷酸序列的核苷酸523-552(SEQ ID NO:40)的比对结果。

[0089] 图2b显示A1的轻链CDR2区的核苷酸序列(SEQ ID NO:29)与小鼠生殖系V_K4-74核苷酸序列的核苷酸577-597(SEQ ID NO:38)的比对结果;A2的轻链CDR2区的核苷酸序列(SEQ ID NO:30)与小鼠生殖系V_K 4-55核苷酸序列的核苷酸598-618(SEQ ID NO:41)的比对结果。

[0090] 图2c显示A1的轻链CDR3区的核苷酸序列(SEQ ID NO:31)与小鼠生殖系V_K4-74核苷酸序列的核苷酸691-718(SEQ ID NO:39)的比对结果;A2的轻链CDR3区的核苷酸序列(SEQ ID NO:32)与小鼠生殖系V_K 4-55核苷酸序列的核苷酸715-739(SEQ ID NO:42)的比对结果。

[0091] 图3a及3b显示A549及H226细胞上的BST1的流式细胞分析的结果。

[0092] 图4a及4b显示抗BST1单克隆抗体由A549及H226细胞内化,使用MabZAP分析法。

[0093] 图5显示SEQ ID NO:2的残基21-137(SEQ ID NO:45)、SEQ ID NO:2的CDR区(以粗体突出显示)转移至人类生殖系BF238102VH的相应位置的人源化VH链(SEQ ID NO:46)与人类生殖系BF238102VH(SEQ ID NO:47)的比对结果。将显示明显与CDR区接触的残基取代为相应的人类残基。这些取代(加下划线)在位置30、48、67、71及100处进行。

[0094] 图6显示SEQ ID NO:4的残基22-128(SEQ ID NO:48)、SEQ ID NO:4的CDR区(以粗体突出显示)转移至人类生殖系X72441 VL的相应位置的人源化VL链(SEQ ID NO:49)与人类生殖系X72441 VL(SEQ ID NO:50)的比对结果。将显示明显与CDR区接触的残基取代为相应的人类残基。一个取代(加下划线)在位置71处进行。

[0095] 图7显示A2重链的CDR2区(SEQ ID NO:12)与不损失抗原结合亲和力的可能氨基酸取代(SEQ ID NO:51)的比对结果。

[0096] 图8显示BST1_A2及BST1_A2_NF在效应细胞存在下激发抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)反应。

[0097] 图9展示一个代表性MDS样品(VM-B0136)的免疫表型分型门控策略。(A)在CD45对SSC双参数点阵图中,基于CD45表达鉴别细胞子集。(B)CD45阴性亚群的CD34对CD157点阵图鉴别表达CD157抗原的5.6%母细胞(四分之一Q2)。(C)CD45低亚群的CD34对CD157点阵图鉴别61%的CD157(四分之一Q2)。(D)CD45高淋巴细胞亚群的CD34对CD157点阵图鉴别2%的CD157。(E)CD45高单核细胞亚群的CD34对CD157点阵图鉴别55%的CD157抗原。

[0098] 图10展示对MDS样品VM-BM0136的离体耗尽分析法。在此患者中,评估CD34+/CD45低细胞上的BST1_A2诱导的耗尽。展示各BST1_A2浓度的耗尽百分比。BST1_A2之用量以μg/mL为单位表示。

[0099] 图11展示对MDS样品VM-BM0138的离体耗尽分析法。在此患者中,评估CD34+/CD45高细胞上的BST1_A2诱导的耗尽。展示各BST1_A2浓度的耗尽百分比。BST1_A2的用量以μg/mL为单位表示。

具体实施方式

[0100] 为可更轻易地理解本发明,首先定义某些术语。另外的定义在详细描述中给出。

[0101] 在某些情况下,本文所描述的人源化及鼠类抗体可与来自人类以外的物种的BST1交叉反应。在某些实施方式中,抗体对一或多种人类BST1具有完全特异性,且不会显示出物种型或其他类型的非人类交叉反应性。

[0102] 术语“免疫反应”是指例如淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞及由上述细胞或肝脏产生的可溶性大分子(包括抗体、细胞介素及补体)的作用,该作用导致选择性损伤、破坏或自人体中消除正在入侵的病原体、受病原体感染的细胞或组织、癌细胞或在自体免疫性或病理炎症的情况下的正常人类细胞或组织。

[0103] “信号转导途径”是指在信号自细胞一个部分传输至细胞另一部分中发挥作用的各种信号转导分子之间的生物化学关系。如本文所用,词组“细胞表面受体”包括例如能够接收信号及跨细胞质膜传输此类信号的分子及分子复合物。“细胞表面受体”的实例是BST1。

[0104] 如本文所提及,术语“抗体”至少包括免疫球蛋白的抗原结合片段(也即“抗原结合部分”)。

[0105] “抗体”的定义包括但不限于全长抗体、抗体片段、单链抗体、双特异性抗体、微型抗体(minibody)、结构域抗体、合成抗体(有时在本文中称作“抗体模拟物”)、嵌合抗体、人源化抗体、抗体融合物(有时称作“抗体偶联物”)及前述每一者的片段和/或衍生物。一般而言,全长抗体(有时在本文中称作“完整抗体”)是指包含由二硫桥键相互连接的至少两条重(H)链及两条轻(L)链的糖蛋白。各重链包含重链可变区(本文中缩写为 V_H)及重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 及 C_{H3} 。各轻链包含轻链可变区(本文中缩写为 V_L 或 V_K)及轻链恒定区。轻链恒定结构域包含一个结构域 C_L 。 V_H 区及 V_L/V_K 区可进一步再分为超变区,名为互补决定区(CDR),其间间插有更保守的区,名为框架区(FR)。各 V_H 及 V_L/V_K 包含自氨基端至羧基端按以下顺序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4排列的三个CDR及四个FR。重链及轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)及经典补体系统的第一组分($C1q$))结合。

[0106] 在一个实施方式中,抗体是抗体片段。特定抗体片段包括但不限于(i)由 V_L 、 V_H 、 C_L 及 C_{H1} 结构域组成的Fab片段;(ii)由 V_H 及 C_{H1} 结构域组成的Fd片段;(iii)由单一抗体的 V_L 及 V_H 结构域组成的Fv片段;(iv)由单一可变结构域组成的dAb片段;(v)分离的CDR区;(vi)F(ab')₂片段,包含两个相连的Fab片段的双价片段;(vii)单链Fv分子(scFv),其中 V_H 结构域及 V_L 结构域由允许两个结构域缔合以形成抗原结合位点的肽接头连接;(viii)双特异性单链Fv二聚体;和(ix)“双功能抗体(diabody)”或“三功能抗体(triabody)”,通过基因融合所构建的多价或多特异性片段。抗体片段可经修饰。例如,可通过并入连接 V_H 及 V_L 结构域之二硫桥键使分子稳定。抗体样式及构造的实例在Holliger及Hudson(2006)Nature Biotechnology 23(9):1126-1136及Carter(2006)Nature Reviews Immunology6:343-357以及其中引用的参考文献中描述,这些文献均明确地以引用的方式并入。

[0107] 本发明提供抗体类似物。这些类似物可包含多种结构,包括但不限于全长抗体、抗体片段、双特异性抗体、微型抗体、结构域抗体、合成抗体(有时在本文中称作“抗体模拟

物”)、抗体融合物、抗体偶联物及前述每一者的片段。

[0108] 在一个实施方式中,免疫球蛋白包含抗体片段。特定抗体片段包括但不限于(i)由VL、VH、CL及CH1结构域组成的Fab片段;(ii)由VH及CH1结构域组成的Fd片段;(iii)由单一抗体的VL及VH结构域组成的Fv片段;(iv)由单一可变结构域组成的dAb片段;(v)分离的CDR区;(vi)F(ab')₂片段,包含两个相连的Fab片段的双价片段;(vii)单链Fv分子(scFv),其中VH结构域及VL结构域由允许两个结构域缔合以形成抗原结合位点的肽接头连接;(viii)双特异性单链Fv二聚体;和(ix)“双功能抗体”或“三功能抗体”,通过基因融合所构建的多价或多特异性片段。抗体片段可经修饰。例如,可通过并入连接VH及VL结构域的二硫桥键使分子稳定。抗体样式及构造的实例在Holliger及Hudson,2006,Nature Biotechnology 23(9):1126-1136及Carter,2006,Nature Reviews Immunology6:343-357以及其中引用的参考文献中描述,这些文献均明确地以引用的方式并入。

[0109] 识别的免疫球蛋白基因(例如在人类中)包括κ(kappa)、λ(lambda)及重链基因座(其一起包含无数可变区基因),及恒定区基因ν(mu)、δ(delta)、γ(gamma)、σ(sigma)及α(alpha),其分别编码IgM、IgD、IgG(IgG1、IgG2、IgG3及IgG4)、IgE及IgA(IgA1及IgA2)同型。本文中的抗体意在包括全长抗体及抗体片段,且可指来自任何生物的天然抗体、工程化抗体或为实验目的、治疗目的或其他目的重组产生的抗体。

[0110] 在一个实施方式中,本文中公开的抗体可为多特异性抗体,且值得注意地为双特异性抗体,有时亦称作“双功能抗体”。其是与两种(或更多种)不同抗原结合的抗体。双功能抗体可以本领域已知的多种方式制备,例如化学地或自杂合融合瘤制备。在一个实施方式中,抗体是微型抗体。微型抗体是最小化的抗体样蛋白质,其包含与CH3结构域连接的scFv。在一些情况下,scFv可与Fc区连接且可包括一些或全部的铰链区。关于多特异性抗体的描述,参见Holliger及Hudson(2006)Nature Biotechnology 23(9):1126-1136及其中引用的参考文献,这些文献均明确地以引用的方式并入。

[0111] 如本文所用,“CDR”意指抗体可变结构域的“互补决定区”。CDR中所包括的残基的系统鉴别已由Kabat开发(Kabat等,(1991)《免疫学热门蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第5版,美国公共卫生署(United States Public Health Service),国立卫生研究院(National Institutes of Health),贝塞斯达(Bethesda))及替代地由Chothia开发[Chothia及Lesk(1987)J.Mol.Biol.196:901-917;Chothia等,(1989)Nature 342:877-883;Al-Lazikani等,(1997)J.Mol.Biol.273:927-948]。出于本发明目的,将CDR定义为比Chothia定义的CDR略小的残基集。V_L CDR在本文中定义为包括在位置27-32(CDR1)、50-56(CDR2)及91-97(CDR3)处的残基,其中根据Chothia进行编号。因为Chothia及Kabat定义的V_L CDR一致,所以这些V_L CDR位置的编号亦根据Kabat进行。V_H CDR在本文中定义为包括在位置27-33(CDR1)、52-56(CDR2)及95-102(CDR3)处的残基,其中根据Chothia进行编号。这些V_H CDR位置对应于Kabat位置27-35(CDR1)、52-56(CDR2)及95-102(CDR3)。

[0112] 如本领域技术人员所了解,本文所公开的CDR也可包括变异体,例如,当将本文所公开的CDR回复突变入不同框架区时。通常,个体变异CDR的间的核酸一致性相对于本文所述的序列是至少80%,且更典型地具有较佳增加的至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%及几乎100%的一致性。类似地,相对于本文中鉴别的结合蛋白

的核酸序列,将“核酸序列一致性百分比(%)”定义为,候选序列中与抗原结合蛋白的编码序列中的核苷酸残基一致的核苷酸残基的百分比。特定方法使用设置成预设参数的WU-BLAST-2的BLASTN模块,其中重叠跨度及重叠分数分别设置成1及0.125且不选择过滤器。

[0113] 通常,在编码个别变异CDR的核苷酸序列与本文所述的核苷酸序列之间的核酸序列一致性是至少80%,且更典型地具有较佳增加的至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%及几乎100%的一致性。

[0114] 因而,“变异CDR”是如下CDR,其与本发明的亲本CDR具有规定的同源性、相似性或一致性且共有生物学功能,包括但不限于亲本CDR的至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的特异性和/或活性。

[0115] 尽管用于引入氨基酸序列变异的位点或区是预先确定的,但突变本身不需要预先确定。例如,为优化突变在既定位点的效能,可在靶密码子或区处实施随机突变诱发,且针对所需活性的最佳组合,筛选表达的抗原结合蛋白CDR变异体。在具有已知序列的DNA中的预定位点处进行取代突变的技术是熟知的,例如,M13引物突变诱发及PCR突变诱发。使用如本文所述的抗原结合蛋白活性分析法进行突变体的筛选。

[0116] 氨基酸取代典型地是单个残基;插入通常在约一个(1)至约二十个(20)氨基酸残基的级别上,但可耐受明显更大的插入。缺失的范围是约一个(1)至约二十个(20)氨基酸残基,但在一些情况下缺失可大得多。

[0117] 取代、缺失、插入或其任意组合可用来获得最终的衍生物或变异体。通常,在一些氨基酸上进行这些改变,以便使分子的改变、尤其抗原结合蛋白的免疫原性及特异性最小化。然而,在某些情况下可耐受较大改变。

[0118] 如本文所用,“Fab”或“Fab区”意指包含V_H、C_{H1}、V_L及C_L免疫球蛋白结构域的多肽。Fab可指分离的此区,或在全长抗体、抗体片段或Fab融合蛋白或如本文概述的任何其他抗体实施方式的情境下的此区。

[0119] 如本文所用,“Fv”或“Fv片段”或“Fv区”意指包含单一抗体的V_L及V_H结构域的多肽。

[0120] 如本文所用,“框架”意指抗体可变结构域的不包括定义为CDR的那些区的区。各抗体可变结构域框架可进一步再分为由CDR分隔的连续区(FR1、FR2、FR3及FR4)。

[0121] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”)是指保留与抗原(例如BST1)特异性结合的能力的一或多种抗体片段。已显示抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段执行。术语抗体的“抗原结合部分”所涵盖的结合片段的实例包括(i) Fab片段,由V_L/V_K、V_H、C_L及C_{H1}结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,包含由二硫桥键在铰链区连接的两个Fab片段的双价片段;(iii)基本上为带有部分铰链区的Fab的Fab'片段(参见FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul编,第3次补充修订版,1993);(iv)由V_H及C_{H1}结构域组成的Fd片段;(v)由抗体单臂的V_L及V_H结构域组成的Fv片段;(vi)由V_H结构域组成的dAb片段[Ward等(1989)Nature 341:544-546];(vii)分离的互补决定区(CDR);和(viii)纳米抗体,含有单个可变结构域及两个恒定结构域的重链可变区。另外,虽然Fv片段的两个结构域V_L/V_K及V_H由独立基因编码,但可使用重组方法,通过能够使其作为单条蛋白链产生的合成接头将其连接,在该单条蛋白链中V_L/V_K区及V_H区配对以形成单价分子(称作单链Fv(scFv));参见

例如Bird等(1988) *Science* 242:423-426;和Huston等(1988) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*85:5879-5883)。这些单链抗体也意图涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内。使用本领域技术人员已知的常规技术,获得这些抗体片段,且按与完整抗体相同的方式针对用途筛选这些片段。

[0122] 如本文所用,“分离的抗体”意指一种抗体,其实质上不含具有不同抗原特异性的其他抗体(例如与BST1特异性结合的分离的抗体实质上不含特异性结合不为BST1的抗原的抗体)。然而,与BST1特异性结合的分离的抗体可对其他抗原(诸如来自其他物种的BST1分子)具有交叉反应性。另外和/或替代地,分离的抗体可实质上不含呈自然界中通常不可见的形式的其他细胞物质和/或化学品。

[0123] 在一些实施方式中,本发明的抗体是重组蛋白、分离的蛋白质或实质上纯的蛋白质。“分离的”蛋白质不伴有在其天然状态下通常与其缔合的至少一些物质,例如在既定样品中按重量计构成总蛋白的至少约5%或至少约50%。应理解,视环境而定,分离的蛋白质可按重量计构成总蛋白含量的5%至99.9%。例如,可经由使用诱导型启动子或高表达启动子以显著更高浓度产生蛋白质,以便以增加的浓度水平产生该蛋白质。在重组蛋白的情况下,该定义包括在本领域已知的类型广泛的不天然产生抗体的生物和/或宿主细胞中产生抗体。

[0124] 如本文所用,术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指具有单一分子组成的抗体分子制剂。单克隆抗体组合物对特定表位显示单一结合特异性及亲和力。如本文所用,“多克隆抗体”是指如同完整动物中的情形一样,由几种B-淋巴细胞克隆产生的抗体。

[0125] 如本文所用,“同型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别(例如IgM或IgG1)。

[0126] 词组“识别抗原的抗体”及“对抗原特异的抗体”在本文中术语“与抗原特异性结合的抗体”可互换使用。

[0127] 术语“抗体衍生物”是指任何修饰形式的抗体,例如抗体与另一试剂或抗体的偶联物(通常化学连接)。例如,本发明的抗体可偶联至试剂,包括但不限于聚合物(例如PEG)、毒素、标记物等,如下文更充分描述。本发明的抗体可为非人类、嵌合、人源化或全人类的。关于嵌合抗体及人源化抗体概念的描述,参见Clark等(2000)及其中引用的参考文献(Clark, 2000, *Immunol Today*21:397-402)。嵌合抗体包含与人类抗体的恒定区操作性地连接的非人类抗体的可变区,例如小鼠或大鼠来源的V_H及V_L结构域(参见例如美国专利第4,816,567号)。在一较佳实施方式中,用于本发明的抗体是人源化的。如本文所用,“人源化”抗体意指包含人类框架区(FR)及一或多个来自非人类(通常小鼠或大鼠)抗体的互补决定区(CDR)的抗体。提供CDR的非人类抗体称作“供体”且提供框架的人类免疫球蛋白称作“受体”。人源化原则上依赖于将供体CDR移植至受体(人类)V_L及V_H框架上(美国专利第5,225,539号)。此策略称作“CDR移植”。经常需要将选择的受体框架残基“回复突变”成相应的供体残基,以再次获得在最初移植的构建体中丧失的亲和力(US 5,530,101;US 5,585,089;US 5,693,761;US 5,693,762;US 6,180,370;US 5,859,205;US 5,821,337;US 6,054,297;US6,407,213)。人源化抗体最佳地亦将包含免疫球蛋白恒定区的至少一部分,典型地为人类免疫球蛋白的相应部分,且因此典型地将包含人类Fc区。用于人源化非人类抗体的方法是本领域已知的,且可基本上遵循Winter及合作者的方法进行[Jones等(1986) *Nature* 321:522-525;Riechmann等(1988) *Nature* 332:323-329;Verhoeyen等(1988) *Science*,239:1534-

1536]。人源化鼠类单克隆抗体的额外实例亦为本领域已知的,例如结合人类蛋白C(O'Connor等,1998,Protein Eng11:321-8)、介白素2受体[Queen等(1989)Proc Natl Acad Sci,USA 86:10029-33]及人类表皮生长因子受体2[Carter等(1992)Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9]的抗体。在一替代实施方式中,本发明的抗体可为全人类抗体,也即,抗体序列为完全或实质上人类的。本领域已知用于产生全人类抗体的许多方法,包括使用转殖基因小鼠[Bruggemann等(1997)Curr Opin Biotechnol 8:455-458]或人类抗体文库连同选择方法[Griffiths等(1998)Curr Opin Biotechnol 9:102-108]。

[0128] 术语“人源化抗体”意在包括源自另一哺乳动物物种(诸如小鼠)的生殖系的CDR序列已移植至人类框架序列上的抗体。可在人类框架序列内产生其它框架区修饰,诸如Fc结构域氨基酸修饰,如本文所述。

[0129] 术语“嵌合抗体”意指可变区序列源自一个物种且恒定区序列源自另一物种的抗体,诸如可变区序列源自小鼠抗体且恒定区序列源自人类抗体的抗体。

[0130] 术语“特异性结合”(或“免疫特异性结合”)不意在表示,抗体排他性地与其预期靶结合,但在许多实施方式中情况如此;也即,抗体与其靶“特异性结合”且与样品、细胞或患者中的其他组分不可侦测地结合或实质上不结合。然而,在一些实施方式中,若与抗体针对非靶分子的亲和力相比,抗体针对其预期靶的亲和力是约5倍,则该抗体“特异性结合”。适当地,不存在与非预期物质(尤其健康人或动物的天然存在的蛋白质或组织)的显著交叉反应或交叉结合。抗体对靶分子的亲和力将为其对非靶分子的亲和力的例如至少约5倍,诸如10倍,诸如25倍,尤其50倍且特别地100倍或更大。在一些实施方式中,抗体或其他结合剂与抗原之间的特异性结合意指至少 10^6M^{-1} 的结合亲和力。抗体可例如以至少约 10^7M^{-1} ,诸如在约 10^8M^{-1} 至约 10^9M^{-1} 、约 10^9M^{-1} 至约 10^{10}M^{-1} 或约 10^{10}M^{-1} 至约 10^{11}M^{-1} 之间的亲和力结合。抗体可例如以50nM或更小、10nM或更小、1nM或更小、100pM或更小,或更佳10pM或更小的 EC_{50} 结合。

[0131] 如本文所用,术语“实质上不结合”蛋白质或细胞意指不结合或不以高亲和力结合蛋白质或细胞,也即以 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 或更大、更佳 $1 \times 10^{-5}\text{M}$ 或更大、更佳 $1 \times 10^{-4}\text{M}$ 或更大、更佳 $1 \times 10^{-3}\text{M}$ 或更大、甚至更佳 $1 \times 10^{-2}\text{M}$ 或更大的 K_D 与蛋白质或细胞结合。

[0132] 如本文所用,术语“ EC_{50} ”意指通过定量导致50%最大反应/作用的浓度所确定的化合物的效力。可通过Scratchard或FACS确定 EC_{50} 。

[0133] 如本文所用,术语“ K_{assoc} ”或“ K_a ”意指特定抗体-抗原相互作用之缔合速率,而如本文所用,术语“ K_{dis} ”或“ K_d ”意指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。如本文所用,术语“ K_D ”意指亲和力常数,其自 K_d 对 K_a 的比率(也即 K_d/K_a)获得,且表示为莫耳浓度(M)。可使用本领域充分确立的方法确定抗体之 K_D 值。一种用于确定抗体之 K_D 的较佳方法是使用表面电浆子共振法,较佳使用生物传感器系统诸如Biacore®系统。

[0134] 如本文所用,用于IgG抗体的术语“高亲和力”是指抗体针对靶抗原具有 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ 或更小、更佳 $5 \times 10^{-8}\text{M}$ 或更小、甚至更佳 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 或更小、甚至更佳 $5 \times 10^{-9}\text{M}$ 或更小、且甚至更佳 $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 或更小的 K_D 。然而,“高亲和力”结合可随其他抗体同型而变动。例如,用于IgM同型的“高亲和力”结合是指抗体具有 10^{-6}M 或更小、更佳 10^{-7}M 或更小、甚至更佳 10^{-8}M 或更小的 K_D 。

[0135] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指免疫球蛋白或抗体所特异性结合至的抗原上的位点。表位可由连续氨基酸或因蛋白质的三级折叠而并列的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位典型地在曝露于变性溶剂时保留,而因三级折叠形成的表位典型地在用变

性溶剂处理时丧失。表位典型地包括至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个处于独特空间构形的氨基酸。确定表位之空间构形的方法包括本领域的技术及本文所述的技术,例如x射线晶体学及2-维核磁共振[参见例如《分子生物学方法中的表位定位方案》(Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology),第66卷,G.E.Morris编(1996)]。

[0136] 因此,本发明也包括结合(也即识别)与本文所述的抗体(也即BST1_A2、BST1_A1及BST1_A3)相同的表位的抗体,用于预防或治疗MDS。与相同表位结合的抗体可通过其与参考抗体以统计学显著的方式交叉竞争靶抗原(也即竞争性抑制参考抗体与靶抗原的结合)的能力来鉴别。例如,若抗体与一致或结构上相似的表位(例如重叠表位)或空间上接近的表位结合,则可出现竞争性抑制,这些空间上接近的表位在结合时在抗体之间造成位阻。

[0137] 可使用测试的免疫球蛋白抑制参考抗体与共同抗原的特异性结合的例行分析法来确定竞争性抑制。众多类型的竞争性结合分析法是已知的,例如:固相直接或间接放射免疫分析法(RIA)、固相直接或间接酶免疫分析法(EIA)、夹心竞争分析法[参见Stahl等(1983) *Methods in Enzymology* 9:242];固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA[参见Kirkland等(1986) *J. Immunol.* 137:3614];固相直接标记的分析法、固相直接标记的夹心分析法[参见Harlow及Lane(1988)《抗体:实验室手册》(Antibodies:A Laboratory Manual),冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press)];使用I-125标记的固相直接标记RIA[参见Morel等(1988) *Mol. Immunol.* 25(1):7];固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA[Cheung等(1990) *Virology* 176:546];和直接标记的RIA[Moldenhauer等(1990) *Scand. J. Immunol.* 32:77]。典型地,此类分析法涉及使用与具有未标记的测试免疫球蛋白及标记之参考免疫球蛋白的固体表面或细胞结合的纯化抗原。通过测定在测试免疫球蛋白存在下与固体表面或细胞结合的标记的量,测量竞争性抑制。通常,测试免疫球蛋白过量存在。通常,当竞争性抗体过量存在时,其将抑制参考抗体与共同抗原的特异性结合至少50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或更多。

[0138] 其他技术包括例如表位定位方法,诸如抗原:抗体复合物晶体的x射线分析,其提供表位的原子分辨率。其他方法监测抗体与抗原片段或抗原的突变变型的结合,其中经常将因抗原序列内的氨基酸残基修饰所致的结合丧失视为表位组分的指标。此外,也可使用用于表位定位的计算组合方法。这些方法依赖于目的抗体自组合噬菌体呈现肽文库中亲和分离特定短肽的能力。随后将这些肽视为用于确定与用来筛选肽文库的抗体相对应的表位的先导(lead)。为进行表位定位,亦开发已显示能够定位构形不连续表位的计算算法。

[0139] 如本文所用,术语“对象”包括任何人类或非人类动物。术语“非人类动物”包括全部脊椎动物,例如哺乳动物及非哺乳动物,诸如非人类灵长类动物、羊、犬、猫、马、乳牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0140] 本发明的多个方面在以下子部分进一步详细描述。

[0141] 本发明涉及抗BST1抗体或其抗原结合部分,其用于预防或治疗MDS。

[0142] 抗BST1抗体

[0143] 用于本发明的抗体特征为抗体的特定功能特征或特性。例如,抗体与人类BST1特异性结合。较佳地,用于本发明的抗体以高亲和力例如以 8×10^{-7} M或更小、甚至更典型地 1×10^{-8} M或更小的 K_D 与BST1结合。抗BST1抗体较佳显示出一或多种以下特征,其中抗体显示出两种特定用途:

[0144] 以50nM或更小、10nM或更小、1nM或更小、100pM或更小,或更佳10pM或更小的EC₅₀与人类BST1结合;

[0145] 与表达BST1的人类细胞结合。

[0146] 在一个实施方式中,抗体较佳与BST1中存在的抗原表位结合,该表位不存在于其他蛋白质中。较佳地,抗体不与相关蛋白质结合,例如,抗体基本上不与其他细胞黏附分子结合。在一个实施方式中,抗体可内化入表达BST1的细胞。评价抗体内化作用的标准分析方法是本领域已知的,包括例如MabZap或HumZap内化分析法。

[0147] 评价抗体针对BST1的结合能力的标准分析法可在蛋白质水平或细胞水平上进行且为本领域已知的,包括例如ELISA、西方墨点法(Western blots)、RIA、**BIAcore**[®]分析法及流式细胞分析。在实施方式中详述适合的分析法。也可通过本领域已知的标准分析法,诸如通过**Biacore**[®]系统分析评估抗体的结合动力学(例如结合亲和力)。为评估与Raji或Daudi B细胞肿瘤细胞的结合,Raji细胞(ATCC保藏号CCL-86)或Daudi细胞(ATCC保藏号CCL-213)可自公众可获得的来源诸如美国菌种保存中心(American Type Culture Collection)获得,且用于标准分析法(诸如流式细胞分析)。

[0148] 单克隆抗体

[0149] 较佳抗体是如实例1-4中所描述而分离且结构表征的单克隆抗体BST1_A2、BST1_A1及BST1_A3。BST1_A2、BST1_A1及BST1_A3之V_H氨基酸序列分别展示于SEQ ID NO:2、1及52中。BST1_A2、BST1_A1及BST1_A3的V_K氨基酸序列分别展示于SEQ ID NO:4、3及53中。

[0150] 鉴于这些抗体中的每一者可结合至BST1,V_H及V_K序列可“经混合及匹配”以产生本发明的其他抗BST1结合分子。此类“经混合及匹配”的抗体之BST1结合可使用上文及实例中所描述的结合分析法(例如ELISA)来测试。较佳地,当V_H及V_K链经混合及匹配时,由特定V_H/V_K配对得到的V_H序列经结构类似的V_H序列置换。同样,较佳地,由特定V_H/V_K配对得到的V_K序列经结构类似的V_K序列置换。

[0151] 因此,在一个方面中,本发明提供一种抗体或其抗原结合部分,其包含:

[0152] 包含选自由2、1、46及52组成之群组的SEQ ID NO:中所述的氨基酸序列的重链可变区及包含选自由4、3、49及53组成之群组的SEQ ID NO:中所述的氨基酸序列的轻链可变区,其中该抗体特异性结合至BST1、较佳人类BST1,其用于预防或治疗MDS。

[0153] 较佳的重链及轻链组合包括:

[0154] 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;或

[0155] 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的轻链可变区;或

[0156] 包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的轻链可变区。

[0157] 在另一方面中,本发明提供抗体,其包含BST1_A2、BST1_A1及BST1_A3的重链及轻链CDR1、CDR2及CDR3或其组合。BST1_A2、BST1_A1及BST1_A3的V_H CDR1的氨基酸序列分别展示于SEQ ID NO:10、9及56中。BST1_A2、BST1_A1及BST1_A3的V_H CDR2的氨基酸序列分别展示于SEQ ID NO:12或51、11及57中。BST1_A2、BST1_A1及BST1_A3的V_H CDR3的氨基酸序列分

别展示于SEQ ID NO:14、13及58中。BST1_A2、BST1_A1及BST1_A3的V_K CDR1的氨基酸序列分别展示于SEQ ID NO:16、15及59中。BST1_A2、BST1_A1及BST1_A3的V_K CDR2的氨基酸序列分别展示于SEQ ID NO:18、17及60中。BST1_A2、BST1_A1及BST1_A3的V_K CDR3的氨基酸序列分别展示于SEQ ID NO:20、19及61中。CDR区是使用Kabat系统描绘[Kabat, E. A. 等(1991)《免疫学热门蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第五版, 美国卫生及公众服务部(US Department of Health and Human Services), NIH出版号91-3242]。

[0158] 鉴于这些抗体中之每一者可结合至BST1且抗原结合特异性主要由CDR1、CDR2及CDR3区提供, V_H CDR1、CDR2及CDR3序列及V_K CDR1、CDR2及CDR3序列可“经混合及匹配”(也即来自不同抗体的CDR可经混合及匹配, 但各抗体通常含有V_H CDR1、CDR2及CDR3及V_K CDR1、CDR2及CDR3)以产生本发明的其他抗BST1结合分子。因此, 本发明具体而言包括重链及轻链的CDR的每种可能组合。

[0159] 此类“经混合及匹配”的抗体的BST1结合可使用上文及实例中所描述的结合分析法(例如ELISA、**Biacore**[®]分析)来测试。较佳地, 当V_H CDR序列经混合及匹配时, 来自特定V_H序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列经结构类似的CDR序列置换。同样, 当V_K CDR序列经混合及匹配时, 来自特定V_K序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列较佳经结构类似的CDR序列置换。对于一般本领域技术人员显而易见, 新颖V_H及V_K序列可通过用来自本文关于单克隆抗体BST1_A2、BST1_A1及BST1_A3所公开的CDR序列的结构类似序列取代一或多个V_H和/或V_L/V_K CDR区序列而产生。

[0160] 因此, 在另一方面中, 本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含:

[0161] 包含选自由SEQ ID NO:10、9及56组成的群组的氨基酸序列的重链可变区CDR1;

[0162] 包含选自由SEQ ID NO:12或51、11及57组成的群组的氨基酸序列的重链可变区CDR2;

[0163] 包含选自由SEQ ID NO:14、13及58组成的群组的氨基酸序列的重链可变区CDR3;

[0164] 包含选自由SEQ ID NO:16、15及59组成的群组的氨基酸序列的轻链可变区CDR1;

[0165] 包含选自由SEQ ID NO:18、17及60组成的群组的氨基酸序列的轻链可变区CDR2;

和

[0166] 包含选自由SEQ ID NO:20、19及61组成的群组的氨基酸序列的轻链可变区CDR3;

[0167] 所有可能组合是可能的, 其中该抗体特异性结合至BST1、较佳人类BST1。

[0168] 本领域熟知, CDR3结构域, 独立于CDR1和/或CDR2结构域, 可单独决定抗体对相应抗原的结合特异性, 且可基于共同CDR3序列可预测地产生具有相同结合特异性之多种抗体。参见例如Klimka等(2000) *British J. of Cancer* 83(2):252-260(描述仅使用鼠类抗CD30抗体Ki-4的重链可变结构域CDR3产生人源化抗CD30抗体); Beiboer等(2000) *J. Mol. Biol.* 296:833-849(描述仅使用亲本鼠类MOC-31抗EGP-2抗体的重链CDR3序列的重组上皮糖蛋白-2(EGP-2)抗体); Rader等(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:8910-8915(描述使用鼠类抗整合素 $\alpha_v\beta_3$ 抗体LM609的重链及轻链可变CDR3结构域的一组人源化抗整合素 $\alpha_v\beta_3$ 抗体, 其中各成员抗体在CDR3结构域外部包含独特序列且能够以与亲本鼠类抗体同样高或更高的亲和力结合与亲本鼠类抗体相同的表位); Barbas等(1994)

J. Am. Chem. Soc. 116:2161-2162 (公开CDR3结构域为抗原结合提供最显著贡献); Barbas等 (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:2529-2533 (描述将针对人类胎盘DNA之三种Fab (SI-1、SI-40及SI-32) 的重链CDR3序列移植至抗破伤风类毒素Fab的重链上并置换现有重链CDR3, 且证实该CDR3结构域单独赋予结合特异性); 和Ditzel等 (1996) J. Immunol. 157:739-749 (描述移植研究, 其中仅将亲本多特异性Fab LNA3的重链CDR3转移至单特异性IgG结合破伤风类毒素的Fab p313抗体的重链即足以保留亲本Fab的结合特异性)。这些参考文献中之每一者均特此以引用的方式完整地并入。

[0169] 因此, 本发明提供包含一或多个重链和/或轻链CDR3结构域的单克隆抗体用于预防或治疗MDS, 这些CDR3结构域来自衍生于人类或非人类动物的抗体, 其中该单克隆抗体能够与BST1特异性结合。在某些方面内, 本发明提供包含一或多个重链和/或轻链CDR3结构域的单克隆抗体用于预防或治疗MDS, 该CDR3结构域来自非人类抗体诸如小鼠或大鼠抗体, 其中该单克隆抗体能够与BST1特异性结合。在一些实施方式内, 包含来自非人类抗体之一或多个重链和/或轻链CDR3结构域的这些本发明抗体 (a) 能够与相应的亲本非人类抗体竞争结合; (b) 保留相应的亲本非人类抗体的功能特征; (c) 结合与相应的亲本非人类抗体相同的表位; 和/或 (d) 具有与相应的亲本非人类抗体相似的结合亲和力。

[0170] 在其他方面内, 本发明提供包含一或多个重链和/或轻链CDR3结构域的单克隆抗体用于预防或治疗MDS, 这些CDR3结构域来自人类抗体, 诸如自非人类动物获得的人类抗体, 其中该人类抗体能够与BST1特异性结合。在其他方面内, 本发明提供包含一或多个重链和/或轻链CDR3结构域的单克隆抗体用于预防或治疗MDS, 该CDR3结构域来自第一人类抗体, 诸如自非人类动物获得的人类抗体, 其中第一人类抗体能够与BST1特异性结合, 且其中来自第一人类抗体的CDR3结构域置换对BST1缺少结合特异性之人类抗体中的CDR3结构域, 以产生能够与BST1特异性结合的第二人类抗体。在一些实施方式内, 包含来自第一人类抗体之一或多个重链和/或轻链CDR3结构域的这些本发明抗体 (a) 能够与相应的亲本第一人类抗体竞争结合; (b) 保留相应的亲本第一人类抗体的功能特征; (c) 结合与相应的亲本第一人类抗体相同的表位; 和/或 (d) 具有与相应的亲本第一人类抗体相似的结合亲和力。

[0171] 具有特定生殖系序列的抗体

[0172] 在某些实施方式中, 根据本发明使用的抗体包含来自特定生殖系重链免疫球蛋白基因的重链可变区和/或来自特定生殖系轻链免疫球蛋白基因的轻链可变区。

[0173] 例如, 在一较佳实施方式中, 分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含作为鼠类V_H 1-39基因、鼠类V_H 1-80基因或鼠类V_H 69-1基因之产物或源自鼠类V_H1-39基因、鼠类V_H 1-80基因或鼠类V_H 69-1基因的重链可变区, 其中该抗体与BST1特异性结合。在又一较佳实施方式中, 分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含作为鼠类V_K 4-55基因、鼠类V_K 4-74基因或鼠类V_K 44-1基因的产物或源自鼠类V_K 4-55基因、鼠类V_K 4-74基因或鼠类V_K 44-1基因的轻链可变区, 其中该抗体与BST1特异性结合。

[0174] 在又一较佳实施方式中, 分离的单克隆抗体或其抗原结合部分:

[0175] 包含作为鼠类V_H 1-39基因 (该基因包括SEQ ID NO:35及36中所述的核苷酸序列) 的产物或源自鼠类V_H 1-39基因的重链可变区; 包含作为鼠类V_K 4-55基因 (该基因包括SEQ ID NO:40、41及42中所述的核苷酸序列) 的产物或源自鼠类V_K 4-55基因的轻链可变区; 且与BST1、较佳人类BST1特异性结合。具有V_H 1-39及V_K 4-55基因 (具有上文描述的序列) 的抗

体的实例是BST1_A2。

[0176] 在又一较佳实施方式中,分离的单克隆抗体或其抗原结合部分:

[0177] 包含作为鼠类V_H 1-80基因(该基因包括SEQ ID NO:33及34中所述的核苷酸序列)的产物或源自鼠类V_H 1-80基因的重链可变区;包含作为鼠类V_K 4-74基因(该基因包括SEQ ID NO:37、38及39中所述的核苷酸序列)的产物或源自鼠类V_K 4-74基因的轻链可变区;且与BST1、较佳人类BST1特异性结合。具有V_H 1-80及V_K 4-74基因(具有上文描述的序列)的抗体的实例是BST1_A1。

[0178] 在又一较佳实施方式中,分离的单克隆抗体或其抗原结合部分:

[0179] 包含作为鼠类V_H 69-1基因(该基因包括SEQ ID NO:68及69中所述的核苷酸序列)的产物或源自鼠类V_H 69-1基因的重链可变区;包含作为鼠类V_K 44-1基因(该基因包括SEQ ID NO:70、71及72中所述的核苷酸序列)的产物或源自鼠类V_K 44-1基因的轻链可变区;且与BST1、较佳人类BST1特异性结合。具有V_H及V_K基因(具有上文描述的序列)的抗体的实例是BST1_A3。

[0180] 如本文所用,若抗体的可变区自使用鼠类生殖系免疫球蛋白基因的系统获得,则抗体包含作为特定生殖系序列“的产物”或“源自”特定生殖系序列的重链或轻链可变区。这些系统包括,用目的抗原筛选噬菌体上呈现之鼠类免疫球蛋白基因文库。因此可通过以下方式鉴别作为鼠类生殖系免疫球蛋白序列“的产物”或“源自”鼠类生殖系免疫球蛋白序列的抗体:将抗体的核苷酸或氨基酸序列与鼠类生殖系免疫球蛋白的核苷酸或氨基酸序列比较,且选出在序列方面与抗体的序列最接近(也即最大一致性%)的鼠类生殖系免疫球蛋白序列。作为特定鼠类生殖系免疫球蛋白序列“的产物”或“源自”特定鼠类生殖系免疫球蛋白序列的抗体与该生殖系序列相比,可含有氨基酸差异,例如因天然存在之体细胞突变或人为引入的定点突变所致的氨基酸差异。然而,选择的抗体典型地在氨基酸序列上与鼠类生殖系免疫球蛋白基因所编码的氨基酸序列至少90%一致,且含有与其他物种之生殖系免疫球蛋白氨基酸序列(例如人类生殖系序列)相比时,将该抗体鉴别为鼠类的氨基酸残基。在某些情况下,抗体可在氨基酸序列上与生殖系免疫球蛋白基因所编码的氨基酸序列至少95%,或甚至至少96%、97%、98%或99%一致。典型地,源自特定鼠类生殖系序列的抗体与鼠类生殖系免疫球蛋白基因所编码的氨基酸序列相比,显示不多于10个氨基酸的差异。在某些情况下,抗体与生殖系免疫球蛋白基因所编码的氨基酸序列相比,可显示不多于5个,或甚至不多于4、3、2或1个氨基酸的差异。

[0181] 同源抗体

[0182] 在又一实施方式中,根据本发明使用的抗体包含重链及轻链可变区,这些可变区包含与本文所述的较佳抗体的氨基酸序列同源的氨基酸序列,且其中这些抗体保留本文所述的抗BST1抗体的期望的功能特性。

[0183] 例如,分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含重链可变区及轻链可变区,其中:该重链可变区包含与选自由SEQ ID NO:2、1、46及52组成的群组的氨基酸序列至少80%一致的氨基酸序列;该轻链可变区包含与选自由SEQ ID NO:4、3、49、53组成的群组的氨基酸序列至少80%一致的氨基酸序列;且抗体与人类BST1结合。这些抗体可以50nM或更小、10nM或更小、1nM或更小、100pM或更小,或更佳10pM或更小的EC₅₀与人类BST1结合。

[0184] 抗体也可与用人类BST1转染的CHO细胞结合。

[0185] 在多种实施方式中,抗体可为例如人类抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0186] 在其他实施方式中, V_H 和/或 V_K 氨基酸序列可与上文所述的序列85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或100%同源。可通过以下方式获得具有与上文所述序列的 V_H 及 V_K 区高度一致(也即80%或更大)的 V_H 及 V_K 区的抗体:突变诱发(例如定点或PCR介导之突变诱发)编码SEQ ID NO:6、5、8、7、54及55的核酸分子,随后使用本文所述的功能分析法,针对保留的功能测试编码的改变的抗体。

[0187] 两个序列之间的一致性百分比是这些序列所共有的一致位置的数目的函数(也即同源性% = 一致位置数目/总位置数目 × 100),考虑为最佳比对两个序列而需要引入的空隙之数目及各空隙的长度。可使用如下文非限制性实例中所述的数学算法,完成两个序列之间的序列的比较及一致性百分比的确定。

[0188] 可利用已并入ALIGN程序(2.0版)之E. Meyers及W. Miller算法[Comput. Appl. Biosci. (1988) 4:11-17],使用PAM120加权余数表、12之空隙长度罚分,4之空隙罚分,确定两个氨基酸序列之间的一致性百分比。此外,可使用已并入GCG软件包(在<http://www.gcg.com>可获得)之GAP程序中的Needleman及Wunsch[J. Mol. Biol. (1970) 48:444-453]算法,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,及16、14、12、10、8、6或4的空隙权重(gap weight),及1、2、3、4、5或6的长度权重,确定两个氨基酸序列之间的一致性百分比。

[0189] 另外或替代地,可进一步使用本发明的蛋白质序列作为“查询序列”以针对公共数据库进行搜寻,以例如鉴别相关序列。这些搜寻可使用Altschul等(1990) J. Mol. Biol. 215:403-10的XBLAST程序(2.0版)进行。可用XBLAST程序、记分=50、字长=3进行BLAST蛋白质搜寻,以获得与本发明的抗体分子同源的氨基酸序列。为获得带空隙的比对(出于比较目的),可如Altschul等(1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402所述,使用有空隙的BLAST。当使用BLAST及有空隙的BLAST程序时,可使用各别程序(例如XBLAST及NBLAST)的预设参数。参见www.ncbi.nlm.nih.gov。

[0190] 具有保守修饰的抗体

[0191] 在某些实施方式中,根据本发明使用的抗体包含重链可变区,该重链可变区包含CDR1、CDR2及CDR3序列;和轻链可变区,该轻链可变区包含CDR1、CDR2及CDR3序列,其中这些CDR序列中之一或多个者包含基于本文所述的较佳抗体(例如BST1_A2、BST1_A1及BST1_A3)的指定氨基酸序列,或其保守修饰,且其中这些抗体保留本发明的抗BST1抗体的期望的功能特性。因此,本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,该分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含重链可变区,该重链可变区包含CDR1、CDR2及CDR3序列;和轻链可变区,该轻链可变区包含CDR1、CDR2及CDR3序列,其中:重链可变区CDR3序列包含选自自由SEQ ID NO:14、13及58的氨基酸序列组成之群组的氨基酸序列及其保守修饰;轻链可变区CDR3序列包含选自自由SEQ ID NO:20、19及61之氨基酸序列组成之群组的氨基酸序列及其保守修饰;且该抗体以50nM或更小、10nM或更小、1nM或更小、100pM或更小,或更佳10pM或更小的 EC_{50} 与人类BST1结合。

[0192] 抗体也可与用人类BST1转染的CHO细胞结合。

[0193] 在一较佳实施方式中,重链可变区CDR2序列包含选自自由SEQ ID NO:12或51、11及57之氨基酸序列组成之群组的氨基酸序列及其保守修饰;且轻链可变区CDR2序列包含选自自由SEQ ID NO:18、17及60之氨基酸序列组成之群组的氨基酸序列及其保守修饰。在另一较

佳实施方式中,重链可变区CDR1序列包含选自由SEQ ID NO:10、9及56的氨基酸序列组成之群组的氨基酸序列及其保守修饰;且轻链可变区CDR1序列包含选自由SEQ ID NO:16、15及59的氨基酸序列组成之群组的氨基酸序列及其保守修饰。在另一较佳实施方式中,重链可变区CDR3序列包含选自由SEQ ID NO:14、13及58的氨基酸序列组成之群组的氨基酸序列及其保守修饰;且轻链可变区CDR3序列包含选自由SEQ ID NO:20、19及61的氨基酸序列组成之群组的氨基酸序列及其保守修饰。

[0194] 在一较佳实施方式中,重链可变区CDR2序列包含选自由SEQ ID NO:12或51、11及57的氨基酸序列组成之群组的氨基酸序列及其保守修饰;且轻链可变区CDR2序列包含选自由SEQ ID NO:18、17及60的氨基酸序列组成之群组的氨基酸序列及其保守修饰。在另一较佳实施方式中,重链可变区CDR1序列包含选自由SEQ ID NO:10、9及56的氨基酸序列组成之群组的氨基酸序列及其保守修饰;且轻链可变区CDR1序列包含选自由SEQ ID NO:16、15及59的氨基酸序列组成之群组的氨基酸序列及其保守修饰。

[0195] 在多种实施方式中,抗体可为例如人类抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0196] 如本文所用,术语“保守序列修饰”意指不显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。这些保守修饰包括氨基酸取代、添加及缺失。可通过本领域已知的标准技术,诸如定点突变诱发及PCR介导之突变诱发向本发明的抗体引入修饰。保守氨基酸取代是氨基酸残基经具有相似侧链的氨基酸残基置换的氨基酸取代。本领域已定义具有相似侧链的氨基酸残基之家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、白氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β -分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)及芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)之氨基酸。因而,可将本文所公开的抗体的CDR区内之一或多个氨基酸残基置换为来自相同侧链家族的其他氨基酸残基,且可使用本文所述的功能分析法,针对保留的功能测试改变的抗体。

[0197] SEQ ID NO:10、9及56的重链CDR1序列可包含一或多个保守序列修饰,诸如一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代、添加或缺失;SEQ ID NO:16、15及59的轻链CDR1序列可包含一或多个保守序列修饰,诸如一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代、添加或缺失;SEQ ID NO:12或51、11及57中所示的重链CDR2序列可包含一或多个保守序列修饰,诸如一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代、添加或缺失;SEQ ID NO:18、17及60中所示的轻链CDR2序列可包含一或多个保守序列修饰,诸如一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代、添加或缺失;SEQ ID NO:14、13及58中所示的重链CDR3序列可包含一或多个保守序列修饰,诸如一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代、添加或缺失;和/或SEQ ID NO:20、19及61中所示的轻链CDR3序列可包含一或多个保守序列修饰,诸如一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代、添加或缺失。

[0198] 结合与本发明抗BST1抗体相同的表位的抗体

[0199] 在另一实施方式中,提供根据本发明使用的抗体,其与用于本发明的BST1单克隆抗体中之任一者结合至人类BST1上的相同表位(也即具有与本发明的单克隆抗体中之任一者交叉竞争结合至BST1的能力的抗体)。在较佳实施方式中,用于交叉竞争研究之参考抗体可为单克隆抗体BST1_A2(具有分别如SEQ ID NO:2及4或46及49中所示之 V_H 及 V_K 序列)、单克

隆抗体BST1_A1 (具有分别如SEQ ID NO:1及3中所示之V_H及V_K序列)、单克隆抗体BST1_A3 (具有分别如SEQ ID NO:52及53中所示之V_H及V_K序列)。

[0200] 这些交叉竞争性抗体可基于其在标准BST1结合分析法中与BST1_A2、BST1_A1及BST1_A3交叉竞争之能力来进行鉴别。例如,BIAcore分析、ELISA分析法或流式细胞术可用以展示与本发明抗体的交叉竞争。测试抗体抑制例如BST1_A2、BST1_A1及BST1_A3与人类BST1结合的能力表明,测试抗体可与BST1_A2、BST1_A1或BST1_A3竞争与人类BST1的结合且因此结合人类BST1_A2、BST1_A1或BST1_A3上的相同表位。

[0201] 工程化及修饰的抗体

[0202] 可使用具有本文所公开的一或多个V_H和/或V_L序列的抗体(其可用作起始材料来工程化修饰的抗体)来制备本文所公开的抗体,与起始抗体相比,该修饰的抗体可具有改变之特性。可通过修饰一或两个可变区(也即V_H和/或V_L)内,例如一或多个CDR区内和/或一或多个框架区内之一或多个氨基酸,将抗体工程化。另外或替代地,可通过修饰恒定区内的残基(例如以改变抗体的效应功能),将抗体工程化。

[0203] 在某些实施方式中,CDR移植可用以将抗体的可变区工程化。抗体主要经由位于六个重链及轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。出于此原因,个别抗体之间CDR内的氨基酸序列比CDR外的序列更多样。因为CDR序列负责大部分的抗体-抗原相互作用,所以有可能通过构建表达载体来表达模拟天然存在之特定抗体的特性之重组抗体,其中这些表达载体包括来自该天然存在之特定抗体的CDR序列,这些CDR序列移植至来自具有不同特性的不同抗体的框架序列上(参见例如Riechmann,L.等(1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P.等(1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C.等(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:10029-10033; Winter的美国专利第5,225,539号;和Queen等的美国专利第5,530,101号、第5,585,089号、第5,693,762号及第6,180,370号)。

[0204] 因此,本发明的另一实施方式涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含:包含分别包含选自由SEQ ID NO 10、9及56;12或51、11及57;和14、13及58组成的群组的氨基酸序列的CDR1、CDR2及CDR3序列的重链可变区,及包含分别包含选自由SEQ ID NO: 16、15及59;18、17及60;和20、19及61组成的群组的氨基酸序列的CDR1、CDR2及CDR3序列的轻链可变区。因此,此类抗体含有单克隆抗体BST1_A2、BST1_A1及BST1_A3的V_H及V_K CDR序列,又可含有与这些抗体不同的框架序列。

[0205] 这些框架序列可从包括生殖系抗体基因序列的公共DNA数据库或公布的参考文献中获得。例如,鼠类重链及轻链可变区基因的生殖系DNA序列可在IMGT(国际ImMunoGeneTics)鼠类生殖系序列数据库(可在超文本传送协议//www.imgt.cines.fr/?获得)中以及在Kabat,E.A.等(1991)《免疫学热门蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第五版,美国卫生及公众服务部,NIH出版号91-3242中找到;其中的每一者的内容明确地以引用的方式并入本文。作为另一实例,鼠类重链及轻链可变区基因的生殖系DNA序列可在Genbank数据库中找到。

[0206] 使用本领域技术人员熟知的称作有空隙的BLAST的序列相似性搜寻方法之一[Altschul等(1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402],将抗体蛋白质序列针对汇编的蛋白质序列数据库进行比较。BLAST是一种试探性算法,其中抗体序列与数据库序列之间的统计学显著比对可能含有所比对字的高计分片段对(HSP)。记分无法通过扩展或修剪

而提高的片段对称作命中 (hit)。简言之,翻译数据库中的核苷酸序列,且保留FR1至FR3框架区之间且包括FR1至FR3框架区的区。数据库序列具有98个残基的平均长度。移除在蛋白质的整个长度范围内精确匹配的重复序列。使用程序blastp,默认标准参数(低复杂性过滤器例外,其关闭)及取代矩阵BLOSUM62、用于产生序列匹配的前5个命中的过滤器,进行蛋白质的BLAST搜寻。翻译全部六个框架中的核苷酸序列,且将数据库序列之匹配区段中无终止密码子的框架视为潜在命中。此进而使用BLAST程序tblastx来证实,该tblastx翻译全部六个框架中的抗体序列,且将那些翻译与数据库中全部六个框架内动态翻译的核苷酸序列相比较。

[0207] 一致性是在整个序列长度范围内抗体序列与蛋白质数据库之间的精确氨基酸匹配。阳性(一致性+取代匹配)不为一致,但存在由BLOSUM62取代矩阵指导的氨基酸取代。若抗体序列以相同一致性匹配两个数据库序列,则将具有最多阳性的命中确定为匹配性序列命中。

[0208] 用于本文所公开的抗体的较佳框架序列是如下序列,其在结构上与选择的本发明抗体所使用的框架序列相似,例如,与本发明的较佳单克隆抗体所使用的V_H 1-80框架序列、V_H 1-39框架序列、V_K 4-74框架序列和/或V_K 4-55框架序列相似。可将V_H CDR1、CDR2及CDR3序列及V_K CDR1、CDR2及CDR3序列移植至如下框架区上,这些框架区的序列与框架序列来源的生殖系免疫球蛋白基因中存在的序列一致,或可将这些CDR序列移植至与生殖系序列相比含有一或多个突变的框架区上。例如,已发现在某些情况下,使框架区内的残基突变有益于维持或增强抗体的抗原结合能力(参见例如,Queen等的美国专利第5,530,101号、第5,585,089号、第5,693,762号及第6,180,370号)。

[0209] 另一类型的可变区修饰是使V_H和/或V_K CDR1区、CDR2区和/或CDR3区内的氨基酸残基突变,以改良目的抗体之一或多种结合特性(例如亲和力)。可进行定点突变诱发或PCR介导的突变诱发以引入突变,且可在如本文所述及实例中提供的活体外或活体内分析法中评价对抗体结合或其他目的功能特性的影响。在一些实施方式中,引入保守修饰(如上文所讨论)。替代地,可进行非保守修饰。突变可为氨基酸取代、添加或缺失,但较佳为取代。另外,典型地改变CDR区内的不多于一个、两个、三个、四个或五个残基,但如本领域技术人员所理解,其他区域(例如框架区)内的变异体可更大。

[0210] 因此,在另一实施方式中,本发明提供分离的抗BST1单克隆抗体或其抗原结合部分,其包括包含以下的重链可变区:(a)包含选自由SEQ ID NO:10、9及56组成的群组的氨基酸序列或与SEQ ID NO:10、9及56相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的V_H CDR1区;(b)包含选自由SEQ ID NO:12或51、11及57组成的群组的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12或51、11及57相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加之氨基酸序列的V_H CDR2区;(c)包含选自由SEQ ID NO:14、13及58组成的群组的氨基酸序列或与SEQ ID NO:14、13及58相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加之氨基酸序列的V_H CDR3区;(d)包含选自由SEQ ID NO:16、15及59组成的群组的氨基酸序列或与SEQ ID NO:16、15及59相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加之氨基酸序列的V_K CDR1区;(e)包含选自由SEQ ID NO:18、17及60组成的群组的氨基酸序列或与SEQ ID NO:18、17及60相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加之氨基酸序列的V_K CDR2区;和(f)包含选自由SEQ ID NO:20、19

及61组成的群组的氨基酸序列或与SEQ ID NO:20、19及61相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的V_K CDR3区。

[0211] 本发明的工程化抗体包括例如为改良抗体特性而对V_H和/或V_K内的框架残基进行修饰的抗体。典型地,进行这些框架修饰以降低抗体的免疫原性。例如,一种方法是将一或多个框架残基“回复突变”成相应的生殖系序列。更特定言之,已经历体细胞突变的抗体可含有与该抗体所来源的生殖系序列不同的框架残基。可通过将抗体框架序列与该抗体所来源的生殖系序列比较而鉴别这些残基。

[0212] 另一类型的框架修饰涉及,使框架区内,或甚至一或多个CDR区内之一或多个残基突变,以移除T细胞表位,从而降低抗体的潜在免疫原性。此方法亦称作“去免疫化”且在美国专利公开案第2003/0153043号中更详细地描述。

[0213] 除了在框架区或CDR区内进行修饰之外或作为替代,本文所公开的抗体可进行工程化以在Fc区内包括修饰,典型地旨在改变抗体之一或多种功能特性,诸如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞的细胞毒性。另外,本文所公开的抗体可进行化学修饰(例如可将一或多个化学部分与抗体连接)或进行修饰以改变其糖基化,此再次旨在改变抗体之一或多种功能特性。下文进一步详细描述这些实施方式中之每一者。Fc区中残基的编号是Kabat的EU索引的编号。

[0214] 在一个实施方式中,修饰C_H1的铰链区,以便改变(例如增加或减少)铰链区中半胱氨酸残基的数目。此方法在美国专利第5,677,425号中进一步描述。改变C_H1的铰链区中半胱氨酸残基的数目,以便例如促进轻链及重链的组装或提高或降低抗体的稳定性。

[0215] 在另一实施方式中,将抗体的Fc铰链区突变以减少抗体的生物性半衰期。更特定言之,将一或多种氨基酸突变引入Fc-铰链片段的C_H2-C_H3结构域界面区,以便相对于天然Fc-铰链结构域SpA结合,抗体具有削弱的葡萄球菌蛋白A(SpA)结合。此方法在美国专利第6,165,745号中进一步详细描述。

[0216] 在另一实施方式中,将抗体修饰以增加其生物性半衰期。多种方法都是可能的。例如,可引入一或多个以下突变:T252L、T254S、T256F,如美国专利第6,277,375号中所述。替代地,为增加生物性半衰期,可在C_H1或C_L区内改变抗体以含有救助受体(salvage receptor)结合表位,该救助受体结合表位取自IgG的Fc区的C_H2结构域的两个环,如美国专利第5,869,046号及第6,121,022号中所述。

[0217] 在另一实施方式中,该抗体以单抗体产生,如以引用的方式完整并入本文的W02007/059782中所述。

[0218] 在其他实施方式中,通过以下方式改变Fc区:将至少一个氨基酸残基替换成不同氨基酸残基以改变抗体的效应功能。例如,可将选自氨基酸残基234、235、236、237、297、318、320及322之一或多个氨基酸替换成不同氨基酸残基,以便抗体具有改变的效应配体亲和力,但保留亲本抗体的抗原结合能力。亲和力改变的效应配体可为例如Fc受体或补体的C1组分。此方法在美国专利第5,624,821号及第5,648,260号中进一步详细描述。

[0219] 在另一实例中,可将选自氨基酸残基329、331及322之一或多个氨基酸替换成不同氨基酸残基,以便抗体具有改变的C1q结合和/或降低或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。此方法在美国专利第6,194,551号中进一步详细描述。

[0220] 在另一实例中,改变氨基酸位置231及239内之一或多个氨基酸残基,以改变抗体

固定补体的能力。此方法在PCT公开案W0 94/29351中进一步描述。

[0221] 在又一实例中,通过修饰以下位置处之一或多个氨基酸:238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438或439,来修饰Fc区以增加抗体介导抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)之能力和/或以增加抗体对Fc γ 受体之亲和力。此方法在Presta之PCT公开案W0 00/42072中进一步描述。另外,已定位人类IgG1上Fc γ R1、Fc γ RII、Fc γ RIII及FcRn的结合位点,且已描述具有改良的结合的变异体(参见Shields,R.L.等(2001)J.Biol.Chem.276:6591-6604)。已显示,在位置256、290、298、333、334及339处的特定突变改良与Fc γ RIII的结合。另外,以下组合突变体显示改良Fc γ RIII结合:T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224A及S298A/E333A/K334A。其他的ADCC变异体例如在W02006/019447中描述。

[0222] 在又一实例中,修饰Fc区以增加抗体的半衰期,通常通过增加与FcRn受体的结合来实现,如例如PCT/US2008/088053、US 7,371,826、US 7,670,600及W097/34631中所描述。在另一实施方式中,修饰抗体以增加其生物性半衰期。多种方法都是可能的。例如,可引入一或多个以下突变:T252L、T254S、T256F,如Ward之美国专利第6,277,375号中所述。替代地,为增加生物性半衰期,可在C_H1或C_L区内改变抗体以含有救助受体结合表位,该救助受体结合表位取自IgG的Fc区的C_H2结构域的两个环,如美国专利第5,869,046号及第6,121,022号中所述。

[0223] 在又一实施方式中,修饰抗体的糖基化。例如,可产生无糖基化的抗体(也即缺少糖基化的抗体)。可改变糖基化以便例如增加抗体对抗原的亲和力。这些碳水化合物修饰可通过例如改变抗体序列内之一或多个糖基化位点来完成。例如,可产生一或多个氨基酸取代,这些氨基酸取代导致消除一或多个可变区框架糖基化位点,从而消除在该位点处之糖基化。该无糖基化可增加抗体对抗原的亲和力。此类方法在Co等的美国专利第5,714,350号及第6,350,861号中进一步详细描述,且可通过移除位置297处的天冬酰胺实现。

[0224] 另外或替代地,可产生抗体,该抗体具有改变的糖基化类型,诸如具有减少之岩藻糖基残基数目的低岩藻糖基化抗体或具有增加的二分GlcNac结构的抗体。在本领域,此有时称作“工程化糖型”。这些改变的糖基化模式已据证实可增加抗体之ADCC能力。这些碳水化合物修饰通常可以两种方式完成;例如,在一些实施方式中,在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体。本领域已描述具有改变的糖基化机制的细胞且其可用作表达本发明重组抗体之宿主细胞,从而产生具有改变的糖基化的抗体。参考POTELLIGENT®技术。例如,细胞株Ms704、Ms705及Ms709缺少岩藻糖基转移酶基因FUT8(α (1,6)岩藻糖基转移酶),以便在Ms704、Ms705及Ms709细胞株中表达的抗体在其碳水化合物上缺少岩藻糖。通过使用两种置换载体在CHO/DG44细胞中靶向破坏FUT8基因而产生Ms704、Ms705及Ms709 FUT8^{-/-}细胞株[参见美国专利公开案第2004/0110704号、美国专利第7,517,670号及Yamane-Ohnuki等(2004)Biotechnol.Bioeng.87:614-22]。作为另一实例,Hanai等的EP 1,176,195描述具有功能上破坏的FUT8基因的细胞株,该FUT8基因编码岩藻糖基转移酶,以便在此类细胞株中表达的抗体因减少或消除 α 1,6键相关酶而显示出低岩藻糖基化。Hanai等亦描述如下细胞株,其具有添加岩藻糖至与抗体的Fc区结合的N-乙酰葡萄糖胺的低酶活性或

不具有该酶活性,例如大鼠骨髓瘤细胞株YB2/0(ATCC CRL 1662)。替代地,可使用糖基化途径酶的小分子抑制剂制备工程化糖型,尤其进行无岩藻糖化[参见例如Rothman等(1989) *Mol. Immunol.* 26(12):113-1123;Elbein(1991) *FASEB J.* 5:3055;PCT/US2009/042610;和美国专利第7,700,321号]。PCT公开案W0 03/035835描述一种变异CHO细胞株,Lec13细胞,该细胞株具有降低的连接岩藻糖至Asn(297)-连接的碳水化合物的能力,此亦导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化[也参见Shields,R.L.等(2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740]。PCT公开案W0 99/54342描述经工程化以表达修饰糖蛋白的糖基转移酶(例如 $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖氨基转移酶III(GnTIII))的细胞株,以便在工程化的细胞株中表达的抗体显示出增加的二分GlcNac结构,此导致抗体的增加的ADCC活性[也参见Umana等(1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180]。

[0225] 替代地,可使用岩藻糖苷酶裂解抗体的岩藻糖残基。例如,岩藻糖苷酶 α -L-岩藻糖苷酶自抗体移除岩藻糖基残基[Tarentino,A.L.等(1975) *Biochem.* 14:5516-23]。

[0226] 本发明涵盖的本文中抗体的另一修饰是聚乙二醇化。抗体可进行聚乙二醇化以例如增加抗体的生物性(例如血清)半衰期。为使抗体聚乙二醇化,典型地使抗体或其片段与聚乙二醇(PEG)诸如PEG的活性酯或醛衍生物在一或多个PEG基团变得与抗体或抗体片段连接的条件反应。较佳地,可经由与反应性PEG分子(或类似的反应性水溶性聚合物)之酰化反应或烷化反应实施聚乙二醇化。如本文所用,术语“聚乙二醇”意欲包括,已用以衍生其他蛋白质的任何形式之PEG,诸如单(C1-C10)烷氧基或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-顺丁烯二酰亚胺。在某些实施方式中,待聚乙二醇化的抗体是无糖基化的抗体。使蛋白质聚乙二醇化的方法是本领域已知的且可适用于本发明的抗体。参见例如EP0154316及EP 0401384。

[0227] 在另外的实施方式中,例如在将本发明抗体用于诊断或侦测用途时,抗体可包含标记。“标记的”在本文中意指,化合物连接有至少一种元素、同位素或化学化合物以实现化合物之侦测。一般而言,标记分成三类:a)同位素标记,其可为放射性同位素或重同位素;b)磁力的、电学的、热学的标记;和c)有色或发光染料;但标记也可包括酶及颗粒,诸如磁性颗粒。较佳标记包括但不限于荧光镧系元素络合物(包括铈及铽之络合物);和荧光标记,包括但不限于量子点、荧光素、若丹明(rhodamine)、四甲基若丹明、伊红、赤藓红、香豆素、甲基-香豆素、苝、Malacite绿、芪、荧光黄(Lucifer Yellow)、Cascade蓝、得克萨斯红(Texas Red)、Alexa染料、Cy染料及在Richard P.Haugland的《分子探针手册》(*Molecular Probes Handbook*)第6版中描述的其他标记,该文献明确地以引用的方式并入本文。

[0228] 接头

[0229] 还提供根据本发明使用的抗体-伴侣偶联物,其中抗体经化学接头与伴侣连接。在一些实施方式中,接头是肽基接头;其他接头包括胍接头及二硫桥键接头。除接头与伴侣连接之外,本发明还提供可裂解之接头臂,这些接头臂适宜连接基本上任何分子物种。在本文中通过参考本发明的接头臂与治疗性部分的连接来例举接头臂方面。然而,对于本领域技术人员显而易见,接头可连接至多样的物种,包括但不限于诊断剂、分析剂、生物分子、靶向剂、可检测标记物及其类似物。

[0230] 肽基接头及其他接头在抗体-伴侣偶联物中的用途描述于美国临时专利申请案第60/295,196号、第60/295,259号、第60/295342号、第60/304,908号、第60/572,667号、第60/661,174号、第60/669,871号、第60/720,499号、第60/730,804号及第60/735,657号及美国

专利申请案第10/160,972号、第10/161,234号、第11/134,685号、第11/134,826号及第11/398,854号以及美国专利第6,989,452号及PCT专利申请案第PCT/US2006/37793号中,这些文献均以引用的方式并入本文。另外的接头描述于美国专利第6,214,345号;美国专利申请案2003/0096743;和美国专利申请案2003/0130189;de Groot等,J.Med.Chem.42,5277(1999);de Groot等,J.Org.Chem.43,3093(2000);de Groot等,J.Med.Chem.66,8815,(2001);WO 02/083180;Carl等,J.Med.Chem.Lett.24,479,(1981);Dubowchik等,Bioorg&Med.Chem.Lett.8,3347(1998);和美国临时专利申请案第60/891,028号中。

[0231] 在一个方面中,本发明涉及可用于将靶向基团与治疗剂及标志物连接的接头。在另一方面中,本发明提供赋予给化合物稳定性、降低其等活体内毒性或另外有利地影响其等药物代谢动力学、生物可用性和/或药效动力学的接头。通常较佳地,在这些实施方式中,一旦将药物递送至其作用位点,该接头会经裂解而释放出活性药物。因而,在一个实施方式中,接头是无痕的,以便一旦自治疗剂或标志物移除(诸如在活化期间),不留下存在接头的痕迹。在另一实施方式中,接头之特征在于,其在靶细胞中或其附近的位点处(诸如在治疗作用或标志物活性的位点处)裂解的能力。该裂解本质上可为酶促的。此特征有助于减少治疗剂或标志物之全身性活化,从而降低毒性及全身副作用。用于酶促裂解之较佳可裂解基团包括肽键、酯键及二硫桥键。在其他实施方式中,这些接头对pH敏感且可透由pH的变化进行裂解。

[0232] 本发明的一方面是控制接头裂解的速度的能力。通常需要迅速裂解的接头。然而,在一些实施方式中,更缓慢裂解的接头是较佳的。例如,在持续释放制剂中或在含有快速释放组分及缓慢释放组分之制剂中,提供更缓慢裂解的接头可能为有用的。WO 02/096910提供几种具有胍接头的特定配体-药物复合物。然而,没有办法视所需要的环化速率而“调节”接头组成,且所描述的特定化合物以更缓慢速率(与许多药物-接头偶联物的较佳速率相比)自药物裂解配体。相比之下,胍接头提供一系列环化速率(自极快至极慢),因而允许基于所需的环化速率选择特定胍接头。

[0233] 例如,可用裂解时产生单个5员环的胍接头实现极快环化。使用如下胍接头实现向细胞靶向递送细胞毒性剂的较佳环化速率,这些胍接头在裂解时产生两个5员环或单个6员环(其由在偕位(geminal position)具有两个甲基的接头产生)。已显示,与在偕位不具有两个甲基之单个6员环相比,偕二甲基效应使环化反应速率加速。这是由于应力在环中得到缓解所致。然而,取代基有时可减缓反应,而非使加速反应。阻滞的原因经常可归因于位阻。例如,与偕碳为CH₂时相比,偕二甲基取代允许发生快得多的环化反应。

[0234] 然而,重要的是注意到,在一些实施方式中,更缓慢裂解的接头可为较佳的。例如,在持续释放制剂中或在含有快速释放组分及缓慢释放组分的制剂中,提供更缓慢裂解的接头可为有用的。在某些实施方式中,使用胍接头实现慢环化速率,该胍接头在裂解时产生单个6员环(无偕二甲基取代)或产生单个7员环。这些接头亦用于使治疗剂或标志物在循环时稳定化,防止降解。此特征提供显著益处,因为该稳定化导致延长连接的试剂或标志物的循环半衰期。接头亦用于减弱连接的试剂或标志物的活性,以便偶联物在循环时为相对良性的且在期望的作用位点活化后具有期望的作用,例如具有毒性。对于治疗剂偶联物,接头之此特征用于改良试剂的治疗指数。

[0235] 较佳地,选择稳定化基团以限制治疗剂或标志物被可能存在于血液或非靶组织中

的酶清除及代谢,且进一步选择其以限制试剂或标志物转运至细胞中。稳定化基团用于阻断试剂或标志物的降解,且也可用于提供试剂或标志物之其他物理特征。稳定化基团也可提高试剂或标志物在以调配或非调配形式储存期间的稳定性。

[0236] 理想地,若稳定化基团在通过以下方式测试时保护试剂或标志物免遭降解:在人类血液中于37℃储存试剂或标志物2小时,且在既定分析条件下导致试剂或标志物被人类血液中的酶裂解少于20%、较佳少于10%、更佳少于5%且甚至更佳少于2%,则稳定化基团可用来使治疗剂或标志物稳定化。本发明亦关于含有这些接头的偶联物。更特定言之,本发明涉及可用于治疗疾病、尤其用于癌症化疗的前药的用途。具体而言,本文所述的接头的使用提供如下前药,其相比于结构相似之前药,显示高的作用特异性、降低的毒性及提高的血液中稳定性。如本文所述的本发明接头可在伴侣分子内的多个位置处存在。

[0237] 因而,提供一种接头,该接头可含有多种基团中之任一者作为其链的部分,这些基团在活体内(例如在血流中)以相对于缺少这些基团的构建体而言增强的速率裂解。还提供接头臂与治疗剂及诊断剂的偶联物。接头可用于形成治疗剂之前药类似物,且可用于将治疗剂或诊断剂可逆地连接于靶向剂、可检测标记物或固体支撑物。接头可并入包括细胞毒素之复合物。

[0238] 前药与抗体的连接可产生优于细胞毒性药物之常规抗体偶联物的额外安全优势。前药之活化可通过肿瘤细胞内及几种正常组织(包括血浆)中的酯酶实现。已显示,人类中相关酯酶活性之水平与在大鼠及非人类灵长类动物中观测到之水平极其相似,但低于在小鼠中观测到的水平。前药之活化也可通过葡糖醛酸糖苷酶之裂解实现。除可裂解肽、胍或二硫桥键基团之外,任选地在细胞毒素与靶向剂之间引入一或多种自我分解型接头基团。这些接头基团也可描述为间隔基团且含有至少两个反应性官能基。典型地,间隔基团的一个化学官能基与治疗剂(例如细胞毒素)的化学官能基键合,而间隔基团的另一化学官能基用来与靶向剂或可裂解接头的化学官能基键合。间隔基团之化学官能基的实例包括羟基、巯基、羰基、羧基、氨基、酮基及巯基。

[0239] 自我分解型接头通常为经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基,或经取代或未经取代的杂烷基。在一个实施方式中,烷基或芳基可包含1至20个碳原子。其也可包含聚乙二醇部分。

[0240] 示例性间隔基团包括例如6-氨基己醇、6-巯基己醇、10-羟基癸酸、甘氨酸及其他氨基酸、1,6-己二醇、β-丙氨酸、2-氨基乙醇、半胱胺(2-氨基乙硫醇)、5-氨基戊酸、6-氨基己酸、3-顺丁烯二酰亚胺苯甲酸、苯酐、α-取代的苯酐、羰基、动物酯、核酸、肽及其类似物。

[0241] 间隔子可用于向细胞毒素-靶向剂复合物中引入额外的分子质量及化学官能基。通常,额外的质量及官能基将影响复合物的血清半衰期及其他特性。因而,经由仔细选择间隔基团,可产生具有一系列血清半衰期的细胞毒素复合物。

[0242] 当存在多个间隔子时,可使用相同或不同的间隔子。

[0243] 可使用额外的接头部分,其较佳向利用含有该部分的接头的偶联物赋予增加之溶解度或降低的聚集特性,或调节偶联物的水解速率,这些接头不必为自我分解型的。在一个实施方式中,连接部分是经取代的烷基、未经取代的烷基、经取代的芳基、未经取代的芳基、经取代的杂烷基,或未经取代的杂烷基,其中之任一者可为直链的、分支链的或环状的。取代可为例如低级(C₁-C₆)烷基、烷氧基、烷硫基、烷氨基或二烷氨基。在某些实施方式中,接头

包含非环状部分。在另一实施方式中,接头包含任何带正电荷或带负电荷之氨基酸聚合物,诸如聚赖氨酸或聚精氨酸。接头可包含聚合物,诸如聚乙二醇部分。另外,接头可包含例如聚合物组分及小化学部分。在一较佳实施方式中,这些接头包含聚乙二醇(PEG)部分。

[0244] PEG部分可具有1与50个单元之间的长度。较佳地,PEG具有1-12个重复单元、更佳3-12个重复单元、更佳2-6重复单元,或甚至更佳3-5个重复单元、且最佳4个重复单元。接头可完全由PEG部分组成,或其也可含有额外的经取代或未经取代的烷基或杂烷基。有用的为,合并PEG作为该部分之一部分以增强复合物的水溶性。另外,PEG部分降低在药物与抗体偶联期间可能发生的聚集的程度。

[0245] 关于细胞毒素类型、接头以及使治疗剂与抗体偶联之其他方法的进一步论述,也参见Gangwar等的名为“细胞毒性化合物和偶联物(Cytotoxic Compounds And Conjugates)”的PCT公开案W0 2007/059404;Saito,G.等,(2003)Adv.Drug Deliv.Rev.55:199-215;Trail,P.A.等(2003)Cancer Immunol.Immunother.52:328-337;Payne,G.(2003)Cancer Cell 3:207-212;Allen,T.M.(2002)Nat.Rev.Cancer 2:750-763;Pastan,I.及Kreitman,R.J.(2002)Curr.Opin.Investig.Drugs3:1089-1091;Senter,P.D.及Springer,CJ.(2001)Adv.Drug Deliv.Rev.53:247-264,这些文献中之每一者以引用的方式完整并入本文。

[0246] 伴侣分子

[0247] 本发明包括与伴侣分子诸如细胞毒素、药物(例如免疫抑制剂)或放射性毒素偶联的抗体,其用于如本文所规定的用途。这些偶联物在本文中亦称作“免疫偶联物”。包括一或多种细胞毒素之免疫偶联物称作“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒性剂包括有害于(例如杀死)细胞的任何试剂。

[0248] 本发明的伴侣分子的实例包括紫杉醇、细胞迟缓素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、道诺霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-脱氢鞣固酮、糖皮质激素、普鲁卡因、四卡因、利多卡因、普萘洛尔及嘌呤霉素及其类似物或同源物。伴侣分子的实例亦包括例如抗代谢物(例如甲胺喋呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪)、烷化剂(例如氮芥、噻替派、氮芥苯丁酸、美法仑、卡莫司汀(BSNU)及洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链佐霉素、丝裂霉素C及顺-二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环霉素(例如道诺霉素(daunorubicin)(以前称道诺霉素(daunorubicin))及多柔比星)、抗生素(例如更生霉素(以前称放线菌素)、博莱霉素、光神霉素及安曲霉素(AMC))以及抗有丝分裂剂(例如长春新碱及长春碱)。

[0249] 可与抗体偶联之伴侣分子的其他较佳实例包括多卡霉素(duocarmycin)、卡奇霉素、美登素及奥瑞斯他汀(auristatin),及其衍生物。卡奇霉素抗体偶联物的实例是可商业获得的(Mylotarg®;美国家庭用品公司(American Home Products))。

[0250] 伴侣分子之较佳实例是CC-1065及多卡霉素。CC-1065在1981年由Upjohn公司首次从泽耳链霉菌(*Streptomyces zelensis*)分离(Hanka等,J.Antibiot.31:1211(1978);Martin等,J.Antibiot.33:902(1980);Martin等,J.Antibiot.34:1119(1981))且发现其在活体外及在实验动物中均具有强力抗肿瘤及抗微生物活性(Li等,Cancer Res.42:999(1982))。CC-1065与双股B-DNA在小沟内结合(Swenson等,Cancer Res.42:2821(1982)),序

列偏好性为5'-d(A/GNTTA)-3'及5'-d(AAAAA)-3',且通过分子中存在的其CPI左手单元烷化3'-腺嘌呤之N3位置(Hurley等,Science 226:843(1984))。

[0251] 尽管其强力且广泛的抗肿瘤活性,但CC-1065不能用于人类中,因为其在实验动物中造成迟发性死亡。CC-1065及多卡霉素的许多类似物及衍生物是本领域已知的。已综述对许多这些化合物的结构、合成及特性的研究。参见例如Boger等,Angew.Chem.Int.Ed.Engl.35:1438(1996);和Boger等,Chem.Rev.97:787(1997)。协和发酵生技有限公司(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)的一个组已制备许多CC-1065衍生物。参见例如美国专利第5,101,038号、第5,641,780号、第5,187,186号、第5,070,092号、第5,703,080号、第5,070,092号、第5,641,780号、第5,101,038号及第5,084,468号;和公布的PCT申请案WO 96/10405及公布的欧洲申请案0 537 575A1。Upjohn公司(Pharmacia Upjohn)亦在积极制备CC-1065的衍生物。参见例如美国专利第5,739,350号、第4,978,757号、第5,332,837号及第4,912,227号。

[0252] 抗体物理特性

[0253] 本文所公开的抗体可进一步特征为抗BST1抗体的多种物理特性。各种分析法可用于基于这些物理特性侦测和/或区分不同类别的抗体。

[0254] 在一些实施方式中,本文所公开的抗体可在轻链或重链可变区中含有一或多个糖基化位点。一或多个糖基化位点在可变区中的存在可导致抗体之免疫原性增加或抗体pK的改变(由于改变的抗原结合)[Marshall等(1972)Annu Rev Biochem 41:673-702;Gala FA及Morrison SL(2004)J Immunol 172:5489-94;Wallick等(1988)J ExpMed 168:1099-109;Spiro RG(2002)Glycobiology12:43R-56R;Parekh等(1985)Nature 316:452-7;Mimura等(2000)Mol Immunol37:697-706]。已知晓,糖基化在含有N-X-S/T序列的基序处发生。可使用糖墨点分析法(glycoblot assay)测试可变区糖基化,该糖墨点分析法裂解抗体以产生Fab,且随后使用测量过碘酸盐氧化及希夫碱(Schiff base)形成之分析法测试糖基化。替代地,可使用Dionex轻层析法(Dionex-LC)测试可变区糖基化,该Dionex轻层析法将来自Fab之糖裂解成单糖并分析个别糖之含量。在一些情况下,较佳具有不含可变区糖基化的抗BST1抗体。可通过选择在可变区中不含有糖基化基序的抗体或通过使用本领域熟知的标准技术突变糖基化基序内的残基,实现此点。

[0255] 在一较佳实施方式中,本文所公开的抗体不含有天冬酰胺异构位点。脱酰胺化或异天冬氨酸作用可分别在N-G或D-G序列上发生。脱酰胺化或异天冬氨酸作用导致产生异天冬氨酸,此由于在侧链羧基端而非主链外产生扭结结构而降低抗体之稳定性。可使用等量分析法测量异天冬氨酸的产生,这些量分析法使用逆相HPLC测试异天冬氨酸。

[0256] 各抗体具有独特等电点(pI),但抗体通常将落在6与9.5之间的pH范围内。IgG1抗体之pI典型地落在7-9.5之pH范围内且IgG4抗体之pI典型地落在6-8之pH范围内。抗体可具有此范围之外的pI。虽然作用通常未知,但存在猜想:具有在正常范围之外的pI的抗体在活体内条件下可能具有一定解折叠及不稳定性。可使用毛细管等电聚焦分析法测试等电点,该分析法产生pH梯度且可利用雷射对焦以增加准确度[Janini等(2002)Electrophoresis 23:1605-11;Ma等(2001)Chromatographia 53:S75-89;Hunt等(1998)J Chromatogr A 800:355-67]。在一些情况下,较佳具有含有落在正常范围内的pI值的抗BST1抗体。可通过选择pI处于正常范围内的抗体或通过使用本领域熟知的标准技术突变带电荷之表面残基,

实现此点。

[0257] 各抗体具有指示热稳定性的熔融温度 [Krishnamurthy R及ManningMC (2002) Curr Pharm Biotechnol 3:361-71]。较高的热稳定性指示较大的活体内总体抗体稳定性。可使用多种技术诸如差示扫描量热法测量抗体的熔点 [Chen等 (2003) Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando等 (1999) Immunol Lett 68:47-52]。 T_{M1} 指示抗体开始解折叠的温度。 T_{M2} 指示抗体完成解折叠的温度。通常, 较佳地, 本文所公开的抗体的 T_{M1} 大于 60°C , 较佳大于 65°C , 甚至更佳大于 70°C 。替代地, 可利用圆二色性测量抗体的热稳定性 [Murray等 (2002) J.Chromatogr Sci40:343-9]。

[0258] 在一较佳实施方式中, 选择不快速降解的抗体。可使用毛细管电泳法 (CE) 及MALDI-MS测量抗BST1抗体的片段化, 如本领域公知的 [Alexander AJ及Hughes DE (1995) Anal.Chem.67:3626-32]。

[0259] 在另一较佳实施方式中, 选择具有最小聚集效应的抗体。聚集可导致触发不希望的免疫反应和/或改变的或不利的药物代谢动力学特性。通常, 可接受具有25%或更少、较佳20%或更少、甚至更佳15%或更少、甚至更佳10%或更少、且甚至更佳5%或更少的聚集的抗体。可通过本领域熟知的用于鉴别单体、二聚体、三聚体或多聚体的几项技术测量聚集, 这些技术包括尺寸排阻管柱 (SEC) 高效液相层析法 (HPLC) 及光散射法。

[0260] 工程化抗体的方法

[0261] 如上文所讨论, 具有本文所公开的 V_H 及 V_K 序列的抗BST1抗体可用来通过修饰 V_H 和/或 V_K 序列或与其连接的恒定区而产生新的抗BST1抗体。因而, 较佳抗BST1抗体 (例如BST1_A2、BST1_A1或BST1_A3) 之结构特征用来产生保留抗体的至少一种功能特性 (诸如与人类BST1结合) 的结构上相关的抗BST1抗体。例如, 可将BST1_A2、BST1_A1或BST1_A3之一或多个CDR区或其突变与已知的框架区和/或其他CDR重组地组合, 以产生本发明的另外的重组工程化的抗BST1抗体, 如上文所讨论的。其他类型之修饰包括在先前章节中描述的那些。用于工程化方法的起始材料是本文所提供之一或多个 V_H 和/或 V_K 序列或其一或多个CDR区。为产生工程化抗体, 不需要实际地制备 (也即表达为蛋白质) 具有本文所提供之一或多个 V_H 和/或 V_K 序列或其一或多个CDR区的抗体。相反地, 使用序列中所含之信息作为初始材料以产生源自原始序列的“第二代”序列, 且随后制备“第二代”序列且将其表达为蛋白质。

[0262] 标准分子生物学技术可用来制备并表达改变的抗体序列。

[0263] 较佳地, 由改变的抗体序列编码的抗体是如下抗体, 其保留本文所述的抗BST1抗体的一种、一些或全部功能特性, 这些功能特性包括但不限于: (a) 以 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ 或更小的 K_D 与人类BST1结合; (b) 与用BST1转染的人类CHO细胞结合。

[0264] 可使用本领域可获得的和/或本文所述的标准分析法, 诸如实例中所述的那些 (例如流式细胞术、结合分析法) 评估改变的抗体的功能特性。

[0265] 可沿着全部或部分的抗BST1抗体编码序列随机地或选择性地引入突变, 且可针对如本文所述的结合活性和/或其他功能特性, 对所得之修饰的抗BST1抗体进行筛选。本领域已描述突变方法。例如, PCT公开案W0 02/092780描述使用饱和突变诱发、合成连接组装或其组合产生并筛选抗体突变的方法。替代地, PCT公开案W0 03/074679描述使用计算筛选方法优化抗体的物理化学特性的方法。

[0266] 编码本发明的抗体的核酸分子

[0267] 亦公开编码本文所公开的抗体的核酸分子。这些核酸可存在于完整细胞中,存在于细胞溶解物中,或可呈部分纯化或实质上纯的形式。当通过标准技术(包括碱/SDS处理、CsCl显带、管柱层析、琼脂糖凝胶电泳)及本领域熟知的其他技术,与其他细胞组分或其他杂质(例如其他细胞核酸或蛋白质)分离纯化时,核酸是“分离的”或“变得实质上纯的”。参见F.Ausubel等编(1987)《分子生物学新编方案》(Current Protocols in Molecular Biology), 格里尼出版社和威利跨学科出版公司(Greene Publishing and Wiley Interscience), 纽约州。这些核酸可为例如DNA或RNA且可含有或可不含有内含子序列。在一较佳实施方式中,核酸是cDNA分子。

[0268] 可使用标准分子生物学技术获得编码本文所公开的抗体的核酸。对于由融合瘤表达的抗体,可通过标准PCR扩增或cDNA克隆技术获得cDNA,这些cDNA编码由融合瘤产生的抗体的轻链及重链。对于自免疫球蛋白基因文库(例如使用噬菌体呈现技术)获得的抗体,可自该文库回收编码抗体的核酸。

[0269] 较佳核酸分子是编码BST1_A2、BST1_A1或BST1_A3单克隆抗体的V_H及V_K序列的那些。编码BST1_A2、BST1_A1或BST1_A3的V_H序列的DNA序列分别在SEQ ID NO:6、5及54中显示。编码BST1_A2、BST1_A1或BST1_A3的V_K序列的DNA序列分别在SEQ ID NO:8、7及55中显示。

[0270] 其他较佳核酸是与SEQ ID NO:6、5、8、7、54及55中所示的序列之一具有至少80%序列一致性,诸如至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性的核酸,这些核酸编码本文所公开的抗体或其抗原结合部分。

[0271] 两个核酸序列之间的一致性百分比是序列中核苷酸一致的位置的数目,考虑为最佳比对两个序列而需要引入的空隙的数目及各空隙之长度。两个序列之间的序列的比较及一致性百分比的计算可利用数学算法实现,诸如上文所描述的Meyers及Miller算法或Altschul之XBLAST程序。

[0272] 此外,本发明的较佳核酸包含SEQ ID NO:6、5、8、7、54及55中所示之核酸序列之一或多个编码CDR的部分。在此实施方式中,核酸可编码BST1_A2、BST1_A1或BST1_A3的重链及轻链CDR1、CDR2和/或CDR3序列。

[0273] 与SEQ ID NO:6、5、8、7、54及55(V_H及V_K序列)的此类编码CDR的部分具有至少80%、诸如至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性之核酸亦为本发明的较佳核酸。这些核酸可在非CDR编码区中和/或在CDR编码区中与SEQ ID NO:6、5、8、7、54及55之相应部分不同。在差异处于CDR编码区中之情况下,与BST1_A2、BST1_A1或BST1_A3的相应CDR序列相比,由该核酸编码之核酸CDR区典型地含有如本文所定义之一或多个保守序列修饰。

[0274] 一旦获得编码V_H及V_K区段的DNA片段,即可通过标准重组DNA技术进一步操纵这些DNA片段,例如以将可变区基因转化成全长抗体链基因、转化成Fab片段基因,或转化成scFv基因。在这些操纵中,将编码V_K或V_H的DNA片段与编码另一蛋白质(诸如抗体恒定区或可挠性接头)的另一DNA片段操作性地连接。如此环境下所用,术语“操作性地连接”意指,两个DNA片段如此连接,使得由此两个DNA片段编码的氨基酸序列仍保持同框。

[0275] 编码V_H区的分离DNA可通过将编码V_H之DNA与编码重链恒定区(C_{H1}、C_{H2}及C_{H3})之另一DNA分子操作性地连接而转化成全长重链基因。鼠类重链恒定区基因的序列是本领域已

知的[参见例如Kabat,E.A.等(1991)《免疫学热门蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第五版,美国卫生及公众服务部,NIH出版号91-3242],且可通过标准PCR扩增获得包含这些区之DNA片段。重链恒定区可为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区,但最佳为IgG1或IgG4恒定区。对于Fab片段重链基因,可将编码V_H的DNA与仅编码重链C_{H1}恒定区的另一DNA分子操作性地连接。

[0276] 编码V_L/V_K区的分离DNA可通过将编码V_L的DNA与编码轻链恒定区C_L之另一DNA分子操作性地连接而转化成全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。鼠类轻链恒定区基因的序列是本领域已知的[参见例如Kabat,E.A.等(1991)《免疫学热门蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第五版,美国卫生及公众服务部,NIH出版号91-3242],且可通过标准PCR扩增获得包含这些区的DNA片段。在较佳实施方式中,轻链恒定区可为κ或λ恒定区。

[0277] 为产生scFv基因,将编码V_H及编码V_L/V_K的DNA片段与编码可挠性接头(例如编码氨基酸序列(Gly₄-Ser)₃)的另一片段操作性地连接,以便V_H及V_L/V_K序列可表达为具有由可挠性接头连接的V_L/V_K及V_H区的连续单链蛋白[参见例如Bird等(1988)Science 242:423-426;Huston等(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;McCafferty等(1990)Nature 348:552-554]。

[0278] 单克隆抗体的产生

[0279] BST1或其片段或衍生物可用作免疫原以产生免疫特异性结合此类免疫原的抗体。这些免疫原可通过任何便利的手段分离。本领域技术人员理解,许多方法可用于抗体的产生,例如如《抗体,实验室手册》(Antibodies,A Laboratory Manual),Harlow及David Lane编,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory)(1988),纽约州冷泉港中所述。本领域技术人员亦理解,也可通过各种工序自遗传信息制备仿真抗体的结合片段或Fab片段[《抗体工程化:实践方法》(Antibody Engineering:A Practical Approach)(Borrebaeck,C.编),1995,牛津大学出版社(Oxford University Press),牛津;J.Immunol.149,3914-3920(1992)]。

[0280] 可产生针对BST1的特定结构域的抗体。可使用BST1的亲水片段作为产生抗体的免疫原。

[0281] 在产生抗体时,可通过本领域已知的技术,例如ELISA(酶联免疫吸附分析法)实现对所需抗体的筛选。例如,为选择识别BST1的特定结构域的抗体,可针对结合含有此类结构域的BST1片段的产物,分析产生的融合瘤。为选择特异性结合第一BST1同源物但不特异性结合于(或以较小亲合力结合于)第二BST1同源物的抗体,可基于对第一BST1同源物的阳性结合及对第二BST1同源物的结合的不存在(或对其结合的减少)进行选择。类似地,为选择特异性结合BST1但不特异性结合于(或以较小亲合力结合于)相同蛋白质的不同同型(诸如具有与BST1相同的核心肽的不同糖型)的抗体,可基于对BST1的阳性结合及对不同同型(例如不同糖型)的结合的不存在(或对其的结合的减少)进行选择。

[0282] 因而,公开如下抗体(诸如单克隆抗体),与BST1的不同同型(例如糖型)相比,其以更大的亲和力(例如至少2倍,诸如至少5倍、尤其至少10倍更大的亲和力)与BST1结合。

[0283] 可在本发明的用途及方法中使用的多克隆抗体是源自经免疫的动物的血清的异源抗体分子群体。也可使用未分化免疫血清。本领域已知的多种工序可用于产生针对BST1、

BST1片段、BST1相关多肽或BST1相关多肽的片段的多克隆抗体。例如,一种方式是纯化目的多肽或使用例如本领域熟知的固相肽合成方法合成目的多肽。参见例如《蛋白质纯化指南》(Guide to Protein Purification),Murray P.Deutcher编,Meth.Enzymol.第182卷(1990);《固相肽合成》(Solid Phase Peptide Synthesis),Greg B.Fields编,Meth.Enzymol.第289卷(1997);Kiso等,Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)38:1192-99,1990;Mostafavi等,Biomed.Pept.Proteins Nucleic Acids 1:255-60,1995;Fujiwara等,Chem.Pharm.Bull.(东京)44:1326-31,1996。选择的多肽随后可用来通过注射而对各种宿主动物进行免疫以产生多株或单克隆抗体,这些宿主动物包括但不限于兔、小鼠、大鼠等。视宿主物种而定,可使用各种佐剂(也即免疫刺激剂)来增强免疫反应,这些佐剂包括但不限于弗氏完全佐剂或不完全佐剂、无机凝胶诸如氢氧化铝、表面活性物质诸如溶血卵磷脂、普洛尼克多元醇(pluronic polyol)、聚阴离子、肽、油乳液、匙孔螺血氰蛋白、二硝基酚及佐剂诸如卡介苗(bacille Calmette-Guerin,BCG)或短棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*)。其他佐剂亦为本领域熟知的。

[0284] 为制备针对BST1的单克隆抗体(mAb),可使用通过培养连续细胞株产生抗体分子的任何技术。例如,最初由Kohler及Milstein开发之融合瘤技术(1975,Nature 256:495-497)、以及三体瘤(trioma)技术、人类B细胞融合瘤技术[Kozbor等(1983)Immunology Today 4:72]及产生人类单克隆抗体之EBV-融合瘤技术[Cole等(1985),Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.,第77-96页]。这些抗体可属于任何免疫球蛋白类别,包括IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及其任何亚类。可在活体外或在活体内培养产生单克隆抗体的融合瘤。可利用已知技术在无菌动物中产生单克隆抗体(PCT/US90/02545,其以引用的方式并入本文)。

[0285] 制备融合瘤的较佳动物系统是鼠类系统。在小鼠中产生融合瘤是一项充分确立的方法。用于分离经免疫的脾细胞以便融合的免疫方案及技术是本领域已知的。融合伴侣(例如鼠类骨髓瘤细胞)及融合工序亦为已知的。

[0286] 单克隆抗体包括但不限于人类单克隆抗体及嵌合单克隆抗体(例如人类-小鼠嵌合体)。

[0287] 可基于如上文所述制备的非人类单克隆抗体的序列,制备用于本发明的嵌合抗体或人源化抗体。编码重链及轻链免疫球蛋白之DNA可自目的非人类融合瘤获得且可使用标准分子生物学技术进行工程化以含有非鼠类(例如人类)免疫球蛋白序列。例如,为产生嵌合抗体,可使用本领域已知的方法,将鼠类可变区与人类恒定区连接(参见例如Cabilly等的美国专利第4,816,567号)。为产生人源化抗体,可使用本领域已知的方法,将鼠类CDR区插入人类框架中(参见例如Winter的美国专利第5,225,539号以及Queen等的美国专利第5,530,101号、第5,585,089号、第5,693,762号及第6,180,370号)。

[0288] 也可使用转殖基因或转染色体小鼠产生全人类抗体,其中这些小鼠不能表达内源免疫球蛋白重链及轻链基因,但可表达人类重链及轻链基因。转殖基因小鼠以正常方式用选择的抗原(例如BST1的全部或一部分)免疫。可使用常规融合瘤技术获得针对抗原之单克隆抗体。由转殖基因小鼠携带之人类免疫球蛋白转殖基因在B细胞分化期间重排,且随后经历类别转换及体细胞突变。因而,使用此类技术,有可能产生治疗上有用之IgG、IgA、IgM及IgE抗体。这些转殖基因及转染色体小鼠包括HuMAb Mouse[®](Medarex[®]公司)及KM Mouse[®]

品系的小鼠。HuMAb Mouse[®]品系 (Medarex[®]公司) 在 Lonberg 及 Huszar (1995, *Int.Rev.Immunol.* 13:65-93) 中描述。关于产生人类抗体及人类单克隆抗体之此技术及用于产生这些抗体之方案的详细讨论, 参见例如美国专利5,625,126、美国专利5,633,425、美国专利5,569,825、美国专利5,661,016、及美国专利5,545,806。KM Mouse[®]品系是指携带人类重链转殖基因及人类轻链转染色体的小鼠, 且在 Ishida 等的 PCT 公开案 W0 02/43478 中详述。

[0289] 另外, 表达人类免疫球蛋白基因之替代性转殖基因动物系统是本领域可获得的且可用来产生本发明的抗BST1抗体。例如, 可使用称作 Xenomouse 之替代性转殖基因系统 (Amgen, Inc.); 这些小鼠在例如 Kucherlapati 等的美国专利第5,939,598号、第6,075,181号、第6,114,598号、第6,150,584号及第6,162,963号中描述。

[0290] 可使用称作“导向选择 (guided selection)”的技术产生识别所选择表位之全人类抗体。在此方法中, 将选择的非人类单克隆抗体 (例如小鼠抗体) 用来指导识别相同表位之全人类抗体的选择 [Jespersen 等 (1994) *Biotechnology* 12:899-903]。

[0291] 另外, 表达人类免疫球蛋白基因的替代性转染色体动物系统是本领域可获得的且可用来产生抗BST1抗体。例如, 可使用称作“TC小鼠”的携带人类重链转染色体及人类轻链转染色体的小鼠; 这些小鼠在 Tomizuka 等 (2000) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 97:722-727 中描述。另外, 携带人类重链及轻链转染色体的乳牛已在本领域得到描述 [Kuroiwa 等 (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894 及 PCT 公开案第 W02002/092812 号] 且可用来产生抗BST1抗体。

[0292] 也可使用 SCID 小鼠制备本发明的人类单克隆抗体, 已在这些 SCID 小鼠中重构人类免疫细胞, 以便在免疫后可产生人类抗体反应。这些小鼠在例如美国专利第5,476,994号及第3,698,767号中描述。

[0293] 可通过下述来产生抗BST1抗体: 使用噬菌体呈现技术以针对与所选靶的结合产生及筛选多肽文库 [参见例如 Cwirla 等, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87,6378-82,1990; Devlin 等, *Science* 249,404-6,1990; Scott 及 Smith, *Science* 249,386-88,1990; 和 Ladner 等, 美国专利第5,571,698号]。噬菌体呈现法之基本概念是在编码待筛选多肽之 DNA 与该多肽之间建立物理缔合。此物理缔合由噬菌体粒子提供, 该噬菌体粒子将多肽呈现为包围编码该多肽之噬菌体基因组之衣壳的一部分。在多肽与其遗传物质之间建立物理缔合允许同时大规模筛选数目极大的携带不同多肽之噬菌体。呈现对靶具有亲和力的多肽的噬菌体与该靶结合, 且通过针对该靶的亲和力筛选来富集这些噬菌体。可自这些噬菌体之各别基因组确定自其呈现的多肽的身分。使用这些方法, 随后可通过常规手段大量合成鉴别为对所靶具有结合亲和力的多肽。参见例如美国专利第6,057,098号, 该专利完整并入本文, 包括全部的表、图及申请专利范围。特定言之, 该噬菌体可用来呈现自抗体库或组合抗体文库 (例如人类或鼠类) 表达的抗原结合结构域。可用抗原 (例如使用标记的抗原或与固体表面或珠结合或捕捉至固体表面或珠的抗原) 选择或鉴别表达结合目的抗原的抗原结合结构域之噬菌体。这些方法中所用之噬菌体典型地为丝状噬菌体, 该丝状噬菌体包括自噬菌体表达的 Fd 及 M13 结合结构域, 以及与噬菌体基因 III 或基因 VIII 蛋白重组融合的 Fab、Fv 或二硫桥键稳定的 Fv 抗体结构域。可用来产生本发明抗体之噬菌体呈现法包括在 Brinkman 等 (1995)

J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames等(1995) J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough等, Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic等(1997) Gene 187 9-18; Burton等(1994) Advances in Immunology 57:191-280; PCT申请案第PCT/GB91/01134号; PCT公开案W0 90/02809、W091/10737、W0 92/01047、W0 92/18619、W0 93/11236、W0 95/15982、W095/20401; 以及美国专利第5,698,426号、第5,223,409号、第5,403,484号、第5,580,717号、第5,427,908号、第5,750,753号、第5,821,047号、第5,571,698号、第5,427,908号、第5,516,637号、第5,780,225号、第5,658,727号、第5,733,743号及第5,969,108号所公开的那些; 这些文献中之每一者以引用的方式完整地并入本文。

[0294] 如以上参考文献中所述, 在噬菌体选择后, 可分离来自噬菌体的抗体编码区且将其用来产生完整抗体(包括人类抗体)或任何其他所需的抗原结合片段且在任何所需的宿主中表达, 该宿主包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母及细菌, 例如如下文详细描述。例如, 也可使用本领域已知的方法, 诸如在PCT公开案第W0 92/22324号; Mullinax等(1992) BioTechniques 12(6):864-869; 和Sawai等(1995) AJRI 34:26-34; 和Better等(1988) Science 240:1041-1043(这些参考文献以引用的方式完整并入)中所公开的那些, 利用重组产生Fab、Fab'及F(ab')₂片段的技术。

[0295] 可用来产生单链Fv及抗体的技术的实例包括在美国专利4,946,778及5,258,498; Huston等(1991), Methods in Enzymology 203:46-88; Shu等(1993) PNAS 90:7995-7999; 和Skerra等(1988) Science 240:1038-1040中描述的那些。

[0296] 本发明提供抗BST1免疫球蛋白分子的功能活性片段、衍生物或类似物的用途, 其用于预防或治疗MDS。功能活性意指, 片段、衍生物或类似物能够激发抗-抗个体基因型抗体(也即三级抗体(tertiary antibody)), 这些抗-抗个体基因型抗体识别由该片段、衍生物或类似物所源自的抗体识别的相同抗原。具体而言, 在一特定实施方式中, 免疫球蛋白分子的个体基因型的抗原性可通过缺失特异性识别抗原的CDR序列C末端的框架及CDR序列来增强。为确定何等CDR序列结合抗原, 可通过本领域已知的任何结合分析方法, 在结合分析法中使用含有CDR序列的合成肽以及抗原。

[0297] 本发明提供抗体片段, 诸如但不限于F(ab')₂片段及Fab片段的用途。可通过已知技术产生识别特定表位的抗体片段。F(ab')₂片段由可变区、轻链恒定区及重链之C_H1结构域组成且通过胃蛋白酶消化抗体分子来产生。Fab片段通过还原F(ab')₂片段的二硫桥键而产生。本发明还提供本发明的抗体的重链及轻链二聚体, 或其任何最小片段, 诸如Fv或单链抗体(SCA) [例如如美国专利4,946,778; Bird, (1988) Science 242:423-42; Huston等(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; 和Ward等(1989) Nature 334:544-5中所述], 或具有与本发明抗体相同的特异性的任何其他分子。通过用氨基酸桥连接Fv区的重链及轻链片段以产生单链多肽, 来形成单链抗体。可使用在大肠杆菌中组装功能性Fv片段的技术 [Skerra等(1988) Science 242:1038-1041]。

[0298] 本文公开免疫球蛋白(或其功能活性片段)的融合蛋白, 例如其中免疫球蛋白经由共价键(例如肽键)在N末端或C末端与不为免疫球蛋白之另一蛋白质(或其部分, 较佳该蛋白质的至少10、20或50个氨基酸的部分)的氨基酸序列融合。较佳地, 免疫球蛋白或其片段在恒定结构域之N末端与另一蛋白质共价连接。如上文所述, 这些融合蛋白可促进纯化、增加活体内半衰期及促进抗原跨上皮屏障递送至免疫系统。

[0299] 本文所公开的免疫球蛋白包括经修饰之类似物及衍生物,也即通过共价连接任何类型的分子来进行修饰,只要该共价连接不损害免疫特异性结合。例如,但不作为限制,免疫球蛋白的衍生物及类似物包括已例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、由已知保护/阻断基团进行的衍生化、蛋白酶裂解、与细胞配体或其他蛋白质的连接等进一步修饰之衍生物及类似物。可通过已知技术实施众多化学修饰中之任一者,包括但不限于特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化等。另外,类似物或衍生物可含有一或多种非经典氨基酸。

[0300] 小鼠的免疫

[0301] 小鼠可用BST1抗原和/或重组BST1的纯化或富集的制剂或表达BST1的细胞进行免疫。较佳地,当首次输注时,小鼠是6-16周龄。例如,BST1抗原的纯化或重组制剂(100 μ g)可用来腹膜内免疫小鼠。

[0302] 采用各种抗原的累积性经验已显示,用弗氏完全佐剂中的抗原腹膜内(IP)免疫时,小鼠产生反应。然而,发现不为弗氏佐剂之佐剂亦有效。此外,发现完整细胞在佐剂不存在时具有高度免疫原性。可在免疫方案过程期间监测免疫反应,通过后眼眶采血获得血浆样品。可通过ELISA(如下文所描述)筛选血浆,以测试令人满意的滴度。可用抗原连续3日静脉内增强免疫小鼠,5天后处死小鼠并取出脾脏。在一个实施方式中,可使用A/J小鼠品系(Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me.)。

[0303] 产生单克隆抗体的转染瘤的生成

[0304] 如本领域所熟知,可在宿主细胞转染瘤中,使用例如重组DNA技术及基因转染方法的组合,产生本文所公开的抗体[例如Morrison, S. (1985) Science 229:1202]。

[0305] 例如,为表达抗体或其抗体片段,可通过标准分子生物学技术(例如使用表达目的抗体的融合瘤的PCR扩增或cDNA克隆)获得编码部分或全长轻链及重链之DNA,且可将这些DNA插入表达载体中,以便基因与转录及翻译控制序列操作性地连接。在此背景下,术语“操作性地连接”意指,将抗体基因连接入载体,以便载体内的转录及翻译控制序列执行其调节抗体基因转录及翻译的预期功能。选择表达载体及表达控制序列以与所用表达宿主细胞相容。

[0306] 可用两种表达载体共转染宿主细胞,第一载体编码重链衍生的多肽,且第二载体编码轻链衍生的多肽。两种载体可含有使得重链及轻链多肽能够等同表达的相同可选标志物。替代地,可使用编码重链及轻链多肽二者之单个载体。在这些情况下,轻链应置于重链之前以避免过量之有毒游离重链[Proudfoot (1986) Nature 322:52; Kohler (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197]。重链及轻链的编码序列可包含cDNA或基因组DNA。

[0307] 可通过标准方法将抗体基因插入表达载体(例如连接抗体基因片段及载体上之互补限制性位点,或若不存在限制性位点,则使末端连接平钝)。本文所述的抗体的轻链及重链可变区可通过以下方式用来产生任何抗体同型之全长抗体基因:将其插入已编码所需同型的重链恒定区及轻链恒定区的表达载体中,以便V_H区段与载体内之C_H区段操作性地连接且V_K区段与载体内之C_L区段操作性地连接。另外或替代地,重组表达载体可编码促进抗体链自宿主细胞分泌的信号肽。可将抗体链基因克隆入载体,使得信号肽与抗体链基因的氨基末端同框连接。信号肽可为免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(也即来自非免疫球蛋白的蛋白质的信号肽)。

[0308] 除抗体链基因之外,本文所公开的重组表达载体也可携带控制抗体链基因在宿主

细胞中表达的调节序列。术语“调节序列”意在包括启动子、增强子及其他控制抗体链基因转录或翻译的表达控制组件(例如聚腺苷酸化信号)。这些调节序列例如在Goeddel(基因表达技术(Gene Expression Technology).《酶学方法》(Methods in Enzymology) 185, 学术出版社(Academic Press), 加利福尼亚州圣迭戈(1990))中描述。本领域技术人员理解, 表达载体的设计, 包括调节序列的选择, 可视诸如以下的因素而定: 待转化的宿主细胞的选择、所需的蛋白质的表达量等。用于哺乳动物宿主细胞表达的较佳调节序列包括引导哺乳动物细胞中高蛋白质表达量的病毒组件, 诸如衍生自巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))及多瘤病毒的启动子和/或增强子。替代地, 可使用非病毒调节序列, 诸如泛素启动子或 β -血球蛋白启动子。另外, 调节组件包含不同来源的序列, 诸如SR α 启动子系统, 其含有来自SV40早期启动子及人类T细胞白血病病毒1型的长末端重复序列的序列[Takebe, Y.等(1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472]。

[0309] 除抗体链基因及调节序列之外, 本文所公开的重组表达载体也可携带其他序列, 诸如调节载体在宿主细胞中之复制的序列(例如复制起点)及可选标志物基因。可选标志物基因促进选择已导入载体之宿主细胞(参见例如美国专利第4,399,216号、第4,634,665号及第5,179,017号, 均属于Axel等)。例如, 可选标志物基因典型地对已导入载体的宿主细胞赋予针对药物(诸如G418、潮霉素或甲胺喋呤)的抗性。较佳可选标志物基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(在dhfr-宿主细胞中连同甲胺喋呤选择/扩增一起使用)及neo基因(用于G418选择)。

[0310] 为表达轻链及重链, 通过标准技术将编码重链及轻链的表达载体转染入宿主细胞。术语“转染”的各种形式意在包括常用于向原核或真核宿主细胞引入外源DNA之各种技术, 例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染及其类似技术。虽然理论上有可能在原核或真核宿主细胞中表达本文所公开的抗体, 但最佳在真核细胞中且最佳在哺乳动物宿主细胞中表达抗体, 因为这些真核细胞且尤其哺乳动物细胞比原核细胞更有可能组装并分泌正确折叠且免疫学活性的抗体。已报导抗体基因之原核表达不能有效产生高产量的活性抗体[Boss, M.A.及Wood, C.R. (1985) Immunology Today 6:12-13]。

[0311] 用于表达本文所公开的重组抗体的较佳哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO)(连同载体诸如来自人类巨细胞病毒之主要中间早期基因启动子组件)[Foeking等, 1986, Gene 45:101; Cockett等(1990) BioTechnology 8:2]、在Urlaub及Chasin(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220中描述的dhfr-CHO细胞(其与DHFR可选标志物一起使用, 例如如R. J. Kaufman及P. A. Sharp(1982) J. Mol. Biol. 159:601-621中所述)、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞及SP2细胞。特定言之, 为与NS0骨髓瘤细胞一起使用, 另一较佳表达系统是在W087/04462(Wilson)、W089/01036(Bebbington)及EP 338,841(Bebbington)所公开的GS基因表达系统。

[0312] 各种宿主表达载体系统可用来表达本文所公开的抗体分子。这些宿主-表达系统代表可藉以产生且随后纯化目的编码序列的载体, 而且代表在用适当核苷酸编码序列转化或转染时可原位表达本文所公开的抗体分子的细胞。其包括但不限于用含有抗体编码序列的重组噬菌体DNA、质体DNA或黏质体DNA表达载体转化的微生物诸如细菌(例如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)); 用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如酵母属(*Saccharomyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)); 用含有抗体编码序列的重组病毒表达载

体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒, CaMV;烟草花叶病毒, TMV)感染或用含有抗体编码序列的重组质体表达载体(例如Ti质体)转化的植物细胞系统;或携带重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如COS、CHO、BHK、293、3T3细胞),这些重组表达构建体含有源自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如腺病毒晚期启动子;痘苗病毒7.5K启动子)。

[0313] 在细菌系统中,可根据表达的抗体分子的预期用途有利地选择许多表达载体。例如,当意在大量产生此类蛋白质例如以用于产生包含抗体分子的药物组合物时,可能需要引导易于纯化的融合蛋白产物的高水平表达的载体。这些载体包括但不限于大肠杆菌表达载体pUR278(Ruther等(1983)EMBO J.2:1791),其中抗体编码序列可与lac Z编码区同框地个别连接入载体中,从而产生融合蛋白;pIN载体[Inouye及Inouye(1985)Nucleic Acids Res.13:3101-3109;Van Heeke及Schuster(1989)J.Biol.Chem.24:5503-5509];且相似的pGEX载体也可用于将外来多肽与麸胱甘肽S-转移酶(GST)一起表达为融合蛋白。通常,这些融合蛋白是可溶的且可通过吸附并与基质麸胱甘肽-琼脂糖珠结合,随后在游离麸胱甘肽存在下溶解,自溶解的细胞中轻易地纯化。pGEX载体经设计以包括凝血酶或因因子Xa蛋白酶裂解位点,以便克隆的靶基因产物可自GST部分释放。

[0314] 在一昆虫系统中,使用苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)核多角体病毒(AcNPV)作为表达外来基因的载体。该病毒在草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞中生长。可将抗体编码序列个别地克隆至该病毒的非必需区(例如多角体蛋白基因)中并置于AcNPV启动子(例如多角体蛋白启动子)的控制下。在哺乳动物宿主细胞中,可利用许多基于病毒的表达系统(例如腺病毒表达系统)。

[0315] 如上文所讨论,可选择如下宿主细胞品系,其以期望的特定方式调节插入序列的表达或修饰及加工基因产物。蛋白质产物的这些修饰(例如糖基化)及加工(例如裂解)对蛋白质的功能可为重要的。

[0316] 为长期、高产量产生重组抗体,稳定表达是较佳的。例如,可通过以下方式产生稳定表达目的抗体的细胞株:用包含抗体的核苷酸序列及可选标志物(例如新霉素或潮霉素)的核苷酸序列的表达载体转染细胞,且针对可选标志物的表达进行选择。这些工程化的细胞株尤其适用于筛选及评价与抗体分子直接或间接相互作用的化合物。

[0317] 可通过载体扩增来增加抗体分子的表达量[关于综述,参见Bebbington及Hentschel,基于基因扩增的载体在DNA克隆中在哺乳动物细胞中表达克隆基因的用途(The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning),第3卷(学术出版社,纽约,1987)]。当表达抗体的载体系统中的标记可扩增时,宿主细胞培养物中存在的抑制剂的水平的提高将增加标记基因的复本数。由于扩增区与抗体基因缔合,所以抗体的产生亦将增加[Crouse等,1983, Mol.Cell.Biol.3:257]。

[0318] 当将编码抗体基因的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞时,通过以下方式产生抗体:培养宿主细胞足以允许抗体在宿主细胞中表达或更佳允许抗体分泌入生长宿主细胞的培养基中的一段时间。在重组地表达抗体分子后,可通过本领域已知的用于纯化抗体分子的任何方法来纯化其,例如通过层析(例如离子交换层析、亲和层析诸如采用蛋白A或

特定抗原、及筛分管柱层析)、离心、差异性溶解,或通过用于纯化蛋白质的任何其他标准技术来纯化。

[0319] 替代地,可通过利用对表达的融合蛋白特异的抗体,轻易地纯化任何融合蛋白。例如,由Janknecht等描述的系统允许容易地纯化人类细胞株中表达的未变性的融合蛋白[Janknecht等,1991,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:8972-897]。在此系统中,将目的基因亚克隆至痘苗病毒重组质体中,以便基因的开放阅读框与由六个组氨酸残基组成的氨基端标签以翻译方式融合。该卷标充当融合蛋白的基质结合结构域。将来自经重组痘苗病毒感染的细胞的提取物负载至Ni²⁺氨基乙酸-琼脂糖管柱上,且用含有咪唑的缓冲液选择性地溶离加组氨酸标签的蛋白质。

[0320] 与抗原结合的抗体的表征

[0321] 随后可通过以下方式选择由这些方法产生的抗体:首先筛选与纯化的目的多肽的亲合力及特异性,且需要时将结果与抗体与需要自结合排除的多肽的亲合力及特异性相比较。可通过例如标准ELISA测试抗体与BST1的结合。筛选方法可包括在微量滴定盘的单独孔中固定纯化的多肽。随后将含有潜在抗体或抗体组的溶液置于各别微量滴定孔中且培育约30分钟至2小时。随后洗涤微量滴定孔,且将标记的二级抗体(例如,若生成的抗体是小鼠抗体,则为与碱性磷酸酶偶联的抗小鼠抗体)添加至各孔且培育约30分钟,且随后洗涤。将受质添加至各孔,且当针对固定多肽的抗体存在时,将出现颜色反应。

[0322] 随后可在所选的分析设计中,进一步分析如此鉴别的抗体的亲合力及特异性。在开发针对靶蛋白的免疫分析法时,纯化的靶蛋白充当标准,用该标准判断使用所选抗体的免疫分析法的敏感度及特异性。因为各种抗体的结合亲合力可能不同、某些抗体对(例如在夹心分析法中)可能在空间上彼此干扰等,所以抗体的分析效能可能为比抗体的绝对亲合力及特异性更重要的量度。

[0323] 本领域技术人员将认识到,在产生抗体或结合片段且筛选及选择各种多肽的亲合力及特异性时,可采用许多方法,但这些方法不改变本发明的范畴。

[0324] 为确定选择的抗BST1单克隆抗体是否与独特表位结合,可使用市售试剂(Pierce, Rockford, IL)将各抗体生物素化。可使用经BST1涂布的ELISA盘进行竞争研究,这些竞争研究使用未标记的单克隆抗体及生物素化的单克隆抗体。可用抗生蛋白链菌素-碱性磷酸酶探针侦测生物素化的mAb的结合。

[0325] 为确定纯化的抗体的同型,可使用对特定同型抗体特异的试剂进行同型ELISA。

[0326] 可通过西方墨点法进一步测试抗BST1抗体与BST1抗原的反应性。简言之,可制备BST1并使其经历十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。在电泳后,将分离的抗原转移至硝酸纤维素膜,用10%胎牛血清阻断,且用待测试的单克隆抗体探测。

[0327] 本文所公开的抗体的结合特异性也可通过监测(例如通过流式细胞术监测)抗体与表达BST1的细胞的结合来测定。典型地,细胞株,诸如CHO细胞株,可用编码BST1的表达载体转染。转染的蛋白质可包含卷标(诸如myc-卷标),较佳处于N末端,以便使用针对该标签的抗体进行侦测。可通过将经转染的细胞与抗体一起培育且侦测结合的抗体,来测定抗体与BST1的结合。可将抗体与经转染的蛋白质上的卷标的结合用作阳性对照。

[0328] 可通过以下方式进一步研究抗体针对BST1的特异性:使用用于测定与BST1的结合的相同方法,确定抗体是否与其他蛋白质(诸如Eph家族的另一成员)结合。

[0329] 免疫偶联物

[0330] 在另一方面中,本发明提供与治疗性部分诸如细胞毒素、药物(例如免疫抑制剂)或放射性毒素偶联的抗BST1抗体或其片段。这些偶联物在本文中称作“免疫偶联物”。包括一或多种细胞毒素的免疫偶联物称作“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒性剂包括有害于(例如杀死)细胞的任何试剂。实例包括紫杉醇、细胞迟缓素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、道诺霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-脱氢鞣固酮、糖皮质激素、普鲁卡因、四卡因、利多卡因、普萘洛尔及嘌呤霉素及其类似物或同源物。治疗剂亦包括例如抗代谢物(例如甲胺喋呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪)、烷化剂(例如氮芥、噻替派、氮芥苯丁酸、美法仑、卡莫司汀(BSNU)及洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链佐霉素、丝裂霉素C及顺-二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环霉素(例如道诺霉素(daunorubicin)(以前称道诺霉素(daunorubicin))及多柔比星)、抗生素(例如更生霉素(以前称放线菌素D)、博莱霉素、光神霉素及安曲霉素(AMC))以及抗有丝分裂剂(例如长春新碱及长春碱)。

[0331] 可与本发明的抗体偶联的治疗性细胞毒素的其他较佳实例包括多卡霉素、卡奇霉素、美登素及奥瑞斯他汀及其衍生物。卡奇霉素抗体偶联物之一实例是可商业获得的(Mylotarg[®];美国家庭用品公司(American Home Products))。

[0332] 细胞毒素可使用本领域可获得的接头技术与本文所公开的抗体偶联。已用来将细胞毒素与抗体偶联的接头类型的实例包括但不限于脲、硫醚、酯、二硫桥键及含肽的接头。可选择例如对溶酶体区室内的低pH的裂解敏感或对蛋白酶(诸如肿瘤组织中优先表达的蛋白酶诸如组织蛋白酶(例如组织蛋白酶B、C、D))的裂解敏感的接头。

[0333] 细胞毒素的实例例如描述于美国专利第6,989,452号、第7,087,600号及第7,129,261号,及PCT申请案第PCT/US2002/17210号、第PCT/US2005/017804号、第PCT/US2006/37793号、第PCT/US2006/060050号、第PCT/US2006/060711号、第W02006/110476号,及美国专利申请案第60/891,028号中,其全部以引用的方式完整并入本文。关于细胞毒素类型、接头及用于使治疗剂与抗体偶联的方法的进一步讨论,也参见Saito,G.等(2003)Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail, P.A.等(2003)Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, G. (2003)Cancer Cell 3:207-212; Allen, T.M. (2002)Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. 及Kreitman, R.J. (2002)Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter, P.D. 及Springer, C.J. (2001)Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264。

[0334] 抗体也可与放射性同位素偶联以产生细胞毒性放射药物,亦称作放射免疫偶联物。可与抗体偶联用于诊断或治疗性用途的放射性同位素的实例包括但不限于碘131、铟111、钇90及镱177。本领域确立用于制备放射免疫偶联物的方法。放射免疫偶联物的实例是可商业获得的,包括 Zevalin[®] (IDEC Pharmaceuticals) 及 Bexxar[®] (Corixa Pharmaceuticals), 且相似的方法可用来制备利用抗体的放射免疫偶联物。

[0335] 本发明的抗体偶联物可用来调节既定生物学反应,且药物部分不应解释为限于经典的化学治疗剂。例如,药物部分可为拥有所需生物学活性的蛋白质或多肽。这些蛋白质可包括例如酶活性毒素或其活性片段,诸如相思子毒素、蓖麻毒素A、假单胞菌外毒素或白喉毒素;蛋白质,诸如肿瘤坏死因子或干扰素- γ ;或生物学反应调节剂,诸如淋巴介素、介白

素-1 (“IL-1”)、介白素-2 (“IL-2”)、介白素-6 (“IL-6”)、粒细胞巨噬细胞群落刺激因子 (“GM-CSF”)、粒细胞群落刺激因子 (“G-CSF”)或其他生长因子。

[0336] 用于将该治疗性部分与抗体偶联的技术是熟知的,参见例如Arnon等,“用于癌症治疗中药物免疫靶向的单克隆抗体 (Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy)”,《单克隆抗体与癌症治疗》(Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy),Reisfeld等(编),第243-56页(Alan R.Liss出版公司1985);Hellstrom等,“药物递送用抗体 (Antibodies For Drug Delivery)”,《控制药物递送》(Controlled Drug Delivery) (第2版),Robinson等(编),第623-53页(马塞尔·德克尔公司 (Marcel Dekker, Inc.) 1987);Thorpe,“癌症治疗中细胞毒性剂的抗体运载体:综述 (Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review)”,《单克隆抗体’84:生物学与临床应用 (Monoclonal Antibodies’84:Biological And Clinical Applications)”,Pinchera等(编),第475-506页(1985);“放射性标记抗体在癌症治疗中的治疗用途的分析,结果和未来展望 (Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy)”,《用于癌症检测和治疗的单克隆抗体》(Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy),Baldwin等(编),第303-16页学术出版社1985);和Thorpe等,Immunol.Rev.,62:119-58 (1982)。

[0337] 双特异性分子

[0338] 在另一方面中,可使用包含抗BST1抗体或其片段的双特异性分子。本发明的抗体或其抗原结合部分可进行衍生化或连接至另一功能分子,例如另一肽或蛋白质(例如另一抗体或针对受体的配体)以产生与至少两个不同结合位点或靶分子结合的双特异性分子。实际上,本文所公开的抗体可进行衍生化或连接至多于一种其他功能分子以产生与多于两个不同结合位点和/或靶分子结合的多特异性分子;这些多特异性分子也意图包括在如本文所用的术语“双特异性分子”中。为产生双特异性分子,可将抗体功能性连接(例如通过化学偶联、遗传融合、非共价缔合或其他方式)至一或多种其他结合分子,诸如另一抗体、抗体片段、肽或结合模拟物,以便产生双特异性分子。

[0339] 因此,本发明包括双特异性分子,这些双特异性分子包含针对第一靶表位(也即BST1)的至少一个第一结合特异性及针对第二靶表位的第二结合特异性。第二靶表位可在与第一结合特异性所结合的靶蛋白相同的靶蛋白上存在;或第二靶表位可在与第一结合特异性所结合的靶蛋白不同的靶蛋白上存在。第二靶表位可在与第一靶表位(也即BST1)相同的细胞上存在;或第二靶表位可在不由呈现第一靶表位的细胞呈现的靶上存在。如本文所用,术语“结合特异性”是指包含至少一个抗体可变结构域的部分。

[0340] 在本发明的一个实施方式中,第二靶表位是Fc受体,例如人类Fc γ RI (CD64)或人类Fc α 受体 (CD89)。因此,本发明包括能够结合至表达Fc γ R或Fc α R的效应细胞(例如单核细胞、巨噬细胞或多形核细胞 (PMN))并结合至表达BST1的靶细胞的双特异性分子。这些双特异性分子将表达BST1的细胞靶向效应细胞并触发Fc受体介导的效应细胞活性,诸如吞噬表达BST1的细胞、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)、细胞介素释放或生成超氧阴离子。

[0341] 在本发明的另一实施方式中,第二靶表位是CD3或CD5。因此,本发明包括能够结合至表达CD3或CD5的效应细胞(例如表达CD3或CD5的细胞毒T细胞)并结合至表达BST1的靶细胞的双特异性分子。这些双特异性分子将表达BST1的细胞靶向效应细胞并触发CD3或CD5介

导的效应细胞活性,诸如T细胞纯是扩增及T细胞细胞毒性。在此实施方式中,双特异性抗体可具有总计两个或三个抗体可变结构域,其中双特异性抗体的第一部分能够通过特异性结合至位于人类免疫效应细胞上的效应抗原而募集人类免疫效应细胞的活性,其中该效应抗原是人类CD3或CD5抗原,该第一部分由一个抗体可变结构域组成,且双特异性抗体的第二部分能够特异性结合至不为效应抗原的靶抗原(例如BST1),该靶抗原位于不是该人类免疫效应细胞的靶细胞上,且该第二部分包含一或两个抗体可变结构域。

[0342] 在本发明的其中双特异性分子具有多特异性的一实施方式中,除了抗Fc结合特异性或抗CD3或CD5结合特异性及抗BST1结合特异性之外,分子可进一步包括第三结合特异性。在一个实施方式中,第三结合特异性是抗增强因子(EF)部分,例如与参与细胞毒性活性的表面蛋白结合并因而增加针对靶细胞的免疫反应的分子。“抗增强因子部分”可为与既定分子(例如抗原或受体)结合且因而导致增强结合决定簇对Fc受体或靶细胞抗原的作用的抗体、功能性抗体片段或配体。“抗增强因子部分”可结合Fc受体或靶细胞抗原。替代地,抗增强因子部分可与如下实体结合,该实体不同于第一和第二结合特异性所结合的实体。例如,抗增强因子部分可结合细胞毒性T细胞(例如经由CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1或导致针对靶细胞的免疫反应增加的其他免疫细胞)。

[0343] 在一个实施方式中,双特异性分子包含至少一种抗体或其抗体片段(包括例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fd、dAb或单链Fv)作为结合特异性。抗体也可为轻链或重链二聚体或其任何最小片段诸如Fv或单链构建体,如美国专利第4,946,778号中所述,该专利的内容明确地以引用的方式并入。

[0344] 在一个实施方式中,针对Fc γ 受体的结合特异性由单克隆抗体提供,该单克隆抗体的结合不被人类免疫球蛋白G(IgG)阻断。如本文所用,术语“IgG受体”是指位于染色体1上的8个 γ -链基因中的任一者。这些基因编码总计12种跨膜或可溶性受体同型,其分成三个Fc γ 受体类别:Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)及Fc γ RIII(CD16)。在一个较佳实施方式中,Fc γ 受体是人类高亲和力Fc γ RI。人类Fc γ RI是一种72kDa分子,其对单体IgG显示高亲和力(10^8 - 10^9 M⁻¹)。

[0345] 某些较佳抗Fc γ 单克隆抗体的产生及表征描述于PCT公开案W0 88/00052及美国专利第4,954,617号中,这些文献的教导内容以引用的方式完整并入本文。这些抗体与Fc γ RI、Fc γ RII或Fc γ RIII的表位在如下位点结合,该位点不同于受体的Fc γ 结合位点,且因此,其结合实质上不被生理学水平的IgG所阻断。可用于本发明中的特定抗Fc γ RI抗体是mAb 22、mAb 32、mAb 44、mAb 62及mAb 197。产生mAb 32的融合瘤可自美国菌种保存中心获得,ATCC保藏号HB9469。在其他实施方式中,抗Fc γ 受体抗体是人源化形式的单克隆抗体22(H22)。H22抗体的产生及表征在Graziano,R.F.等(1995)J.Immunol 155(10):4996-5002及PCT公开案W0 94/10332中描述。产生H22抗体的细胞株以名称HA022CL1保藏于美国菌种保存中心并具有保藏号CRL 11177。

[0346] 在其他较佳实施方式中,针对Fc受体的结合特异性由结合至人类IgA受体(例如Fc α 受体[Fc α RI(CD89)])的抗体提供,该抗体的结合较佳不被人类免疫球蛋白A(IgA)阻断。术语“IgA受体”意在包括位于染色体19上的一个 α -基因(Fc α RI)的基因产物。已知此基因编码55至110kDa的几种交替剪接的跨膜同型。Fc α RI(CD89)以组成性方式在单核细胞/巨噬细胞、嗜酸性粒细胞及嗜中性粒细胞上表达,但不在非效应细胞群体上表达。Fc α RI对

IgA1及IgA2具有中等亲和力(约 $5 \times 10^7 M^{-1}$),该亲和力在曝露于细胞介素诸如G-CSF或GM-CSF时增加[Morton,H.C.等(1996)Critical Reviews in Immunology 16:423-440]。已描述4种Fc α RI-特异性单克隆抗体,其被鉴别为A3、A59、A62及A77,其在IgA配体结合结构域外部结合Fc α RI[Monteiro,R.C.等(1992)J.Immunol.148:1764]。

[0347] Fc α RI及Fc γ RI是用于本发明双特异性分子中的较佳触发受体,因为其(1)主要表达在免疫效应细胞(例如单核细胞、PMN、巨噬细胞及树突细胞)上;(2)以高水平表达(例如5,000-100,000每细胞);(3)是细胞毒性活性(例如ADCC、吞噬)的介体;且(4)介导靶向其的抗原(包括自身抗原)的增强的抗原呈递。

[0348] 可用于双特异性分子中的抗体是鼠类、人类、嵌合及人源化单克隆抗体。

[0349] 可通过使用本领域已知的方法,将成分结合特异性例如抗-FcR、抗-CD3、抗-CD5及抗-BST1结合特异性偶联而制备本发明的双特异性分子。例如,各双特异性分子的结合特异性可单独地产生且随后彼此偶联。当结合特异性是蛋白质或肽时,各种偶联剂或交联剂可用于共价偶联。交联剂的实例包括蛋白A、碳化二亚胺、N-丁二酰亚氨基-S-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻亚苯基双顺丁烯二酰亚胺(oPDM)、N-丁二酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)及磺基丁二酰亚氨基-4-(N-顺丁烯二酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-SMCC)[参见例如Karpovsky等(1984)J.Exp.Med.160:1686;Liu,MA等(1985)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:8648]。其他方法包括在Paulus(1985)Behring Ins.Mitt.第78期,118-132;Brennan等(1985)Science229:81-83;和Glennie等(1987)J.Immunol.139:2367-2375中描述的那些。较佳偶联剂是SATA及磺基-SMCC,二者均可自皮尔斯化学公司(Pierce Chemical Co.)(伊利诺伊州罗克福德)获得。

[0350] 已通过将双重结合工程化入全长抗体样形式,针对双特异性获得另外的双价结构(Wu等,2007,Nature Biotechnology 25[11]:1290-1297;USSN12/477,711;Michaelson等,2009,mAbs 1[2]:128-141;PCT/US2008/074693;Zuo等,2000,Protein Engineering 13[5]:361-367;USSN09/865,198;Shen等,2006,J Biol Chem 281[16]:10706-10714;Lu等,2005,J Biol Chem 280[20]:19665-19672;PCT/US2005/025472;这些文献明确地以引用的方式并入本文)。

[0351] 当结合特异性是抗体时,其可通过两个重链的C末端铰链区的巯基键合而偶联。在一尤其较佳实施方式中,在偶联之前修饰铰链区以含有奇数个巯基残基,较佳1个巯基残基。

[0352] 替代地,两种结合特异性可在相同的载体中编码且在相同的宿主细胞中表达及组装。此方法在下述情况下尤其有用,其中双特异性分子是mAb x mAb、mAb x Fab、Fab x F(ab')₂或配体x Fab融合蛋白。双特异性分子可为包含一个单链抗体及结合决定簇的单链分子或包含两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性分子可包含至少两个单链分子。用于制备双特异性分子的方法例如在美国专利第5,260,203号、第5,455,030号、第4,881,175号、第5,132,405号、第5,091,513号、第5,476,786号、第5,013,653号、第5,258,498号及第5,482,858号中描述,这些专利均明确地以引用的方式并入本文。

[0353] 可通过例如酶联免疫吸附分析法(ELISA)、放射免疫分析法(RIA)、FACS分析、生物分析法(例如生长抑制)或西方墨点分析法证实双特异性分子与其特异性靶的结合。通常,通过使用特异于目的复合物的经标记试剂(例如抗体),这些分析法中的每一者侦测特定目

的蛋白质-抗体复合物的存在。例如,可使用例如识别抗体-FcR复合物并与其特异性结合的酶联抗体或抗体片段侦测FcR-抗体复合物。替代地,可使用多种其他免疫分析法中之任一者侦测复合物。例如,抗体可进行放射性标记且用于放射免疫分析法(RIA)中(参见例如Weintraub,B.,放射免疫分析原理(Principles of Radioimmunoassays),第七次放射性配体测定技术培训班(Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques),内分泌学会(The Endocrine Society),1986年3月,该文献以引用的方式并入本文)。可通过手段诸如使用 γ 计数器或闪烁计数器或通过放射自显影术侦测放射性同位素。

[0354] 抗体片段和抗体模拟物

[0355] 本发明不限于传统抗体的用途;其可经由使用抗体片段及抗体模拟物来实践。如下文所详述,现已开发多种抗体片段及抗体模拟技术且其是此项技术内广泛已知的。尽管许多这些技术诸如结构域抗体、纳米抗体及单抗体利用传统抗体结构的片段或其他修饰,但亦存在替代性技术,诸如采用如下结合结构的亲和抗体、DARPin、Anticalin、亲和体(Avimer)及万能抗体(Versabody),这些结合结构虽然仿真传统抗体结合,但可自不同机理产生且经由不同机理发挥功能。

[0356] 结构域抗体(dAb)是抗体的最小功能性结合单元,对应于人类抗体重链(V_H)或轻链(V_L)的可变区。结构域抗体具有大约13kDa的分子量。Domantis已开发一系列庞大且高度功能性的完全人类 V_H 及 V_L dAb文库(各文库中超过100亿个不同序列),且使用这些文库来选择对治疗性靶特异的dAb。与许多常规抗体相反,结构域抗体在细菌、酵母及哺乳动物细胞系统中表达良好。结构域抗体及其产生方法的其他细节可通过参考美国专利第6,291,158号、第6,582,915号、第6,593,081号、第6,172,197号、第6,696,245号;美国系列号2004/0110941;欧洲专利申请案第1433846号及欧洲专利0368684及0616640;W005/035572、W004/101790、W004/081026、W004/058821、W004/003019及W003/002609而获得,这些文献中之每一者以引用的方式完整并入本文。

[0357] 纳米抗体是抗体衍生的治疗性蛋白质,其含有天然存在的重链抗体的独特结构性及功能性特性。这些重链抗体含有单个可变结构域(VHH)及两个恒定结构域(C_H2 及 C_H3)。重要地,克隆及分离的VHH结构域是具有原始重链抗体的完整抗原结合能力的极其稳定的多肽。纳米抗体与人类抗体的 V_H 结构域具有高度同源性及可进一步人源化,而不会丧失任何活性。重要地,纳米抗体具有低免疫原性潜力,此已在采用纳米抗体先导化合物的灵长类动物研究中得以证实。

[0358] 纳米抗体合并常规抗体的优点与小分子药物的重要特征。如同常规抗体,纳米抗体显示对其靶的高度靶特异性、高亲和力以及低固有毒性。然而,如同小分子药物,其可抑制酶并轻易地接近受体裂隙。另外,纳米抗体极端稳定,可通过注射以外的手段给予(参见例如W004/041867,其以引用的方式完整并入本文)且易于制备。纳米抗体的其他优点包括识别由于其小尺寸而不常见或隐藏的表位、归因于其独特3维结构而以高亲和力及选择性结合至蛋白质靶的腔或活性位点内、药物形式灵活性、半衰期的可调节性、以及开发药物的容易性及速度。

[0359] 纳米抗体由单基因编码且在几乎全部的原核及真核宿主,例如大肠杆菌(参见例如US 6,765,087,其以引用的方式完整并入本文)、霉菌(例如曲霉属(*Aspergillus*)或木霉属(*Trichoderma*))及酵母(例如酵母属、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、汉逊酵母属

(Hansenula) 或毕赤酵母属) (参见例如US 6,838,254,其以的引用方式完整并入本文) 中可高效产生。生产制程是可扩展性的,且已产生多公斤量的纳米抗体。由于相比于常规抗体,纳米抗体显示出优越稳定性,故可将其调配成储存期长的即用型溶液。

[0360] 纳米克隆(Nanoclone)方法(参见例如WO 06/079372,其以引用的方式完整并入本文)是一种基于B-细胞的自动化高通量选择,针对所要靶产生纳米抗体的专有方法,且可在本发明的情形下使用。

[0361] 单抗体是另一抗体片段技术,然而此技术基于IgG4抗体的铰链区的移除。铰链区的缺失产生尺寸基本上为传统IgG4抗体的一半且具有单价结合区而非IgG4抗体双价结合区的分子。亦熟知的为,IgG4抗体具有惰性且因而不与免疫系统相互作用,此对于治疗不希望有免疫反应的疾病可为有利的,且此优点传递至单抗体上。例如,单抗体可起作用以抑制或沉默而非杀伤其所结合的细胞。另外,与癌细胞结合的单抗体不刺激其增殖。另外,因为单抗体的尺寸为传统IgG4抗体的约一半,所以其可在较大实体瘤上显示更好的分布,并产生潜在有利的功效。单抗体以类似于完整IgG4抗体的速率自身体中清除且能够以类似于完整抗体的亲和力与其抗原结合。单抗体的其他细节可通过参考专利公开案WO2007/059782获得,该文献以引用的方式完整并入本文。

[0362] 亲和抗体分子代表基于58个氨基酸残基的蛋白质结构域的一类新亲和蛋白,该58个氨基酸残基的蛋白质结构域源自葡萄球菌蛋白A的结合IgG的结构域之一。已将此三螺旋束结构域用作构建组合噬菌体文库的骨架,可使用噬菌体呈现技术,自这些噬菌体文库中选择靶向所需分子的亲和抗体变体[Nord K,Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA, (1997) “选自 α -螺旋细菌受体结构域组合文库的结合蛋白(Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain)”, Nat Biotechnol 15:772-7; Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA (2002) “来自蛋白A组合工程的人免疫球蛋白A(IgA)特异性配体(Human immunoglobulin A(IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A)”, Eur J Biochem. 269:2647-55]。亲和抗体分子的简单稳健结构连同其低分子量(6kDa)使得其适合类型广泛的应用,例如用作侦测试剂[Ronmark J.等(2002)“大肠杆菌生产的亲和抗体-Fc嵌合体的构建和表征(Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in Escherichia coli)” J Immunol Methods 261:199-211]及用于抑制受体相互作用[Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA (2003) “通过组合蛋白工程开发的CD28结合亲和抗体配体对CD28-CD80共刺激信号的抑制(Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering)” Protein Eng 16:691-7]。亲和抗体及其产生方法的其他细节可通过参考美国专利第5831012号获得,该专利以引用的方式完整并入本文。

[0363] 标记的亲和抗体也可用于成像应用中,用于确定同型的丰度。

[0364] DARPin(设计的锚蛋白重复序列蛋白)是已经开发用来探索非抗体多肽的结合能力的抗体模拟物DRP(设计的重复序列蛋白)技术的一个实例。重复序列蛋白诸如锚蛋白或富白氨酸重复序列蛋白是泛素化结合分子,其不同于抗体,在胞内及胞外存在。其独特模块式架构以重复结构单元(重复序列)为特征,这些重复结构单元堆迭在一起,形成呈现可变的及模块式的靶结合表面的延长重复序列结构域。基于此模块性,可产生具有高度多样化

的结合特异性的多肽组合文库。此策略包括呈现可变表面残基的自我兼容性重复序列的共有设计及其随机组装成重复序列结构域。

[0365] DARPin可在细菌表达系统中以极高产率产生,且其属于已知最稳定蛋白质。已选择针对宽范围的靶蛋白的高度特异性高亲和力的DARPin,这些靶蛋白包括人类受体、细胞介素、激酶、人类蛋白酶、病毒及膜蛋白。可获得具有单位数奈莫耳至皮莫耳范围内的亲和力的DARPin。

[0366] DARPin已用于广泛类型的应用中,包括ELISA、夹心ELISA、流式细胞分析(FACS)、免疫组织化学(IHC)、芯片应用、亲和纯化或西方墨点法。亦已证明DARPin在胞内区室中具有高度活性,例如作为与绿色荧光蛋白(GFP)融合的胞内标记蛋白。DARPin进一步用来以pM范围的IC₅₀抑制病毒进入。DARPin不仅理想地阻断蛋白质-蛋白质相互作用,而且抑制酶。已成功地抑制蛋白酶、激酶及转运蛋白,最常为立体异位抑制模式。在肿瘤上极快速且特异的富集及极有利的肿瘤与血液比使得DARPin尤其适用于活体内诊断学或治疗方法。

[0367] 关于DARPin及其他DRP技术的其它信息可在美国专利申请公开案第2004/0132028号及国际专利公开案第WO 02/20565号中找到,这些公开案均以引用的方式完整地并入本文。

[0368] Anticalin是另一抗体模拟物技术。然而,在此情况下,结合特异性源自脂质运载蛋白(lipocalin),在人类组织及体液中天然及大量表达的低分子量蛋白质家族。脂质运载蛋白已演化成在活体内执行一系列与生理转运及储存化学敏感或不溶性化合物相关的功能。脂质运载蛋白具有稳健的固有结构,其包含高度保守的 β -桶,该 β -桶在蛋白质的一端支撑4个环。这些环形成结合袋的入口,且分子的此部分中的构形差异解释个别脂质运载蛋白之间结合特异性的变化。

[0369] 尽管保守 β -折叠框架支撑的高变环的总体结构类似于免疫球蛋白,但脂质运载蛋白就尺寸而言与抗体明显不同,由160-180个氨基酸的单个多肽链组成,该单个多肽链略大于单个免疫球蛋白结构域。

[0370] 将脂质运载蛋白克隆且使其环经历工程化以产生Anticalin。已产生结构上多样的Anticalin的文库,且Anticalin呈现允许选择并筛选结合功能,随后表达及产生可溶性蛋白用于在原核或真核系统中进行进一步分析。研究已成功证实:可形成如下Anticalin,其对几乎任何人类靶蛋白是特异的,可将其分离,且可获得奈莫耳或更高范围的结合亲和力。

[0371] 也可将Anticalin编制为双重靶向蛋白,也即所谓的Duocalin。Duocalin以使用标准制备制程易于产生的一种单体蛋白质结合两个单独的治疗靶,同时保留靶特异性及亲和力,无论其两个结合结构域的结构取向如何。

[0372] 在已知涉及多于单个病原因素的疾病中,经由单个分子调节多个靶是尤其有利的。另外,二价或多价结合形式诸如Duocalin在以下方面具有明显潜力:靶向疾病中的细胞表面分子、介导对信号转导途径的促效效应或经由结合细胞表面受体且使其簇集而诱导增强的内化作用。另外,Duocalin的高固有稳定性与单体Anticalin相当,从而为Duocalin提供灵活的调配及递送潜力。

[0373] 关于Anticalin的其它信息可在美国专利第7,250,297号及国际专利公开案第WO 99/16873号中找到,这些文献均以引用的方式完整地并入本文。

[0374] 可用于本发明情形下的另一抗体模拟物技术是亲和体。亲和体通过活体外外显子改组及噬菌体呈现而自一个庞大的人类胞外受体结构域家族中演化,从而产生具有结合特性及抑制特性的多结构域蛋白质。已显示,多个独立的结合结构域的连接产生亲合力且与常规单表位结合蛋白相比,导致改良的亲和性及特异性。其他潜在优点包括在大肠杆菌中简单且高效地产生多靶特异性分子、改良的热稳定性及对蛋白酶的抗性。已获得针对多种靶的具有低于纳摩尔的亲和力的亲和体。

[0375] 关于亲和体的其它信息可在美国专利申请公开案第2006/0286603号、第2006/0234299号、第2006/0223114号、第2006/0177831号、第2006/0008844号、第2005/0221384号、第2005/0164301号、第2005/0089932号、第2005/0053973号、第2005/0048512号、第2004/0175756号中找到,这些文献均以引用的方式完整地并入本文。

[0376] 万能抗体是可用于本发明情形下的另一抗体模拟物技术。万能抗体是半胱氨酸>15%的3-5kDa小蛋白质,其形成置换典型蛋白质具有的疏水核心的高二硫桥键密度骨架。用少数二硫桥键置换大量疏水性氨基酸(包含疏水核心)产生更小、亲水性更大(更少的聚集及非特异性结合)、对蛋白酶及热的抗性更大且具有更低T细胞表位密度的蛋白质,因为对MHC呈递作出最大贡献的残基是疏水性的。众所周知全部4种这些特性均影响免疫原性,且预期其一起引起免疫原性的巨大降低。

[0377] 万能抗体的灵感来自水蛭、蛇、蜘蛛、蝎子、蜗牛及海葵产生的可注射天然生物药物,已知这些药物显示出意料低的免疫原性。自选择的天然蛋白质家族开始,通过设计及筛选,使尺寸、疏水性、蛋白水解抗原加工及表位密度最小化至远低于可注射天然蛋白均值的程度。

[0378] 鉴于万能抗体的结构,这些抗体仿真物提供通用样式,该通用样式包括多价态、多特异性、多样的半衰期机制、组织靶向模块及不存在抗体Fc区。另外,万能抗体在大肠杆菌中以高产率产生,且因为其亲水性及小尺寸,万能抗体是高度可溶的且可调配成高浓度。万能抗体具有出乎意料的热稳定性(其可被蒸煮)并提供延长的存放期。

[0379] 关于万能抗体的其它信息,可在美国专利申请公开案第2007/0191272号中找到,该文献以引用的方式完整地并入本文。

[0380] 上文提供的抗体片段及抗体模拟物技术的详细描述不意欲为可用于本说明书上下文中的全部技术的全面清单。例如且非限制性地,可在本发明的情形下使用多项额外技术,包括基于多肽的替代性技术,诸如如Qui等(2007)Nature Biotechnology 25(8):921-929中所概述的互补决定区融合法,该文献以引用的方式完整地并入本文;以及基于核酸的技术,诸如在美国专利第5,789,157号、第5,864,026号、第5,712,375号、第5,763,566号、第6,013,443号、第6,376,474号、第6,613,526号、第6,114,120号、第6,261,774号及第6,387,620号中描述的RNA适体技术,这些文献均以引用的方式并入本文。

[0381] 药物组合物

[0382] 在另一方面中,本发明提供一种组合物,例如一种药物组合物,其含有一种抗BST1抗体或其抗原结合部分或抗BST1抗体或其抗原结合部分的组合,与药学上可接受的运载体一起调配,其用于预防或治疗MDS。此类组合物可包括一种本发明的抗体或免疫偶联物或双特异性分子或(例如两种或更多种不同的)本发明的抗体或免疫偶联物或双特异性分子的组合。举例而言,本发明的药物组合物可包含结合至BST1上不同表位或具有互补活性的抗

体(或免疫偶联物或双特异性抗体)的组合。

[0383] 本发明的药物组合物也可在组合疗法中给予,也即与其他试剂组合。例如,组合疗法可包括与至少一种其他的抗肿瘤剂或抗炎剂或免疫抑制剂组合的如本文所公开的抗体。在下文关于本发明抗体用途的章节中,更详细描述可在组合疗法中使用的治疗剂的实例。

[0384] 如本文所用,“药学上可接受的运载体”包括生理上相容的任何及全部溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂及抗真菌剂、等张及吸收延迟剂及其类似物。较佳地,运载体适用于静脉内、肌内、皮下、非经肠、脊髓或表皮给予(例如通过注射或输注)。视给予途径而定,活性化合物,也即抗体、免疫偶联物或双特异性分子,可包覆于保护该化合物免遭可能使化合物失活的酸及其它天然条件的作用的材料内。

[0385] 本发明的药物组合物可包括一或多种药学上可接受的盐。“药学上可接受的盐”是指保留母化合物的所要生物活性且不引起任何不希望的毒理作用的盐[参见例如Berge, S.M.等(1977) J.Pharm.Sci.66:1-19]。这些盐的实例包括酸加成盐及碱加成盐。酸加成盐包括衍生自无毒无机酸,诸如氢氯酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸及其类似无机酸;以及衍生自无毒有机酸,诸如脂族一元及二元羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳族酸、脂族及芳族磺酸及其类似有机酸的酸加成盐。碱加成盐包括衍生自碱土金属,诸如钠、钾、镁、钙及其类似碱土金属;以及衍生自无毒有机胺,诸如N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因及其类似有机胺的碱加成盐。

[0386] 本发明的药物组合物也可包括药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,诸如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠及其类似物;(2)油溶性抗氧化剂,诸如棕榈酸抗坏血酸酯、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚及其类似物;和(3)金属螯合剂,诸如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸及其类似物。

[0387] 可在本发明的药物组合物中使用的适合水性及非水性运载体的实例包括水、乙醇、多元醇(诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇及其类似物)及其适合混合物、植物油(诸如橄榄油)及可注射的有机酯(诸如油酸乙酯)。可例如通过使用包衣材料诸如卵磷脂、在分散液的情况下通过维持所需要的粒度、及通过使用界面活性剂,来维持适当的流动性。

[0388] 这些组合物也可含有佐剂,诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂及分散剂。可通过同前的灭菌工序及通过纳入多种抗细菌剂及抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸及其类似物)确保防止微生物存在。也可能希望的为,将等张剂(诸如糖、氯化钠及其类似物)纳入组合物。此外,可通过纳入延迟吸收的试剂(诸如单硬脂酸铝及明胶)来实现可注射医药形式的延长吸收。

[0389] 药学上可接受的运载体包括无菌水溶液或分散液及用于现场制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。用于药学上活性物质的这些介质及试剂的用途是本领域已知的。除了与活性化合物不兼容的情况之外,涵盖任何常规介质或试剂在本发明药物组合物中的用途。也可将补充性活性化合物并入组合物中。

[0390] 治疗性组合物通常必须为无菌的,且在制备及储存条件下是稳定的。组合物可调配为溶液、微乳液、脂质体或适合高药物浓度的其他有序结构。运载体可为溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇及液体聚乙二醇及其类似物)及其适合混合物。可例如通过使用包衣诸如卵磷脂、在分散液的情况下通过维持所需要的粒度及通

通过使用界面活性剂,来维持适当流动性。在许多情况下,将较佳在组合物中包括等张剂,例如糖、多元醇诸如甘露醇、山梨醇或氯化钠。可通过在组合物中包括延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸盐及明胶)来实现可注射药物组合物的延长吸收。

[0391] 可通过将活性化合物以所需要的量连同上文所列举的成分之一或组合(根据需要)并入适当溶剂中,随后无菌微过滤,而制备无菌可注射溶液。通常,通过将活性化合物并入无菌媒剂中来制备分散液,该无菌媒剂含有基础分散介质及所需要的其他成分(来自上文所列举的成分)。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,较佳制备方法是真空干燥法及冷冻干燥(冻干)法,这些方法产生活性成分外加来自其先前无菌过滤的溶液中的任何其他所需成分的粉末。

[0392] 可与运载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将视待治疗的对象及特定给予模式而变动。可与运载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量通常为产生治疗效果的组合物的量。一般而言,以100%计,此量可为与药学上可接受的运载体组合的约0.01%至约99%的活性成分,较佳约0.1%至约70%、最佳约1%至约30%的活性成分。

[0393] 调整给药方案以提供所要的最佳反应(例如治疗反应)。例如,可给予单次大丸剂,可随时间推移给予几个分开的剂量,或可如治疗情况的需要所示,按比例减少或增加剂量。尤其有利的为,以单位剂型调配非经肠组合物以易于剂量的给予及均匀性。如本文所用,单位剂型是指适合作为用于待治疗对象的单一剂量的物理离散单位;各单位含有预定量的活性化合物,该预定量经计算与所需要的医药运载体结合产生所要治疗效果。本发明单位剂型的规格由以下决定且直接视以下而定:(a) 活性化合物的独特特征及待实现的特定治疗效果,及(b) 调配此类活性化合物用于治疗对象敏感性的技术内的固有限制。

[0394] 对于抗体给予,剂量是约0.0001至100mg/kg且更常见地0.01至5mg/kg宿主体重。例如,剂量可为0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg的范围内。示范性治疗方案需要给予每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每3个月一次或每3至6个月一次。本发明抗BST1抗体的较佳给药方案包括经由静脉内给予的1mg/kg体重或3mg/kg体重,使用以下给药时程之一给予抗体:(i) 每四周持续六个剂量,随后每三个月;(ii) 每三周;(iii) 3mg/kg体重一次,随后每三周1mg/kg体重。

[0395] 在一些方法中,同时给予具有不同结合特异性的两种或更多种单克隆抗体,在此情况下,给予的各抗体的剂量落在所指示的范围内。通常多次给予抗体。单个剂量之间的时间间隔可为例如每周、每月、每三个月或每年。时间间隔也可为不规则的,如通过测量患者中针对靶抗原的抗体的血液水平所指示。在一些方法中,调整剂量以实现约1-1000 μ g/ml、且在一些方法中约25-300 μ g/ml的血浆抗体浓度。

[0396] 替代地,抗体可以持续释放制剂形式给予,在此情况下需要较低频率的给予。剂量及频率视抗体在患者中的半衰期而变化。通常,人类抗体显示最长的半衰期,随后为人源化抗体、嵌合抗体及非人类抗体。给予的剂量及频率可视治疗为预防性的抑或治疗性的而变动。在预防性应用中,相对低的剂量以相对不频繁的时间间隔在长的时间范围内给予。一些患者继续接受治疗持续其余生。在治疗性应用中,有时需要相对短的时间间隔的相对高的剂量,直至疾病的进展减少或终止,且较佳直至患者显示出部分或完全的疾病症状改善。此后,可向患者给予预防性方案。

[0397] 可变动活性成分在本发明药物组合物中的实际剂量水平,以获得如下的活性成分

的量,该量对于特定患者、组合物及给予模式,有效实现期望的治疗反应,而对患者无毒。所选剂量水平视多种药物代谢动力学因素而定,这些因素包括所用本发明特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性、给予途径、给予时间、所用的特定化合物的排泄速率、治疗持续时间、与所用特定组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料、所治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康及既往医史以及医学技术中熟知的类似因素。

[0398] 本文所公开的抗BST1抗体的“治疗有效剂量”较佳导致降低疾病症状的严重性,增加无疾病症状期的频率及持续时间,或预防因疾病侵袭所致的受损或致残。例如,为治疗BST1介导的肿瘤,相对于未经治疗的对象,“治疗有效剂量”较佳抑制细胞生长或肿瘤生长至少约20%、更佳至少约40%、甚至更佳至少约60%且仍更佳至少约80%。可在预示人类肿瘤中的功效的动物模型系统中评估化合物抑制肿瘤生长的能力。替代地,可通过检查化合物抑制细胞生长的能力来评估组合物的此特性,该抑制可通过技术人员已知的分析法活体外测量。治疗有效量的治疗性化合物可减小肿瘤尺寸或以其他方式改善对象的症状。一般本领域技术人员能够基于因素诸如对象的大小、对象症状的严重性及选择的特定组合物或给予途径,确定这些量。

[0399] 本发明的组合物可使用本领域已知的多种方法中之一或多者,经由一或多种给予途径给予。如技术人员所理解,给予的途径和/或模式将视所要结果而变化。本发明的抗体的较佳给予途径包括静脉内、肌内、皮内、腹膜内、皮下、脊髓或其他非经肠给予途径,例如通过注射或输注。

[0400] 如本文所用,词组“非经肠给予”意指不为经肠及局部给予的给予模式,通常通过注射给予,且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、被膜下、蛛网膜下、椎管内、硬膜外及胸骨内注射及输注。

[0401] 替代地,本文所公开的抗体可经由非经肠途径,诸如局部、表皮或黏膜给予途径,例如鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部地给予。

[0402] 活性化合物可连同保护化合物免于快速释放的运载体一起制备,诸如控释制剂,包括植入物、经皮贴片及微囊化递送系统。可使用生物可降解、生物相容性聚合物,诸如乙烯-乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯及聚乳酸。用于制备这些制剂的多种方法已被授予专利权或为本领域技术人员一般已知[参见例如缓释和控释药物递送系统(Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems) (1978) J.R.Robinson编著,马塞尔·德克尔公司(Marcel Dekker, Inc.),纽约州]。

[0403] 可用本领域已知的医疗装置给予治疗组合物。例如,在一较佳实施方式中,本发明的治疗组合物可用无针皮下注射装置诸如美国专利第5,399,163号、第5,383,851号、第5,312,335号、第5,064,413号、第4,941,880号、第4,790,824号或第4,596,556号所公开的装置给予。可用于本发明的熟知植入物及模块的实例包括:美国专利第4,487,603号,其公开用于以受控速率分配药物的可植入式微量输注泵;美国专利第4,486,194号,其公开用于经皮肤给予药物的治疗装置;美国专利第4,447,233号,其公开用于以精确输注速率递送药物的药物输注泵;美国专利第4,447,224号,其公开用于连续递送药物的可变流量的可植入式输注装置;美国专利第4,439,196号,其公开具有多腔区室的渗透性药物递送系统;和美国专利第4,475,196号,其公开渗透性药物递送系统。这些专利以引用的方式并入本文。许多其他的此类植入物、递送系统及模块是本领域技术人员已知的。

[0404] 在某些实施方式中,可调配本文所公开的单克隆抗体以确保在活体内的适当分布。例如,血脑屏障(BBB)排除许多高度亲水的化合物。为确保本文所公开的治疗性化合物穿过BBB(若希望),可将其例如调配在脂质体中。关于制备脂质体的方法,参见例如美国专利4,522,811、5,374,548及5,399,331。脂质体可包含一或多个被选择性转运至特定细胞或器官中的部分,从而增强靶向性药物递送[参见例如V.V.Ranade(1989) *J.Clin.Pharmacol.*29:685]。示例性靶向部分包括叶酸或生物素(参见例如美国专利5,416,016);甘露糖苷[Umezawa等(1988) *Biochem.Biophys.Res.Commun.*153:1038];抗体[P.G.Bloeman等(1995) *FEBS Lett.*357:140;M.Owais等(1995) *Antimicrob.Agents Chemother.*39:180];界面活性蛋白A受体[Briscoe等(1995) *Am.J.Physiol.*1233:134];p120[Schreier等(1994) *J.Biol.Chem.*269:9090];也参见K.Keinanen;M.L.Laukkanen(1994) *FEBS Lett.*346:123;J.J.Killion;I.J.Fidler(1994) *Immunomethods* 4:273。

[0405] 如本文所用,术语“对象”意在包括人类及非人类动物。鉴于BST1在MDS相关细胞上的表达,本文所公开的抗体、抗体组合物及方法可用于治疗患有MDS的对象。已证实BST1在抗体结合时内化,如下文实例5中所示,因此使得本发明的抗体可用于任何负载作用机制例如ADC方法、放射免疫偶联物或ADEPT方法中。

[0406] 抗体可用来抑制或阻断BST1功能,此转而可与MDS的预防或改善关联。在一特定实施方式中,将抗体(例如单克隆抗体、多特异性及双特异性分子及组合物)在活体内用于治疗或预防MDS。活体内及活体外给予本文所公开的抗体组合物(例如,单克隆抗体、多特异性及双特异性分子及免疫偶联物)的适合途径是本领域熟知的且可由一般本领域技术人员选择。例如,抗体组合物可通过注射(例如静脉内或皮下)给予。所用分子的适合剂量将视对象的年龄及体重以及抗体组合物的浓度和/或配方而定。

[0407] 如先前所描述,本文所公开的抗BST1抗体可与一或多种其他治疗剂例如细胞毒性剂、放射毒性剂或免疫抑制剂一起共给予。抗体可与试剂连接(作为免疫复合物)或可与试剂分开给予。在后一种情况下(分开给予),抗体可在试剂之前、之后或与其同时给予或可与其他已知的疗法(例如抗癌疗法,例如辐射)共给予。这些治疗剂尤其包括本身仅在对患者有毒或亚毒性的水平上有效的抗肿瘤剂,诸如多柔比星(阿德力霉素(adriamycin))、顺铂、硫酸博莱霉素、卡莫司汀、氮芥苯丁酸及环磷酰胺羟基脲。将顺铂以100mg/kg剂量每4周静脉内给予1次,且将阿德力霉素以60-75mg/ml剂量每21日静脉内给予1次。适合与本文所公开的抗体共给予的其他试剂包括用于治疗癌症的其他试剂,诸如Avastin[®]、5FU及吉西他滨。抗BST1抗体或其抗原结合片段与化疗剂的共给予提供经由对人类肿瘤细胞产生细胞毒性效应的不同机制起作用的两种抗癌剂。该共给予可解决因肿瘤细胞形成药物抗性或其抗原性变化(此可导致肿瘤细胞对抗体无反应)所致的问题。

[0408] 靶特异性效应细胞,例如与组合物(例如单克隆抗体、多特异性及双特异性分子)连接的效应细胞,也可用作治疗剂。用于靶向的效应细胞可为人类白细胞,诸如巨噬细胞、嗜中性粒细胞或单核细胞。其他细胞包括嗜酸性粒细胞、天然杀伤细胞及其他携带IgG或IgA受体的细胞。若需要,则效应细胞可自待治疗的对象获得。靶特异性效应细胞可作为生理学上可接受的溶液中的细胞悬浮液给予。给予的细胞的数目可为大约 10^8 - 10^9 ,但将视治疗目的而变动。通常,该量将足以在靶细胞(例如表达BST1的肿瘤细胞)处获得定位且通过例如吞噬影响细胞杀伤。给予途径也可变动。

[0409] 采用靶特异性效应细胞的疗法可与用于移除靶向细胞的其他技术联合进行。例如,使用本文所公开的组合物(例如单克隆抗体、多特异性及双特异性分子)和/或以这些组合物武装的效应细胞的抗肿瘤疗法可与化疗法联合使用。另外,组合免疫疗法可用来将两个不同的细胞毒性效应子群体引向肿瘤细胞排斥。例如,与抗Fc- γ RI或抗CD3连接的抗BST1抗体可与IgG或IgA受体特异性结合剂联合使用。

[0410] 本文所公开的双特异性及多特异性分子也可用来调节效应细胞上的Fc γ R或Fc γ R水平,诸如通过对细胞表面上的受体封端及消除细胞表面上的受体。抗Fc受体的混合物也可用于此目的。

[0411] 具有补体结合位点(诸如来自结合补体的IgG1、IgG-2或IgG-3或IgM的部分)的本文所公开的组合物(例如单克隆抗体、多特异性及双特异性分子及免疫偶联物)也可在补体存在下使用。在一个实施方式中,用结合剂及适当效应细胞离体处理包含靶细胞的细胞群体可通过添加补体或含有补体的血清进行补充。可通过结合补体蛋白来改良对包被有结合剂的靶细胞的吞噬。在另一实施方式中,包被有组合物(例如单克隆抗体、多特异性及双特异性分子)的靶细胞也可由补体溶解。在又一实施方式中,本发明的组合物不活化补体。

[0412] 本发明的组合物(例如单克隆抗体、多特异性及双特异性分子及免疫偶联物)也可与补体一起给予。在某些实施方式中,本发明提供包含抗体、多特异性或双特异性分子以及血清或补体的组合物。当补体紧邻于抗体、多特异性或双特异性分子存在时,这些组合物可为有利的。替代地,本文所公开的抗体、多特异性或双特异性分子以及补体或血清可单独给予。

[0413] 因此,可向用本文所公开的抗体组合物治疗的患者另外给予(在给予本发明的抗体之前、同时或之后)增强或增进抗体治疗效果的另一治疗剂,诸如细胞毒性剂或放射毒性剂。

[0414] 在其他实施方式中,可额外地用调节(例如增强或抑制)Fc γ 或Fc γ 受体的表达或活性的试剂治疗对象,例如用细胞介素治疗对象。在用多特异性分子治疗期间给予的较佳细胞介素包括粒细胞群落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞群落刺激因子(GM-CSF)、干扰素- γ (IFN- γ)及肿瘤坏死因子(TNF)。

[0415] 本文所公开的组合物(例如抗体、多特异性及双特异性分子)也可用来靶向表达Fc γ R或BST1的细胞,例如用于标记这些细胞。对于该用途,结合剂可与可被侦测的分子连接。因此,本发明提供用于离体或活体外定位表达Fc受体(诸如Fc γ R)或BST1的细胞的方法。可检测标记物可为例如放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子。

[0416] 在又一实施方式中,通过将化合物(例如治疗剂、标记、细胞毒素、放射性毒素、免疫抑制剂等)与抗体连接,本文所公开的免疫偶联物可用来将这些化合物靶向具有BST1细胞表面受体的细胞。例如,抗BST1抗体可偶联至美国专利第6,281,354号及第6,548,530号、美国专利公开案第2003/0050331号、第2003/0064984号、第2003/0073852号及第2004/0087497号中描述或W003/022806中公开的任何毒素化合物。因而,本发明提供离体或活体内定位表达BST1的细胞的方法(例如采用可检测标记物,诸如放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子)。替代地,免疫偶联物可通过将细胞毒素或放射性毒素靶向BST1,用来杀伤具有BST1细胞表面受体的细胞。

[0417] 本说明书中引用的全部参考文献,包括但不限于全部论文、公开案、专利、专利申

请案、演讲辞、本文、报导、手稿、手册、书籍、因特网告示、杂志文章、期刊、产品数据页及其类似物,在此以引用的方式完整并入本说明书。对本文中的参考文献的讨论仅意在概述其作者所作出的陈述,而不承认任何参考文献构成先前技术,且申请人保留对所引用参考文献的精确性及关联性提出异议的权利。

[0418] 虽然出于清楚理解的目的,已通过例示及实例详细描述前述发明,但一般本领域技术人员在本发明教示下将易于理解,可对本发明作出某些变化及修改,而不脱离所附申请专利范围的精神或范畴。

[0419] 本发明通过不应视为限制性的以下实例进一步说明。

[0420] 实例1:噬菌体展示文库的构建

[0421] 由BST1的氨基酸29-292组成的重组蛋白(SEQ ID NO:44)通过标准重组方法以真核方式合成且用作免疫用抗原。

[0422] 免疫及mRNA分离

[0423] 如下构建用于鉴别BST1结合分子的噬菌体展示文库。A/J小鼠(杰克森实验室公司(Jackson Laboratories),缅因州巴港)用重组BST1抗原(胞外结构域)进行腹膜内免疫,在第0日使用弗氏完全佐剂中的100 μ g蛋白质且在第28日使用100 μ g抗原。经由穿刺后眼眶窦获得小鼠的测试血液。若通过测试滴度,通过ELISA使用经由中性抗生物素蛋白(Reacti-Bind™)固定的生物素化BST1抗原(经NeutrAvidin(TM)涂布的聚苯乙烯盘,皮尔斯公司(Pierce),伊利诺伊州罗克福德)认为这些滴度高,则在第70日、第71日及第72日用100 μ g蛋白质对小鼠进行增强免疫,随后在第77日处死小鼠并进行脾切除术。若认为抗体的滴度不令人满意,则在第56日用100 μ g抗原对小鼠增强免疫且在第63日取测试血液。若获得令人满意的滴度,则在第98日、第99日及第100日用100 μ g抗原对动物增强免疫且在第105日收获脾脏。

[0424] 在层流通风橱中收获脾脏并将其转移至皮式培养皿,剪下并弃去脂肪及结缔组织。在1.0ml溶液D、25.0g硫氰酸胍(伯伦格曼海姆公司(Boehringer Mannheim),印第安纳州印第安纳波利斯)、29.3ml无菌水、1.76ml 0.75M柠檬酸钠pH 7.0、2.64ml 10%月桂酰基肌氨酸钠(sarkosyl)(费舍尔科技公司(Fisher Scientific),宾夕法尼亚州匹兹堡)、0.36ml 2-巯基乙醇(费舍尔科技公司(Fisher Scientific),宾夕法尼亚州匹兹堡)存在下,用来自无菌5cc注射器的柱塞迅速捣碎脾脏。将此脾脏悬浮液用18号针抽吸直至全部细胞溶解,且将黏性溶液转移至微量离心管。皮式培养皿用100 μ l溶液D洗涤以回收任何剩余的脾脏。此悬浮液随后经22号针另抽吸5-10次。

[0425] 将样品在两个微量离心管之间平均分配且按顺序添加以下溶液,且在每次添加后通过颠倒混合:50 μ l 2M乙酸钠pH 4.0、0.5ml水-饱和苯酚(费舍尔科技公司(Fisher Scientific),宾夕法尼亚州匹兹堡),100 μ l氯仿/异戊醇49:1(费舍尔科技公司(Fisher Scientific),宾夕法尼亚州匹兹堡)。将溶液涡旋混合10秒并在冰上培育15分钟。在2-8 $^{\circ}$ C以14krpm离心20分钟后,将水相转移至一个新管。添加等体积的水饱和苯酚:氯仿:异戊醇(50:49:1),并将该管涡旋混合10秒。在冰上培育15分钟后,将样品在2-8 $^{\circ}$ C离心20分钟,并将水相转移至一个新管且用等体积异丙醇在-20 $^{\circ}$ C沉淀最少30分钟。在4 $^{\circ}$ C以14krpm离心20分钟后,吸弃上清液,将管短暂离心且自RNA集结粒移除全部痕量的液体。

[0426] 将RNA集结粒各自溶解于300 μ l溶液D中,合并且用等体积异丙醇在-20 $^{\circ}$ C沉淀最短

30分钟。将样品在4℃以14krpm离心20分钟,如前吸弃上清液,且样品用100μl冰冷的70%乙醇冲洗。将样品再次在4℃以14krpm离心20分钟,吸弃70%乙醇溶液,且将RNA集结粒真空干燥。将集结粒再悬浮于100μl无菌的焦碳酸二乙酯处理的水中。使用吸光度1.0对应于浓度40μg/ml,通过A260测定浓度。RNA储存在-80℃。

[0427] 互补DNA (cDNA) 的制备

[0428] 直接使用如上文所述的自小鼠脾脏纯化的总RNA作为制备cDNA的模板。将RNA (50μg) 用无菌水稀释至100μL,且添加10μL 130ng/μL寡聚dT12(在Applied Biosystems 392型号DNA合成仪上合成)。将样品在70℃加热10分钟,随后在冰上冷却。在冰上添加40μL 5*第一股缓冲液(Gibco/BRL,马里兰州盖瑟斯堡),连同20μL 0.1M二硫苏糖醇(Gibco/BRL,马里兰州盖瑟斯堡)、10μL 20mM脱氧核苷三磷酸(dNTP,伯伦格曼海姆公司(Boehringer Mannheim),印地安纳州印第安纳波利斯)及10μL水。随后将样品在37℃培育2分钟。添加10μL逆转录酶(Superscript™ II,Gibco/BRL,马里兰州盖瑟斯堡),且在37℃继续培育1小时。cDNA产物直接用于聚合酶链反应(PCR)。

[0429] 通过PCR扩增抗体基因

[0430] 为使用PCR扩增实质上全部的H及L链基因,选择与实质上全部公开的序列对应的引物。因为H及L的氨基端的核苷酸序列含有巨大的多样性,所以合成33个寡核苷酸以充当H链的5'引物,并合成29个寡核苷酸以充当κL链的5'引物,如US 6,555,310中所描述。各链的恒定区核苷酸序列仅需要用于H链的一个3'引物及用于κL链的一个3'引物。

[0431] 对于各引物对,采用以下组分执行50μL反应:50μmol 5'引物,50μmol 3'引物,0.25μL Taq DNA聚合酶(5单位/μL,伯伦格曼海姆公司(Boehringer Mannheim),印地安纳州印第安纳波利斯),3μL cDNA(如前述制备的),5μL 2mM dNTP,5μL含MgCl₂的10*Taq DNA聚合酶缓冲液(伯伦格曼海姆公司(Boehringer Mannheim),印地安纳州印第安纳波利斯)及H₂O至50μL。使用GeneAmp (R) 9600热循环仪(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer),加利福尼亚州福斯特城),按以下热循环程序进行扩增:94℃1分钟;30个循环的94℃20秒;55℃30秒;和72℃30秒;72℃6分钟;4℃。

[0432] PCR过程的dsDNA产物随后经受仅使用3'引物的非对称PCR,以实质上仅产生靶基因的反义股。对于各dsDNA产物,采用以下组分执行100μL反应:200μmol 3'引物,2μL ds-DNA产物,0.5μL Taq DNA聚合酶,10μL 2mM dNTP,10μL含MgCl₂的10*Taq DNA聚合酶缓冲液(伯伦格曼海姆公司(Boehringer Mannheim),印地安纳州印第安纳波利斯)及H₂O至100μL。如上文描述的不同PCR程序用来扩增单股(ss)-DNA。

[0433] 通过高效液相层析纯化单股DNA及单股DNA的激酶激活

[0434] 通过添加2.5体积乙醇及0.2体积7.5M乙酸铵及在-20℃培育至少30分钟,乙醇沉淀H链ss-PCR产物及L链单股PCR产物。通过在Eppendorf离心机中以14krpm在2-8℃离心10分钟,使DNA集结。小心地吸出上清液,并将管再次短暂离心。用移液器移除最后一滴上清液。将DNA以中温真空干燥10分钟。将H链产物汇集于210μL水中且将L链产物单独汇集于210μL水中。通过使用Hewlett Packard 1090HPLC及Gen-Pak™ FAX阴离子交换管柱(密理博公司(Millipore Corp.),马萨诸塞州米尔福德)的高效液相层析(HPLC)纯化单股DNA。表1中显示用来纯化单股DNA的梯度,且烘箱温度是60℃。在260nm监测吸光度。以0.5分钟级分收集自HPLC溶离的单股DNA。将含有单股DNA的级分如上文所述进行乙醇沉淀、集结及干燥。将

干燥的DNA集结粒汇集于200 μ L无菌水中。

[0435] 表1-用于纯化ss-DNA的HPLC梯度

时间(分钟)	%A	%B	%C	流速(ml/分钟)
0	70	30	0	0.75
2	40	60	0	0.75
17	15	85	0	0.75
18	0	100	0	0.75
23	0	100	0	0.75
24	0	0	100	0.75
28	0	0	100	0.75
29	0	100	0	0.75
34	0	100	0	0.75
35	70	30	0	0.75

[0438] 缓冲液A是25mM Tris,1mM EDTA,pH 8.0

[0439] 缓冲液B是25mM Tris,1mM EDTA,1M NaCl,pH 8.0

[0440] 缓冲液C是40mm磷酸

[0441] 在制备时将单股DNA 5'-磷酸化以便突变诱发。将24 μ L 10*激酶缓冲液(美国生物化学公司(United States Biochemical),俄亥俄州克里夫兰)、10.4 μ L 10mM腺苷-5'-三磷酸(伯伦格曼海姆公司(Boehringer Mannheim),印地安纳州印第安纳波利斯)及2 μ L聚核苷酸激酶(30单位/ μ L,美国生物化学公司(United States Biochemical),俄亥俄州克里夫兰)添加至各样品,且将管在37 $^{\circ}$ C培育1小时。通过在70 $^{\circ}$ C培育管10分钟而终止反应。通过用Tris平衡苯酚(pH>8.0,美国生物化学公司(United States Biochemical),俄亥俄州克里夫兰):氯仿:异戊醇(50:49:1)萃取1次并用氯仿:异戊醇(49:1)萃取1次,纯化DNA。在萃取后,如上文所述,将DNA乙醇沉淀并集结。将DNA集结粒干燥,随后溶解于50 μ L无菌水中。使用33 μ g/ml对应于吸光度1.0,通过在260nm测量DNA等分试样的吸光度测定浓度。样品储存在-20 $^{\circ}$ C。

[0442] 制备在生成脾脏抗体噬菌体文库中使用的尿嘧啶模板

[0443] 将1ml大肠杆菌CJ236(伯乐公司(BioRAD),加利福尼亚州赫拉克勒斯)隔夜培养物添加至250ml带挡板的摇瓶中的50ml 2*YT。使培养物在37 $^{\circ}$ C生长至OD600=0.6,用10 μ l 1/100稀释的BS45载体噬菌体储备液接种(US 6,555,310中描述的)且继续生长6小时。将大约40ml培养物在4 $^{\circ}$ C以12krpm离心15分钟。将上清液(30ml)转移至新离心管并在添加15 μ l 10mg/ml RNaseA(伯伦格曼海姆公司(Boehringer Mannheim),印地安纳州印第安纳波利斯)后于室温培育15分钟。通过添加7.5ml 20%聚乙二醇8000(费舍尔科技公司(Fisher Scientific),宾夕法尼亚州匹兹堡)/3.5M乙酸铵(西格玛化学公司(Sigma Chemical Co.),密苏里州圣路易斯)并在冰上培育30分钟,使噬菌体沉淀。将样品在2-8 $^{\circ}$ C以12krpm离心15分钟。小心地弃去上清液,且将管短暂离心以移除全部痕量的上清液。将集结粒再悬浮

于400 μ l高盐缓冲液(300mM NaCl,100mM Tris pH 8.0,1mM EDTA)中并转移至1.5ml管。

[0444] 噬菌体储备液用等体积的平衡苯酚:氯仿:异戊醇(50:49:1)反复萃取直至见不到痕量的白色界面,且随后用等体积的氯仿:异戊醇(49:1)萃取。将DNA用2.5体积乙醇及1/5体积7.5M乙酸铵沉淀且在-20 $^{\circ}$ C培育30分钟。将DNA在4 $^{\circ}$ C以14krpm离心10分钟,将集结粒用冷70%乙醇洗涤1次并真空干燥。将尿嘧啶模板DNA溶解于30 μ l无菌水中,且使用吸光度1.0对应于浓度40 μ g/ml,通过A260测定浓度。将模板用无菌水稀释至250ng/ μ L,等分并储存在-20 $^{\circ}$ C。

[0445] 突变诱发具有ss-DNA的尿嘧啶模板并电穿孔至大肠杆菌中以产生抗体噬菌体文库

[0446] 通过将单股重链及轻链基因同时引入至噬菌体呈现载体尿嘧啶模板上,生成抗体噬菌体展示文库。通过以下方式以2 μ g规模进行典型突变诱发:在0.2ml PCR反应管中混合以下组分:8 μ l(250ng/ μ L)尿嘧啶模板,8 μ l 10*黏接缓冲液(200mM Tris pH 7.0,20mM MgCl₂,500mM NaCl),3.33 μ l激酶激活的单股重链插入物(100ng/ μ L),3.1 μ l激酶激活的单股轻链插入物(100ng/ μ L)及无菌水至80 μ l。DNA在GeneAmp(R)9600热循环仪中使用以下热曲线黏接:在94 $^{\circ}$ C 20秒,85 $^{\circ}$ C 60秒,经30分钟自85 $^{\circ}$ C递减至55 $^{\circ}$ C,在55 $^{\circ}$ C保持15分钟。在该程序完成后,将DNA转移至冰上。通过添加8 μ l 10*合成缓冲液(5mM各dNTP,10mM ATP,100mM Tris pH 7.4,50mM MgCl₂,20mM DTT),8 μ L T4 DNA连接酶(1U/ μ L,伯伦格曼海姆公司(Boehringer Mannheim),印地安纳州印第安纳波利斯),8 μ L稀释的T7 DNA聚合酶(1U/ μ L,New England BioLabs,Beverly,Mass.)并在37 $^{\circ}$ C培育30分钟,实施延长/连接。用300 μ l突变诱发终止缓冲液(10mM Tris pH 8.0,10mM EDTA)终止反应。突变诱发DNA用平衡苯酚(pH >8):氯仿:异戊醇(50:49:1)萃取一次,用氯仿:异戊醇(49:1)萃取一次,且将DNA在-20 $^{\circ}$ C乙醇沉淀至少30分钟。将DNA集结且如上文所述,小心地移除上清液。将样品再次短暂离心且用移液器移除全部痕量的乙醇。将集结粒真空干燥。使DNA再悬浮于4 μ l无菌水中。

[0447] 使用电穿孔法,将1 μ l突变诱发DNA(500ng)转移至40 μ l电胜任大肠杆菌DH12S(Gibco/BRL,Gaithersburg,Md.)中。将转化的细胞与大约1.0ml隔夜XL-1细胞混合,这些隔夜XL-1细胞用2*YT培养液稀释至60%初始体积。随后将此混合物转移至15ml无菌培养管且添加9ml顶层琼脂,用于涂布在150mm LB琼脂盘上。将盘在37 $^{\circ}$ C培育4小时并随后转移至20 $^{\circ}$ C隔夜。通过用10ml 2*YT自这些盘溶离下噬菌体,离心去除碎片并取上清液,而取得首轮抗体噬菌体。这些样品是用于选择针对BST1的抗体的抗体噬菌体展示文库。通过在LB琼脂盘上涂布10 μ l 10⁻⁴稀释的悬浮细胞,随后在37 $^{\circ}$ C培育盘隔夜,来测量电穿孔的效率。通过将10⁻⁴稀释盘上空斑的数目乘以10⁶,计算出效率。在这些条件下,文库电穿孔效率典型地大于1 \times 10⁷个噬菌体。

[0448] 通过电穿孔转化大肠杆菌

[0449] 在冰上融化电感受态大肠杆菌细胞。通过温和地上下抽吸细胞2-3次,使DNA与40 μ L这些细胞混合,小心勿引入气泡。将细胞转移至已在冰上冷却的Gene Pulser比色管(0.2cm间隙,伯乐公司(BioRAD),加利福尼亚州赫拉克勒斯),再次小心勿在转移时引入气泡。将比色管置于大肠杆菌脉冲发生器(伯乐公司(BioRAD),加利福尼亚州赫拉克勒斯)中且根据制备商的推荐,用设定在1.88kV的电压进行电穿孔。将转化的样品立即再悬浮于1ml 2*YT培养液或400 μ l 2*YT/600 μ l隔夜XL-1细胞的1ml混合物中且如程序所述般进行处理。

[0450] 涂布用抗体噬菌体呈现载体突变诱发反应转化的M13噬菌体或细胞

[0451] 将噬菌体样品添加至200 μ L大肠杆菌XL1-Blue隔夜培养物(当在100mm LB琼脂盘上涂布时),或添加至600 μ L隔夜细胞(当在无菌15ml培养管中在150mm盘上涂布时)。在添加LB顶层琼脂(对于100mm盘,3ml顶层琼脂;或对于150mm盘,9ml顶层琼脂;顶层琼脂储存在55 $^{\circ}$ C(参见附录A1,Sambrook等,同前文献))后,使混合物均匀分布在已预温(37 $^{\circ}$ C-55 $^{\circ}$ C)以移除琼脂表面上任何过量水分的LB琼脂盘上。将盘在室温冷却直至顶层琼脂固化。将盘反扣且如所指示在37 $^{\circ}$ C培育。

[0452] 制备生物素化的ADP-核糖基环化酶2及生物素化的抗体

[0453] 将浓缩的重组BST1抗原(全长胞外结构域)充分透析入BBS(20mM硼酸盐,150mM NaCl,0.1%NaN₃,pH 8.0)中。在透析后,使1mg BST1(1mg/ml于BBS中)与15倍莫耳过量的生物素-XX-NHS酯(分子探针公司(Molecular Probes),俄勒冈州尤金,DMSO中40mM的储备溶液)反应。将反应物在室温培育90分钟并随后用最终浓度20mM的牛磺酸(西格玛化学品公司(Sigma Chemical Co.),密苏里州圣路易斯)淬灭。生物素化反应混合物随后在2-8 $^{\circ}$ C针对BBS透析。在透析后,将生物素化的BST1稀释于淘洗缓冲液(40mM Tris,150mM NaCl,20mg/ml BSA,0.1%吐温20,pH 7.5)中,等分且储存在-80 $^{\circ}$ C直至需要。

[0454] 利用位于重链羧基端处的游离半胱氨酸,使抗体与3-(N-顺丁烯二酰亚氨基丙酰基)生物素(分子探针公司(Molecular Probes),俄勒冈州尤金)反应。通过添加DTT至最终浓度1mM,使抗体在室温还原30分钟。使还原的抗体通过Sephadex G50脱盐管柱,该脱盐管柱在50mM磷酸钾,10mM硼酸,150mM NaCl,pH 7.0中平衡。添加3-(N-顺丁烯二酰亚氨基丙酰基)-生物素至最终浓度1mM,并允许反应在室温继续进行60分钟。随后将样品针对BBS充分透析并储存在2-8 $^{\circ}$ C。

[0455] 制备抗生物素蛋白磁性乳胶

[0456] 彻底地再悬浮磁性乳胶(Estapor,10%固体,邦氏实验室公司(Bangs Laboratories),印地安纳州费舍尔)且以2ml等分至15ml锥形管中。将磁性乳胶悬浮于12ml蒸馏水中且使用磁体(帕世帝生物系统公司(PerSeptive Biosystems),马萨诸塞州弗雷明汉),与溶液分离10分钟。在用磁体维持磁性乳胶的分离的同时,使用10ml无菌移液器小心地移除液体。此洗涤过程重复额外3次。在最后一次洗涤后,使乳胶再悬浮于2ml蒸馏水中。在一单独的50ml锥形管中,将10mg抗生物素蛋白-HS(中性抗生物素蛋白,皮尔斯公司(Pierce),伊利诺伊州罗克福德)溶解于18ml 40mM Tris,0.15M氯化钠,pH 7.5(TBS)中。在涡旋混合下,添加2ml经洗涤的磁性乳胶至稀释的抗生物素蛋白-HS,且将混合物混合额外30秒。将此混合物在45 $^{\circ}$ C培育2小时,每隔30分钟震荡。如上文所述,利用磁体使抗生物素蛋白磁性乳胶与溶液分离且用20ml BBS洗涤3次。在最后一次洗涤后,使乳胶再悬浮于10ml BBS中,且储存在4 $^{\circ}$ C。

[0457] 紧邻使用之前,将抗生物素蛋白磁性乳胶在淘洗缓冲液(40mM Tris,150mM NaCl,20mg/ml BSA,0.1%吐温20,pH 7.5)中平衡。将淘洗实验所需的抗生物素蛋白磁性乳胶(200 μ l/样品)添加至无菌15ml离心管且用淘洗缓冲液补足至10ml。将管置于磁体上10分钟以使乳胶分离。如上文所述,用10ml无菌移液器小心地移除溶液。将磁性乳胶再悬浮于10ml淘洗缓冲液中以开始第二次洗涤。用淘洗缓冲液洗涤磁性乳胶总计3次。在最后一次洗涤后,使乳胶再悬浮于淘洗缓冲液中至起始体积。

[0458] 实例2:选择针对BST1抗原的重组多克隆抗体

[0459] 如实例1中所述,自产生自高免疫小鼠的噬菌体展示文库中选择与BST1特异性结合的结合试剂。

[0460] 淘洗(panning)

[0461] 如实例1中所述,使用BS45尿嘧啶模板制备首轮抗体噬菌体。进行突变诱发DNA的电穿孔,产生源自不同免疫小鼠的噬菌体样品。为在重组多株文库中产生更大的多样性,单独淘洗各噬菌体样品。

[0462] 在用生物素化的BST1抗原进行第一轮功能性淘洗之前,通过用7F11-磁性乳胶淘洗,自抗体噬菌体文库中选择在其表面上呈现重链及轻链的噬菌体(如US 6,555,310的实例21及22中所述)。原则上如US 6,555,310的实例16中所述,对这些富集的文库进行功能性淘洗。具体而言,将10 μ L 1×10^{-6} M生物素化的BST1抗原添加至噬菌体样品(BST1的最终浓度大约 1×10^{-8} M),且允许混合物在2-8 $^{\circ}$ C平衡隔夜。

[0463] 在达至平衡后,将样品用抗生物素蛋白磁性乳胶淘洗以捕捉与BST1结合的抗体噬菌体。平衡的抗生物素蛋白磁性乳胶(实例1)(每份样品200 μ L乳胶)在室温与噬菌体一起培育10分钟。在10分钟后,将大约9ml淘洗缓冲液添加至各噬菌体样品,且使用磁体使磁性乳胶与溶液分离。在10分钟分离后,使用10ml无菌移液器小心地移除未结合的噬菌体。随后将磁性乳胶再悬浮于10ml淘洗缓冲液中以开始第二次洗涤。如上文所述,将乳胶洗涤总计3次。对于各洗涤,使管与磁体接触10分钟以使得未结合的噬菌体与磁性乳胶分离。在第三次洗涤后,使磁性乳胶再悬浮于1ml淘洗缓冲液中且转移至1.5mL管。随后收集对应于各样品的全部体积的磁性乳胶并使其再悬浮于200 μ L 2*YT中且如实例1中所述,涂布在150mm LB盘上以扩增结合的噬菌体。将盘在37 $^{\circ}$ C培育4小时,随后在20 $^{\circ}$ C隔夜。

[0464] 将用以扩增结合的噬菌体的150mm盘用来产生下一轮抗体噬菌体。在隔夜培育后,通过抽吸10mL 2*YT培养基至菌苔(lawn)上且在室温温和地震荡盘20分钟,自150mm盘溶离第二轮抗体噬菌体。随后将噬菌体样品转移至带塞式密封盖的15ml抛弃式无菌离心管,且通过以3500rpm离心该管15分钟,将来自LB盘的碎片集结。随后转移含有第二轮抗体噬菌体的上清液至新管。

[0465] 通过在15ml抛弃式无菌离心管中将100 μ L各噬菌体储备液稀释入900 μ L淘洗缓冲液,建立第二轮功能性淘洗。随后如关于第一轮淘洗所述,将生物素化的BST1抗原添加至各样品,且将噬菌体样品在室温培育1小时。随后如上文所述,用抗生物素蛋白磁性乳胶淘洗噬菌体样品。此时通过在100mm LB琼脂盘上涂布各乳胶样的等分试样(以测定 κ 阳性百分比),监测淘洗的进程。将来自各淘洗的大部分乳胶(99%)涂布在150mm LB琼脂盘上以扩增与乳胶结合的噬菌体。将100mm LB琼脂盘在37 $^{\circ}$ C培育6-7小时,此后将盘转移至室温,且将硝酸纤维素滤膜(孔径0.45mm,BA85 Protran,施莱歇舒尔公司(Schleicher and Schuel),新罕布什尔州基恩)上覆至空斑上。

[0466] 带有硝酸纤维素滤膜的盘在室温培育隔夜且随后用山羊抗小鼠 κ 碱性磷酸酶偶联物显色,以测定 κ 阳性百分比,如下文描述的。群体中具有较低 κ 阳性百分比(<70%)的噬菌体样品经历一轮采用7F11-磁性乳胶的淘洗,随后使用大约 2×10^{-9} M的生物素化的BST1抗原,在2-8 $^{\circ}$ C进行第三轮功能淘洗隔夜。亦监测此轮淘洗的 κ 阳性。汇集 κ 阳性百分比大于80%的个别噬菌体样品且使其经受最终轮次的在2-8 $^{\circ}$ C、 5×10^{-9} M下的淘洗隔夜。将来自此

第四轮次的功能性淘洗的溶离的噬菌体内所含有的BST1抗体基因亚克隆至表达载体pBRncoH3中。

[0467] 总体上,如US 6,555,310的实例18中所述,进行亚克隆过程。在亚克隆后,将表达载体电穿孔至DH10B细胞中且混合物在含有1%甘油及10 μ g/ml四环素的2*YT中生长隔夜。在四环素存在下进行第二轮生长及选择后,将细胞的等分试样冷冻在-80 $^{\circ}$ C,作为生产BST1多克隆抗体的来源。通过在含有10 μ g/ml四环素的LB琼脂盘上涂布多株混合物的样品并筛选识别BST1的抗体,自这些多株混合物中选出单克隆抗体。

[0468] 表达及纯化针对ADP-核糖基环化酶2的重组抗体

[0469] 在设定为37 $^{\circ}$ C,300rpm的Innova 4330培养震荡器(新布伦瑞克科学股份有限公司(New Brunswick Scientific),新泽西州爱迪生)中,自-70 $^{\circ}$ C细胞库隔夜产生摇瓶接种物。接种物用来接种含有成分确定的培养基[Pack等(1993)Bio/Technology 11:1271-1277]的20L发酵罐(阿布利康公司(Applikon),加利福尼亚州福斯特城),该成分确定的培养基补充有3g/L L-白氨酸、3g/L L-异亮氨酸、12g/L酪蛋白消化物(迪福科(Difco),密歇根州底特律)、12.5g/L甘油及10 μ g/ml四环素。将发酵罐中的温度、pH及溶解氧分别控制在26 $^{\circ}$ C、6.0-6.8及25%饱和度。通过添加聚丙二醇(陶氏化学公司(Dow),密歇根州米德兰)来控制泡沫。以分批补料模式添加甘油至发酵罐。通过在晚对数生长期期间添加L(+)-阿拉伯糖(西格玛公司(Sigma),密苏里州圣路易斯)至2g/L,诱导Fab表达。通过在UV-1201分光亮度计(岛津制作所(Shimadzu),马里兰州哥伦比亚)中在600nm处的光密度,测量细胞密度。在操作终止并调节pH至6.0后,使培养物以17,000psi通过M-210B-EH微流化器(微流体公司(Microfluidics),马萨诸塞州牛顿)2次。细胞的高压均化释放Fab至培养上清液中。

[0470] 纯化的第一步骤是膨胀床固定化金属亲和层析(EB-IMAC)。将0.1M NiCl₂充入StreamlineTM螯合树脂(法马西雅公司(Pharmacia),新泽西州皮斯卡特)且随后使其在以上行方向流动的50mM乙酸盐、200mM NaCl、10mM咪唑、0.01%NaN₃,pH 6.0缓冲液中膨胀及平衡。储备溶液用于使得培养物匀浆达至10mM咪唑,此后,在平衡缓冲液中稀释培养物匀浆两倍或更多倍,以降低湿固体含量至按重量计小于5%。随后将培养物匀浆装载至以表观速度300cm/小时、上行方向流动的Streamline管柱上。细胞碎片未受阻地通过,但借助镍与Fab重链上的六组氨酸标签之间的高亲和力相互作用捕捉Fab。在洗涤后,将膨胀床转换成填充床且Fab用以下行方向流动的20mM硼酸盐、150mM NaCl、200mM咪唑、0.01%NaN₃,pH 8.0缓冲液溶离。

[0471] 纯化的第二步骤使用离子交换层析(IEC)。Q Sepharose FastFlow树脂(法马西雅公司(Pharmacia),新泽西州皮斯卡特)在20mM硼酸盐、37.5mM NaCl、0.01%NaN₃,pH 8.0中平衡。来自EB-IMAC步骤的Fab溶离汇集物在20mM硼酸盐、0.01%NaN₃,pH 8.0中稀释4倍并装载至IEC管柱上。在洗涤后,Fab用37.5-200mM NaCl盐梯度溶离。在汇集之前,使用Xcell IITM SDS-PAGE系统(诺维克斯公司(Novex),加利福尼亚州圣迭戈)评估溶离级分的纯度。最后,将Fab汇集物浓缩及渗滤入20mM硼酸盐、150mM NaCl、0.01%NaN₃,pH 8.0缓冲液中用于储存。此在配备10,000MWC0盒的Sartocon SliceTM系统(赛多利斯公司(Sartorius),纽约州波希米亚)中实现。最终纯化产率典型地为50%。通过在280nm处的UV吸光度测量纯化的Fab的浓度,假定吸光度1.6对应于1mg/ml溶液。

[0472] 实例3:通过流式细胞分析测定的单克隆抗体对BST1的特异性

[0473] 通过流式细胞术测试实例2中所选择的针对BST1的抗体的特异性。为测试抗体与细胞表面BST1蛋白结合的能力,将抗体与表达BST1的细胞(分别来自人类肺腺癌及人类肺鳞状癌的A549及H226)一起培育。将细胞在FACS缓冲液(DPBS,2%FBS)中洗涤,离心并再悬浮于100 μ l稀释的初级BST1抗体(亦稀释于FACS缓冲液中)中。将抗体-A549复合物在冰上培育60分钟且随后如上文所述,用FACS缓冲液洗涤两次。将细胞-抗体集结粒再悬浮于100 μ l稀释的二级抗体(亦稀释于FACS缓冲液中)内并在冰上培育60分钟。将集结粒如先前般洗涤并再悬浮于200 μ l FACS缓冲液中。将样品装载至BD FACScanto II流式细胞仪上,且使用BD FACSDiva软件分析数据。

[0474] 流式细胞分析的结果显示,命名为BST1_A1、BST1_A2及BST1_A3的3种单克隆抗体有效地与细胞表面人类BST1结合。图3a显示BST1_A1及BST1_A2两者分别与A549及H226细胞上的BST1的结合特异性。图3b显示BST1_A3与A549及H226细胞上的BST1的结合特异性。结果显示,那些抗体针对A549及H226上BST1的强结合。

[0475] 实例4:针对BST1的单克隆抗体的结构表征

[0476] 使用标准PCR技术获得编码BST1_A2及BST1_A1单克隆抗体的重链及轻链可变区的cDNA序列,且使用标准DNA测序技术,对这些cDNA序列测序。

[0477] 可突变诱发抗体序列,以在一或多个残基处回复突变成生殖系残基。

[0478] BST1_A2的重链可变区的核苷酸及氨基酸序列分别为SEQ ID NO:10及2。BST1_A2的轻链可变区的核苷酸及氨基酸序列分别为SEQ ID NO:14及6。

[0479] BST1_A2重链免疫球蛋白序列与已知鼠类生殖系免疫球蛋白重链序列的比较显示,BST1_A2重链利用来自鼠类生殖系V_H 1-39的V_H区段。使用确定CDR区的Kabat系统进一步分析BST1_A2 V_H序列显示,重链CDR1区、CDR2区及CDR3区分别阐明如SEQ ID NO:38、42及46中所示。在图1a及1b中显示BST1_A2CDR1及CDR2 V_H序列与生殖系V_H 1-39序列的比对。

[0480] BST1_A2轻链免疫球蛋白序列与已知鼠类生殖系免疫球蛋白轻链序列的比较显示,BST1_A2轻链利用来自鼠类生殖系V_K 4-55的V_K区段。使用确定CDR区的Kabat系统进一步分析BST1_A2 V_K序列显示,轻链CDR1区、CDR2区及CDR3区分别阐明如SEQ ID NO:49、52及55中所示。在图2a、2b及2c中显示BST1_A2 CDR1、CDR2及CDR3 V_K序列与生殖系V_K 4-55序列的比对。

[0481] BST1_A1的重链可变区的核苷酸及氨基酸序列分别为SEQ ID NO:9及1。BST1_A1的轻链可变区的核苷酸及氨基酸序列分别为SEQ ID NO:13及5。

[0482] BST1_A1重链免疫球蛋白序列与已知鼠类生殖系免疫球蛋白重链序列的比较显示,BST1_A1重链利用来自鼠类生殖系V_H 1-80的V_H区段。使用确定CDR区的Kabat系统进一步分析BST1_A1 V_H序列显示,重链CDR1区、CDR2区及CDR3区分别阐明如SEQ ID NO:37、41及45中所示。在图1a及1b中显示BST1_A1CDR1及CDR2 V_H序列与生殖系V_H 1-80序列的比对。

[0483] BST1_A1轻链免疫球蛋白序列与已知鼠类生殖系免疫球蛋白轻链序列的比较显示,BST1_A1轻链利用来自鼠类生殖系V_K 4-74的V_K区段。使用确定CDR区的Kabat系统进一步分析BST1_A1 V_K序列显示,轻链CDR1区、CDR2区及CDR3区分别阐明如SEQ ID NO:48、51及54中所示。在图2a、2b及2c中显示BST1_A1 CDR1、CDR2及CDR3 V_K序列与生殖系V_K 4-74序列的比对。

[0484] BST1_A3的重链可变区的核苷酸及氨基酸序列分别为SEQ ID NO:54及52。BST1_A3

的轻链可变区的核苷酸及氨基酸序列分别为SEQ ID NO:55及53。

[0485] BST1_A3重链免疫球蛋白序列与已知鼠类生殖系免疫球蛋白重链序列的比较显示,BST1_A3重链利用来自鼠类V_H生殖系69-1的V_H区段。使用确定CDR区的Kabat系统进一步分析BST1_A3 V_H序列显示,重链CDR1区、CDR2区及CDR3区分别阐明如SEQ ID NO:56、57及58中所示。在图1a及1b中显示BST1_A3CDR1及CDR2 V_H序列与鼠类V_H生殖系69-1序列的比对。

[0486] BST1_A3轻链免疫球蛋白序列与已知鼠类生殖系免疫球蛋白轻链序列的比较显示,BST1_A3轻链利用来自鼠类V_K生殖系44-1的V_K区段。使用确定CDR区的Kabat系统进一步分析BST1_A3 V_K序列显示,轻链CDR1区、CDR2区及CDR3区分别阐明如SEQ ID NO:59、60及61中所示。在图2a、2b及2c中显示BST1_A3 CDR1、CDR2及CDR3 V_K序列与鼠类V_K生殖系44-1序列的比对。

[0487] 实例5:BST1_A1及BST1_A2在A549及H226细胞中的内化及MabZAP

[0488] 使用MabZap分析法研究H226及A549对BST1_A1及BST1_A2的内化。MabZAP分析法显示,抗BST1单克隆抗体经由结合与毒素皂草素偶联的抗人类IgG二级抗体而内化。(先进靶向系统(Advanced Targeting System),加利福尼亚州圣迭戈,IT-22-100)。首先,BST1 Fab与细胞的表面结合。随后,MabZAP抗体与初级抗体结合。随后,MabZAP复合物由细胞内化。皂草素进入细胞,导致蛋白质合成抑制及最终细胞死亡。

[0489] 如下实施MabZAP分析法。将各细胞以 5×10^3 个细胞/孔的密度接种。将抗BST1单克隆抗体或同型对照人类IgG连续稀释,随后添加至细胞并在25℃培育15分钟。随后添加MabZAP且在37℃培育72小时。通过CellTiter-Glo[®]发光细胞生存力分析(Luminescent Cell Viability Assay)试剂盒(Promega,G7571)侦测盘中的细胞生存力,且使用Promega Glomax读取并分析盘。细胞死亡与抗BST1单克隆抗体的浓度成正比。图4a及4b显示,与抗人类IgG同型对照抗体相比,抗BST1单克隆抗体BST1_A1及BST1_A2有效地由H226及A549细胞内化。

[0490] 实例6:BST1_A2的人源化

[0491] 为设计BST1_A2 V_H及V_L的人源化序列,使用三维模型鉴别对于CDR结构的形成重要的框架氨基酸。亦自GenBank数据库中选择与BST1_A2具有高度同源性的人类V_H及V_L序列。将CDR序列连同鉴别的框架氨基酸残基一起自BST1_A2移植至人类框架序列(图5-7)。

[0492] 人源化BST1_A2重链及轻链(氨基酸及核苷酸)序列给出于SEQ ID NO:73-76中。

[0493] 实例7:抗BST1 mAbs介导的抗体依赖性细胞的细胞毒性

[0494] 首先,将25μl亲本及非岩藻糖化的抗BST1抗体(BST1_A2及BST1_A2_NF)以10nm/L至0.1nm/L的浓度添加至v底96孔盘的含有50μl表达BST1的A549及U937细胞的单独孔。随后添加25μl效应细胞至这些孔以产生10:1及25:1的最终效应子:靶(E:T)比率。随后以1000rpm将盘温和地离心2分钟,此后将其在37℃,5%CO₂培育箱中培育4小时。在培育后3小时,将10μl溶解溶液添加至仅含有表达BST1的细胞的各孔,以测量最大LDH释放,及添加至仅含有培养基之一组孔用于体积校正对照。

[0495] 在培育后,以1000rpm将细胞温和地离心2分钟,此后将50μl上清液转移至平底96孔盘。使用自Promega可获得的CytoTox96[®]非放射性细胞毒性分析法(目录号:G1780),根据制备商说明书使试剂盒组分重构并随后将50μl受质混合物添加至各孔。随后覆盖盘且在25℃避光静置培育30分钟。此后,向各孔添加50μl终止溶液且使用Varioskan盘读数仪记录

在490nm处的吸光度。

[0496] 使用已知经由ADCC激发细胞杀伤的抗体作为阳性对照并使用人类IgG1同型对照作为阴性对照,结果显示,BST1_A2及BST1_A2_NF能够在表达BST1的A549及U937细胞上激发ADCC。已显示,在表达BST1的A549细胞上,BST1_A2_NF在10nmol/L下具有大约45%的杀伤(图8a)。已显示,在表达BST1的U937细胞上,BST1_A2在1nmol/L下具有大约20%的杀伤,且已显示,BST1_A2_NF在1nmol/L下具有大约45%的杀伤(图8b)。

[0497] 实例8:在MDS患者中通过流式细胞分析测定的单克隆抗体对BST1的特异性

[0498] 对由AllCells细胞库公司购买的骨髓(BM)MDS初级样品评估CD157抗原的存在。所有MDS样品在实验之前均储存于氮气中。在融化之后,通过流式细胞测量术进行免疫表型分型以评估CD157抗原的存在。使用抗人类CD45 FITC、抗人类CD34 BV421及抗人类CD157 PE (SY11B5克隆)进行FACS染色。

[0499] 所有MDS样品对于CD157抗原均为阳性的,尤其在单核细胞及母细胞中。淋巴细胞及CD45阴性亚群不表达CD157抗原。此外,单核细胞及母细胞群体两者上均观测到对CD34的良好阳性,CD34是干细胞标志物(图9)。此可为以下的证据:在MDS疾病中,发育不良病况普遍存在于整个骨髓谱系中。关于染色指数的结果展示于下表中(对CD157的阳性=SI>2)。

[0500] 表.4个MDS初级样品的不同细胞子集上的CD157表达的染色指数(SI)值

CD157染色指数				
样品代码	CD45 ^{neg}	CD45 ^高 /Lympho	CD45 ^高 /Mono	CD45低
VM-BM128	1	2	35	4
SOJ-BM0070	1.3	1.2	32	2
VM-B0138	3	3	627	31
VM-B0136	1.8	2	252	15

[0501] CD45^低及CD45^高/Mono亚群含有较高百分比的CD34细胞。使用下式计算染色指数:阳性样品中值荧光/阴性对照中值荧光。当SI>2时,细胞群体视为CD157阳性。

[0502] 实例9:使用MDS样品的离体耗尽分析法

[0503] 我们随后旨在标准自体离体分析法中确定去岩藻糖化的人源化BST1_A2是否可介导母细胞耗尽。

[0504] 将两个MDS样品在37°C/5%CO₂下(5×10⁵个细胞/管,在RPMI 10%FBS+IL-2 200IU中)在200IU的IL-2存在下与不同剂量的去岩藻糖化的人源化BST1_A2(1、0.1、0.01μg/ml)或与1μg/mL同型对照一起培育16-18小时。在培育之后,将样品用PBS+1%BSA洗涤,且随后用由制造商所提供的浓度的抗CD157-PE(SY11B5)、抗CD45-FITC、抗CD34-BV421染色,在BD Fortessa-X20获取,且在FACSDiva软件v8.0.1分析。

[0505] 结果显示一个MDS样品中在每个剂量的BST1_A2下(VM-BM0136样品)的高耗尽百分比的CD157+/CD34+/CD45低(母细胞/未分化群体)细胞(图10)。以相同方式,在测试的第二MDS样品(VM-BM0138样品)中观测到CD157+/CD34+/CD45^高细胞(单核细胞样,包括异常细胞)的耗尽(图11)。用作阴性对照的同型抗体仅诱导低百分比的耗尽。在高浓度BST1_A2下剂量-反应相关性的缺乏相当常见于此类型的去岩藻糖化治疗性抗体中(Chung等,mAbs

2012,4:326)。

[0506] 总之,数据显示,CD157高度表达于来自不同患者的MDS样品中的不同骨髓细胞亚群上,且去岩藻糖化的人源化BST1_A2促进CD157/CD34双阳性特异性细胞耗尽,表明BST1_A2在MDS治疗中的治疗应用。

[0507] 序列

[0508]

SEQ ID NO	描述	序列
1	aa VH_A1	MKQSTIALALLPLLFTPVAKAQVKLQQSGAELVRPGSS VKISCKASGYAFSNSWINWVKQRPGQGLEWIGQIYPGD YDTNYNGKFKGKATLTADYSSSTAYMQLNSLTSEDSAV YFCARGGSIYYGNLGGFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPSV YPLAPGSAQAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNV AHPASSTKVDKKIVPRDCHHHHHHH
2	aa VH_A2	MKQSTIALALLPLLFTPVAKAQAYLQQSGPELVKAGAS VKMSCKASGYSFIEYTNWVKQSHGKSLEWIGNIDPYY GTTYYNQMFTGKATLTVDQSSNTAYMQLKSLTSEDSAV YFCARGSAWFPYWGQGLTVTVSAAKTPPSVYPLAPG SAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVH TFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASST KVDKKIVPRDCHHHHHHH
3	aa VK_A1	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEMVLTQSPAIMSTSLG ERVMTMTCTASSRVSSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSN LASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSEAEADAATYYCHQY HRSPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS VVCFLNFPYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDS

[0509]

		KDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVK SFNRNES
4	aa VK_A2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMSQSPAIMSASPG EKVTMTCSASSVTYMYWYQQKPGSSPRLIYDTSNL ASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDTATYYCQQWS NYPLTFGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS VVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDS KDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVK SFNRNES
5	nt VH_A1	acgctttgtacatggagaaaataaagtgaacaaagcactattgcactggcacttface gctcttattaccctgtggcaaaagcccaggtgaagcttcagcagtcggggctgagc tggtgaggcctgggtcctcagtgagatttctgcaaggtcttgctacgaltcagta actcctggataactgggtgaagcagaggcctggacagggcttgagtggattggaca gattatcctggagattatgataactacaatggaaaatcaagggtaaagccacact gactgcagactactcctccagcacagcctacatgcagctcaacagcctaactctgag gactctgcggtctatttctgtgcaaggggggatcagctactatggaacctcgggttct tcgatgtctggggcgcaggaccacggcaccgtctcctcagccaaaacgacacccc catctgtctatccactggccccggatctgctgcccanaactcaactggtgacctgg gatgacctggaaggctatttccctgagccagtgacagtgacctggaacttgatcc ctgtccagcgggtgacacactccagctgtcctgcagctgacctctacactctgagc agctcagtgactgtccctccagcactggccccagcagacctgacctgcaacgttg cccaccggccagcagcaccagggtggacaagaaaattgtgccagggtatgcatc atcacatcacatcactaattgacagcttatcatcगतangct
6	nt VH_A2	aaaacctggcgttaccacgctttgtacatggagaaaataaagtgaacaaagcacta ttgactggcactcttaccgctcttattaccctgtggcaaaagcccaggttatctaca gcagcttgacctgagctggtagaggctggcgttcagtgagatgtcctgcaaggctt ctggttactcattcaltgagtacaccataaactgggtgaacagagccatggaagagc cttgagtggattggaatattgatccttattatggaaccacttattacaatcagatgtcagc ggcaaggccacatgactgtagaccaatcttccaacactgcctacatgcagctcaagag cctgacatctgaggactctgcagctcttctgtgcaagaggctccgectggttcttact ggggccaggggactctagctactgtctcagccaaaacgacacccccatctgtctat ccactggccccggatctgtgcccanaactcaactcatggtgacctgggatgctggt caagggtatttccctgagccagtgacagtgacctggaactctggatccctgtccagcg gtgtgacacactccagctgtcctgcagctgacctctacactctgagcagctcagtg ctgtccccctccagcactggcccagcagacctgacctgcaacgttgcccaccgg ccagcagcaccagggtggacaagaaaattgtgccagggtatgcatcaccatca ccatcactaattgacagcttatcatcगत
7	nt VK_A1	gttttttggatggatgaaacgatgaaatacctattgcctacggcagccgctggattgt attactcgtgcccnaaccagccatggccgaaatggfctcaccagctcaccgcaatcat gtctacatctctaggggaacgggtcacatgacctgcactgccagctcactgtaagt ccagttactgcaactggtaccagcagaagccaggatctccccnaactctggattata gtacatccaacctggcttctggagtccagctcgttcagtgagcagtgggctgggacc tctactctcacaatcagcagcatggaggctgaagatgctgccacttattactgccacc agtatcatcgttccccctacacgttccggagggggaccaagctggaataaaacggg ctgatgctgaccaactgtatccatctcccaccatccagtgagcagttaacatctggag gtgcctcagctgtgcttctgaacaactctaccccnaagacatcaatgcaagtggga agattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggacag caaagacagcactacagcatgagcagcaccctcagttgaccaaggacgagatga acgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaactcaccatgtca agagctcaacaggaatgagtcttaagtgatgactaattctagaacg
8	nt VK_A2	actctactgtttctccatacccgttttttggatggagtgaacgatgaaatacctattgc ctacggcagccgctggattgttattactcgtgcccnaaccagccatggccagatcgtt

[0510]

		atgtctcagtcctccagcaatcatgtctgcctcctccaggggagaaggcaccatgacctg cagtgccagctcaagtgaacttacatgactgggtaccagcagaagccaggatcctccc ccagactcctgatttatgacacatccaacctggcttctggagtcctcttctcagtggtg cagtggtctgggacctctactctcacaatcagccgaatggaggtcgaagatactg ccacttactgcccagcagtgagtaattaccactcacgtcggctgctgggaccaag ctggagctgaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtga gcagtaacatctggaggctcctcagtcgtgtcttctgaacaactctaccccaaaga catcaatgcaagtgaagattgatggcagtgacgacaaaatggcgtcctgaacagtt ggactgatcaggacagcaaagacagcacctacagcatgagcagcacctcaggtga ccaaggacgagtatgaacgacataacagctatacctgtgagggcactcacaagacatc aactcaccattgtcaagagctcaacaggaatgagcttaagtgattagctaattctag aacgcgtcacttggcactggccctcgttlla
9	aa VH CDR1 A1	GYAFSNSWINW
10	aa VH CDR1 A2	GYSFIEYTINW
11	aa VH CDR2 A1	GQIYPGDYDTNYNGKFK
12	aa VH CDR2 A2	GNIDPYYGTTYYNQMFT
13	aa VH CDR3 A1	ARGGSIYYGNLGGFFDV
14	aa VH CDR3 A2	ARGSAWFPY
15	aa VK CDR1 A1	TASSRVSSSYLH
16	aa VK CDR1 A2	SASSSVTYMY
17	aa VK CDR2 A1	STSNLAS
18	aa VK CDR2 A2	DTSNLAS
19	aa VK CDR3 A1	HQYHRSPYT
20	aa VK CDR3 A2	QQWSNYPLT
21	nt VH CDR1 A1	ggctacgattcagtaactcctggataaactgg
22	nt VH CDR1 A2	ggttactcattcattgagtacaccataaactgg
23	nt VH CDR2 A1	ggacagatttatcctggagattatgataactacaatggaaaattcaag
24	nt VH CDR2 A2	ggaaatattgatccttattatggaacctattacaatcagatgttcacg
25	nt VH CDR3 A1	gcaaggggggatcgatctactatgtaacctcgggttcttcgatgic
26	nt VH CDR3 A2	gcaagaggctccgctggttcttac
27	nt VK CDR1 A1	actgccagtcacgtgtaagtccagtacttgac
28	nt VK CDR1 A2	agtgccagctcaagtgaacttacatgtac
29	nt VK CDR2 A1	agtacatccaacctggcttct
30	nt VK CDR2 A2	gacacatccaacctggcttct
31	nt VK CDR3 A1	caccagtatcatggtccccgtacacg
32	nt VK CDR3 A2	cagcagtgagtaattaccactcag
33	IGHV1-80*01 (Genebank : AC160990 鼠) nt 138392-138424	ggctacgattcagtagctactggatgaactgg
34	IGHV1-80*01 (Genebank : AC160990 鼠) nt 138461-138511	ggacagatttatcctggagatggtgataactacaacggaaagtcaag
35	IGHV1-39*01 (Genebank : AC079181 鼠) nt 153362-153394	ggttactcattcactgactacaacatgaactgg
36	IGHV1-39*01 (Genebank :	ggagtaattaatcctaactatggtactactagctacaatcagaagtcaag

[0511]

	AC079181 鼠) nt 153431-153481	
37	IGKV4-74*01 (Genebank : AJ231217 鼠) nt 496-531	actgccagctcaagtgttaagtccagttacttgcac
38	IGKV4-74*01 (Genebank : AJ231217 鼠) nt 577-597	agcacatccaacctggcttct
39	IGKV4-74*01 (Genebank : AJ231217 鼠) nt 691-718	caccagtatcatcgttccccacca
40	IGKV4-55*01 (Genebank : AJ231225 鼠) nt 523-552	agtgccagctcaagtgttaagttacatgtac
41	IGKV4-55*01 (Genebank : AJ231225 鼠) nt 598-618	gacacatccaacctggcttct
42	IGKV4-55*01 (Genebank : AJ231225 鼠) nt 715-739	cagcagtgaggagtagttaccacca
43	ADP-核糖基环化酶 2 (CD157; BST1)	MAAQGCAASRLQLLLQLLLLLLLLLAAGGARARWRGE G TSAHLRDI FLGRCAEYRALLSPEQRNKNCTAIWEAFK VALDKDPCSVLPSDYDLFINLSRHSIPRDKSLFWENSHL LVNSFADNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSWCRQKND SGL DYQSCPTSEDCENNPVDSFWKRASIYQSKDSSGVIVHM LNGSEPTGAYPIKGFFADYEIPNLQKEKITRIEIVWMHEI GGPNVESC GEGSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRPVK LLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRKAPSLYTEQRAGLI IPLFLVLASRTQL
44	ADP-核糖基环化酶 2 (CD157; BST1)的 aa 29-292	GARARWRGEGTSAHLRDI FLGRCAEYRALLSPEQRNKN NCTAIWEAFKVALDKDPCSVLPSDYDLFINLSRHSIPR KSLFWENSHLLVNSFADNTRRFMPLSDVLYGRVADFLS WCRQKND SGLDYQSCPTSEDCENNPVDSFWKRASIYQ SKDSSGVIVHMLNGSEPTGAYPIKGFFADYEIPNLQKEK ITRIEIVWMHEI GGPNVESC GEGSMKVLEKRLKDMGFQ YSCINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRK
45	A2VH (SEQ ID No:2 的 氨 基 酸 21-137)	QAYLQQSGPELVKAGASVKMSCASGYSFIEYTINWV KQSHGKSLEWIGNIDPYYGTTYNQMF TGKATLTV DQ SSNTAYMQLKSLTSEDSAVYFCARGSAWFPYWGQGL VTVSA
46	VH1-人源化VH_A2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSFIEYTINWVR QAPGQGLEWIGNIDPYYGTTYNQMF TGRATLTV DTSI STAYMELSR LRSDDTAVYYCARGSAWFPYWGQGLTV VSS

[0512]

47	BF238102 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTXXXXXW VRQAPGQGLEWMGXXXXXXXXXXXXXXXXXRVTLT RDTISISTAYMELSRLSDDTAVYYCARXXXXXXXXXWG QGTLVPVSS
48	A2VL (SEQ ID No:4 的氨基酸22-128)	DIVMSQSPAIMSASPGEKVTMTCSAS-SSVTYMYWYQQ KPGSSPRLLIYDTSNLAGVPSRFSGSGSGTYSYSLTISRM EAEDTATYYCQQWSNYPLTFGAGTKLELK
49	VL1-人源化VK_A2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSAS-SSVTYMYWYQQ KPGKAPKLLIYDTSNLAGVPSRFSGSGSGTDTYTLTISSL QPEDFATYYCQQWSNYPLTFGQGTKVEIK
50	X72441 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCXXXXXXXXXXXXXWYQ QKPGKAPKLLIYXXXXXXXXGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCXXXXXXXXXXFGQGTKVEIK
51	VH1_CDR2	NIDPYYGTTYNQMFQ
52	aa VH_A3	MKQSTIALALLPLLFTPVAKAQVQLQQSRAELVMPGAS VKMSCKTSGYTFSDYVWHVWRQRPQGLEWIGRIDG SDTFNDYSQKFKGRATLTVDESSSTVYMLSSLTSEDSA VYYCARGGLLQYWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPG SAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWSGSLSSGVH TFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSETVTCNVAHPASST KVDKKIVPRDCHHHHHH
53	aa VK_A3	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIQLTQSPASLSASVG ETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNTKTL GEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHY GTPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASV VCFLNFPYKDKINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKS FNRNES
54	nt VH_A3	gtgaacaaagcactattgcactggcactctaccgctcttattaccctgtggcaaaag cccaggctcagctgcagcagcttagggctgaactgtgatgcctggggctcagtgaa gatgctcgaagactctggctacacattctgactactgggtacactgggtgaggca gaggcctggacaaggccttgagtggatcggagcgattgatggttctgalactttaatga ctacagtcagaagttaaggcaggccacattgactgtagacgaatcctccagcaca gtclacatgcaactcagcagcctgacatctgaggactctgcggtctattactgtcaagg ggggccttctcagctactggggccaaggcaccactctcacagctcctccagccaaa cgacacccccctctgtctatccactggccccctggatctgctgcccactaacctcatgg tgacctgggatgcctggcaagggtattccctgagccagtgcagtgacctggaac tctggatccctgtccagcgggtgtgcacacctccagctgtcctgcagctgacctctac actctgagcagctcagtgactgtcccctccagcacctggcccagcgagacctcact gcaacgtgcccaccggccagcagcacaaggtggacaagaaattgtgccagg gattgtcatcatcaccatcaccatcactaa
55	nt VK_A3	atgaaatactattgcctacggcagccgctggattgttactcgtgcccaccagcc atggccgacattcagctgaccagctccagcctccctatctgcactgtgggagaaact gtcaccatcacatgtcagcaagtgaacaattacagttatttagcatggatcagcag aaacagggaaaatctcctcagctcctggtctataatacaaaaacctaggagaagggtg gcatcaagggtcagtgagcagtgatcgggcacacaatttctgaagatcaacagcc tgcagcctgaagatttgggagtattactgtcaacatcattatgtactcattcacgtcg gctcggggacaaggtggaataaaacgggctgatgctgaccaactgatccatctc ccaccatccagtgcagcagtaacatctggaggtgcctcagctgtgctcttgaacaac ttctacccaaaagacatcaatgtcaagtggaagattgatggcagtgacgacaaaatgg cgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaagacagcacctacagcatgagcag

[0513]

		caccctcacgttgaccaaggacgagtatgaacgacataacagctatacctgtgaggcc actcacaagacatcaacttcaccactgtcaagagcttcaacaggaatgagtcttaa
56	aa VH_CDR1_A3	GYTFSDYWVHW
57	aa VH_CDR2_A3	GAIDGSDTFNDYSQKFK
58	aa VH_CDR3_A3	ARGGLLQY
59	aa VK_CDR1_A3	RASENIYSYLA
60	aa VK_CDR2_A3	NTKTLGE
61	aa VK_CDR3_A3	QHHYGTPFT
62	nt VH_CDR1_A3	ggctacacattctctgactactgggtactgg
63	nt VH_CDR2_A3	ggagcgattgatggttctgatactttaatgactacagtcagaagttaag
64	nt VH_CDR3_A3	gcaagggggggccttctcagtac
65	nt VK_CDR1_A3	cgagcaagtgaaaacatttacagttatttagca
66	nt VK_CDR2_A3	aatacaaaaaccttaggagaa
67	nt VK_CDR3_A3	caacatcattatggtactccattcag
68	IGHV1-69*01 (AC073939)	ggctacaccttcaccagctactggatgcactgg
69	IGHV1-69*01 (AC073939)	ggagagattgatcctctgatagttataactacaatcaaaagttaag
70	IGKV12-44*01 (AJ235955)	cgagcaagtgagaatatttacagttatttagca
71	IGKV12-44*01 (AJ235955)	aatgcaaaaaccttagcagaa
72	IGKV12-44*01 (AJ235955)	caacatcattatggtactcctcc
73	aa H_A2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFIEYNTINWVR QAPGQGLEWIGNIDPYYGTTYNQMFTRATLTVDTSI STAYMELSRRLRSDDTAVYYCARGSAWFPYWGQGLVTV VSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
74	nt H_A2	CAAGTCCAACCTGGTTCAATCTGGTGCTGAGGTTAAGA AGCCTGGTGCCTCTGTGAAGGTGTCATGTAAAGCATC TGGGTACAGCTTCATCGAGTACACCATTAATTGGGTC CGCCAAGCTCCTGGCCAGGGACTGGAGTGGATCGGC AATATCGATCCCTACTACGGGACCACATACTACAATCA AATGTTCACTGGCAGAGCCACCCTGACCGTCGACAC AAGCATATCTACAGCCTATATGGAGCTCAGCCGCTG CGGTCTGACGACACCGCTGTGTATTACTGCGCTCGGG GAAGTGCTTGGTTCCCATATTGGGGTCAGGGAACCCCT CGTTACAGTCTCCTCAGCTTCAACCAAAGGCCCCAGT GTCTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGTAAGTCTACCAGCG GCGGCACTGCCGCCCTGGGCTGTCTCGTCAAAGACT

[0514]

		<p>ACTTCCCTGAACCCGTGACAGTGTCTTGGAACAGCG GCGCACTGACAAGCGGGGTGCACACATTTCCCGCCG TCCTGCAATCCTCCGGACTGTACAGCCTCTCAAGTGT GGTGACTGTCCCATCCTCCTCCCTCGGGACCCAGACA TATATATGCAATGTGAACCATAAGCCCAGCAACACCA AGGTCGATAAGAAGGTGGAACCTAAAAGTTGCGATA AGACTCATACATGTCTCCATGCCCTGCCCTGAACT GCTGGGAGGACCTTCTGTCTTCTGTCCCTCCCAAG CCCAAAGATACCCTGATGATATCCCGCACACCAGAAG TGACATGTGTTGTTGTCGATGTCTCTCACGAGGACCC TGAAGTGAAGTTAATTGGTATGTGGACGGGGTGGAA GTGCACAACGCCAAGACCAACCTCGCGAAGAGCA GTACAACTCCACATAACCGCGTGGTGAAGTGTGCTCACC GTTCTCCATCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTATA AGTGTAAGGTGAGCAACAAAGCTCTGCCAGCACCCA TAGAGAAAATATTAGCAAAGCTAAGGGCCAGCCTC GCGAGCCACAGGTGTATACCCTCCCTCCTAGTCGCGA GGAAATGACTAAGAACCAGGTTTCCCTGACATGCCTC GTCAAGGGATTCTATCCTAGCGATATTGCCGTGCAATG GGAGTCCAATGGCCAGCCCGAGAACAATAACAAGAC CACACCTCCTGTCTCGACTCTGACGGATCCTTCTTT CTCTATAGCAAGCTGACCGTTGACAAAAGCAGGTGG CAACAGGGTAACGTGTTTTTCATGCTCTGTGATGCACG AAGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGA GCCTGTCCCCTGGCAA</p>
<p>75</p>	<p>aa L_A2</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVTYMYWYQQK PGKAPKLLIYDTSNLAGVPSRFSGSGSDYTLTISSLQ PEDFATYYCQWSNYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQ SGNSEQESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>76</p>	<p>nt L_A2</p>	<p>GACATTCAGATGACCCAATCACCAAGCAGTCTGTCAG CCAGTGTTGGGGATCGCGTGACCATAACATGCTCTGC ATCCTCTAGTGTGACTTACATGTACTGGTACCAACAG AAGCCCGGGAAAGCCCCAAAGTCTCTGATCTATGAC ACTAGCAACCTGGCTAGTGGAGTCCCCAGCCGGTTTT CCGGTTCAAGGCTCAGGGACTGACTATACTCTCACTAT TTCATCTCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACTTATTATT GTCAGCAATGGAGCAATTACCCACTGACCTTTGGGCA GGGCACCAAGGTGGAAATCAAGAGAACTGTTGCTGC TCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCAACAAGCGATGAGCAG CTGAAATCCGGGACAGCCTCTGTGGTGTGTCTCCTGA ACAACTTCTATCCTCGGGAGGCAAAGGTCCAGTGGA AAGTCGATAATGCCCTCCAGAGTGGCAACTCACAAG AAAGCGTGACTGAACAGGACTCCAAAGATAGTACAT ATAGCCTCAGCAGTACACTGACCCTGAGCAAAGCCG ATTATGAGAAACATAAGGTGTACGCTTGCGAGGTCCAC CCACCAGGGCCTGTCCAGTCCAGTGACTAAGAGCTTT AATAGAGGTGAGTGT</p>

210	215	220
Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys		
225	230	235
Ile Val Pro Arg Asp Cys His His His His His His His		240
	245	250
<210> 2		
<211> 246		
<212> PRT		
<213> 小家鼠 (Mus musculus)		
<400> 2		
Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr		
1	5	10
Pro Val Ala Lys Ala Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu		
	20	25
Val Lys Ala Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr		
	35	40
Ser Phe Ile Glu Tyr Thr Ile Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys		
	50	55
Ser Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr		
65	70	75
Tyr Asn Gln Met Phe Thr Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Gln Ser		
	85	90
Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser		
	100	105
Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ser Ala Trp Phe Pro Tyr Trp Gly		
	115	120
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser		
	130	135
Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val		
145	150	155
Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
	165	170
Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
	180	185
Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro		
	195	200
Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro		
	210	220
Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys His		

<211> 235
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)
 <400> 4
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 35 40 45
 Ser Ser Val Thr Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
 50 55 60
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 100 105 110
 Ser Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 115 120 125
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 130 135 140
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 145 150 155 160
 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 165 170 175
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 180 185 190
 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 195 200 205
 Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 210 215 220
 Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Ser
 225 230 235
 <210> 5
 <211> 811
 <212> DNA
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)
 <220>

<221> misc_feature

<222> (808)..(808)

<223> n是a, c, g, 或t

<400> 5

```
acgctttgta catggagaaa ataaagtgaa acaaagcact attgcactgg cactcttacc 60
gctcttattt acccctgtgg caaaagccca ggtgaagctt cagcagtccg gggctgagct 120
ggtgaggcct gggctcctcag tgaagatttc ctgcaaggct tctggctacg cattcagtaa 180
ctcctggata aactgggtga agcagaggcc tggacagggt cttgagtgga ttggacagat 240
ttatcctgga gattatgata ctaactacaa tggaaaattc aagggtaaag ccacactgac 300
tgcagactac tctccagca cagcctacat gcagctaac agcctaakat ctgaggactc 360
tgcggtctat ttctgtgcaa ggggggggatc gatctactat ggtaacctcg ggttcttcga 420
tgtctggggc gcagggacca cggtcaccgt ctctcagcc aaaacgacac ccccatctgt 480
ctatccactg gcccctggat ctgetgccc aactaactec atggtgacc tgggatgcct 540
ggtcaagggc tatttccctg agccagtac agtgacctgg aactctggat cctgtccag 600
cgggtgtcac accttcccag ctgtcctgca gtctgacctc tacactctga gcagctcagt 660
gactgtcccc tccagcacct ggcccagcga gaccgtcacc tgcaacgttg cccaccggc 720
cagcagcacc aaggtggaca agaaaattgt gccagggat tgtcatcatc accatcacca 780
tactaattg acagcttacc atcgatangc t 811
```

<210> 6

<211> 803

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 6

```
aaaaccctgg cgttaccac gctttgtaca tggagaaaat aaagtgaac aaagcactat 60
tgcactggca ctcttaccgc tcttatttac cctgtggca aaagcccagg cttatctaca 120
gcagtctgga cctgagctgg tgaaggctgg cgcttcagtg aagatgtcct gcaaggcttc 180
tggttactca ttcatgagt acaccataaa ctgggtgaaa cagagccatg gaaagagcct 240
tgagtggatt ggaaatattg atccttatta tggaaccact tattacaatc agatgttcac 300
gggcaaggcc acattgactg tagaccaatc ttccaacact gcctacatgc agctcaagag 360
cctgacatct gaggactctg cagtctattt ctgtgcaaga ggctccgctt ggtttcctta 420
ctggggccag gggactctag tcaactgtctc tgcagccaaa acgacacccc catctgtcta 480
tccactggcc cctggatctg ctgcccacac taactccatg gtgacctgg gatgcctggt 540
caagggtat ttccctgagc cagtgcagct gacctggaac tctggatccc tgtccagcgg 600
tgtgcacacc ttcccagctg tcttgcagtc tgacctctac actctgagca gctcagtgac 660
tgtcccctcc agcacctggc ccagcgagac cgtcacctgc aacgttgccc acccgccag 720
cagcaccaag gtggacaaga aaattgtgcc cagggtattg catcatcacc atcaccatca 780
ctaattgaca gcttatcatc gat 803
```

<210> 7

<211> 759

<212> DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 7

gtttttttgg atggagtgaa acgatgaaat acctattgcc tacggcagcc gctggattgt 60
 tattactcgc tgcccaacca gccatggccg aaatggttct caccagctct ccagcaatca 120
 tgtctacatc tctaggggaa cgggtcacca tgacctgcac tgccagctca cgtgtaagtt 180
 ccagttactt gcactggtac cagcagaagc caggatcctc ccccaaactc tggatttata 240
 gtacatccaa cctggcttct ggagtcccag ctcgcttcag tggcagtggg tctgggacct 300
 cttactctct cacaatcagc agcatggagg ctgaagatgc tgccacttat tactgccacc 360
 agtatcatcg ttccccgtac acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgggctg 420
 atgctgcacc aactgtatcc atcttccac catccagtga gcagttaaca tctggaggtg 480
 cctcagtcgt gtgcttcttg aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtggaaga 540
 ttgatggcag tgaacgacaa aatggcgctc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag 600
 acagcaccta cagcatgagc agcaccctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata 660
 acagctatac ctgtgaggcc actcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagcttca 720
 acaggaatga gtcttaagtg attagctaatt tctagaacg 759

<210> 8

<211> 804

<212> DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 8

actctctact gtttctccat acccgttttt ttggatggag tgaacgatg aaatacctat 60
 tgccctacggc agccgctgga ttgttattac tcgctgccc accagccatg gccgacatcg 120
 ttatgtctca gtctccagca atcatgtctg catctccagg ggagaaggtc accatgacct 180
 gcagtgccag ctcaagtgta acttacatgt actggtacca gcagaagcca ggatcctccc 240
 ccagactcct gatttatgac acatccaacc tggcttctgg agtccctggt cgcttcagtg 300
 gcagtgggctc tgggacctct tactctctca caatcagccg aatggaggct gaagatactg 360
 ccacttatta ctgccagcag tggagtaatt acccactcac gttcggtgct gggaccaagc 420
 tggagctgaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca tccagtgagc 480
 agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac cccaaagaca 540
 tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg aacagttgga 600
 ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcagc ttgaccaagg 660
 acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca tcaacttcac 720
 ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt ctttaagtgat tagctaattc tagaacgcgt 780
 cacttggcac tggccgctcgt tttta 804

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

gcaagaggct cgcctgggt tccttac 27
<210> 27
<211> 36
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
<400> 27
actgccagct cacgtgtaag ttccagttac ttgcac 36
<210> 28
<211> 30
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
<400> 28
agtgccagct caagtgtaac ttacatgtac 30
<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
<400> 29
agtacatcca acctggcttc t 21
<210> 30
<211> 21
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
<400> 30
gacacatcca acctggcttc t 21
<210> 31
<211> 27
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
<400> 31
caccagtatc atcggtcccc gtacacg 27
<210> 32
<211> 27
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
<400> 32
cagcagtgga gtaattaccc actcacg 27
<210> 33
<211> 33

<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
<400> 33
ggctacgcat tcagtagcta ctggatgaac tgg 33
<210> 34
<211> 51
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
<400> 34
ggacagatTT atcctggaga tggTgatact aactacaacg gaaagttcaa g 51
<210> 35
<211> 33
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
<400> 35
ggTtactcat tcaactgacta caacatgaac tgg 33
<210> 36
<211> 51
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
<400> 36
ggagtaatta atcctaacta tggTactact agctacaatc agaagttcaa g 51
<210> 37
<211> 36
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
<400> 37
actgccagct caagtgtAag ttccagttac ttgcac 36
<210> 38
<211> 21
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
<400> 38
agcacatcca acctggettc t 21
<210> 39
<211> 25
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
<400> 39

caccagtatc atcggtcccc accca 25

<210> 40

<211> 30

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 40

agtgccagct caagtgtaag ttacatgtac 30

<210> 41

<211> 21

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 41

gacacatcca acctggettc t 21

<210> 42

<211> 25

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 42

cagcagtgga gtagttaccc accca 25

<210> 43

<211> 318

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 43

Met Ala Ala Gln Gly Cys Ala Ala Ser Arg Leu Leu Gln Leu Leu Leu

1 5 10 15

Gln Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gly Gly Ala Arg Ala

20 25 30

Arg Trp Arg Gly Glu Gly Thr Ser Ala His Leu Arg Asp Ile Phe Leu

35 40 45

Gly Arg Cys Ala Glu Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Pro Glu Gln Arg Asn

50 55 60

Lys Asn Cys Thr Ala Ile Trp Glu Ala Phe Lys Val Ala Leu Asp Lys

65 70 75 80

Asp Pro Cys Ser Val Leu Pro Ser Asp Tyr Asp Leu Phe Ile Asn Leu

85 90 95

Ser Arg His Ser Ile Pro Arg Asp Lys Ser Leu Phe Trp Glu Asn Ser

100 105 110

His Leu Leu Val Asn Ser Phe Ala Asp Asn Thr Arg Arg Phe Met Pro

115	120	125
Leu Ser Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Ala Asp Phe Leu Ser Trp Cys		
130	135	140
Arg Gln Lys Asn Asp Ser Gly Leu Asp Tyr Gln Ser Cys Pro Thr Ser		
145	150	155
Glu Asp Cys Glu Asn Asn Pro Val Asp Ser Phe Trp Lys Arg Ala Ser		
165	170	175
Ile Gln Tyr Ser Lys Asp Ser Ser Gly Val Ile His Val Met Leu Asn		
180	185	190
Gly Ser Glu Pro Thr Gly Ala Tyr Pro Ile Lys Gly Phe Phe Ala Asp		
195	200	205
Tyr Glu Ile Pro Asn Leu Gln Lys Glu Lys Ile Thr Arg Ile Glu Ile		
210	215	220
Trp Val Met His Glu Ile Gly Gly Pro Asn Val Glu Ser Cys Gly Glu		
225	230	235
Gly Ser Met Lys Val Leu Glu Lys Arg Leu Lys Asp Met Gly Phe Gln		
245	250	255
Tyr Ser Cys Ile Asn Asp Tyr Arg Pro Val Lys Leu Leu Gln Cys Val		
260	265	270
Asp His Ser Thr His Pro Asp Cys Ala Leu Lys Ser Ala Ala Ala Ala		
275	280	285
Thr Gln Arg Lys Ala Pro Ser Leu Tyr Thr Glu Gln Arg Ala Gly Leu		
290	295	300
Ile Ile Pro Leu Phe Leu Val Leu Ala Ser Arg Thr Gln Leu		
305	310	315
<210> 44		
<211> 264		
<212> PRT		
<213> 智人 (Homo sapiens)		
<400> 44		
Gly Ala Arg Ala Arg Trp Arg Gly Glu Gly Thr Ser Ala His Leu Arg		
1	5	10
Asp Ile Phe Leu Gly Arg Cys Ala Glu Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Pro		
20	25	30
Glu Gln Arg Asn Lys Asn Cys Thr Ala Ile Trp Glu Ala Phe Lys Val		
35	40	45
Ala Leu Asp Lys Asp Pro Cys Ser Val Leu Pro Ser Asp Tyr Asp Leu		
50	55	60
Phe Ile Asn Leu Ser Arg His Ser Ile Pro Arg Asp Lys Ser Leu Phe		

65	70	75	80
Trp Glu Asn Ser His	Leu Leu Val Asn Ser	Phe Ala Asp Asn Thr	Arg
	85	90	95
Arg Phe Met Pro Leu	Ser Asp Val Leu Tyr	Gly Arg Val Ala Asp	Phe
	100	105	110
Leu Ser Trp Cys Arg	Gln Lys Asn Asp Ser	Gly Leu Asp Tyr Gln	Ser
	115	120	125
Cys Pro Thr Ser Glu	Asp Cys Glu Asn Asn	Pro Val Asp Ser Phe	Trp
	130	135	140
Lys Arg Ala Ser Ile	Gln Tyr Ser Lys Asp	Ser Ser Gly Val Ile	His
145	150	155	160
Val Met Leu Asn Gly	Ser Glu Pro Thr Gly	Ala Tyr Pro Ile Lys	Gly
	165	170	175
Phe Phe Ala Asp Tyr	Glu Ile Pro Asn Leu	Gln Lys Glu Lys Ile	Thr
	180	185	190
Arg Ile Glu Ile Trp	Val Met His Glu Ile	Gly Gly Pro Asn Val	Glu
	195	200	205
Ser Cys Gly Glu Gly	Ser Met Lys Val Leu	Glu Lys Arg Leu Lys	Asp
	210	215	220
Met Gly Phe Gln Tyr	Ser Cys Ile Asn Asp	Tyr Arg Pro Val Lys	Leu
225	230	235	240
Leu Gln Cys Val Asp	His Ser Thr His Pro	Asp Cys Ala Leu Lys	Ser
	245	250	255
Ala Ala Ala Ala Thr	Gln Arg Lys		
	260		

<210> 45

<211> 116

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 45

Gln Ala Tyr Leu Gln	Gln Ser Gly Pro Glu	Leu Val Lys Ala Gly	Ala
1	5	10	15
Ser Val Lys Met Ser	Cys Lys Ala Ser Gly	Tyr Ser Phe Ile Glu	Tyr
	20	25	30
Thr Ile Asn Trp Val	Lys Gln Ser His Gly	Lys Ser Leu Glu Trp	Ile
	35	40	45
Gly Asn Ile Asp Pro	Tyr Tyr Gly Thr Thr	Tyr Tyr Asn Gln Met	Phe
	50	55	60
Thr Gly Lys Ala Thr	Leu Thr Val Asp	Gln Ser Ser Asn Thr	Ala Tyr

<223> Xaa可以是任何天然产生的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (99) .. (106)

<223> Xaa可以是任何天然产生的氨基酸

<400> 47

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

<210> 48

<211> 106

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 48

```
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1          5          10          15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
          20          25          30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
          35          40          45
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65          70          75          80
Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Tyr Pro Leu Thr
          85          90          95
```

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105
 <210> 49
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 49
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Tyr Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 50
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24) .. (34)
 <223> Xaa可以是任何天然产生的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (50) .. (56)
 <223> Xaa可以是任何天然产生的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (89) .. (97)
 <223> Xaa可以是任何天然产生的氨基酸
 <400> 50
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 51

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 51

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Gln Met Phe Gln
 1 5 10 15

<210> 52

<211> 245

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 52

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Leu Gln Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
 130 135 140
 Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
 145 150 155 160
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
 165 170 175
 Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190
 Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205
 Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 210 215 220
 Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys His His
 225 230 235 240
 His His His His His
 245

<210> 53

<211> 236

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 53

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
 20 25 30
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys
 50 55 60
 Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Gly Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys
 85 90 95
 Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His
 100 105 110
 His Tyr Gly Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
 130 135 140
 Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu
 165 170 175
 Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr
 195 200 205
 Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr
 210 215 220
 Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Ser
 225 230 235

<210> 54

<211> 738

<212> DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 54

gtgaaacaaa gcactattgc actggcactc ttaccgctct tatttaccce tgtggcaaaa 60
 gccaggtcc agctgcagca gtctagggt gaacttgtga tgcttggggc ttcagtgaag 120
 atgtcctgca agacttctgg ctacacattc tctgactact ggttacctg ggtgaggcag 180
 aggccctggac aaggccttga gtggatcgga gcgattgatg gttctgatac ttttaatgac 240
 tacagtcaga agtttaaggg cagggccaca ttgactgtag acgaatctc cagcacagtc 300
 tacatgcaac tcagcagcct gacatctgag gactctgcgg tctattactg tgcaaggggg 360
 ggcccttcttc agtactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcagc caaaacgaca 420
 cccccatctg tctatccact ggcccctgga tctgctgccc aaactaactc catggtgacc 480
 ctgggatgcc tggcaaggg ctatttcct gagccagtga cagtgacctg gaactctgga 540
 tccctgtcca gcggtgtgca caccttccca gctgtcctgc agtctgacct ctacactctg 600
 agcagctcag tgactgtccc ctccagcacc tggcccagcg agaccgtcac ctgcaacgtt 660
 gccaccccg ccagcagcac caaggtggac aagaaaattg tgcccaggga ttgtcatcat 720
 caccatcacc atcaactaa 738

<210> 55

<211> 711

<212> DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 55

atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgtctc ccaaccagcc 60
 atggccgaca ttcagctgac ccagctctcca gcctccctat ctgcatctgt gggagaaact 120

gtcacatca catgtcgagc aagtgaaaac atttacagtt atttagcatg gtatcagcag 180
 aaacagggaa aatctcctca gtcctgtgtc tataatacaa aaaccttagg agaaggtgtg 240
 ccatcaaggt tcagtggcag tggatcgggc acacaatfff ctctgaagat caacagcctg 300
 cagcctgaag attttgggag ttattactgt caacatcatt atggtactcc attcacgttc 360
 ggctcgggga caaagttgga aataaaacgg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
 ccacatcca gtgagcagtt aacatctgga ggtgcctcag tcgtgtgctt cttgaacaac 480
 ttctacccca aagacatcaa tgtcaagtgg aagattgatg gcagtgaacg acaaaatggc 540
 gtcctgaaca gttggactga tcaggacagc aaagacagca cctacagcat gagcagcacc 600
 ctcacgttga ccaaggacga gtatgaacga cataacagct atacctgtga ggccactcac 660
 aagacatcaa cttcacccat tgtcaagagc ttcaacagga atgagtctta a 711

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 56

Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Val His Trp

1 5 10

<210> 57

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 57

Gly Ala Ile Asp Gly Ser Asp Thr Phe Asn Asp Tyr Ser Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 58

Ala Arg Gly Gly Leu Leu Gln Tyr

1 5

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 59

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<211> 21
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
<400> 66
aatacaaaaa ccttaggaga a 21
<210> 67
<211> 27
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
<400> 67
caacatcatt atggtactcc attcacg 27
<210> 68
<211> 33
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
<400> 68
ggctacacct tcaccagcta ctggatgcac tgg 33
<210> 69
<211> 51
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
<400> 69
ggagagattg atccttctga tagttatact aactacaatc aaaagttcaa g 51
<210> 70
<211> 33
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
<400> 70
cgagcaagtg agaatattta cagttattta gca 33
<210> 71
<211> 21
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
<400> 71
aatgcaaaaa ccttagcaga a 21
<210> 72
<211> 23
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

ggccccagtg tcttccctct ggccccttcc agtaagteta ccagcggcgg cactgccgcc 420
 ctgggctgtc tcgtcaaaga ctacttcct gaaccctga cagtgtcttg gaacagcggc 480
 gcaactgaaa gcgggggtgca cacatttccc gccgtcctgc aatcctccgg actgtacagc 540
 ctctcaagtg tggtagactgt cccatcctcc tcctcggga ccagacata tatatgcaat 600
 gtgaaccata agcccagcaa caccaaggtc gataagaagg tggaacctaa aagttgcat 660
 aagactcata catgtcctcc atgccctgcc cctgaactgc tgggaggacc ttctgtcttc 720
 ctgttccctc ccaagcccaa agatacctg atgatatccc gcacaccaga agtgacatgt 780
 gttgttgcg atgtctctca cgaggacct gaagtgaagt ttaattggta tgtggacggg 840
 gtggaagtgc acaacgcaa gaccaaact cgcgaagagc agtacaactc cacataccgc 900
 gtggtagagtg tgctaccctg tctccatcag gactggctga atggcaagga gtataagtg 960
 aaggtgagca acaaagctct gccagcacc atagagaaaa ctattagcaa agctaagggc 1020
 cagcctcgcg agccacaggt gtatacctc cctcctagtc gcgaggaaat gactaagaac 1080
 caggtttccc tgacatgcct cgtcaaggga ttctatacta gcgatattgc cgtcgaatgg 1140
 gagtccaatg gccagcccga gaacaactac aagaccacac ctctgtcct cgactctgac 1200
 ggatccttct ttctctatag caagctgacc gttgacaaaa gcaggtggca acagggtaac 1260
 gtgttttcat gctctgtgat gcacgaagcc ctgcacaatc actacacaca gaagtcctg 1320
 agcctgtccc ctggcaaa 1338

<210> 75

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化轻链

<400> 75

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

115	120	125	
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys			
130	135	140	
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu			
145	150	155	160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser			
	165	170	175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala			
	180	185	190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe			
	195	200	205
Asn Arg Gly Glu Cys			

210

<210> 76

<211> 639

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化轻链

<400> 76

```

gacattcaga tgaccaatc accaagcagt ctgtcagcca gtgttgggga tcgcgtgacc 60
ataacatgct ctgcatcctc tagtgtgact tacatgtact ggtaccaaca gaagcccggg 120
aaagcccaaa agctcctgat ctatgacact agcaacctgg ctagtggagt cccagccgg 180
ttttccgggt caggctcagg gactgactat actctcacta tttcatctct gcagcctgag 240
gactttgcca cttattattg tcagcaatgg agcaattacc cactgacctt tgggcagggc 300
accaaggtgg aatcaagag aactggtgct gtcctctccg tgttcatctt cccaccaagc 360
gatgagcagc tgaatccgg gacagcctct gtggtgtgtc tcctgaacaa cttctatcct 420
cgggaggcaa aggtccagtg gaaagtcgat aatgcctcc agagtggcaa ctacaagaa 480
agcgtgactg aacaggactc caaagatagt acatatagcc tcagcagtac actgaccctg 540
agcaaagccg attatgagaa acataaggtg tacgcttgcg aggtcaccca ccagggcctg 600
tccagtccag tgactaagag cttaataga ggtgagtgt 639

```

VH CDR1 比对

A1

```

SEQ ID No: 21      ggctacgcattcagtaactcctggataaactgg
SEQ ID No: 33      ggctacgcattcagtagctactggatgaactgg
***** ** ***** *****

```

A2

```

SEQ ID No: 22      ggttactcattcattgagtacaccataaactgg
SEQ ID No: 35      ggttactcattcactgactacaacatgaactgg
***** ** * ** * ** * ** *

```

A3

```

SEQ ID No: 62      ggctacacattctctgactactgggtactctgg
SEQ ID No: 68      ggctacaccttcaccagctactggatgcactgg
***** ** * * ***** * *****

```

图1a

VH CDR2 比对

A1

```

SEQ ID No: 23      ggacagatttatcctggagattatgataactaactacaatggaaaattcaag
SEQ ID No: 34      ggacagatttatcctggagatggtgataactaactacaacggaaagtccaag
***** ***** ***** *****

```

A2

```

SEQ ID No: 24      ggaaatattgatccttattatggaaccacttattacaatcagatgttcacg
SEQ ID No: 36      ggagtaattaatcctaactatggtactactagctacaatcagaagtccaag
*** ** * ** * ** * ** * ***** ***** *

```

A3

```

SEQ ID No: 63      ggagcgattgatggttctgatacttttaatgactacagtcagaagtttaag
SEQ ID No: 69      ggagagattgatccttctgatagttataactaactacaatcaaagttccaag
*** ***** ***** ** * * ***** ** * ** *

```

图1b

VK CDR1 比对

A1

```

SEQ ID No: 27      actgccagctcacgtgtaagttccagttacttgcac
SEQ ID No: 37      actgccagctcaagtgtaagttccagttacttgcac
***** *****

```

A2

```

SEQ ID No: 28      agtgccagctcaagtgtaacttacatgtac
SEQ ID No: 40      agtgccagctcaagtgtaagttacatgtac
***** *****

```

A3

```

SEQ ID No: 65      cgagcaagtgaaaacatttacagttatntagca
SEQ ID No: 70      cgagcaagtgagaatatttacagttatntagca
***** ** *****

```

图2a

VK CDR2 比对**A1**

```
SEQ ID No: 29      agtacatccaacctggcttct
SEQ ID No: 38      agcacatccaacctggcttct
                    ** *****
```

A2

```
SEQ ID No: 30      gacacatccaacctggcttct
SEQ ID No: 41      gacacatccaacctggcttct
                    *****
```

A3

```
SEQ ID No: 66      aatacaaaaaccttaggagaa
SEQ ID No: 71      aatgcaaaaaccttagcagaa
                    *** *****
```

图2b

VK CDR3 比对**A1**

```
SEQ ID No: 31      caccagtatcatcgttccccgtacacg
SEQ ID No: 39      caccagtatcatcgttccccaccca--
                    ***** **
```

A2

```
SEQ ID No: 32      cagcagtggagtaattaccactcacg
SEQ ID No: 42      cagcagtggagtagttaccaccca--
                    ***** **
```

A3

```
SEQ ID No: 67      caacatcattatggtactccattcacg
SEQ ID No: 72      caacatcattatggtactcctcc----
                    *****
```

图2c

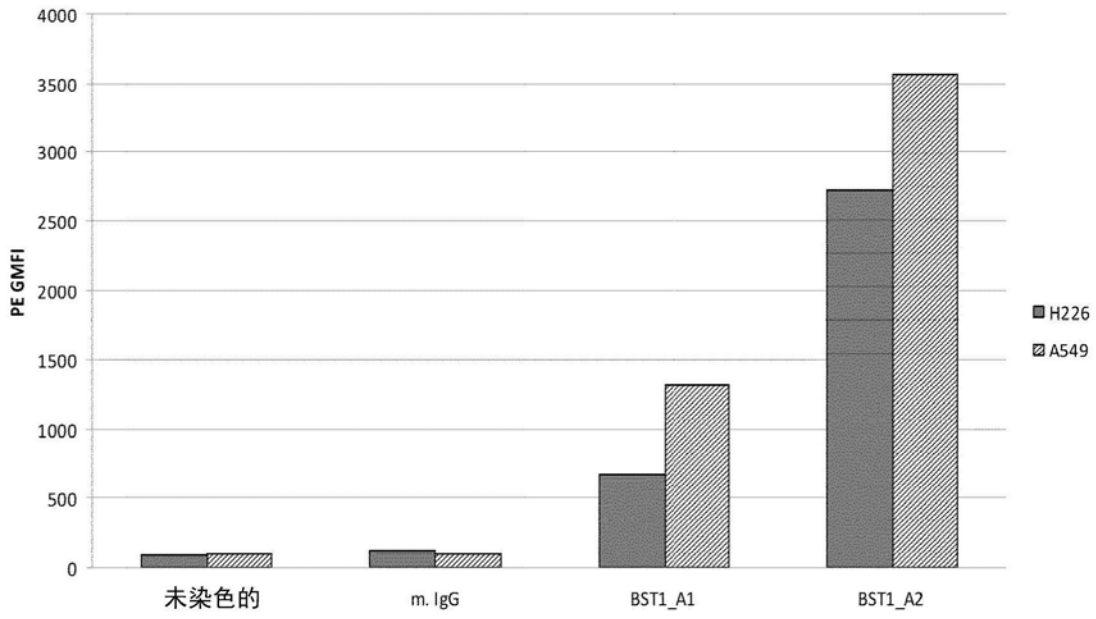


图3a

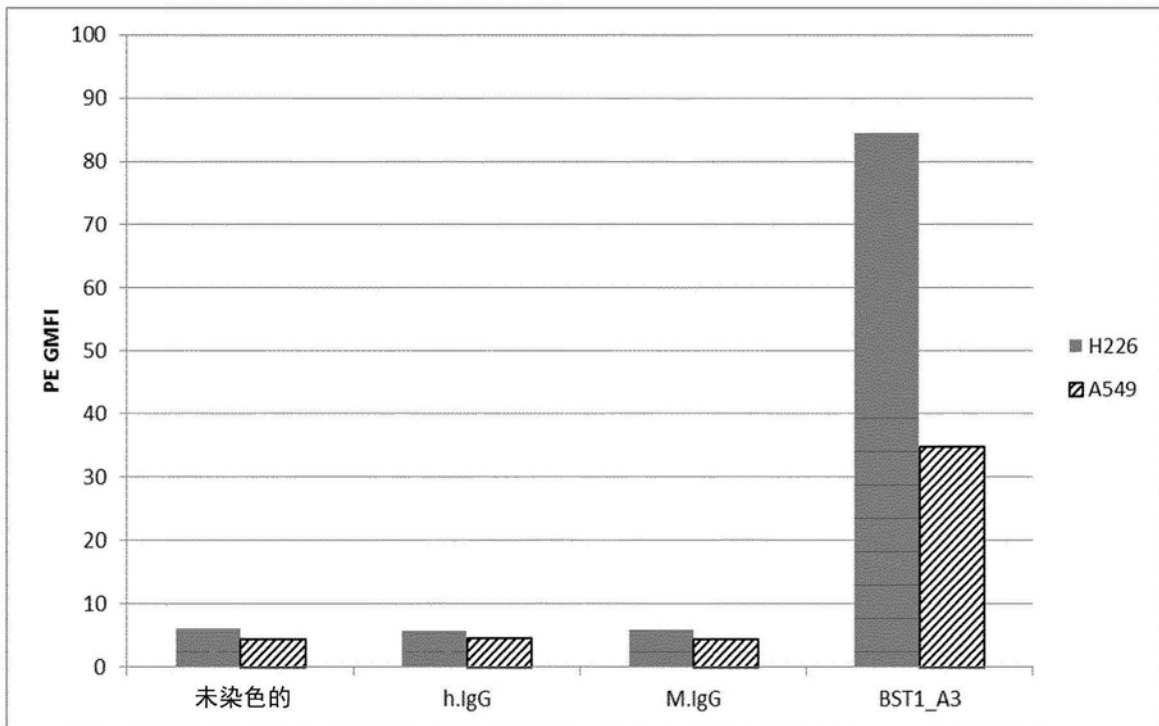


图3b

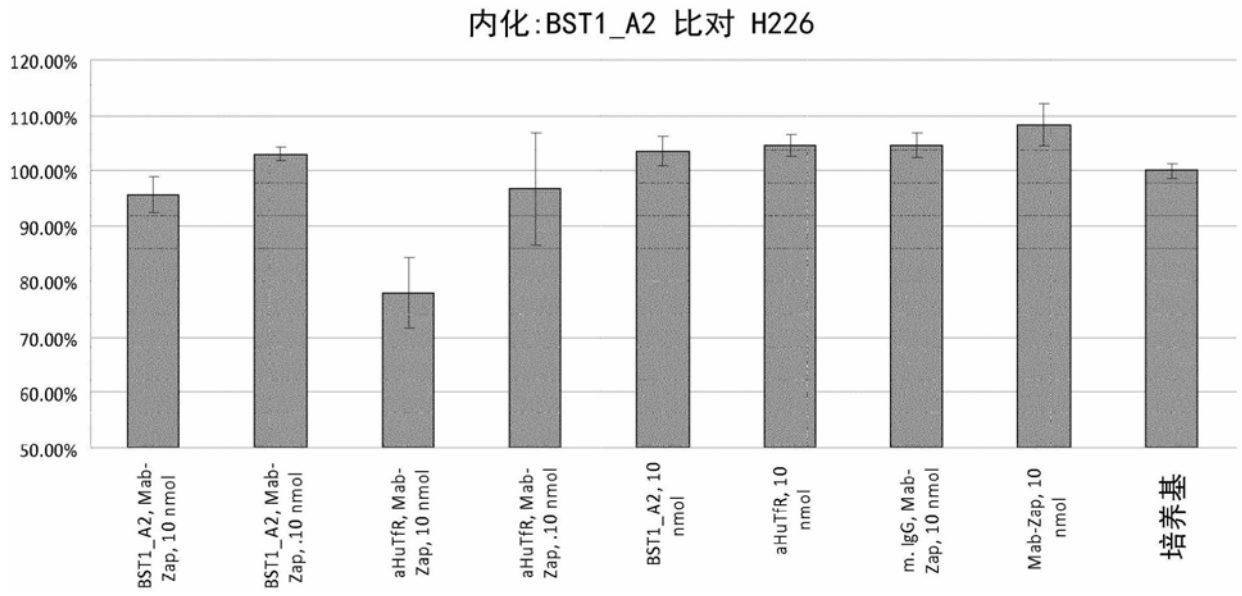


图4a

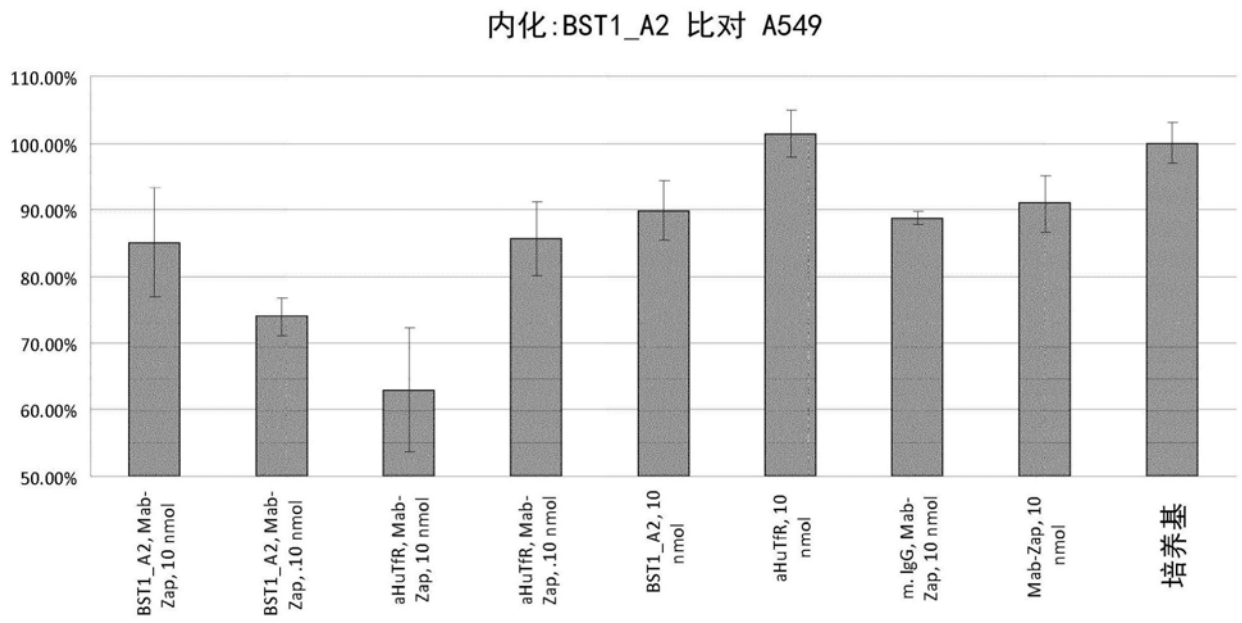


图4b

		1	2	3	4
		123456789	0123456789	0123456789	0123456789
SEQ ID No: 45		QAYLQQSGP	ELVKAGASVK	MSCKASGYSF	<u>I</u> EY <u>TIN</u> WVKQ SHGKSLEWIG
SEQ ID No: 46		QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYSF	<u>I</u> EY <u>TIN</u> WVRQ APGQGLEWIG
SEQ ID No: 47		QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYSF	TXXXXXWVRQ APGQGLEWIMG
		5	6	7	8
		01223456789	0123456789	0123456789	012223456789
SEQ ID No: 45		NIDPYYGTTY	NQMFTG KATL	TVDQSSNTAY	MQLKSLTSEDSAV
SEQ ID No: 46		NIDPYYGTTY	NQMFTG RATL	TVDTSISTAY	MELSRLRSDDTAV
SEQ ID No: 47		XXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXRVTL	TRDTSISTAY	MELSRLRSDDTAV
			1	1	
		9	0	1	
		0123456789	0123456789	0123	
SEQ ID No: 45		YFCAR GSAWF	-PYWGQTLV	TVSA	
SEQ ID No: 46		YYCAR GSAWF	-PYWGQTLV	<u>T</u> VSS	
SEQ ID No: 47		YYCARXXXXX	XXXWGQTLV	PVSS	

图5

		1	2	3
		123456789	0123456789	0123456789
SEQ ID No: 48		DIVMSQSPA	IMSASPGEKV	TMTCSAS-SS VTYMYWYQQK
SEQ ID No: 49		DIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCSAS-SS VTYMYWYQQK
SEQ ID No: 50		DIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCXXXXXX XXXXXWYQQK
		4	5	6
		0123456789	0123456789	0123456789
SEQ ID No: 48		PGSSPRLLIY	DTSNLASGVP	VRFSGSGSGT SYSLTISRME
SEQ ID No: 49		PGKAPKLLIY	DTSNLASGVP	SRFSGSGSGT <u>D</u> YTLTISSLQ
SEQ ID No: 50		PGKAPKLLIY	XXXXXXXXGVP	SRFSGSGSGT DFTLTISSLQ
				1
		8	9	0
		0123456789	0123456789	01234567
SEQ ID No: 48		AEDTATYYCQ	QWSNYPLTFG	AGTKLELK
SEQ ID No: 49		PEDFATYYCQ	QWSNYPLTFG	QGTKVEIK
SEQ ID No: 50		PEDFATYYCX	XXXXXXXXXFG	QGTKVEIK

图6

SEQ ID No: 12 GNIDPYYGTTYYNQMFT
 SEQ ID No: 51 GNIDPYYGTTYYNQMFQ

图7

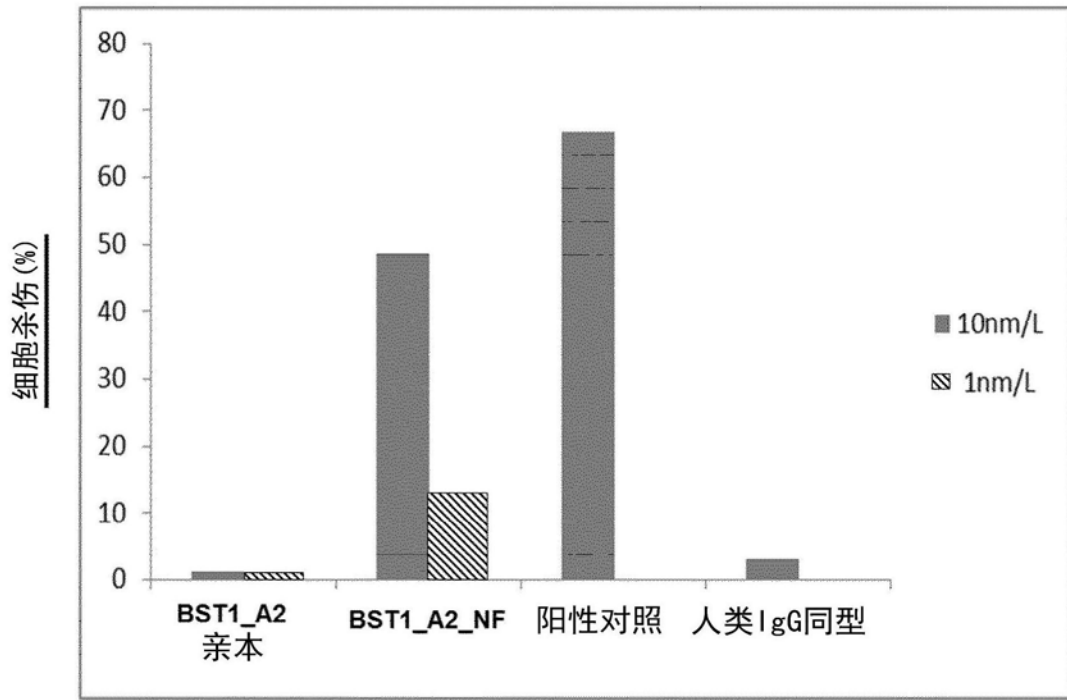


图8a

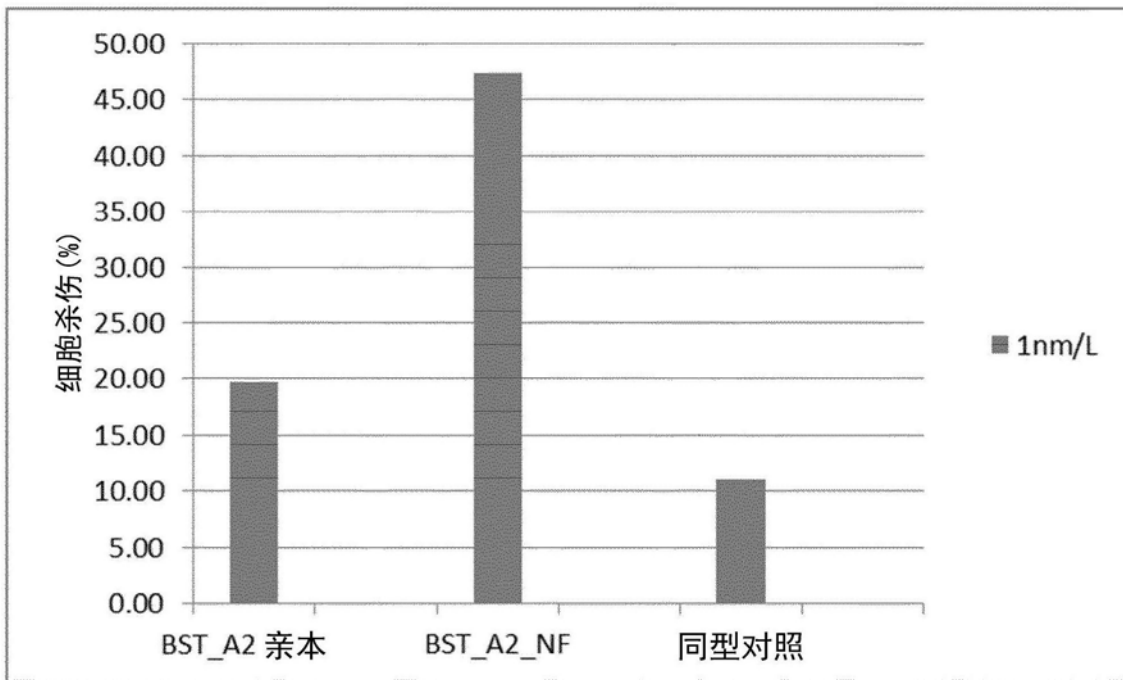


图8b

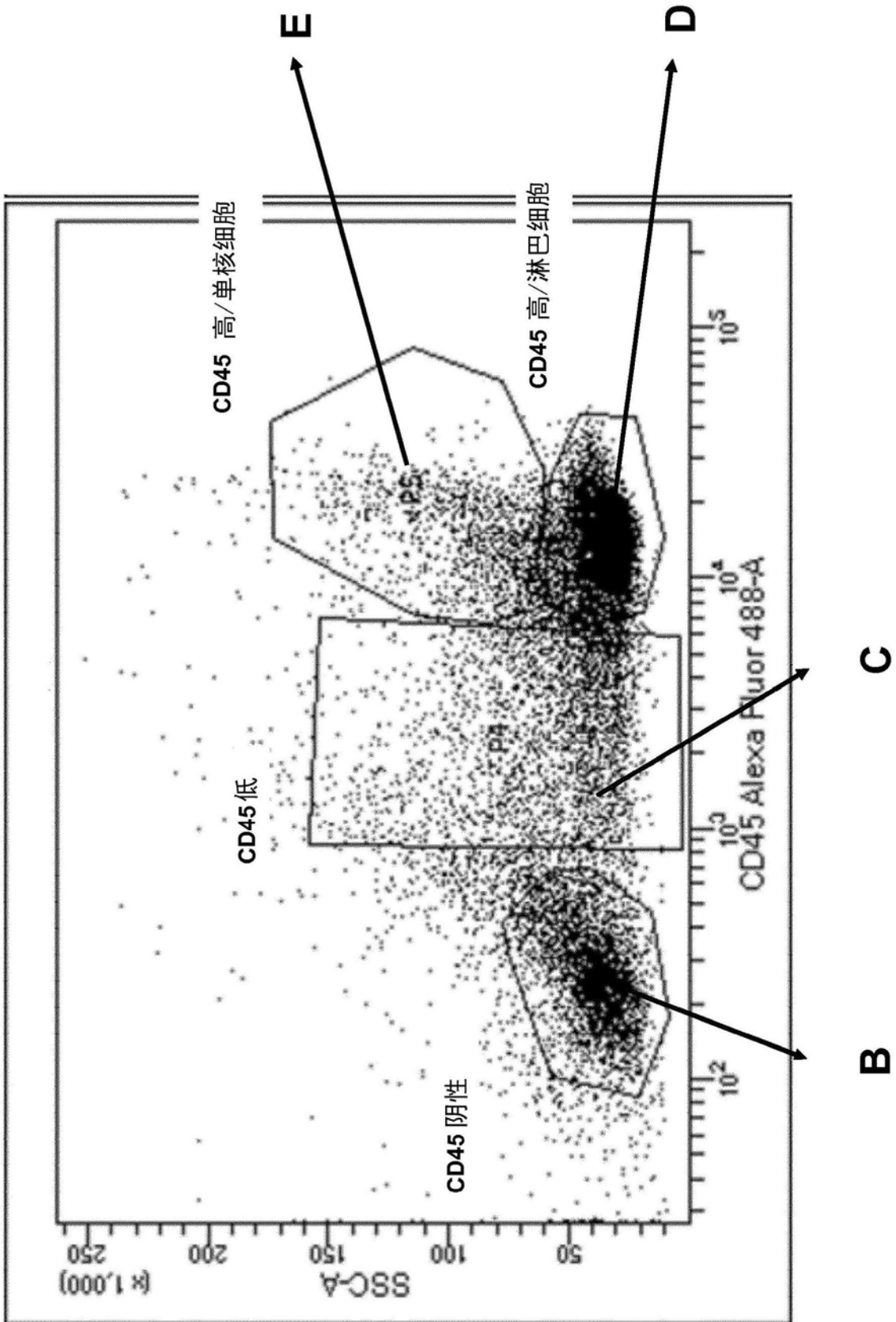


图9A

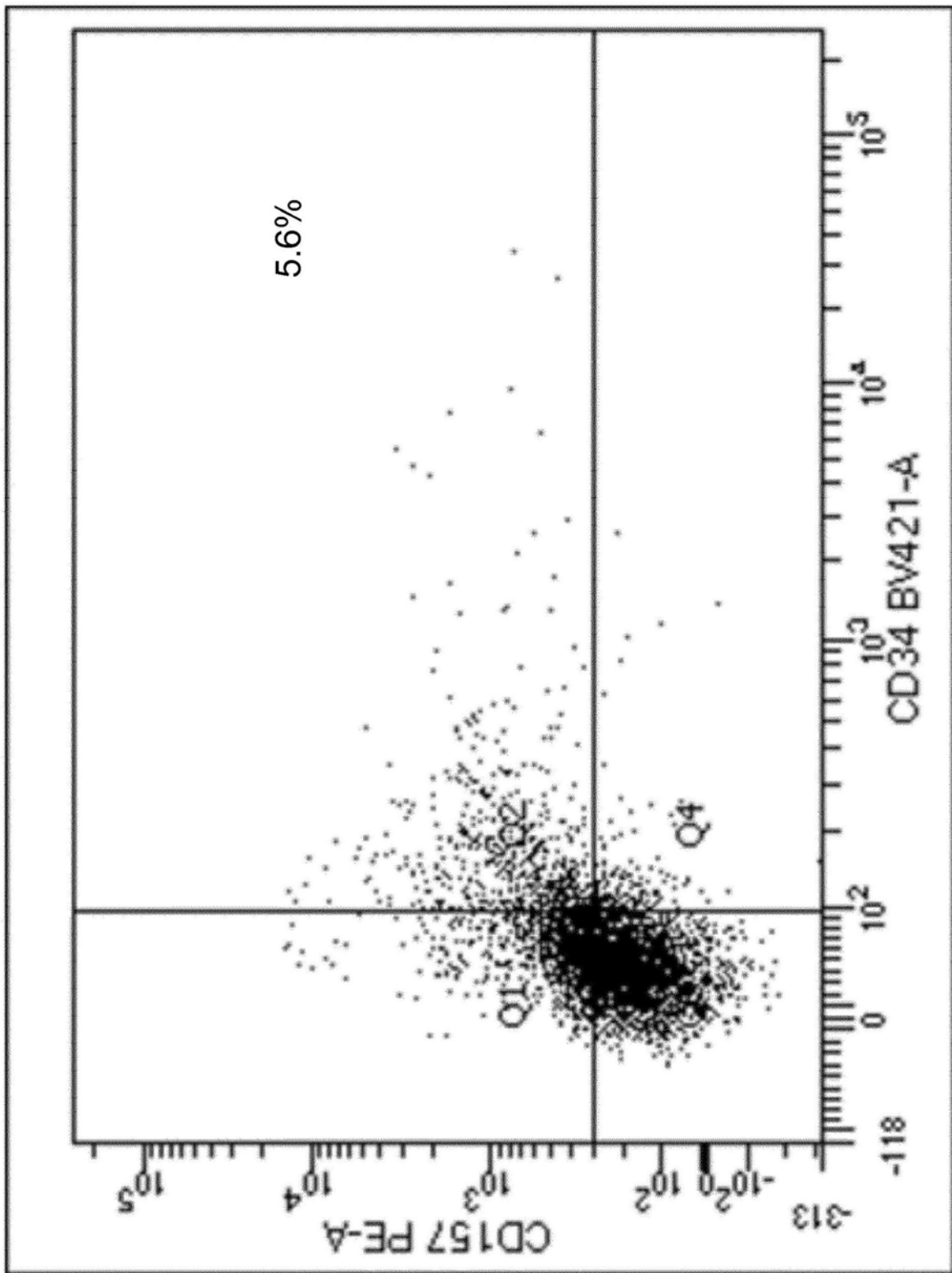


图9B

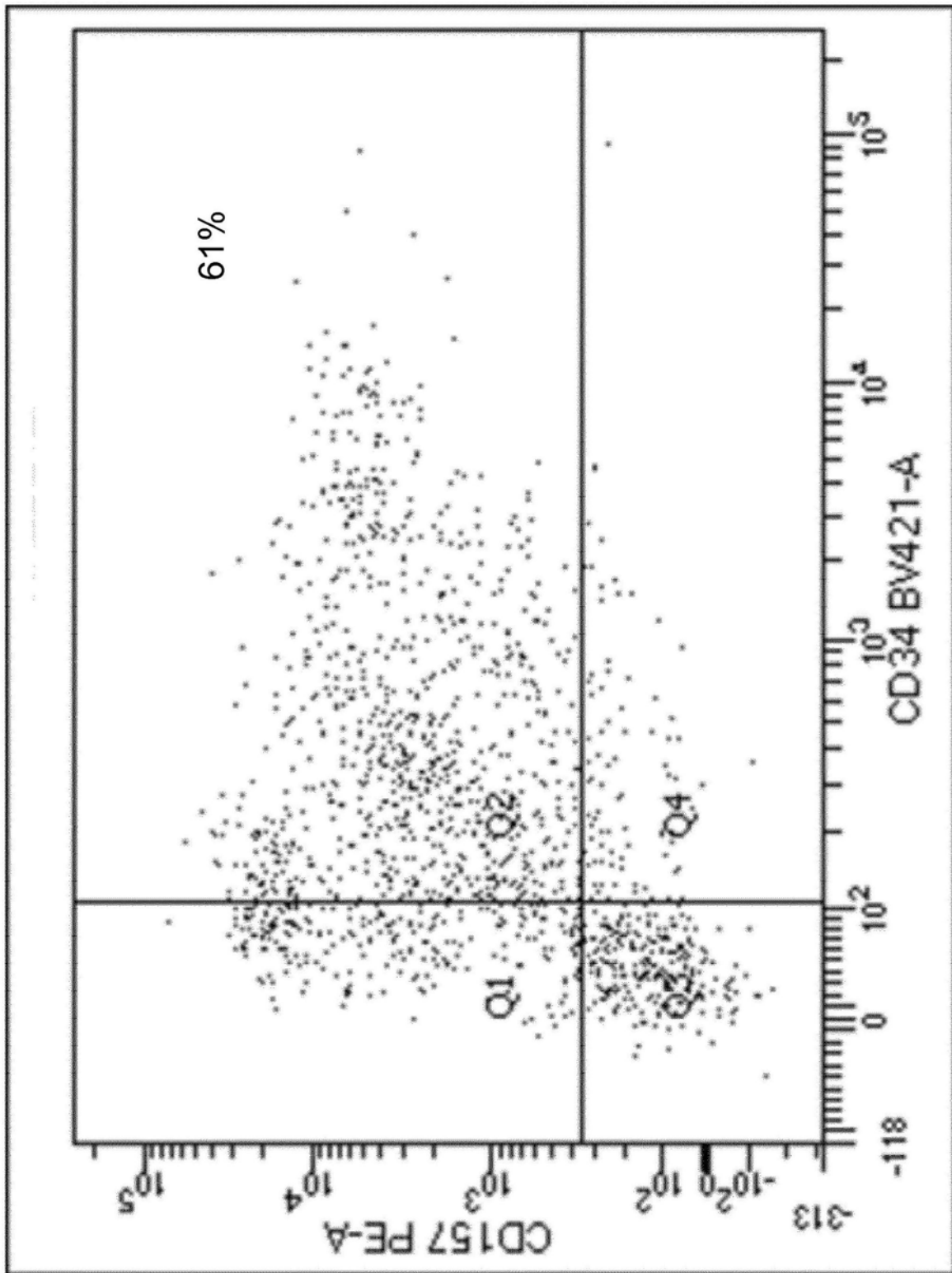


图9C

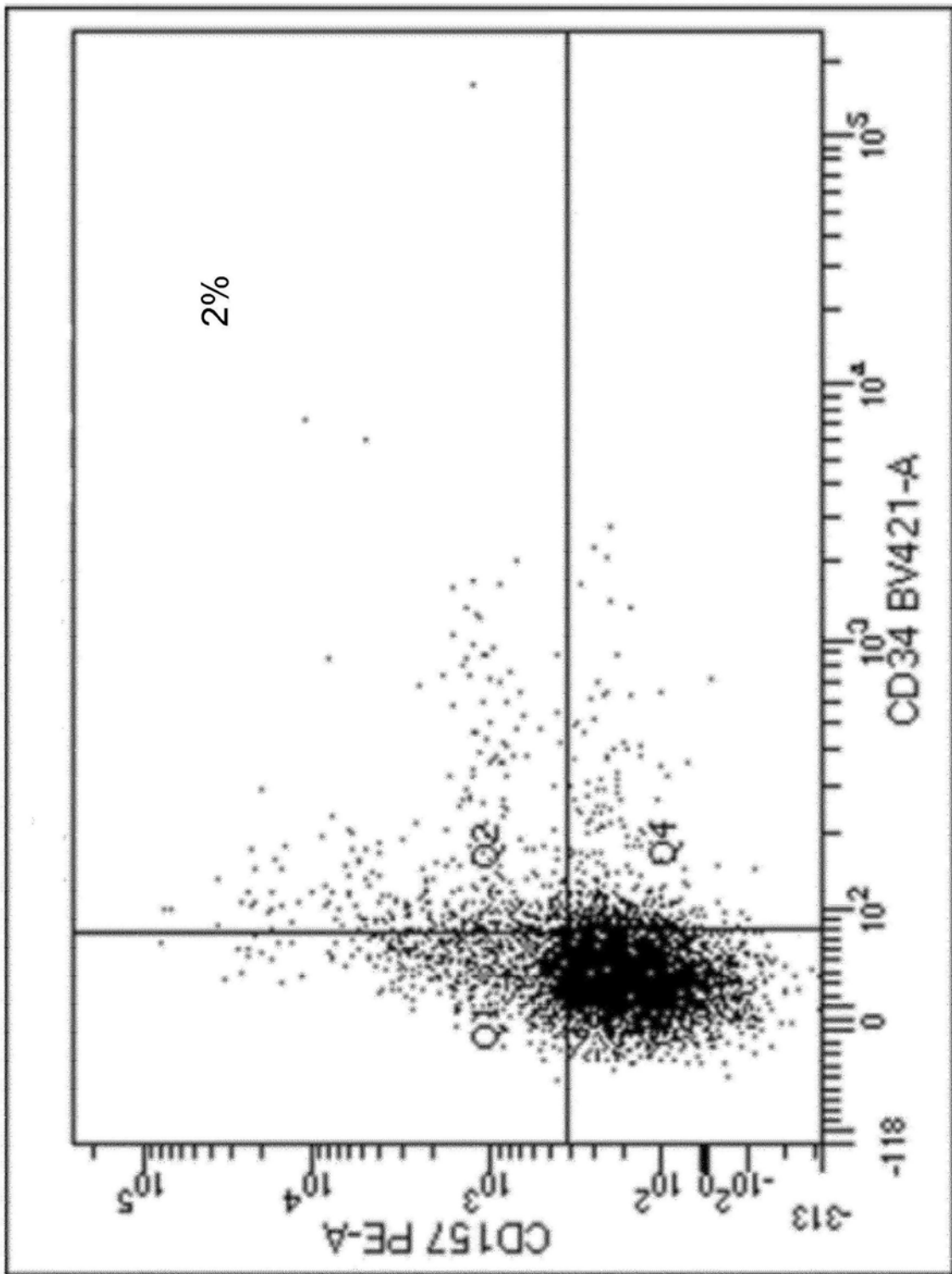


图9D

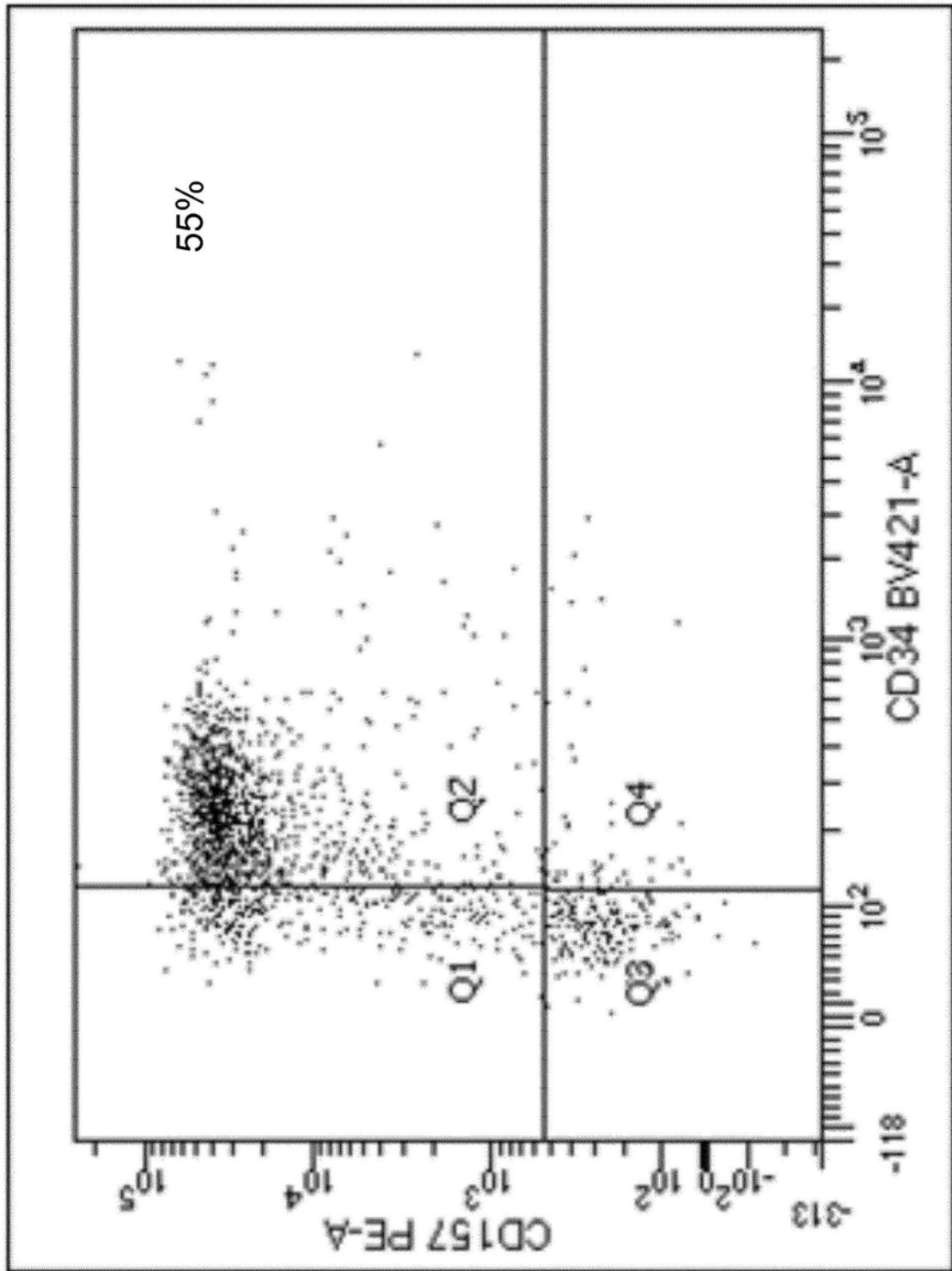


图9E

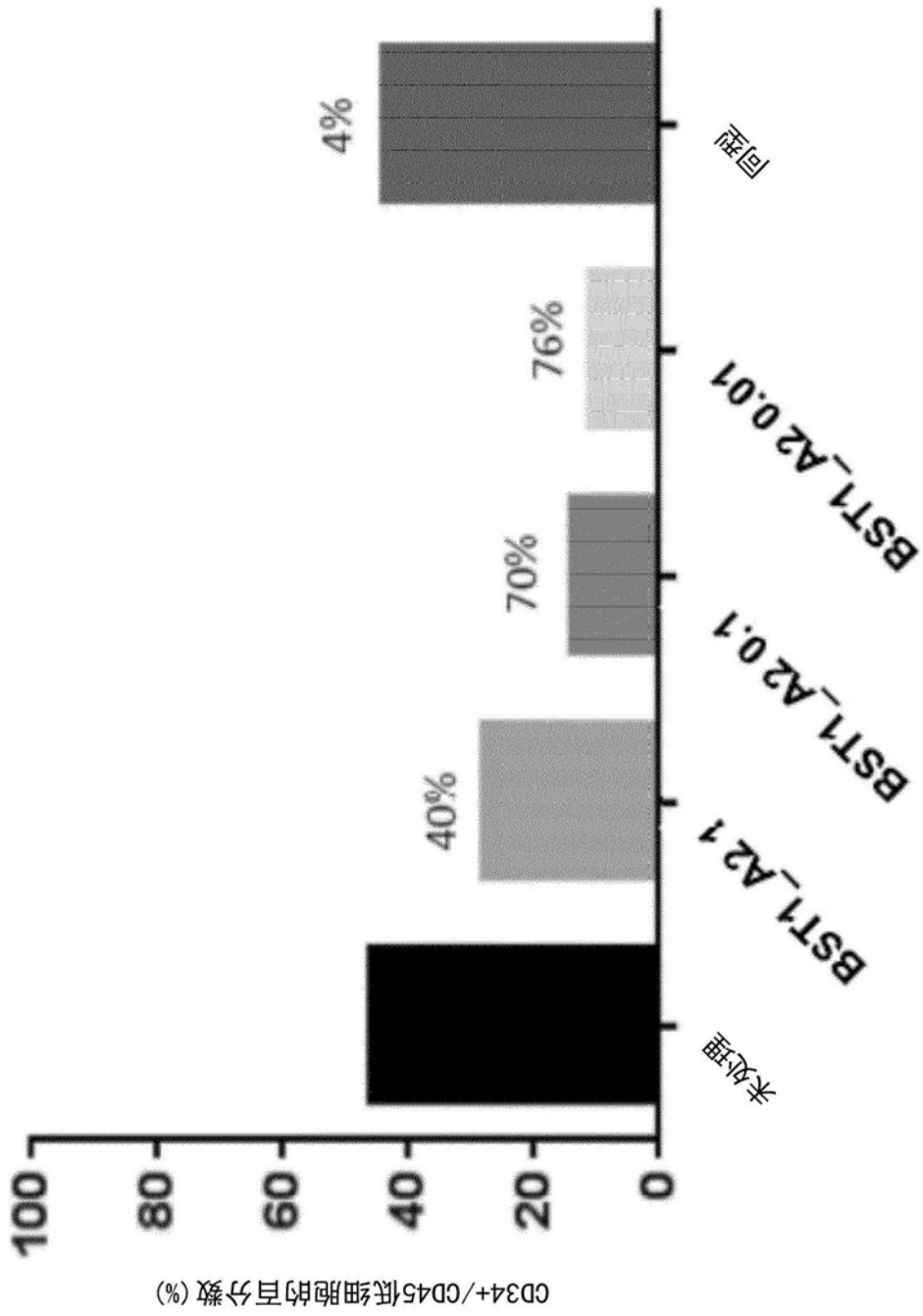


图10

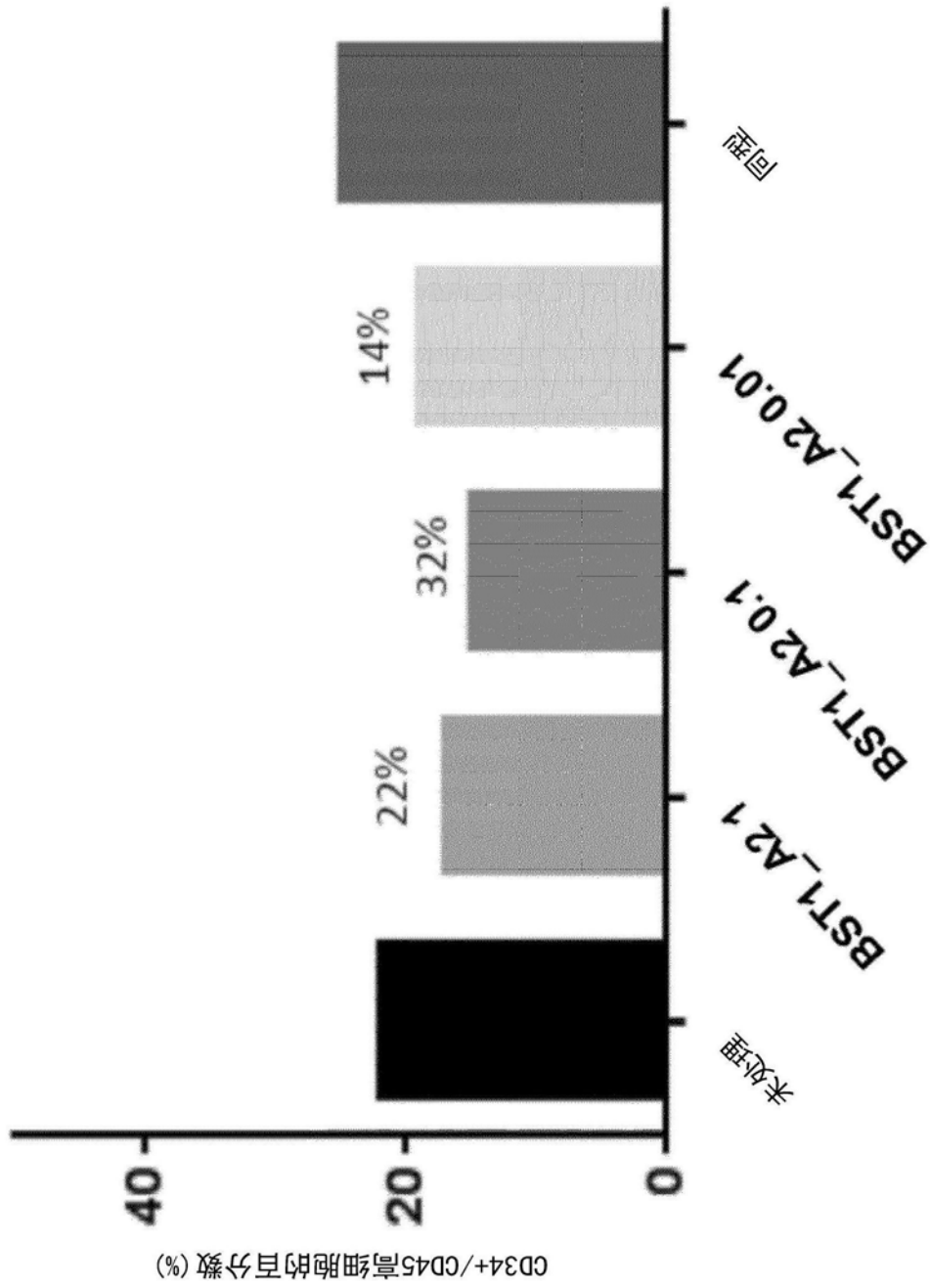


图11