



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103709252 B

(45)授权公告日 2016.12.07

(21)申请号 201310440188.7

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2007.06.07

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103709252 A

Sikut rein et al.Detection of CD43 (leukosialin) in colon adenoma and adenocarcinoma by novel monoclonal antibodies against its intracellular domain.《International journal of cancer》.1999,第82卷(第1,2期),

(43)申请公布日 2014.04.09

Baekstrom dan et al.expression of the leukocyte-associated sialoglycoprotein CD43 by a colon carcinoma cell line.《Journal of biological chemistry》.1995,第270卷(第23期),

(30)优先权数据
60/811,850 2006.06.07 US

审查员 黎舒婷

(62)分案原申请数据
200780021017.3 2007.06.07

(73)专利权人 生物联合公司
地址 荷兰阿姆斯特丹

(72)发明人 R-H·林 L·林 S-Y·林
S-H·李

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴

(51)Int.Cl.
C07K 16/46(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 15/85(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)

权利要求书4页 说明书43页
序列表11页 附图13页

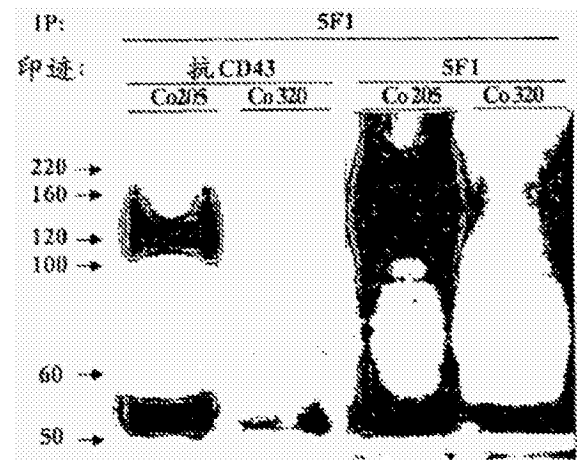
(54)发明名称

识别癌细胞上表达的CD-43和CEA的含糖表位的抗体及其使用方法

(57)摘要

本发明提供新的抗体,该抗体与非造血系统癌细胞表达的CD43和CEA上的表位特异性结合,但不与白细胞或Jurkat细胞表达的CD43特异性结合,并且该抗体在不存在细胞毒素缀合和免疫效应子功能的情况下,在与非造血系统癌细胞的细胞表面上的表位结合后,能够诱导非造血系统癌细胞凋亡,其中表位包含糖结构,并且抗体与表位的结合被包含Le^a结构、Le^a-乳糖结构、LNDFH II结构、或LNT结构的糖抑制。此外,本发明还提供本文描述的抗体用于诊断和治疗目的

的用途。



CN 103709252 B

[接上页]

(56)对比文件

Fernandez rodriguez j et al.The leukocyte antigen CD43 is expressed in different cell lines of nonhematopoietic origin.《Tumor biology》.2002,第23卷(第4期),

Santamaria manuel et al.Specific monoclonal antibodies against leukocyte-restricted cell surface molecule CD43 react with nonhematopoietic tumor cells.《Cancer research》.1996,第56卷(第15期),

1. 一种单克隆抗体,所述抗体与非造血系统癌细胞表达的CD43或CEA的胞外域上的表位特异性结合,其中所述抗体包括:含有来自氨基酸序列SEQ ID NO:1的3个CDRs的重链可变区,以及含有来自氨基酸序列SEQ ID NO:2的3个CDRs的轻链可变区。

2. 一种单克隆抗体,所述抗体与非造血系统癌细胞表达的CD43或CEA的胞外域上的表位特异性结合,其中所述抗体包括:含有来自氨基酸序列SEQ ID NO:3的3个CDRs的重链可变区和含有来自氨基酸序列SEQ ID NO:4的3个CDRs的轻链可变区。

3. 一种单克隆抗体,所述抗体与非造血系统癌细胞表达的CD43或CEA的胞外域上的表位特异性结合,其中所述抗体包括:含有来自氨基酸序列SEQ ID NO:5的3个CDRs的重链可变区和含有来自氨基酸序列SEQ ID NO:6的3个CDRs的轻链可变区。

4. 权利要求1的单克隆抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

5. 权利要求2的单克隆抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

6. 权利要求3的单克隆抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

7. 权利要求3的单克隆抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

8. 权利要求1-3或7中任一项所述的单克隆抗体,其中所述抗体是人源化抗体。

9. 权利要求1-6中任一项所述的单克隆抗体,其中所述抗体是嵌合抗体。

10. 权利要求1-7中任一项所述的单克隆抗体,其中非造血系统癌细胞是结肠直肠癌细胞或胃癌细胞。

11. 一种包含编码权利要求1-10中任一项所述的单克隆抗体的核酸序列的细胞,其生产权利要求1-10中任一项所述的单克隆抗体。

12. 一种组合物,其包含权利要求1-10中任一项所述的单克隆抗体,和药学上可接受的载体。

13. 一种多核苷酸,其包含编码权利要求1-10中任一项所述的单克隆抗体的核酸序列。

14. 一种载体,其包含编码权利要求1-10中任一项所述的单克隆抗体的核酸序列。

15. 一种宿主细胞,其包含权利要求14的载体。

16. 权利要求1-10中任一项所述的单克隆抗体用于制备药物的用途,所述药物用于在患有癌症的个体中治疗非造血系统癌症。

17. 权利要求16的用途,其中非造血系统癌症是结肠直肠癌或胃癌。

18. 权利要求17的用途,其中所述单克隆抗体与细胞毒素缀合。

19. 权利要求16所述的用途,其中所述抗体被制备为和一定量的另一种抗癌剂一起使用,由此所述单克隆抗体与所述抗癌剂联合在个体中提供对癌症的有效治疗。

20. 权利要求19所述的用途,其中非造血系统癌症是结肠直肠癌或胃癌。

21. 权利要求20所述的用途,其中所述抗癌剂是化学治疗剂。

22. 一种试剂盒,用于制备治疗结肠直肠癌或胃癌的药物,其中抗体与非造血系统癌细胞表达的人CD43或CEA的胞外域上的表位特异性结合,所述试剂盒包括药物组合物,该药物组合物含有与非造血系统癌细胞表达的人CD43或CEA的胞外域上的表位特异性结合的单克

隆抗体,其中所述抗体包括:

含有来自氨基酸序列SEQ ID NO:1的3个CDRs的重链可变区,和含有来自氨基酸序列SEQ ID NO:2的3个CDRs的轻链可变区;或

含有来自氨基酸序列SEQ ID NO:3的3个CDRs的重链可变区,和含有来自氨基酸序列SEQ ID NO:4的3个CDRs的轻链可变区;或

含有来自氨基酸序列SEQ ID NO:5的3个CDRs的重链可变区,和含有来自氨基酸序列SEQ ID NO:6的3个CDRs的轻链可变区;

和用于给个体施用有效量的所述药物组合物以治疗结肠直肠癌或胃癌的说明书。

23. 一种抗体在制备用于诊断人体非造血系统癌症的检测试剂或制品中的用途,其中所述抗体可与由人非造血系统癌细胞表达的人CD43或CEA的胞外域上的表位结合,其中所述抗体包括包含有来自SEQ ID NO:1的氨基酸序列的3个CDRs的重链可变区和包含来自SEQ ID NO:2的氨基酸序列的3个CDRs的轻链可变区。

24. 根据权利要求23所述的用途,其中所述抗体包括来自SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和来自SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区。

25. 一种抗体在制备用于诊断人体非造血系统癌症的检测试剂或制品中的用途,其中所述抗体可结合由人非造血系统癌细胞所表达的人CD43或CEA的胞外域上的表位,其中所述抗体包括包含来自SEQ ID NO:3的氨基酸序列的3个CDRs的重链可变区和包含来自SEQ ID NO:4的氨基酸序列的3个CDRs的轻链可变区。

26. 根据权利要求25所述的用途,其中所述抗体包括来自SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区和来自SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区。

27. 一种抗体在制备用于诊断人体非造血系统癌症的检测试剂或制品中的用途,其中所述抗体可结合由人非造血系统癌细胞所表达的人CD43或CEA的胞外域上的表位,其中所述抗体包括包含来自SEQ ID NO:5的氨基酸序列的3个CDRs的重链可变区和包含来自SEQ ID NO:6的氨基酸序列的3个CDRs的轻链可变区。

28. 根据权利要求27所述的用途,其中所述抗体包括来自SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区和来自SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链可变区。

29. 一种抗体在制备用于诊断人体非造血系统癌症的检测试剂或制品中的用途,其中所述抗体可结合由人非造血系统癌细胞所表达的人CD43或CEA的胞外域上的表位,其中所述抗体包括来自SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区和来自SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区。

30. 根据权利要求23-29中任一项所述的用途,其中所述非造血系统癌细胞是人结肠直肠癌细胞、人胰腺癌细胞、人胃癌细胞、人卵巢癌细胞、人食道癌细胞或人子宫内膜癌细胞。

31. 根据权利要求23-29中任一项所述的用途,其中所述抗体是单克隆抗体。

32. 根据权利要求23-29中任一项所述的用途,其中所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

33. 根据权利要求23-29中任一项所述的用途,其中所述抗体与标记结合。

34. 根据权利要求33所述的用途,其中所述标记选自:酶、荧光分子、化学发光分子、放射性分子和生物素。

35. 根据权利要求34所述的用途,其中所述标记选自: ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、

^{125}I 、 ^{131}I 、异硫氰酸荧光素、罗丹明、镧系元素磷光体、藻红蛋白、辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、醇脱氨酶、苹果酸脱氢酶、青霉素酶、萤光素酶。

36. 一种用于诊断人体非造血系统癌症的试剂盒,包括抗体,所述抗体特异性结合由人非造血系统癌细胞所表达的人CD43或CEA的胞外域上的表位,其中所述抗体包括包含来自SEQ ID NO:1的氨基酸序列的3个CDRs的重链可变区和包含来自SEQ ID NO:2的氨基酸序列的3个CDRs的轻链可变区。

37. 根据权利要求36所述的试剂盒,其中所述抗体包括来自SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和来自SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区。

38. 一种用于诊断人体非造血系统癌症的试剂盒,包括抗体,所述抗体与由人非造血系统癌细胞所表达的人CD43或CEA的胞外域上的表位特异性结合,其中所述抗体包括包含来自SEQ ID NO:3的氨基酸序列的3个CDRs的重链可变区和包含来自SEQ ID NO:4的氨基酸序列的3个CDRs的轻链可变区。

39. 根据权利要求38所述的试剂盒,其中所述抗体包括来自SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区和来自SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区。

40. 一种用于诊断人体非造血系统癌症的试剂盒,包括抗体,所述抗体与由人非造血系统癌细胞所表达的人CD43或CEA的胞外域上的表位特异性结合,其中所述抗体包括包含来自SEQ ID NO:5的氨基酸序列的3个CDRs的重链可变区和包含来自SEQ ID NO:6的氨基酸序列的3个CDRs的轻链可变区。

41. 根据权利要求40所述的试剂盒,其中所述抗体包括来自SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区和来自SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链可变区。

42. 一种用于诊断人体非造血系统癌症的试剂盒,包括抗体,所述抗体与由人非造血系统癌细胞所表达的人CD43或CEA的胞外域上的表位特异性结合,其中所述抗体包括包含来自SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区和包含来自SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区。

43. 根据权利要求36-42中任一项所述的试剂盒,其中所述非造血系统癌细胞是人结肠直肠癌细胞、人胰腺癌细胞、人胃癌细胞、人卵巢癌细胞、人食道癌细胞或人子宫内膜癌细胞。

44. 根据权利要求36-42中任一项所述的试剂盒,其中所述抗体是单克隆抗体。

45. 根据权利要求36-42中任一项所述的试剂盒,其中所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

46. 根据权利要求36-42中任一项所述的试剂盒,其中所述抗体与标记结合。

47. 根据权利要求46所述的试剂盒,其中所述标记选自:酶、荧光分子、化学发光分子、放射性分子和生物素。

48. 根据权利要求47所述的试剂盒,其中所述标记选自: ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、异硫氰酸荧光素、罗丹明、镧系元素磷光体、藻红蛋白、辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、醇脱氨酶、苹果酸脱氢酶、青霉素酶、萤光素酶。

49. 一种筛选特异性结合非造血系统癌细胞的抗体的方法,包括:以所述非造血系统癌

细胞对动物进行免疫处理；用培养的所述非造血系统癌细胞与所述免疫处理动物生成的抗体相接触，并用表达CD43的白细胞或白血病细胞与所述抗体接触；若所述抗体与所述非造血系统癌细胞结合，但不与所述白细胞或白血病细胞结合，则选择该抗体。

50. 根据权利要求49所述的方法，其中所述非造血系统癌细胞为COLO 205。

识别癌细胞上表达的CD-43和CEA的含糖表位的抗体及其使用方法

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2006年6月7日提交的美国临时申请序列号60/811,850的优先权,所述美国临时申请整体引入本文作为参考。

技术领域

[0003] 本发明涉及识别非造血系统肿瘤或癌(non-hematopoietic tumor or cancer)细胞上表达的CD-43和癌胚抗原(CEA)的含糖表位的新单克隆抗体。这些抗体具有在不存在细胞毒素缀合和免疫效应子功能的情况下,在这些非造血系统肿瘤或癌细胞中诱导细胞死亡(例如,凋亡)的性质。这些单克隆抗体可以用作诊断和治疗剂。

背景技术

[0004] CD43(也称为涎福林或白涎蛋白)——一种高唾液酸化的分子——在大多数人白细胞,包括所有T细胞和血小板,上以高水平表达,具有115,000-135,000的分子量。CD43表达在具有威-奥二氏综合症的男性的T细胞上有缺陷,所述威-奥二氏综合征是X染色体连锁的隐性遗传免疫缺陷病症(Remold-O'Donnell等人(1987)Blood70(1):104-9;Remold-O'Donnell等人(1984)J.Exp.Med.159:1705-23)。

[0005] 功能研究证实抗CD43单克隆抗体刺激外周血T淋巴细胞的增殖(Mentzer等人(1987)J.Exp.Med.1;165(5):1383-92;Park等人(1991)Nature,350:706-9)和单核细胞的激活(Nong等人(1989)J.Exp.Med.1:170(1):259-67)。单克隆抗CD43抗体L11阻断T细胞与淋巴结和淋巴集结HEV结合。抗体L11抑制T细胞从血液外溢到集结的次级淋巴组织内(McEvoy等人(1997)J.Exp.Med.185:1493-8)。识别CD43分子的单克隆抗体诱导以高密度表达CD34的谱系标记阴性骨髓造血祖细胞(HPCs)(Bazil等人(1996)Blood,87(4):1272-81。)和人T类淋巴母细胞(Brown等人(1996)J.Biol.Chem.271:27686-95)的凋亡。近期研究进一步指出CD43可以充当人T细胞上的E-选择蛋白的配体(Matsumoto等人(2005)J.Immunol.175:8042-50;Fuhlbrigge等人(2006)Blood,107:1421-6)。

[0006] 有趣的是,科学家也已发现某些非造血系统肿瘤细胞,特别是结肠直肠癌,在细胞表面上的确表达CD43分子。Santamaria等人(1996)Cancer Research,56:3526-9;Baeckstrom等人(1995)J.Biol.Chem.270:13688-92;Baeckstrom等人(1997)J.Biol.Chem.272:11503-9;Sikut等人(1997)Biochem.Biophys.Res.Commun.238:612-6。已显示在结肠癌细胞系(COLO205)中表达的CD43上的聚糖与白细胞CD43上的聚糖不同(Baeckstrom等人(1997)J.Biol.Chem.272:11503-9)。尽管已暗示CD43的过表达引起肿瘤抑制蛋白p53的激活(Kadaja等人(2004)Oncogene23:2523-30)和抑制NF- κ B靶基因的子集(部分地经由对p65转录活性的抑制(Laos等人(2006)Int.J.Oncol.28:695-704),但仍缺乏证实CD43在结肠肿瘤发生中的原因性作用的直接证据。由于常规抗CD43抗体与肿瘤和免疫T细胞均有强结合,故其作为非造血系统肿瘤细胞的治疗剂的用途是不实际的。还需要产生

与非造血系统肿瘤或癌细胞上表达的CD43特异性结合,但不与造血系统起源的白细胞或其他细胞上表达的CD43结合的抗体。这些抗体作为用于治疗表达CD43的非造血系统癌症的治疗剂可能是有用的。

[0007] CEA通常表达于各种腺上皮组织(例如胃肠道、呼吸道和泌尿生殖道)中,在其中它看起来位于细胞的顶端表面(apical surface)(Hammarstrom,S.(1999)*Semin.Cancer Biol.*9,67—81.)。在起于这些组织的肿瘤中,存在从顶膜区域延伸到整个细胞表面的递增水平的CEA表达,以及该蛋白质向血液内的分泌(Hammarstrom,S.(1999)*Semin.Cancer Biol.*9,67-81.)。CEA的过量表达在许多类型的癌症中观察到,包括结肠直肠癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、肝细胞瘤、乳腺癌和甲状腺癌。因此,CEA已用作肿瘤标记,并且测量癌症患者血液中升高量的CEA的免疫学测定法长久以来已在临床上用于癌症的预后和控制(Gold P,等人(1965)*J.Expl.Med.*122:467-81;Chevinsky,A.H.(1991)*Semin.Surg.Oncol.*7,162-166;Shively,J.E.等人,(1985)*Crit.Rev.Oncol.Hematol.*2,355-399)。

[0008] 更重要的是,CEA已成为用于靶向治疗的潜在有用的肿瘤相关抗原(Kuroki M,等人(2002)*Anticancer Res*22:4255-64)。已开发了使用CEA作为癌症免疫治疗的靶的2种主要策略。一种方法是通过抗CEA抗体使自杀基因(一氧化氮合酶(iNOS)基因)(Kuroki M.等人,(2000)*Anticancer Res.*20(6A):4067-71)或同位素(Wilkinson R W.等人,(2001)*PNAS USA*98,10256-60,Goldenberg,D.M.(1991)*Am.J.Gastroenterol.*,86:1392-1403,Olafsen T.等人,*Protein Engineering,Design&Selection*,17,21-27,2004)特异性靶向表达CEA的肿瘤细胞。这种方法已扩展至与治疗剂缀合的抗体或抗体片段的使用,所述治疗剂例如药物、毒素、放射性核苷酸、免疫调节剂或细胞因子。另一种方法使用免疫细胞溶解活性,特别是通过抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC),以消除表达CEA的肿瘤细胞(Imakiire T等人,(2004)*Int.J.Cancer*:108,564-570)。这些方法通常造成细胞因子释放,导致全身性副作用。

[0009] 本文公开的所有参考文献、出版物和专利申请在此整体引入作为参考。

[0010] 发明概述

[0011] 在一个方面,本发明提供新的抗体,该抗体与非造血系统癌细胞表达的CD43和CEA上的表位特异性结合,但不与白细胞(例如,人外周T细胞)或Jurkat细胞(或类淋巴母细胞性(lymphoblastoid)白血病细胞)表达的CD43特异性结合。与该抗体结合的表位含糖。这些抗体在不存在与抗体的细胞毒素缀合和免疫效应子功能的情况下,在这些非造血系统癌细胞中能够诱导细胞死亡。

[0012] 本发明提供了抗体,所述抗体与非造血系统癌细胞表达的CD43和/或CEA上的表位特异性结合,但不与白细胞或Jurkat细胞表达的CD43特异性结合,并且所述抗体在不存在细胞毒素缀合和免疫效应子功能的情况下,在与非造血系统癌细胞的细胞表面上表达的表位结合后,能够诱导该非造血系统癌细胞凋亡,其中所述表位含糖,并且抗体与表位的结合被包含Le^a结构、Le^a-乳糖结构、LNDFH II结构、或LNT结构的糖抑制。在某些实施方案中,与抗体结合的表位是岩藻糖敏感性的。

[0013] 非造血系统癌细胞包括但不限于来自结肠直肠癌和胃癌的细胞。

[0014] 在某些实施方案中,本文描述的抗体是单克隆抗体。在某些实施方案中,本文描述的抗体是鼠类、人、人源化、或嵌合抗体。

[0015] 在某些实施方案中,本文描述的抗体在与非造血系统癌细胞的细胞表面上表达的表位结合后,减少癌细胞的数目、和/或抑制癌细胞的生长或增殖。例如,与不存在抗体的情况下的细胞数目或细胞生长比较,抗体存在下的细胞数目的减少或细胞生长的抑制是至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约65%、约75%或更高。

[0016] 在某些实施方案中,本文描述的抗体识别由非造血系统癌细胞表达的CD43和CEA的胞外域上的构象表位,其中该构象表位包括与三肽N'-Trp-Pro-Ile-C'形成的结构具有等价的物理和化学特征的结构。

[0017] 在某些实施方案中,本文描述的抗体与在N端包含N'-Trp-Pro-Ile-C'的氨基酸序列的多肽结合。

[0018] 在某些实施方案中,本文描述的抗体与包含如下重链可变区和轻链可变区的抗体竞争结合非造血系统癌细胞的细胞表面上呈现的表位,所述重链可变区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0019] 在某些实施方案中,本文描述的抗体与包含如下重链可变区和轻链可变区的抗体竞争结合非造血系统癌细胞的细胞表面上呈现的表位,所述重链可变区包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0020] 在某些实施方案中,本文描述的抗体与包含如下重链可变区和轻链可变区的抗体竞争结合非造血系统癌细胞的细胞表面上表达的表位,所述重链可变区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0021] 在某些实施方案中,抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含来自SEQ ID NO:1的氨基酸序列的3个CDRs,所述轻链可变区包含来自SEQ ID NO:2的氨基酸序列的3个CDRs。在某些实施方案中,抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0022] 在某些实施方案中,抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含来自SEQ ID NO:3的氨基酸序列的3个CDRs,所述轻链可变区包含来自SEQ ID NO:4的氨基酸序列的3个CDRs。在某些实施方案中,抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0023] 在某些实施方案中,抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含来自SEQ ID NO:5的氨基酸序列的3个CDRs,所述轻链可变区包含来自SEQ ID NO:6的氨基酸序列的3个CDRs。在某些实施方案中,抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0024] 在某些实施方案中,抗体是包含重链可变区和轻链可变区的人源化抗体,所述重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0025] 在另一个方面,本发明提供了包含本文描述的抗体的重链和/或轻链或片段的多肽。本发明还提供了衍生自本文描述的任何抗体的多肽,其中所述多肽与非造血系统癌细胞表达的CD43和CEA上的表位特异性结合,但不与白细胞或Jurkat细胞表达的CD43特异性结合,并且在不存在细胞毒素缀合和免疫效应子功能的情况下,在与非造血系统癌细胞的细胞表面上表达的CD43结合后,能够诱导非造血系统癌细胞凋亡。

[0026] 在另一个方面,本发明提供了编码本文描述的任何抗体或多肽的多核苷酸。本发

明还提供了包含本文描述的任何多核苷酸的载体(例如,表达载体)。本发明还提供了包含本文描述的任何多核苷酸或载体的宿主细胞。

[0027] 在另一个方面,本发明提供了包含本文描述的任何抗体或多肽的组合物。在某些实施方案中,抗体或多肽与试剂连接。在某些实施方案中,试剂是治疗剂(例如,放射性部分、细胞毒素和化学治疗剂)。在某些实施方案中,试剂是标记物(例如,酶、荧光分子和生物素)。

[0028] 本发明还提供了药物组合物,其包含有效量的本文描述的任何抗体或多肽、或编码抗体或多肽的多核苷酸,和药学上可接受的载体。在某些实施方案中,抗体或多肽与治疗剂连接。在某些实施方案中,组合物配制用于通过腹膜内、静脉内、皮下和肌肉注射,以及其他施用形式,例如口服、粘膜、经由吸入、舌下等施用。

[0029] 在某些实施方案中,组合物可以包含一种以上的本发明抗体、或一种本发明抗体与一种或多种其他抗癌抗体或其他抗癌剂。

[0030] 在另一个方面,本发明提供了用于产生本文描述的抗体或多肽的方法,其包括在允许抗体或多肽生产的条件下培养宿主细胞或其后代,其中宿主细胞包含编码抗体或多肽的表达载体。在某些实施方案中,该方法进一步包括纯化抗体或多肽。

[0031] 在另一个方面,本发明提供了通过下述来产生本文描述的任何抗体的方法:在合适的细胞中表达编码抗体(其可以作为单个轻或重链分开表达,或轻和重链可以由1个载体表达)的一种或多种多核苷酸,一般地随后回收和/或分离目的抗体或多肽。

[0032] 在另一个方面,本发明提供了用于在细胞表面表达表位的非造血系统癌细胞中诱导凋亡的方法,其包括使癌细胞与本文描述的抗体或多肽接触。在某些实施方案中,癌细胞在个体中。

[0033] 在另一个方面,本发明提供了用于治疗个体中的非造血系统癌症的方法,其包括给个体施用有效量的包含本文描述的抗体或多肽的组合物,其中抗体或多肽与个体中的癌细胞结合。在某些实施方案中,癌症是结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌或肺癌。

[0034] 在另一个方面,本发明提供了用于治疗个体中的非造血系统癌症的方法,其包括给个体施用一定量的本文描述的抗体或多肽,和一定量的另一种抗癌剂,其中抗体或多肽与个体中的癌细胞结合,并且由此抗体或多肽和抗癌剂联合提供对个体中的癌症的有效治疗。

[0035] 在另一个方面,本发明提供了用于治疗个体中的非造血系统癌症的试剂盒,其包含本文描述的抗体或多肽。这些试剂盒可以进一步包含用于给个体施用抗体或多肽以治疗癌症的说明书。

[0036] 在另一个方面,本发明提供了用于检测或诊断非造血系统癌症、鉴定可以治疗的患有非造血系统癌症的个体、或监控非造血系统癌症的进展的方法,其包括使样品与本文描述的抗体或多肽接触;和检测抗体或多肽与样品中的细胞有无结合、或结合水平。抗体和样品中的细胞之间的结合的存在指示样品可能包含癌细胞,和/或患有癌症的个体可以用本文描述的抗体进行治疗。该方法可以进一步包括与对照的结合水平相比较的步骤。

[0037] 在另一个方面,本发明提供了用于检测或诊断非造血系统癌症、鉴定可用于治疗的患有非造血系统癌症的个体、或鉴定非造血系统癌症的进展的试剂盒,其包含本文描述的抗体或多肽、和用于检测抗体或多肽与样品中的细胞的结合的试剂。

[0038] 附图简述

[0039] 图1显示5F1的靶蛋白的鉴定结果。来自COL0205裂解物(泳道1和3)或COL0320裂解物(泳道2和4)的5F1免疫亲和柱的洗脱物中的蛋白质用商业抗CD43抗体AF2038(泳道1和2)或抗体5F1(泳道3和4)进行免疫印迹。

[0040] 图2A显示抗体5F1与3种癌细胞系结合的流式细胞术分析结果:结肠直肠癌细胞(COL0205和DLD-1)、和胃癌细胞(NCI-N87)。

[0041] 图2B显示抗体5F1与正常内皮细胞(HUVEC)、正常(胚胎)肺细胞(MRC-5)、正常乳腺上皮细胞(MCF-10A)、正常结肠直肠细胞(CCD841-CoN)、激活的T淋巴细胞(激活7天)、或正常外周血单核细胞(PBMC)结合的流式细胞术分析结果。

[0042] 图3显示在抗体5F1或9E10(抗myc抗体)、或对照培养基的存在下温育6、24和48小时后在COL0205细胞的细胞质中核小体的富集。

[0043] 图4显示在与抗体5F1、9E10或叠氮化物在体外温育72小时后通过WST-1测定法测量的COL0205的细胞生长结果。

[0044] 图5显示通过WST-1测定法测量的细胞生长结果。结肠直肠癌细胞COL0205和正常结肠直肠细胞系CCD841-CoN未经处理,或与9E10、5F1(称为“m133-5F1”)或0.5%叠氮化物温育。

[0045] 图6显示在与各种浓度的5F1(0、2、4、8、16、32、64ug/ml)、9E10(64ug/ml)或0.5%叠氮化物温育后COL0205细胞的MTT染色结果。

[0046] 图7显示抗体5F1(也称为“m133-5F1”)对SCID小鼠中的人COL0205肿瘤的体内效应(对肿瘤大小)。抗体5F1(以500ug/注射)、或对照抗体9E10(以500ug/注射)、或PBS(未经处理的)在第0、3、5、7、10、12、14和17天时进行注射。

[0047] 图8显示抗体5F1与化学药品5FU/LV对SCID小鼠中的人COL0205肿瘤的体内效应(对肿瘤大小)。在COL0205细胞接种后,5FU/LV用一周4次25mg/kg的剂量每隔一天进行静脉内注射。抗体5F1在肿瘤植入后7天以0、6.25mg/kg、12.5mg/kg和25mg/kg每周2次进行腹膜内注射,共3周。

[0048] 图9A显示嵌合抗体5F1与COL0205细胞结合的流式细胞术结果。图9B显示在COL0205细胞与对照培养基(未加处理的)、叠氮化钠(0.5%)、小鼠抗体5F1(m5F1, 2-32ug/ml)、或嵌合抗体5F1(c5F1, 2-32ug/ml)温育后,膜联蛋白V和PI阳性细胞的百分比。

[0049] 图10显示在与各种抗体温育后就凋亡细胞的死亡而言对COL0205和NCI-N87细胞的染色。COL0205和NCI-N87细胞与对照、9E10(30ug/ml)、m5F1(10ug/ml)、或m5F1(30ug/ml)温育过夜。细胞随后用YO-PRO-1(A)或组合的膜联蛋白V和PI(B)进行染色。关于每种条件的染色百分比显示于柱形图中。

[0050] 图11显示m5F1与COL0205细胞上表达的重组人CEA(rhCEA)结合,但不识别COS-7细胞上表达的rhCEA。在图11A中,表达flag标签的人CEA的COL0205的细胞裂解物用抗Flag抗体M2进行免疫沉淀,免疫沉淀的蛋白质在SDS-PAGE上进行电泳且随后转移至NC纸上。如所示的,NC纸与抗Flag M2、m5F1、51-41、138-10或CEA/Ab-3温育。在图11B中,表达flag标签的人CEA的COS-7细胞(+)或不表达CEA的COS-7细胞(-)的细胞裂解物用抗Flag抗体M2进行免疫沉淀,免疫沉淀的蛋白质在SDS-PAGE上进行电泳且随后转移至NC纸上。如所示的NC纸与抗Flag M2、m5F1或CEA/Ab-3温育。

[0051] 图12显示m5F1与COL0205细胞上表达的重组CD43(rh CD43)结合,但不识别COS-7细胞上表达的rh CD43。在图12A中,用蛋白A琼脂糖珠纯化的由COL0205细胞表达的可溶性CD43在SDS-PAGE上进行电泳且转移至NC纸,并且NC纸用抗体m5F1、51-41或138-10进行蛋白质印迹。在图12B中,用hCD43、hCD43/myc-His转染的COS-7细胞或未经转染的细胞的细胞裂解物在SDS-PAGE上进行电泳且随后转移至NC纸,并且NC纸与抗CD43(MEM59)(左图)或m5F1(右图)进行蛋白质印迹。

[0052] 图13显示m5F1抗体识别岩藻糖依赖性糖表位。由COL0205细胞表达的rhCEA用0、0.01、0.03、0.1 μ g α -1 \rightarrow (2,3,4)-岩藻糖苷酶进行处理。处理后,蛋白质在SDS-PAGE上进行电泳,然后进行考马斯蓝染色(右图)或用m5F1抗体进行蛋白质印迹。

[0053] 图14显示路易斯(Lewis)^a-乳糖(Le^a-乳糖)、路易斯^b-乳糖(Le^b-乳糖)、路易斯^x-乳糖(Le^x-乳糖)、乳糖、路易斯^y(Le^y)、唾液酸-路易斯^x(Sialyl-Le^x)、路易斯^a(Le^a)、Lacto-N-四糖(Lacto-N-tetraose)(LNT)、和Lecto-N-二岩藻糖六糖(Lecto-N-difucohexaose)II(LNDFH II)的结构。

[0054] 图15显示通过添加寡糖以与m5F1、138-10和51-41竞争结合COL0205细胞的结合抑制试验的结果。将寡糖(LNDFH II、LNT、sLe(x)、Le(y)、乳糖、Le(x)-乳糖、Le(b)-乳糖、Le(a)-乳糖或Le(a));各自为1mM)加入包含 2×10^5 COL0205细胞的不同孔内,随后添加抗体(138-10、51-41或m5F1)或不添加抗体作为对照。抗体与COL0205细胞的结合通过流式细胞术分析进行测量。对于每种抗体通过寡糖的结合抑制在图中显示为由荧光平均值测定的抑制百分比。

[0055] 发明详述

[0056] 定义

[0057] “抗体”是通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个抗原识别位点而能够与靶特异性结合的免疫球蛋白分子,所述靶例如糖、多核苷酸、脂质、多肽等。如本文所使用的,该术语不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,还包括其片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(ScFv)、突变体、包含抗体部分的融合蛋白、以及包含抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他经修饰的构型。抗体包括任何类型的抗体,例如IgG、IgA或IgM(或其亚类),并且抗体无需是任何特定类型。依赖其重链的恒定结构域的抗体氨基酸序列,免疫球蛋白可以分为不同类。存在5大类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且其中的几类可以进一步分成亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应不同类的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。

[0058] 本发明的抗体还旨在包括具有抗体的至少一个CDR区域所赋予的多肽亲和力的双特异性、多特异性、单链、以及嵌合和人源化分子。本发明的抗体还包括单结构域抗体,其是抗体重链的可变结构域或抗体轻链的可变结构域。Holt等人,Trends Biotechnol.21:484-490,2003。制备结构域抗体的方法也是本领域已知的,所述结构域抗体包含抗体重链的可变结构域或抗体轻链的可变结构域,包含来自抗体的6个天然互补决定区中的3个。参见例如,Muyldermans,Rev.Mol.Biotechnol.74:277-302,2001。

[0059] 如本文所使用的,“单克隆抗体”指基本上均质的抗体中的抗体,即该群体中包含的各单个抗体除了可能以小量存在的天然突变外,都是相同的。单克隆抗体一般是高

特异性的,针对单个抗原位点。此外,与一般包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制品不同,每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。修饰词“单克隆”指抗体具有得自基本上均质的抗体群体的特征,而不应解释为需要通过任何特定方法生产抗体。例如,待依照本发明使用的单克隆抗体可以通过首先由Kohler和Milstein,1975,Nature,256:495描述的杂交瘤方法进行制备,或可以通过例如在美国专利号4,816,567中描述的重组DNA方法进行制备。单克隆抗体还可以从使用例如McCafferty等人,1990,Nature,348:552-554中描述的技术产生的噬菌体文库中分离。

[0060] 如本文所使用的,“嵌合抗体”指具有来自第一物种的可变区或可变区的一部分和来自第二物种的恒定区的抗体。完整的嵌合抗体包含嵌合轻链的2个拷贝和嵌合重链的2个拷贝。嵌合抗体的生产是本领域已知的(Cabilly等人(1984),Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:3273-3277;Harlow和Lane(1988),Antibodies:a Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory)。一般地,在这些嵌合抗体中,轻和重链的可变区模拟源自一个哺乳动物物种的抗体的可变区,而恒定区部分与源自另一哺乳动物物种的抗体的序列同源。关于此类嵌合形式的一个明显优点是例如,可变区可以通过使用容易获得的杂交瘤或来自非人宿主生物的B细胞而方便地源自目前已知的来源,并与源自例如人细胞制品的恒定区组合。尽管可变区具有容易制备和特异性不受其来源影响的优点,但当抗体注射时,与来自非人来源的恒定区比较,人的恒定区较不可能在人受试者中引起免疫应答。然而,该定义不限于这个具体例子。

[0061] “分离的”抗体是已得到鉴定且与其天然环境的组分分离和/或从其中回收的抗体。

[0062] 如本文所使用的,“基本上纯的”指至少50%纯(即,不含污染物)、更优选至少90%纯、更优选至少95%纯、更优选至少98%纯、更优选至少99%纯的材料。

[0063] 如本文所使用的,“人源化”抗体指包含最少衍生自非人免疫球蛋白的序列的非人(例如鼠类)抗体形式,其是特异性嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链、或其片段(例如,抗体的Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或其他抗原结合子序列)。就大部分而言,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基由来自具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)例如小鼠、大鼠或兔的CDR的残基替换。在某些情况下,人免疫球蛋白的Fv构架区(FR)残基由相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可以包含这样的残基,其在受体抗体和导入的CDR或构架序列中均不存在,但被包括以进一步改善和最优化抗体性能。一般而言,人源化抗体将包含至少一个、和一般2个可变结构域的基本上全部,其中所有或基本上所有的CDR区对应非人免疫球蛋白的那些CDR区,而所有或基本上所有的FR区是具有人免疫球蛋白共有序列的那些FR区。人源化抗体最佳地还将包含至少部分免疫球蛋白(典型地,人免疫球蛋白)恒定区或结构域(Fc)。抗体可以具有如W099/58572中所述修饰的Fc区。其他形式的人源化抗体具有就原始抗体而言改变了的一个或多个CDRs(1、2、3、4、5、6个),其也称为“衍生自”原始抗体的一个或多个CDRs的一个或多个CDRs。

[0064] 如本文所使用的,“人抗体”意指具有对应于人生产的抗体的氨基酸序列的抗体,和/或已使用本领域已知的或本文公开的用于制备人抗体的任何技术进行制备的抗体。人抗体的这个定义包括包含至少一个人重链多肽或至少一个人轻链多肽的抗体。一个此类例子是包含鼠类轻链和人重链多肽的抗体。人抗体可以使用本领域已知的各种技术进行生

产。在一个实施方案中,人抗体选自噬菌体文库,其中所述噬菌体文库表达人抗体(Vaughan等人,1996,Nature Biotechnology,14:309-314;Sheets等人,1998,PNAS,(USA)95:6157-6162;Hoogenboom和Winter,1991,J.Mol.Biol.,227:381;Marks等人,1991,J.Mol.Biol.,222:581)。人抗体还可以通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物内例如小鼠内进行制备,在所述转基因动物中内源性免疫球蛋白基因已被部分或完全灭活。这种方法在美国专利号5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;和5,661,016中得到描述。可替代地,人抗体可以通过使产生抗靶抗原的抗体的人B淋巴细胞永生(此类B淋巴细胞可以从个体中回收或可以已在体外被免疫)而制备。参见例如,Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,第77页(1985);Boerner等人,1991,J.Immunol.,147(1):86-95;和美国专利号5,750,373。

[0065] 抗体的“可变区”指单独或组合的抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区。重和轻链的可变区各自由通过3个互补决定区(CDRs)连接的4个构架区(FR)组成,所述CDRs也称为高变区。每条链中的CDRs通过FRs紧靠在一起,并且与来自另一条链的CDRs一起促成抗体的抗原结合位点的形成。存在用于确定CDRs的至少2种技术:(1)基于交叉物种序列变异性的方法(即,Kabat等人Sequences of Proteins of Immunological Interest,(第5版,1991,National Institutes of Health,Bethesda MD));和(2)基于抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法(Al-lazikani等人(1997)J.Molec.Biol.273:927-948))。如本文所使用的,CDR可以指由任一方法或2种方法的组合定义的CDRs。

[0066] 抗体的“恒定区”指单独或组合的抗体轻链的恒定区或抗体重链的恒定区。抗体的恒定区一般提供结构稳定性和其他生物学功能,例如抗体链结合、分泌、跨胎盘的移动和补体结合,但不参与和抗原的结合。恒定区基因中的氨基酸序列和相应的外显子序列将取决于其所来源的物种;但是,在一个物种中对于特定的恒定区,导致同种异型的氨基酸序列变异是相对有限的。每条链的可变区通过连接多肽序列与恒定区连接。连接序列由轻链基因中的“J”序列,以及重链基因中的“D”序列和“J”序列的组合编码。

[0067] 如本文所使用的,“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”指细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcRs)的非特异性细胞毒性细胞(例如,自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上结合的抗体,且随后引起靶细胞的裂解。目的分子的ADCC活性可以使用体外ADCC测定法进行评估,例如美国专利号5,500,362或5,821,337中描述的ADCC测定法。对于此类测定法有用的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和NK细胞。可替代地,或另外地,目的分子的ADCC活性可以在体内例如在动物模型中进行评估,所述动物模型例如在Clynes等人,1998,PNAS(USA),95:652-656中公开的。

[0068] “补体依赖性细胞毒性”和“CDC”指在补体存在下对靶的裂解。补体激活途径由补体系统的第一组分(C1q)与复合了关联抗原的分子(例如抗体)的结合来起始。为了评估补体激活,可以执行例如如Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods,202:163(1996)中描述的CDC测定法。

[0069] 术语“多肽”、“寡肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指任何长度的氨基酸的聚合物。聚合物可以是线性的或分支的,它可以包含经修饰的氨基酸,并且它可以由非氨基酸间断。该术语还包含已天然或通过干预进行修饰的氨基酸聚合物;例如二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化、或任何其他操作或修饰,例如与标记组分缀合。这个定义内

还包括的是例如包含氨基酸的一种或多种类似物(包括例如,非天然氨基酸等)的多肽,以及本领域已知的其他修饰。应当理解,因为本发明的多肽基于抗体,所以该多肽可以以单链或结合的链的形式存在。

[0070] 如本文可互换使用的,“多核苷酸”或“核酸”指任何长度的核苷酸的聚合物,且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核苷酸或碱基、和/或其类似物、或可以通过DNA或RNA聚合酶掺入聚合物内的任何底物。多核苷酸可以包含经修饰的核苷酸,例如甲基化的核苷酸及其类似物。如果存在对核苷酸结构的修饰,则该修饰可以在聚合物装配前或后赋予。核苷酸的序列可以由非核苷酸组分间断。多核苷酸可以在聚合后进一步修饰,例如通过与标记组分缀合。其他类型的修饰包括例如,“加帽”、用类似物置换一个或多个天然存在的核苷酸、核苷酸间修饰,例如具有不带电荷的键(例如,甲基磷酸酯、磷酸三酯、磷酸胺酯(phosphoamidate)、氨基甲酸酯等)和具有带电荷的键(例如,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的那些修饰,包含悬挂部分例如蛋白质(例如,核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚L-赖氨酸等)的那些修饰,具有嵌合剂(例如吡啶、补骨脂素等)的那些修饰,包含螯合剂(例如,金属、放射性金属、硼、氧化性金属等)的那些修饰,包含烷化剂的那些,具有经修饰的键(例如, α 异头核酸等)的那些修饰,以及未经修饰的多核苷酸形式。此外,糖中通常存在的任何羟基可以例如由磷酸酯基团、磷酸酯基置换,由标准保护基团保护,或激活以制备与另外的核苷酸的另外连接,或可以与固体载体缀合。5'和3'末端OH可以进行磷酸化,或用1-20个碳原子的胺或有机封端基团部分进行置换。其他羟基也可以衍生化成标准保护基团。多核苷酸还可以包含本领域一般已知的核糖或脱氧核糖的类似形式,包括例如2'-O-甲基-,2'-O-烯丙基-,2'-氟-或2'-叠氮基-核糖,碳环糖类似物,糖的 α -异头物,糖的差向异构体例如阿拉伯糖、木糖或来苏糖,吡喃糖,呋喃糖,景天庚酮糖,无环类似物和无碱基核苷类似物例如甲基核苷。一个或多个磷酸二酯键可以由可替代的连接基团替换。这些可替代的连接基团包括但不限于,其中磷酸酯由P(O)S(“硫代酯”)、P(S)S(“二硫代酯”)、(O)NR₂(“酰胺酯”)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂(亚甲基缩醛“formacetal”)替换的实施方案,其中每个R或R'独立地是H或取代的或未取代的烷基(1-20C),所述烷基任选包含醚(-O-)键、芳基、链烯基、环烷基、环烯基或aryl基。多核苷酸中的所有键不必都相同。先前描述适用于本文提及的所有多核苷酸,包括RNA和DNA。

[0071] 如本文所使用的,“载体”意指能够在宿主细胞中递送和优选表达一种或多种目的基因或序列的构建体。载体的例子包括但不限于病毒载体、裸DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子缩合剂(condensing agent)结合的DNA或RNA表达载体、封装在脂质体中的DNA或RNA表达载体、和某些真核细胞例如生产细胞。

[0072] 如本文所使用的,“表达控制序列”意指指导核酸转录的核酸序列。表达控制序列可以是启动子,例如组成型或诱导型启动子,或增强子。表达控制序列与待转录的核酸序列可操作地连接。

[0073] 如本文所使用的,药物、化合物或药物组合物的“有效剂量”或“有效量”是足以实现有利或期望结果的量。对于预防用途,有利或期望结果包括这样的结果,例如消除或减少疾病的危险、减轻疾病的严重度、或延迟疾病的发作,所述疾病包括疾病的生物化学、组织学和/或行为症状、其并发症和在疾病发展期间呈现的中间病理表型。对于治疗用途,有利或期望结果包括临床结果,例如减少起因于疾病的一种或多种症状,增加患有疾病的个体

的生活质量,减少治疗疾病所需的其他药物的剂量,例如经由靶向作用增强另一种药物的效果,延迟疾病的进展,和/或延长存活。在癌症或肿瘤的情况下,药物的有效量可以在下述方面具有作用:减少癌细胞数目;减少肿瘤大小;抑制(即,一定程度地减慢和优选终止)癌细胞向外周器官的浸润;抑制(即,一定程度地减慢和优选终止)肿瘤转移;一定程度地抑制肿瘤生长;和/或一定程度地减轻与病症相关的一种或多种症状。有效剂量可以在一次或多次施用中给予。为了本发明的目的,药物、化合物或药物组合物的有效剂量是足以直接或间接地实现预防或治疗的量。如临床中所理解的,药物、化合物或药物组合物的有效剂量可以通过与另一种药物、化合物或药物组合物联合或不联合而达到。因此,在施用一种或多种治疗剂的情况下可以考虑“有效剂量”,并且如果单个活性剂联合一种或多种其它活性剂达到了或者可以达到期望结果,则可以认为该单个活性剂是以有效量给予的。

[0074] 如本文所使用的,“与……联合”指除了一种治疗形式外还施用另一种治疗形式。由此,“与……联合”指一种治疗形式在另一种治疗形式施用于个体之前、之时或之后施用。

[0075] 如本文所使用的,“治疗”是用于获得有利或期望结果,包括和优选临床结果的方法。为了本发明的目的,有利或所需临床结果包括但不限于,下述中的一种或多种:减少(或破坏)癌细胞的增殖、减少起于疾病的症状、增加患有疾病的个体的生活质量、减少治疗疾病所需的其他药物的剂量,延迟疾病的进展,和/或延长个体的存活。

[0076] 如本文所使用的,“延迟疾病的进展”意指推迟、阻碍、减慢、延迟、稳定、和/或推迟疾病(例如癌症)的进展。依赖于待治疗的个体和/或疾病史,这种延迟可以具有不同的时间长度。如对于本领域技术人员显而易见的,足够或显著的延迟事实上可以包含预防,即个体不出现该疾病。例如,晚期癌症,例如转移的发生,可以被延迟。

[0077] “个体”或“受试者”是哺乳动物,更优选人。哺乳动物还包括但不限于,家畜、运动动物、宠物(例如猫、犬、马)、灵长类动物、小鼠和大鼠。

[0078] 如本文所使用的,术语“特异性识别”或“特异性结合”指靶和抗体之间的可测量和可再现的相互作用,例如吸引或结合,这可以在异质分子(包括生物分子)群体存在下确定靶的存在。例如,与表位特异性或优先结合的抗体是这样的抗体,该抗体与该表位的结合,相比较于该抗体与靶的其他表位或非靶表位的结合,具有更大的亲和性、亲合力、更为容易、和/或持续更长的时间。通过阅读此定义,也应当理解,例如,与第一靶特异性或优先结合的抗体(或部分或表位)可能可以或可能不可以与第二靶特异性或优先结合。由此,“特异性结合”或“优先结合”不一定要(尽管它可以包括)专一结合。与靶特异性结合的抗体可以具有至少约 10^3M^{-1} 或 10^4M^{-1} ,有时约 10^5M^{-1} 或 10^6M^{-1} ,在其他情况下约 10^6M^{-1} 或 10^7M^{-1} 、约 10^8M^{-1} 至 10^9M^{-1} 、或约 10^{10}M^{-1} 至 10^{11}M^{-1} 或更高的结合常数。各种免疫测定法形式均可以用于选择与特定蛋白质发生特异性免疫反应的抗体。例如,固相ELISA免疫测定法常规用于选择与蛋白质发生特异性免疫反应的单克隆抗体。关于可以用于测定特定免疫反应性的免疫测定法形式和条件的描述,参见例如,Harlow和Lane(1988)Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York。

[0079] 如本文所使用的,术语“癌症”、“肿瘤”、“癌性”和“恶性”指或描述哺乳动物中典型特征在于不受调节的细胞生长的生理情况。癌症的例子包括但不限于,癌,包括腺癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、黑素瘤和肉瘤。此类癌症的更具体的例子包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、胃肠癌、何杰金氏和非何杰金氏淋巴瘤、胰腺癌、成胶质

细胞瘤、宫颈癌、神经胶质瘤、卵巢癌、肝脏癌症例如肝癌和肝细胞瘤、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌例如肾细胞癌和肾胚细胞瘤、基底细胞癌、黑素瘤、前列腺癌、甲状腺癌、睾丸癌、食管癌、和各种类型的头颈癌。

[0080] 如本文和后附权利要求中所使用的,除非上下文另有明确说明,单数形式“a”、“an”和“the”包括对复数的提及。例如,提及“an”“抗体”是提及一个至多个抗体,例如摩尔量,且包括本领域技术人员已知的其等价形式等等。

[0081] 应当理解本文描述的本发明的方面和变化包括由方面和变化“组成”和/或基本上由方面和变化“组成”。

[0082] 与非造血系统癌细胞上表达的CD43和CEA上的糖表位特异性结合的抗体和多肽

[0083] 本发明提供了分离的抗体和衍生自抗体的多肽,所述抗体和多肽与非造血系统癌细胞表达的CD43和/或CEA上的表位特异性结合,但不与白细胞(例如外周T细胞)或Jurkat细胞表达的CD43特异性结合。本发明的抗体和多肽还可以具有一个或多个下述特征:(a)如果包含表位的分子用 α -1 \rightarrow (2,3,4)-岩藻糖苷酶处理,那么抗体或多肽与表位的结合将减少;(b)抗体或多肽与表位的结合受包含Le^a结构、Le^a-乳糖结构、LNDFH II结构、和/或LNT结构的糖抑制;(c)在不存在细胞毒素缀合和免疫效应子功能的情况下,在与癌细胞的细胞表面上表达的表位结合后,诱导非造血系统癌细胞死亡(例如通过凋亡);(d)在与癌细胞的细胞表面上表达的表位结合后,抑制非造血系统癌细胞的细胞生长或增殖;和(e)治疗或预防个体中在细胞表面上表达表位的非造血系统癌症,例如结肠直肠癌和胃癌。

[0084] 如本文所使用的,术语“抑制”包括部分和完全抑制。例如,抗体或多肽与CD43和CEA上的表位的结合被包含Le^a结构、Le^a-乳糖结构、LNDFH II结构、和/或LNT结构的糖抑制至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、或至少约90%。抗体与表位的结合可以被直接竞争或被其他机制抑制。

[0085] 表达表位的非造血系统癌细胞的例子包括但不限于,结肠直肠癌细胞(例如COLO205和DLD-1)和胃癌细胞(例如NCI-N87)。

[0086] 本发明的抗体和多肽可以识别非造血系统癌细胞上存在的CD43的胞外域,但不与白细胞CD43(例如,外周T细胞)的胞外域、或Jurkat细胞(类淋巴母细胞性白血病细胞)上表达的CD43的胞外域结合。在某些实施方案中,本发明的新抗体或多肽不与造血系统起源的细胞表达的CD43特异性结合。

[0087] 本发明的抗体可以包括单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fc等)、嵌合抗体、单链(ScFv)、它们的突变体、包含抗体部分的融合蛋白、以及包含所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他经修饰的构型。抗体可以是小鼠、大鼠、骆驼、人、或任何其他起源(包括人源化抗体)。

[0088] 多肽(包括抗体)与CD43或CEA的结合亲和力可以小于约500nM、约400nM、约300nM、约200nM、约100nM、约50nM、约10nM、约1nM、约500pM、约100pM或约50pM中的任何一个。如本领域众所周知的,结合亲和力可以表示为K_D、或解离常数,增加的结合亲和力对应减少的K_D。测定抗体与CD43或CEA的结合亲和力的一种方法是测量抗体的单功能Fab片段的结合亲和力。为了获得单功能Fab片段,抗体(例如,IgG)可以用木瓜蛋白酶进行切割或重组表达。抗体的Fab片段的亲和力可以通过表面等离子体共振(BIAcore3000™表面等离子体共振(SPR)系统,BIAcore,INC,Piscaway NJ)和ELISA进行测定。获得动力学结合速率(K_{on})和解离速率

(K_{off})(一般在25℃测量);并且平衡解离常数(K_D)值计算为 K_{off}/K_{on} 。

[0089] 在某些实施方案中,本发明的抗体和多肽减少癌细胞数目,和/或抑制具有表位的肿瘤或癌细胞的细胞生长或增殖。优选地,与未用抗体或多肽处理的细胞比较,细胞数目中的减少或者细胞生长或增殖的抑制是至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约65%、约75%或更高。癌细胞包括但不限于结肠直肠癌、胰腺癌、肺癌、胃癌。

[0090] 在某些实施方案中,在与非造血系统癌细胞的细胞表面上表达的表位结合后,本发明的抗体和多肽能够单独诱导细胞死亡,例如通过凋亡途径。如本文所使用的,术语“诱导细胞死亡”意指本发明的抗体或多肽可以与细胞表面上表达的分子直接相互作用,并且该结合/相互作用单独足以在细胞中诱导细胞死亡而无需其他因素例如细胞毒素缀合或其他免疫效应子功能(即补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、或吞噬作用)的帮助。

[0091] 如本文所使用的,术语“凋亡”指由基因指导的细胞内细胞毁坏过程。凋亡不同于坏死;它包括细胞骨架破坏、细胞质收缩和浓缩、磷脂酰丝氨酸在细胞膜的外表面上的表达和起泡,从而导致细胞膜结合性小泡或凋亡小体的形成。该过程也称为“程序性细胞死亡”。在凋亡期间,观察到特征性现象例如弯曲的细胞表面、核染色质的浓缩、染色体DNA的断裂、和线粒体功能的丧失。各种已知的技术可以用于检测凋亡,例如用膜联蛋白V、碘化丙啶、DNA断裂测定法和YO-PRO-1(Invitrogen)染色细胞。

[0092] 检测细胞死亡(例如凋亡)的方法包括但不限于检测形态、DNA断裂、酶活性、和多肽降解等。参见引入本文作为参考的Siman等人,美国专利号6,048,703;Martin和Green(1995),Cell,82:349-52;Thomberry和Lazebnik(1998),Science,281:1312-6;Zou等人,美国专利号6,291,643;Scovassi和Poirier(1999),Mol.Cell Biochem.,199:125-37;Wyllie等人,(1980),Int.Rev.Cytol,68:251-306;Belhocine等人(2004),Technol.Cancer Res.Treat.,3(1):23-32。

[0093] 在某些实施方案中,本发明的抗体和多肽识别在非造血系统癌细胞上表达的构象表位,这种表位包括与三肽N'-Trp-Pro-Ile-C'所形成的结构具有等价的物理和化学特征的结构。如本文所使用的,“表位包括与肽所形成的结构具有等价的物理和化学特征的结构”意指2种结构具有相似的与抗体结合相关的物理和化学性质,从而使得与一种结构特异性结合的抗体将与2种结构均可以发生结合。在某些实施方案中,抗体和多肽与在N端包含N'-Trp-Pro-Ile-C'氨基酸序列的多肽结合。

[0094] 在某些实施方案中,本发明的抗体和多肽与抗体5F1、138-10或51-41竞争结合癌细胞的细胞表面上表达的表位。在某些实施方案中,本发明的抗体或多肽与抗体5F1、138-10和51-41中的至少一种所结合的CD43或CEA上的表位结合。

[0095] 竞争测定法可以用于确定2种抗体是否可以通过识别相同或空间上重叠的表位而结合相同表位,或一种抗体是否可以竞争性抑制另一种抗体与抗原的结合。这些测定法是本领域已知的,并且在实施例中进行详细描述。一般地,将抗原或抗原表达细胞固定多孔板上,并且测量未标记的抗体阻断标记抗体结合的能力。用于此类竞争测定法的常用标记是放射性标记或酶标记。

[0096] 在某些实施方案中,本发明的抗体是抗体5F1或衍生自5F1的抗体。5F1的重链和轻链可变序列分别在SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2中阐述。本发明提供了包含抗体5F1的片段

或区域的抗体或多肽。在一个实施方案中,片段是抗体5F1的轻链。在另一个实施方案中,片段是抗体5F1的重链。在另外一个实施方案中,片段包含来自抗体5F1的轻链和/或重链的一个或多个可变区。在另外一个实施方案中,片段包含来自抗体5F1的轻链和/或重链的1、2或3个CDRs。在某些实施方案中,抗体是5F1的人源化抗体,例如包含SEQ ID NO:7中所示的重链可变区和SEQ ID NO:8中所示的轻链可变区的h5F1。在某些实施方案中,衍生自抗体5F1的一个或多个CDRs与5F1的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、或至少6个CDRs具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%的同一性。

[0097] 在某些实施方案中,本发明的抗体是抗体138-10或衍生自138-10的抗体。138-10的重链和轻链可变序列分别在SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4中阐述。本发明提供了包含抗体138-10的片段或区域的抗体或多肽。在一个实施方案中,片段是抗体138-10的轻链。在另一个实施方案中,片段是抗体138-10的重链。在另外一个实施方案中,片段包含来自抗体138-10的轻链和/或重链的一个或多个可变区。在另外一个实施方案中,片段包含来自抗体138-10的轻链和/或重链的1、2或3个CDRs。在某些实施方案中,抗体是138-10的人源化抗体。在某些实施方案中,衍生自抗体138-10的一个或多个CDRs与138-10的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、或至少6个CDRs具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%的同一性。

[0098] 在某些实施方案中,本发明的抗体是抗体51-41或衍生自51-41的抗体。51-41的重链和轻链可变序列分别在SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6中阐述。本发明提供了包含抗体51-41的片段或区域的抗体或多肽。在一个实施方案中,片段是抗体51-41的轻链。在另一个实施方案中,片段是抗体51-41的重链。在另外一个实施方案中,片段包含来自抗体51-41的轻链和/或重链的一个或多个可变区。在另外一个实施方案中,片段包含来自抗体51-41的轻链和/或重链的1、2或3个CDRs。在某些实施方案中,抗体是51-41的人源化抗体。在某些实施方案中,衍生自抗体51-41的一个或多个CDRs具有与51-41的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、或至少6个CDRs具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%的同一性。

[0099] 在某些实施方案中,CDR是Kabat CDR。在其他实施方案中,CDR是Chothia CDR。在其他实施方案中,CDR是Kabat和Chothia CDR的组合(也称为“组合的CDR”或“扩展的CDR”)。换言之,对于包含超过一个CDR的任何给定实施方案,CDRs可以是Kabat、Chothia和/或组合的CDR中的任何一种。

[0100] 制备抗体和衍生自抗体的多肽的方法是本领域已知的且在本文中公开。本发明的单克隆抗体可以使用已充分建立的方法进行制备。例如,单克隆抗体可以使用杂交瘤技术进行制备,例如由Kohler和Milstein(1975),*Nature*, 256:495描述的那些。在杂交瘤方法中,小鼠、仓鼠、或其他合适的宿主动物一般用免疫剂(例如,表达CD43或CEA的癌细胞,可以使用本文描述的抗体纯化的CD43或CEA(包括由癌细胞表达的胞外域及其片段),或在N端包含氨基酸序列N'-Trp-Pro-Ile-C'的多肽)免疫,以引起产生或能够产生与免疫剂特异性结

合的抗体的淋巴细胞。可替代地,淋巴细胞可以在体外进行免疫。淋巴细胞随后使用合适的融合试剂例如聚乙二醇与永生化细胞系融合,以形成杂交瘤细胞(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986)第59-1031页)。永生化细胞系通常是转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿类动物、兔、牛和人起源的骨髓瘤细胞。通常,使用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。杂交瘤细胞可以在合适的培养基中进行培养,所述培养基优选包含抑制未融合的永生化细胞的生长或存活的一种或多种物质。例如,如果亲本细胞缺乏次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT),那么用于杂交瘤的培养基一般将包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(“HAT培养基”),所述物质阻止HGPRT缺陷型细胞的生长。

[0101] 优选的永生化细胞系是可以有效融合、能支持所选择的抗体生产细胞稳定地高水平表达抗体,且对培养基例如HAT培养基敏感的那些细胞系。更优选的永生化细胞系是鼠类骨髓瘤细胞系,其可以例如得自Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif, 和美国典型培养物保藏中心Manassas, Va。人骨髓瘤和小鼠-人种间骨髓瘤(heteromyeloma)细胞系也已描述用于生产人单克隆抗体(Kozbor, *J. Immunol.* (1984), 133:3001; Brodeur等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987)第51-63页)。

[0102] 用于培养杂交瘤细胞的培养基随后可以就单克隆抗体的存在进行测定。抗体可以就与非造血系统癌症或肿瘤细胞表达的CD-43或CEA上的表位具有特异性结合、但与表达CD43的白细胞、Jurkat细胞、和/或其他造血系统起源的CD43表达细胞无特异性结合而进行筛选。包含表位的癌细胞或胞外域(包括其片段)可以用于筛选。例如,实施例10中描述的由COLO205细胞表达的CEA-N-A2可以用于筛选。

[0103] Jurkat细胞系是类淋巴母细胞性白血病细胞,由Schneider等人从14岁男孩的外周血建立。Schneider等人, *Int. J. Cancer* 19:621-626, 1977。各种Jurkat细胞系可以例如从美国典型培养物保藏中心商购获得(例如, ATCC TIB-152、ATCC TIB-153、ATCC CRL-2678)。

[0104] 优选地,由杂交瘤细胞生产的单克隆抗体的结合特异性通过免疫沉淀或通过体外结合测定法,例如放射性免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA)进行测定。此类技术和测定法是本领域已知的。单克隆抗体的结合亲和力可以例如通过Munson和Pollard (1980), *Anal. Biochem.*, 107:220的Scatchard分析进行测定。

[0105] 鉴定的抗体可以使用本领域已知的和本文描述的方法就其诱导细胞死亡(例如,凋亡)、和/或抑制细胞生长或增殖的能力进行进一步测试。

[0106] 鉴定到期望的杂交瘤细胞后,克隆可以通过有限稀释法进行亚克隆,且通过标准方法(Goding, 同上)进行培养。用于这个目的的合适的培养基包括例如, Dulbecco氏改良的Eagle氏培养基或RPMI-1640培养基。可替代地,杂交瘤细胞可以在哺乳动物中在体内作为腹水生长。

[0107] 单克隆抗体可以通过培养杂交瘤细胞来产生,并且由杂交瘤细胞分泌的抗体可以进行进一步分离或纯化。抗体可以通过常规免疫球蛋白纯化操作由培养基或腹水中分离或纯化,所述纯化操作例如蛋白A-琼脂糖、羟基磷灰石层析法、凝胶电泳、透析或亲和层析法。

[0108] 本发明的抗体还可以通过重组DNA方法进行制备,例如在此引入作为参考的美国专利号4,816,567和6,331,415中描述的那些,例如编码本发明的单克隆抗体的DNA可以使用常规操作容易地分离和测序(例如,通过使用能够与编码鼠类抗体的重和轻链的基因特

异性结合的寡核苷酸探针)。本发明的杂交瘤细胞充当此类DNA的优选来源。分离后,DNA可以置入表达载体内,所述表达载体随后转染到原本不生产免疫球蛋白的宿主细胞内,例如猴COS细胞、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)细胞或骨髓瘤细胞,以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。DNA还可以例如通过用人重和轻链恒定结构域的编码序列代替同源鼠类序列(美国专利号4,816,567),或通过将非免疫球蛋白多肽的所有或部分编码序列与免疫球蛋白编码序列共价连接,而进行修饰。此类非免疫球蛋白多肽可以替换本发明的抗体的恒定结构域,或可以替换本发明抗体的一个抗原结合部位的可变结构域,以产生嵌合双价抗体。

[0109] 在某些实施方案中,本发明的抗体由2种表达载体表达。第一种表达载体编码抗体(例如,人源化抗体)的重链,包含编码抗体重链可变区的第一部分,和编码抗体重链恒定区的第二部分。在某些实施方案中,第一部分编码具有SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的可变区。第二种表达载体编码抗体的轻链,包含编码抗体轻链可变区的第一部分,和编码抗体轻链恒定区的第二部分。在某些实施方案中,第一部分编码具有SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的可变区。

[0110] 可替代地,本发明的抗体(例如,人源化抗体)由单种表达载体表达。该单种表达载体编码本发明抗体的重链和轻链。在某些实施方案中,该表达载体包含多核苷酸序列,其编码具有SEQ ID NO:7氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:8氨基酸序列的轻链可变区。

[0111] 通常表达载体具有源自与宿主细胞相容的物种的转录和翻译调节序列。此外,载体通常携带能够在转化细胞中提供表型选择的特定基因。

[0112] 大量的用于真核细胞的重组宿主载体表达系统是已知的且可以在本发明中使用。例如,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或通常的面包酵母是真核微生物中最常用的,但许多其他菌株例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)也是可用的。衍生自多细胞生物例如可从ATCC获得的Sp2/0或中国仓鼠卵巢细胞(CHO)的细胞系也可以用作宿主。适合于真核细胞转化的一般载体质粒是例如pSV2neo和pSV2gpt(ATCC),pSVL和pSVK3(Pharmacia),和pBPV-1/pML2d(International Biotechnology, Inc.)。

[0113] 在本发明中有用的真核宿主细胞优选是杂交瘤、骨髓瘤、浆细胞瘤或淋巴瘤细胞。然而,可以适宜地使用其他真核宿主细胞,条件是哺乳动物宿主细胞能够识别用于表达蛋白质的转录和翻译DNA序列;通过前导序列的切割来加工前导肽和分泌蛋白质;且提供蛋白质的翻译后修饰,例如糖基化。

[0114] 因此,本发明提供了真核宿主细胞,其被包含本文公开的DNA构建体的重组表达载体转化,并且能够表达本发明的抗体或多肽。因此,在某些实施方案中,本发明的转化的宿主细胞包含至少一种DNA构建体,其包含本文描述的轻和重链DNA序列、以及相对于轻和重链编码DNA序列放置以指导抗体或多肽表达的转录和翻译调节序列。

[0115] 本发明中使用的宿主细胞可以通过本领域众所周知的标准转染方法以各种方式进行转化。在可以使用的标准转染方法中有电穿孔技术、原生质体融合和磷酸钙沉淀技术。此类技术由F. Toneguzzo等人(1986),*Mol. Cell Biol*,6:703-706;G. Chu等人,*Nucleic Acid Res.*(1987),15:1311-1325;D. Rice等人,*Proc. Natl. Acad. Sci USA*(1979),79:7862-7865;和V. Oi等人,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(1983),80:825-829作了一般描述。

[0116] 在2种表达载体的情况下,2种表达载体可以一个一个分开地或一起(共转移或共

转染)转移到宿主细胞内。

[0117] 本发明还提供了用于生产抗体或多肽的方法,其包括培养包含编码抗体或多肽的表达载体的宿主细胞,和通过本领域技术人员众所周知的方法从培养物中回收抗体或多肽。

[0118] 此外,所需抗体可以在转基因动物中进行生产。合适的转基因动物可以根据标准方法来获得,所述方法包括将合适的表达载体显微注射到卵内,将卵转移到假孕的雌性体内且选择表达所需抗体的后代。

[0119] 本发明还提供了特异性识别癌细胞表达的CD43和CEA上的表位的嵌合抗体。例如,嵌合抗体的可变区和恒定区来自不同的物种。在某些实施方案中,重链和轻链的可变区来自本文描述的鼠类抗体。在某些实施方案中,可变区包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,可变区包含SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,可变区包含SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,重链和轻链的恒定区来自人抗体。

[0120] 本发明的嵌合抗体可以通过本领域充分建立的技术进行制备。参见例如美国专利号6,808,901、美国专利号6,652,852、美国专利号6,329,508、美国专利号6,120,767和美国专利号5,677,427,所述专利各自在此引入作为参考。一般而言,嵌合抗体可以通过下述进行制备:获得编码抗体的重和轻链可变区的cDNAs,将cDNAs插入表达载体内,随后将所述表达载体引入真核宿主细胞内,表达本发明的嵌合抗体。优选地,表达载体携带功能上完全的恒定重或轻链序列,从而使得可以容易地将任何可变重或轻链序列插入表达载体内。

[0121] 本发明提供了特异性识别由非造血系统癌细胞表达的CD43和CEA上的表位的人源化抗体。人源化抗体一般是人抗体,其中来自CDRs的残基由来自具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种例如小鼠、大鼠或兔的CDR的残基替代。在某些情况下,人抗体的Fv构架残基由相应的非人残基替代。

[0122] 使单克隆抗体人源化有4个一般步骤。它们是:(1)测定起始抗体轻和重可变结构域的核苷酸序列和预测的氨基酸序列,(2)设计人源化抗体,即决定何种抗体构架区在人源化过程中使用,(3)实际的人源化方法/技术,和(4)人源化抗体的转染和表达。参见例如,美国专利号4,816,567;5,807,715;5,866,692;6,331,415;5,530,101;5,693,761;5,693,762;5,585,089;6,180,370;和6,548,640。例如,如果抗体在人的临床试验和治疗中使用,那么恒定区可以改造成更类似于人恒定区,以避免免疫应答。参见例如,美国专利号5,997,867和5,866,692。

[0123] 重要的是抗体在进行人源化时保留对于抗原的高亲和力和其他有利的生物性质。为了达到这个目的,人源化抗体可以通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念上的人源化产物而制备。三维免疫球蛋白模型是通常可得的且是本领域技术人员熟悉的。可以获得计算机程序用于描述和展示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构。对这些展示的检查使得可以分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,即,分析影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。以这种方式,可以从共有序列和输入序列选择FR残基并组合,以便获得所需的抗体特征,例如对于靶抗原增加的亲和力。一般而言,CDR残基直接且大多数基本上参与影响抗原结合。人源化抗体还可以包含在铰链区中的修饰以改善抗体的一种或多种特征。

[0124] 在另一种可替代方案中,可以通过噬菌体展示技术筛选和重组制备抗体。参见例如,美国专利号5,565,332;5,580,717;5,733,743和6,265,150;和Winter等人, *Annu. Rev. Immunol* 12:433-455(1994)。可替代地,噬菌体展示技术(McCafferty等人, *Nature* 348:552-553(1990))可以用于由来自未免疫的供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因库在体外生产人抗体和抗体片段。根据这种技术,将抗体V结构域基因以符合读框的方式克隆到丝状噬菌体例如M13或fd的主要或次要外壳蛋白基因内,且作为功能抗体片段展示在噬菌体颗粒的表面上。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链DNA拷贝,所以基于抗体的功能性质的选择也导致编码显示那些性质的抗体的基因的选择。因此,噬菌体模拟了B细胞的某些性质。噬菌体展示可以以各种方式来进行;关于综述参见例如,Johnson, Kevin S. 和 Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3,564-571(1993)。几种来源的V基因片段可以用于噬菌体展示。Clackson等人, *Nature* 352:624-628(1991)从衍生自免疫小鼠脾的V基因的小型随机组合文库中分离了一系列多样的抗噁唑酮抗体。可以构建来自未免疫人供体的V基因库,且可以基本上根据Mark等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-597(1991)或Griffith等人, *EMBO J.* 12:725-734(1993)描述的技术分离针对一系列多样抗原(包括自身抗原)的抗体。在天然免疫应答中,抗体基因以高速率积聚突变(体细胞高变)。引入的某些改变将赋予更高的亲和力,且显示高亲和力表面免疫球蛋白的B细胞在随后的抗原攻击过程中将优先复制和分化。这种天然过程可以通过使用称为“链改组”的技术进行模拟。Marks, 等人, *Bio/Technol.* 10:779-783(1992)。以这种方法,通过噬菌体展示获得的“初级”人抗体的亲和力可以通过下述得到改善:用得自未免疫个体的V结构域基因的天然变体(库)顺次替代重和轻链V区基因。这种技术允许产生具有pM-nM范围中的亲和力的抗体和抗体片段。用于制备极大型噬菌体抗体库(也称为“所有文库之母”)的策略已由Waterhouse等人, *Nucl. Acids Res.* 21:2265-2266(1993)描述。基因改组也可以用于由啮齿类动物抗体获得人抗体,其中人抗体具有与起始啮齿类动物抗体相似的亲和力和特异性。根据也称为“表位印迹”的方法,通过噬菌体展示技术获得的啮齿类动物抗体的重或轻链V结构域基因由人V结构域基因的库替代,产生啮齿类动物-人嵌合体。对抗原的选择导致能够恢复功能抗原结合位点的人可变区的分离,即表位控制(印迹)配偶体的选择。当重复该过程以替代其余的啮齿类动物V结构域时,获得人抗体(参见1993年4月1日公开的PCT公开号W093/06213)。与通过CDR嫁接的啮齿类动物抗体的常规人源化不同,这种技术提供了全人抗体,其不具有啮齿类动物起源的构架或CDR残基。显然尽管上述讨论涉及人源化抗体,但所讨论的一般原则可应用于定制用于例如在犬、猫、灵长类动物、马和牛动物中使用的抗体。

[0125] 在某些实施方案中,抗体是全人抗体。特异性结合抗原的非人抗体可以用于生产与该抗原结合的全人抗体。例如,本领域技术人员可以使用链交换技术,其中非人抗体的重链与表达不同人轻链的表达文库共表达。包含1条人轻链和1条非人重链的所得到的杂合抗体随后就抗原结合进行筛选。参与抗原结合的轻链随后与人抗体重链文库共表达。所得到的人抗体再一次就抗原结合进行筛选。诸如此类的技术在美国专利5,565,332中进一步描述。此外,

[0126] 抗原可以用于接种人免疫球蛋白基因的转基因动物。参见例如,美国专利5,661,016。

[0127] 抗体可以是双特异性抗体,即对于至少2种不同抗原具有结合特异性的单克隆抗体,其可以使用本文公开的抗体进行制备。用于制备双特异性抗体的方法是本领域已知的(参见例如Suresh等人,1986,Methods in Enzymology 121:210)。通常,双特异性抗体的重组生产基于2个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中2条重链具有不同的特异性(Millstein和Cuello,1983,Nature 305,537-539)。

[0128] 根据制备双特异性抗体的一种方法,使具有所需结合特异性(抗体-抗原结合部位)的抗体可变结构域与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。融合物优选具有免疫球蛋白重链恒定结构域,包含至少部分的铰链、CH2和CH3区域。优选具有包含轻链结合所需位点的第一重链恒定区(CH1),存在于融合物的至少一个中。将编码免疫球蛋白重链融合物和如期望的话免疫球蛋白轻链的DNAs插入分开的表达载体内,且共转染到合适的宿主生物中。当构建体中使用的3条多肽链的不等比率提供最优产量时,这提供了调整3个多肽片段的相互比例的极大灵活性。然而当至少2条多肽链以相同比率表达导致高产量时或当比例没有特别意义时,可以将2条或所有3条多肽链的编码序列插入一个表达载体中。

[0129] 在一种方法中,双特异性抗体由在一条臂中具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链,和在另一条臂中的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。在双特异性分子的仅一半中具有免疫球蛋白轻链的这种不对称结构,将有利于所需双特异性化合物与不需要的免疫球蛋白链组合的分离。这种方法在1994年3月3日公开的PCT公开号W094/04690中得到描述。

[0130] 包含2个共价连接的抗体的杂缀合抗体(heteroconjugate antibody)也在本发明的范围内。此类抗体已用于使免疫系统细胞靶向不需要的细胞(美国专利号4,676,980)和用于治疗HIV感染(PCT公开号W091/00360和W092/200373;和EP03089)。杂缀合抗体可以使用任何方便的交联法进行制备。合适的交联试剂和技术是本领域众所周知的,且在美国专利号4,676,980中得到描述。

[0131] 单链Fv片段还可以例如如Iliades等人,1997,FEBS Letters,409:437-441中描述的进行生产。此类单链片段使用各种接头的偶联在Kortt等人,1997,Protein Engineering,10:423-433中得到描述。用于抗体的重组生产和处理的各种技术是本领域众所周知的。

[0132] 本发明旨在不仅包括上文描述的单克隆抗体,还包括其含有抗体的活性结合区域的任何片段,例如Fab、F(ab')₂、scFv、Fv片段等。此类片段可以使用本领域充分建立的技术由本文描述的单克隆抗体进行生产(Rousseaux等人(1986),in Methods Enzymol,121:663-69 Academic Press)。

[0133] 制备抗体片段的方法是本领域众所周知的。例如,抗体片段可以通过用胃蛋白酶酶促切割抗体来生产,以提供命名为F(ab')₂的100Kd片段。这个片段可以使用硫醇还原剂和任选地保护基团(用于因二硫键断裂形成的巯基),进行进一步断裂,以产生50Kd Fab'单价片段。可替代地,使用木瓜蛋白酶的酶促切割直接产生2个单价Fab片段和Fc片段。这些方法例如由美国专利号4,036,945和4,331,647以及其中包含的参考文献进行描述,所述专利引入本文作为参考。同样,参见Nisonoff等人(1960),Arch Biochem. Biophys. 89:230; Porter(1959),Biochem. J. 73:119,Edelman等人,in METHODS IN ENZYMOLOGY VOL. 1,第422页(Academic Press 1967)。

[0134] 可替代地, Fab可以通过下述产生: 将编码抗体Fab的DNA插入用于原核生物的表达载体或用于真核生物的表达载体内, 并且将载体引入原核生物或真核生物内以表达Fab。

[0135] 本发明包含对本文描述的抗体或多肽的修饰, 包括不会显著影响其性质的功能上等价的抗体, 和具有增强的或减少的活性和/或亲和力的变体。例如, 抗体5F1或人源化抗体的氨基酸序列可以进行突变, 以获得对于癌细胞表达的CD43或CEA具有所需结合亲和力的抗体。多肽的修饰是本领域的常规实践, 无需在本文中详细描述。经修饰的多肽的例子包括如下多肽, 所述多肽具有氨基酸残基的保守置换, 不会显著不利地改变功能活性的一个或多个氨基酸的删除或添加、或化学类似物的使用。

[0136] 氨基酸序列插入包括长度从1个残基到包含100个或更多残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合, 以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有N末端甲硫氨酰残基的抗体或与表位标签融合的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N或C末端与酶或增加抗体的血清半衰期的多肽的融合。

[0137] 置换变体在抗体分子中去除了至少一个氨基酸残基并在其位置上插入了不同残基。对于置换诱变具有最大意义的位点包括高变区, 但FR改变也可以考虑。保守置换在下表中的“保守置换”标题下显示。如果此类置换导致生物活性的改变, 那么可以引入在下表中命名为“示例性置换”, 或如下文就氨基酸类别而言进一步描述的更实质的变化, 且筛选产物。

[0138] 氨基酸置换

原始残基	保守置换	示例性置换
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg;
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸
Leu (L)	Ile	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸

[0139]

[0140] 抗体生物学性质的实质性修饰可以通过选择在维持下述方面的作用上具有显著不同的置换来完成:(a)置换区域中的多肽主链的结构,例如作为片层或螺旋构象,(b)分子在靶位点上的电荷或疏水性,或(c)侧链的体积。天然存在的残基基于共同的侧链性质分成以下组:

[0141] (1)非极性:正亮氨酸, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0142] (2)不带电荷的极性: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0143] (3)酸性(带负电荷): Asp, Glu;

[0144] (4)碱性(带正电荷): Lys, Arg;

[0145] (5)影响链取向的残基: Gly, Pro; 和

[0146] (6)芳香族: Trp, Tyr, Phe, His。

[0147] 非保守置换通过将这类别之一的成员换成另一个类别来实现。

[0148] 不涉及抗体的正确构象维持的任何半胱氨酸残基也可以一般用丝氨酸进行置换,以改善分子的抗氧化性且阻止异常交联。相反,半胱氨酸键可以加入抗体中以改善其稳定性,特别是当抗体是抗体片段例如Fv片段时。

[0149] 氨基酸修饰可以从变化或修饰一个或多个氨基酸到完全重新设计区域例如可变区。可变区中的变化可以改变结合亲和力和/或特异性。在某些实施方案中,在CDR结构域内进行不超过1-5个保守氨基酸置换。在其他实施方案中,在CDR结构域内进行不超过1-3个保守氨基酸置换。在另外其他的实施方案中,CDR结构域是CDRH3和/或CDR L3。

[0150] 修饰还包括糖基化和非糖基化的多肽,以及具有其他翻译后修饰的多肽,例如具有不同糖的糖基化、乙酰化和磷酸化。抗体在其恒定区中在保守位置上进行糖基化(Jefferis和Lund,1997,Chem. Immunol. 65:111-128;Wright和Morrison,1997,TibTECH15:26-32)。免疫球蛋白的寡糖侧链影响蛋白质的功能(Boyd等人,1996,Mol. Immunol. 32:1311-1318;Wittwe和Howard,1990,Biochem. 29:4175-4180)和糖蛋白的部分之间的分子内相互作用,这可以影响糖蛋白的构象和呈现的三维表面(Hefferis和Lund,同上;Wyss和Wagner,1996,Current Opin. Biotech. 7:409-416)。基于特异识别结构,寡糖也可以用于使给定糖蛋白靶向某些分子。抗体的糖基化已报道影响抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。特别地,具有四环素调节的 $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖氨基转移酶III(GnTIII)表达的CHO细胞被报道具有改善的ADCC活性(Umana等人,1999,Mature Biotech. 17:176-180),所述GnTIII是催化平分型(bisecting)GlcNAc形成的糖基转移酶。

[0151] 抗体的糖基化一般是N联或O联的。N联指糖部分与天冬酰胺残基的侧链附着。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸、天冬酰胺-X-苏氨酸、和天冬酰胺-X-半胱氨酸是糖部分与天冬酰胺侧链进行酶促附着的识别序列,其中X是除脯氨酸外的任何氨基酸。因此,这些三肽序列之任一在多肽中的存在都将造成潜在糖基化位点。O联糖基化指糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一与羟基氨基酸的附着,最常见地丝氨酸或苏氨酸,尽管5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸也可以使用。

[0152] 给抗体添加糖基化位点可以通过改变氨基酸序列,使得它包含上述三肽序列中的一个或多个(对于N联糖基化位点)而方便地完成。改变还可以通过给原始抗体的序列添加或置换一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来完成(对于O联糖基化位点)。

[0153] 也可以改变抗体的糖基化模式而不改变基础核苷酸序列。糖基化在很大程度上依

赖用于表达抗体的宿主细胞。因为用于表达重组糖蛋白例如抗体作为潜在治疗剂的细胞类型很少是天然细胞,所以可以预期抗体的糖基化模式的变化(参见例如Hse等人,1997, J.Biol.Chem.272:9062-9070)。

[0154] 除了宿主细胞的选择外,在抗体的重组生产过程中影响糖基化的因素还包括生长方式、培养基配方、培养密度、氧合、pH、纯化方案等。已提出改变特定宿主生物中的糖基化模式的各种方法,包括引入或过表达参与寡糖生产的某些酶(美国专利号5,047,335;5,510,261和5.278,299)。糖基化或某些类型的糖基化可以例如使用内切糖苷酶H(Endo H)、N糖苷酶F、内切糖苷酶F1、内切糖苷酶F2、内切糖苷酶F3从糖蛋白中酶促去除。此外,重组宿主细胞可以进行遗传改造以在加工某些类型的多糖方面产生缺陷。这些和类似技术是本领域众所周知的。

[0155] 其他修饰方法包括使用本领域已知的偶联技术,包括但不限于酶促手段、氧化置换(oxidative substitution)和螯合。修饰可以例如用于标记物的附着以用于免疫测定法。经修饰的多肽可以使用本领域建立的方法来制备,并且可以使用本领域已知的标准测定法进行筛选,其中某些在下文和实施例中描述。

[0156] 本发明的抗体或多肽可以与试剂例如治疗剂和标记物缀合(例如,连接)。治疗剂的例子是放射性结构部分、细胞毒素、或化学治疗分子。

[0157] 本发明的抗体(或多肽)可以与标记物连接,所述标记物例如荧光分子、放射性分子、酶、或本领域已知的任何其他标记物。如本文所使用的,术语“标记物”指可以检测的任何分子。在某一实施方案中,抗体可以通过掺入放射性标记的氨基酸进行标记。在某一实施方案中,可以通过标记的抗生物素蛋白(例如,包含可以通过光学或比色法进行检测的荧光标记或酶促活性的链霉抗生物素蛋白)进行检测的生物素部分可以与抗体附着。在某些实施方案中,标记物可以掺入另一种试剂内或与另一种试剂附着,所述另一种试剂又可以与目的抗体结合。例如,标记物可以掺入抗体内或与抗体附着,所述抗体又可以特异性结合目的抗体。在某些实施方案中,标签或标记物也可以是治疗性的。标记多肽和糖蛋白的各种方法是本领域已知的且可以使用。某些一般种类的标记物包括但不限于,酶、荧光、化学发光和放射性标记物。用于多肽的标记物的例子包括但不限于:放射性同位素或放射性核苷酸(例如, ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I),荧光标记物(例如,异硫氰酸荧光素(FITC)、罗丹明、镧系元素磷光体、藻红蛋白(PE)),酶标记物(例如,辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、醇脱氢酶、苹果酸脱氢酶、青霉素酶、萤光素酶),化学发光物,生物素基,由第二报道分子(例如,亮氨酸拉链对序列、二级抗体的识别位点、金属结合结构域、表位标签)识别的预定的多肽表位。在某些实施方案中,标记物与各种长度的间隔臂连接以减少潜在的空间位阻。

[0158] 本发明还提供了包含本文描述的抗体或多肽、和药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。药学上可接受的赋形剂是本领域已知的,并且是有利于药理学有效物质的施用的相对惰性物质。例如,赋形剂可以造成形状或稠度,或充当稀释剂。合适的赋形剂包括但不限于稳定剂、湿润剂和乳化剂、用于改变摩尔渗透压浓度的盐、囊化剂、缓冲剂和皮肤穿透促进剂。用于肠胃外和非肠胃外药物递送的赋形剂以及制剂在Remington, The Science and Practice of Pharmacy第20版, Mack Publishing(2000)中阐述。

[0159] 在某些实施方案中,本发明提供了用于在本文描述的任何方法中使用的组合物

(本文描述的),无论是在作为药物使用的情况中和/或用于制备药物的用途中。

[0160] 多核苷酸、载体和宿主细胞

[0161] 本发明还提供了包含编码本文描述的任何单克隆抗体和多肽的核苷酸序列的多核苷酸。在某些实施方案中,多肽包含轻链和重链可变区的序列。

[0162] 在某些实施方案中,多核苷酸包含编码SEQ ID NO:1中所示的重链可变区的核酸序列,和/或编码SEQ ID NO:2中所示的轻链可变区的核酸序列。在某些实施方案中,多核苷酸包含编码重链可变区的核酸序列和/或编码轻链可变区的核酸序列,所述重链可变区包含来自SEQ ID NO:1的1、2或3个CDRs,所述轻链可变区包含来自SEQ ID NO:2的1、2或3个CDRs。在某些实施方案中,多核苷酸包含SEQ ID NO:9中所示的核酸序列,和/或SEQ ID NO:10中所示的核酸序列。

[0163] 在某些实施方案中,多核苷酸包含编码SEQ ID NO:3中所示的重链可变区的核酸序列,和/或编码SEQ ID NO:4中所示的轻链可变区的核酸序列。在某些实施方案中,多核苷酸包含编码重链可变区的核酸序列和/或编码轻链可变区的核酸序列,所述重链可变区包含来自SEQ ID NO:3的1、2或3个CDRs,所述轻链可变区包含来自SEQ ID NO:4的1、2或3个CDRs。在某些实施方案中,多核苷酸包含SEQ ID NO:11中所示的核酸序列,和/或SEQ ID NO:12中所示的核酸序列。

[0164] 在某些实施方案中,多核苷酸包含编码SEQ ID NO:5中所示的重链可变区的核酸序列,和/或编码SEQ ID NO:6中所示的轻链可变区的核酸序列。在某些实施方案中,多核苷酸包含编码重链可变区的核酸序列和/或编码轻链可变区的核酸序列,所述重链可变区包含来自SEQ ID NO:5的1、2或3个CDRs,所述轻链可变区包含来自SEQ ID NO:6的1、2或3个CDRs。在某些实施方案中,多核苷酸包含SEQ ID NO:13中所示的核酸序列,和/或SEQ ID NO:14中所示的核酸序列。

[0165] 在某些实施方案中,多核苷酸包含编码SEQ ID NO:7中所示的重链可变区的核酸序列,和/或编码SEQ ID NO:8中所示的轻链可变区的核酸序列。在某些实施方案中,多核苷酸包含SEQ ID NO:15中所示的核酸序列,和/或SEQ ID NO:16中所示的核酸序列。

[0166] 本领域普通技术人员应当理解,作为遗传密码简并的结果,存在编码如本文所描述的多肽的许多核苷酸序列。这些多核苷酸中的一些与任何天然基因的核苷酸序列都具有极小的同源性。因此,由于密码子使用的差异而不同的多核苷酸是本发明特别考虑的。此外,包含本文提供的多核苷酸序列的基因的等位基因也在本发明的范围内。等位基因是作为一个或多个核苷酸的突变例如缺失、添加和/或置换的结果而改变的内源基因。所得到的mRNA和蛋白质可以但无需具有改变的结构或功能。等位基因可以使用标准技术(例如杂交、扩增和/或数据库序列比较)进行鉴定。

[0167] 本发明的多核苷酸可以使用化学合成、重组方法或PCR来获得。化学多核苷酸合成的方法是本领域众所周知的,并且无需在本文中详细描述。本领域技术人员可以使用本文提供的序列和商业DNA合成仪生产所需DNA序列。

[0168] 如本文进一步讨论的,对于使用重组方法制备多核苷酸,可以将包含所需序列的多核苷酸插入合适的载体内,而载体可以引入合适的宿主细胞内进行复制和扩增。多核苷酸可以通过本领域已知的任何方法插入宿主细胞内。细胞通过直接摄取、胞吞作用、转染、F交配或电穿孔引入外源多核苷酸而转化。引入后,外源多核苷酸可以以非整合载体(例如质

粒)形式维持在细胞内或整合到宿主细胞基因组内。如此扩增的多核苷酸可以通过本领域众所周知的方法从宿主细胞中分离。参见例如, Sambrook等人(1989)。

[0169] 可替代地, PCR允许DNA序列的复制。PCR技术是本领域众所周知的, 并且在美国专利号4,683,195、4,800,159、4,754,065和4,683,202以及PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis等人编辑, Birkauser Press, Boston(1994)中得到描述。

[0170] 本发明还提供了包含编码本文描述的任何多肽(包括抗体)的核酸序列的载体(例如, 克隆载体、表达载体)。合适的克隆载体可以根据标准技术进行构建, 或可以选自本领域可得的大量克隆载体。尽管所选择的克隆载体可以依预期使用的宿主细胞而变, 但有用的克隆载体一般具有自我复制的能力, 可以具有特定限制性内切酶的单一靶位点, 和/或可以携带能用于选择包含载体的克隆的标志基因。合适的例子包括质粒和细菌病毒, 例如pUC18、pUC19、Bluescript(例如pBS SK+)及其衍生物、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、噬菌体DNAs, 以及穿梭载体pSA3和pAT28。这些和许多其他克隆载体可从商业厂商例如BioRad、Stratagene和Invitrogen获得。

[0171] 表达载体一般是包含本发明多核苷酸的可复制的多核苷酸构建体。表达载体可以在宿主细胞中作为附加体或作为染色体DNA的一个组成部分进行复制。合适的表达载体包括但不限于质粒, 病毒载体, 包括腺病毒、腺伴随病毒、逆转录病毒, 粘粒和PCT公开号W087/04462中公开的表达载体。载体组分一般可以包括但不限于, 下述中的一种或多种: 信号序列; 复制起点; 一种或多种标志基因; 合适的转录控制元件(例如启动子、增强子和终止子)。对于表达(即翻译), 通常还需要一种或多种翻译控制元件, 例如核糖体结合位点、翻译起始位点和终止密码子。

[0172] 包含目的多核苷酸的载体可以通过许多合适的方法中的任何一种引入宿主细胞内, 包括电穿孔, 使用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖或其他物质的转染; 微粒轰击; 脂转染; 和感染(例如, 当载体是感染剂例如痘苗病毒时)。引入载体或多核苷酸的选择通常依赖宿主细胞的特征。

[0173] 本发明还提供了包含本文描述的任何多核苷酸或载体的宿主细胞。能够过表达异源DNAs的任何宿主细胞均可以用于分离编码目的抗体、多肽或蛋白质的基因的用途。哺乳动物宿主细胞的非限制性例子包括但不限于COS、HeLa和CHO细胞。还参见PCT公开号W087/04462。合适的非哺乳动物宿主细胞包括原核生物(例如, 大肠杆菌(*E. coli*)或枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*))和酵母(例如酿酒酵母、粟酒裂殖酵母(*S. pombe*); 或乳酸克鲁维酵母(*K. lactis*))。

[0174] 诊断用途

[0175] 本发明提供了使用本发明的抗体、多肽和多核苷酸用于检测、诊断和监控与表位表达(相对于正常样品增加或减少, 和/或不合适的表达, 例如在通常缺乏表位表达的组织或/或细胞中表达的存在)相关的疾病、病症或病状的方法。

[0176] 在某些实施方案中, 该方法包括在得自疑似患有癌症的受试者的样品中检测表位表达, 所述癌症例如结肠直肠、胰腺、胃和肺的癌。优选地, 检测方法包括使样品与本发明的抗体、多肽或多核苷酸接触, 和测定与对照或比较样品相比结合水平是否不同。该方法还可用于确定本文描述的抗体或多肽是否是患者的合适治疗剂。

[0177] 如本文所使用的, 术语“样品”或“生物样品”指完整生物或其组织、细胞或组分(例

如,体液,包括但不限于血液、粘液、淋巴液、滑液、脑脊髓液、唾液、羊膜液、羊膜脐带血、尿液、阴道液和精液)的子集。“样品”或“生物样品”还指由完整生物或其组织、细胞或组分的子集、或其级分或部分(包括但不限于例如,血浆,血清,脊髓液,淋巴液,皮肤外部、呼吸道、肠道和泌尿生殖道,泪,唾液,乳,血细胞,肿瘤,器官)制备的匀浆物、裂解物或提取物。最通常地,样品已从动物中取出,但术语“样品”或“生物样品”还可以指在体内分析的细胞或组织,即无需从动物中取出。一般地,“样品”或“生物样品”将包含来自动物的细胞,但该术语还可以指可以用于测量癌症相关多核苷酸或多肽水平的非细胞生物材料,例如血液、唾液或尿液的非细胞级分。“样品”或“生物样品”进一步指培养基,例如生物已在其中进行繁殖的营养肉汤或凝胶,其包含细胞组分,例如蛋白质或核酸分子。

[0178] 在一个实施方案中,使细胞或细胞/组织裂解物与抗体接触,并且测定抗体和细胞之间的结合。当与相同组织类型的对照细胞比较,测试细胞显示结合活性时,这可以指示测试细胞是癌性的。在某些实施方案中,测试细胞来自人组织。

[0179] 可以使用本领域已知用于检测特异性抗体-抗原结合的各种方法。可以根据本发明进行的示例性免疫测定法包括荧光偏振免疫测定法(FPIA)、荧光免疫测定法(FIA)、酶免疫测定法(EIA)、比浊抑制免疫测定法(NIA)、酶联免疫吸附测定法(ELISA)和放射免疫测定法(RIA)。指示剂结构部分或标记物基团可以与目的抗体附着,并且可以经选择以便符合方法的各种应用的需要,这通常取决于试验设备和相容的免疫测定法的可得性。合适的标记物包括但不限于放射性核酸(例如, ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 或 ^{32}P),酶(例如,碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、萤光素酶或 β -半乳糖苷酶),荧光部分或蛋白质(例如,荧光素、罗丹明、藻红蛋白、GFP或BFP),或发光部分(例如,由Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA供应的Qdot™纳米颗粒)。用于执行上文所述的各种免疫测定法的一般技术是本领域普通技术人员已知的。

[0180] 为了诊断目的,多肽(包括抗体)可以用可检测部分进行标记,包括但不限于放射性同位素、荧光标记物、和本领域已知的各种酶-底物标记物。使标记物与抗体缀合的方法是本领域已知的。

[0181] 在某些实施方案中,多肽(包括本发明的抗体)无需是标记的,并且它的存在可以使用与本发明的抗体结合的标记抗体进行检测。

[0182] 本发明的抗体可以在任何已知的测定方法中使用,例如竞争结合测定法、直接和间接夹心测定法、和免疫沉淀测定法。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, 第147-158页(CRC Press, Inc. 1987)。

[0183] 抗体和多肽还可以用于体内诊断测定法,例如体内成像。一般地,抗体或多肽用放射性核素(例如 ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^{125}I 或 ^3H)进行标记,从而使得目的细胞或组织可以使用免疫闪烁成像法进行定位。

[0184] 抗体还可以使用本领域众所周知的技术在病理学中用作着色试剂。

[0185] 治疗用途

[0186] 本发明抗体的一个显著的和令人惊讶的特征涉及其有效诱导非造血系统癌细胞死亡的能力。因此,本发明提供了本发明的抗体和多肽在治疗癌症中的治疗用途,所述癌症例如结肠直肠癌、肺癌、胰腺癌、胃癌、乳腺癌、肝细胞癌和甲状腺癌。可以治疗任何癌症,包括结肠癌、结肠直肠癌、肺癌、乳腺癌、脑瘤、恶性黑素瘤、肾细胞癌、膀胱癌、淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、胃癌、胰腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、食管癌、肝癌、头与颈鳞

状细胞癌、皮肤癌、泌尿道癌、前列腺癌、绒毛膜癌、咽癌、喉癌、泡膜细胞增生症、男性细胞瘤、子宫内膜增生、子宫内膜异位症、胚胎瘤、纤维肉瘤、卡波西肉瘤、血管瘤、海绵状血管瘤、成血管细胞瘤、成视网膜细胞瘤、星形细胞瘤、神经纤维瘤、少突神经胶质瘤、成神经管细胞瘤、神经节神经母细胞瘤、神经胶质瘤、横纹肌肉瘤、错构胚细胞瘤、骨源性肉瘤、平滑肌肉瘤、甲状腺肉瘤和肾胚细胞瘤,条件是癌细胞表达由本文描述的抗体识别的表位。该方法可以进一步包括检测本文描述的抗体或多肽和待治疗的个体中的肿瘤或癌细胞之间的结合的步骤。

[0187] 一般地,将包含抗体或多肽的组合物的有效量施用于需要治疗的受试者,从而抑制癌细胞的生长和/或诱导癌细胞的死亡。优选地组合物用药学上可接受的载体进行配制。

[0188] 在一个实施方案中,组合物配制用于通过腹膜内、静脉内、皮下和肌内注射,以及其他施用形式,例如口、粘膜、经由吸入、舌下等施用。

[0189] 在另一个实施方案中,本发明还考虑包含与其他分子缀合的本发明抗体或多肽的组合物的施用,所述其他分子例如可检测标记物、或治疗性或细胞毒性剂。这些试剂可以包括但不限于放射性同位素、毒素、类毒素、炎性因子、酶、反义分子、肽、细胞因子或化学治疗剂。使抗体与此类分子缀合的方法是本领域技术人员一般已知的。参见例如PCT公开W092/08495;W091/14438;W089/12624;美国专利号5,314,995;和EP396,387;所述专利的公开内容整体引入本文作为参考。

[0190] 在一个实施方案中,组合物包含与细胞毒性剂缀合的抗体或多肽。细胞毒性剂可以包括对细胞有害的任何试剂。可以与抗体或片段缀合的细胞毒性剂的优选类别可以包括但不限于紫杉醇(paclitaxol)、细胞松弛素B(cytochalasin B)、短杆菌肽D(gramicidin D)、溴化乙啶、依米丁(emetine)、丝裂霉素、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、秋水仙碱(colchicin)、多柔比星(doxorubicin)、道诺红霉素(daunorubicin)、二羟基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光辉霉素(mithramycin)、放线菌素D(actinomycin D)、1-去氢睾酮酮、糖皮质激素、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)、和嘌呤霉素及其类似物或同系物。

[0191] 治疗所需的剂量依赖施用途径的选择,制剂性质,受试者疾病的性质,受试者的大小、重量、表面积、年龄和性别;施用的其他药物,和主治医师的判断。合适的剂量在0.01—1000.0mg/kg的范围内。

[0192] 一般地,可以使用任何下述剂量:施用至少约50mg/kg体重;至少约10mg/kg体重;至少约3mg/kg体重;至少约1mg/kg体重;至少约750 μ g/kg体重;至少约500 μ g/kg体重;至少约250 μ g/kg体重;至少约100 μ g/kg体重;至少约50 μ g/kg体重;至少约10 μ g/kg体重;至少约1 μ g/kg体重或更少的剂量。对于经过数天或更长时间的重复施用,依赖病状,治疗持续直至疾病症状出现期望的抑制。示例性给药方案包括施用约6mg/kg抗体的每周剂量。然而,依赖于医师所希望达到的药代动力学衰减模式,其他给药方案可能是有用的。经验性考虑例如半衰期一般将有助于剂量的确定。这种疗法的进程通过常规技术和测定法可以容易地监控。

[0193] 在某些受试者中,可能需要超过一次剂量。施用频率可以在治疗过程中进行确定

和调整。例如,基于待治疗的癌症的类型和阶段、药剂施用是用于预防还是治疗目的、先前疗法,患者的临床病史和对药剂的应答,以及主治医师的判断,可以确定或调整施用频率。一般地临床医生将施用治疗性抗体(例如,人源化5F1),直至达到合适剂量以实现期望结果。在某些情况下,抗体的持续缓释制剂可能是合适的。用于达到持续释放的各种制剂和装置是本领域已知的。

[0194] 在一个实施方案中,抗体或多肽的剂量可以在已给予一次或多次施用的受试者中按经验确定。可以给予受试者递增剂量的抗体或多肽。为了评估抗体或多肽的功效,可以监控疾病症状的标志例如CD43或CEA。体内功效还可以通过评估肿瘤负荷或体积、疾病进展时间(TDP)和/或测定应答率(RR)进行测量。

[0195] 依照本发明方法的抗体或多肽的施用可以是连续的或间断的,这依赖于例如受体的生理条件,施用的目的是预防还是治疗性的,和有经验的医师已知的其他因素。抗体或多肽的施用可以在预选的时间段基本上连续或可以是一系列间隔剂量。

[0196] 其他制剂包括本领域已知的合适的递送形式,包括但不限于载体例如脂质体。参见例如,Mahato等人(1997)Pharm. Res. 14:853-859。脂质体制剂包括但不限于细胞转染剂、多层脂质体和单层脂质体。

[0197] 在另一个实施方案中,组合物可以包含一种或多种抗癌剂,本文描述的一种或多种抗体,或连同与不同抗原结合的抗体或多肽。此类组合物可以包含至少1种、至少2种、至少3种、至少4种、至少5种不同抗体。抗体和其他抗癌剂可以在相同制剂中(例如,在混合物中,如在本领域中通常指出的),或在分开制剂中但同时或顺次施用,这在治疗更广泛范围的个体群体时特别有用。

[0198] 编码本发明的任何抗体或多肽(例如抗体5F1或人源化形式)的多核苷酸也可以用于在所需细胞中递送和表达本发明的任何抗体或多肽。显而易见的是表达载体可以用于指导抗体或多肽的表达。表达载体可以通过本领域已知的任何方式施用,例如腹膜内、静脉内、肌内、皮下、鞘内、心室内、经口、肠内、肠胃外、鼻内、真皮、舌下或通过吸入。例如,表达载体的施用包括局部或全身施用,包括注射、口服、粒子枪或插管施用,和局部施用。本领域技术人员熟悉表达载体的施用以获得外源蛋白质在体内的表达。参见例如,美国专利号6,436,908;6,413,942;和6,376,471。

[0199] 还可以使用包含编码本发明任何抗体或多肽的多核苷酸的治疗组合物的靶向递送。受体介导的DNA递送技术在例如下述参考文献中得到描述:Findeis等人,Trends Biotechnol.(1993)11:202;Chiou等人,Gene Therapeutics:Methods And Applications Of Direct Gene Transfer(J.A.Wolff,编辑)(1994);Wu等人,J.Biol.Chem.(1988)263:621;Wu等人,J.Biol.Chem.(1994)269:542;Zenke等人(1990),Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:3655;Wu等人(1991),J.Biol.Chem.266:338。在基因治疗方案中包含多核苷酸的治疗组合物可以以约100ng至约200mg DNA的范围施用,用于局部施用。在基因治疗方案期间还可以使用约500ng-约50mg、约1 μ g-约2mg、约5 μ g-约500 μ g、和约20 μ g-约100 μ g DNA的浓度范围。

[0200] 本发明的治疗性多核苷酸和多肽可以使用基因递送载体进行递送。基因递送载体可以是病毒或非病毒来源的(一般参见,Jolly(1994),Cancer Gene Therapy1:51;Kimura(1994),Human Gene Therapy5:845;Connelly(1985),Human Gene Therapy1:185;和

Kaplitt(1994), Nature Genetics 6:148)。此类编码序列的表达可以使用内源哺乳动物或异源启动子进行诱导。编码序列的表达可以是组成性或受调节的。

[0201] 用于在所需细胞中递送所需多核苷酸和表达的基于病毒的载体是本领域众所周知的。示例性基于病毒的载体包括但不限于, 重组逆转录病毒, 例如, PCT公开号W090/07936; W094/03622; W093/25698; W093/25234; W093/11230; W093/10218; W091/02805; 美国专利号5,219,740; 4,777,127; GB专利号2,200,651; 和EP专利号0345242; 基于甲病毒的载体, 例如, 辛德毕斯病毒载体, 塞姆利基森林病毒(ATCC VR-67; ATCC VR-1247), 罗斯河病毒(ATCC VR-373; ATCC VR-1246)和委内瑞拉马脑炎病毒(ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR1249; ATCC VR-532), 和腺伴随病毒(AAV)载体, 例如, PCT公开号W094/12649, W093/03769; W093/19191; W094/28938; W095/11984和W095/00655。还可以施用如Curiel(1992), Hum. Gene Ther. 3:147中所述的与处死的腺病毒连接的DNA。

[0202] 还可以使用非病毒递送载体和方法, 包括但不限于与处死的腺病毒连接或未连接的单独聚阳离子浓缩的DNA(参见例如, Curiel(1992), Hum. Gene Ther. 3:147); 配体连接的DNA(参见例如, Wu(1989), J. Biol. Chem. 264:16985); 真核细胞递送载体细胞(参见例如, 美国专利号5,814,482; PCT公开号W095/07994; W096/17072; W095/30763; 和W097/42338)以及核电荷中和或与细胞膜融合。

[0203] 还可以使用裸DNA。示例性裸DNA引入方法在PCT公开号W090/11092和美国专利号5,580,859中得到描述。可以充当基因递送载体的脂质体在美国专利号5,422,120; PCT公开号W095/13796; W094/23697; W091/14445; 和EP专利号0524968中得到描述。另外的方法在Philip(1994), Mol. Cell Biol. 14:2411和Woffendin(1994), Proc. Natl. Acad. Sci., 91:1581中得到描述。

[0204] 包含本发明的抗体的组合物可以与一种或多种其他治疗剂顺次或同时施用, 所述其他治疗剂例如化学治疗剂(例如, 5-FU、5-FU/MTX、5-FU/甲酰四氢叶酸(leucovorin)、左旋咪唑(levamisole)、依立替康(irinotecan)、奥沙利铂(oxaliplatin)、卡培他滨(capecitabine)或尿嘧啶/替加氟(tegafur)), 免疫佐剂, 生长抑制剂, 细胞毒性剂和细胞因子等。抗体和治疗剂的量依赖使用何种类型的药物、待治疗的病理状态、以及施用的时间安排和途径, 但一般将小于各自单独施用时。

[0205] 包含本文描述的抗体的组合物施用后, 组合物的功效可以通过本领域普通技术人员众所周知的各种方法在体外和体内进行评估。用于测试候选组合物的抗癌活性的各种动物模型是众所周知的。这些包括异种移植到无胸腺裸鼠或scid/scid小鼠内的人肿瘤, 或遗传鼠类肿瘤模型例如p53敲除小鼠。这些动物模型的体内性质使得它们特别可以预示在人患者中的应答。此类模型可以通过使用标准技术, 例如皮下注射、尾静脉注射、脾植入、腹膜内植入和在肾小囊下植入等, 将细胞引入同基因小鼠内来产生。

[0206] 试剂盒

[0207] 本发明还提供了用于在本发明方法中使用的试剂盒。本发明的试剂盒包括一个或多个容器和用于依照本文描述的本发明的任何方法使用的说明书, 所述容器包含本文描述的纯化抗体或多肽。在某些实施方案中, 这些说明书包含根据本文描述的任何方法施用抗体以治疗非造血系统癌症例如结肠直肠癌的描述。试剂盒可以进一步包含基于鉴定个体是否患有疾病和疾病的阶段、或表位是否在个体的癌细胞上表达, 选择适合于治疗的个体的

描述。

[0208] 在某些实施方案中,用于检测样品中的癌细胞的试剂盒包含本文描述的抗体或多肽,和用于检测抗体或多肽与样品中的细胞的结合的试剂。

[0209] 涉及抗体或多肽治疗癌症的用途的说明书一般包括有关剂量、给药方案和施用途用于预期治疗的信息。容器可以是单位剂量、大包装(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。在本发明的试剂盒中提供的说明书一般是在标签或包装插页上的书面说明书(例如包括在试剂盒中的纸页),但机读说明书(例如在磁盘或光盘上携带的说明书)也是可应用的。

[0210] 标签或包装插页说明组合物用于治疗本文描述的癌症。可以提供说明书用于实践本文描述的任何方法。

[0211] 本发明的试剂盒可以在合适的包装中。合适的包装包括但不限于,小瓶、瓶、罐、软包装(例如密封的Mylar或塑料袋)等。还可以考虑用于与特定装置组合使用的包装,所述装置例如吸入器、鼻施用装置(例如,喷雾器)或输注装置例如微型泵。试剂盒可以具有无菌获取口(例如容器可以是具有可被皮下注射针头穿透的塞子的静脉溶液袋或小瓶)。容器也可以具有无菌获取口(例如容器可以是具有可被皮下注射针头穿透的塞子的静脉溶液袋或小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是本文描述的抗体。容器可以进一步包含第二药学活性剂。

[0212] 试剂盒可以任选提供另外组分例如缓冲剂和解释信息。通常,试剂盒包含容器和在容器上或伴随容器的标签或包装插页。

实施例

[0213] 提供下述实施例以举例说明而不是限制本发明。

[0214] 实施例1:与癌细胞上表达的CD43特异性结合的单克隆抗体的产生和表征

[0215] 单克隆抗体的产生

[0216] 人结肠直肠癌癌细胞系COL0205(ATCC CCL-222)购自Food Industry Research and Development Institute(CCRC60054),Hsin-chu,Taiwan,且在含10%FBS(Hyclone)、100单位/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素(GIBCO BRL)的RPMI1640培养基(GIBCO BRL)中于37 $^{\circ}$ C在5%CO₂的增湿空气中生长。雌性8周龄Ba1b/c小鼠用在500 μ l PBS中的2x10⁷COL0205细胞或在CFA中的10微克部分纯化的蛋白质每2周一次免疫3次,且最后给予在200 μ l PBS中2x10⁶COL0205细胞或10微克部分纯化的蛋白质进行加强。最后的加强后5天,使脾细胞与X63骨髓瘤细胞融合。杂交瘤用补充有10%FBS(Hyclone)和HAT(Hybri-Max®,Sigma H0262,终浓度为100 μ M次黄嘌呤、0.4 μ M氨基蝶呤、16 μ M胸苷)的DMEM进行选择。已产生分泌单克隆抗体5F1、51-41和138-10的3种杂交瘤细胞系m5F1、m51-41、m138-10。

[0217] 关于单克隆抗体5F1的靶抗原的鉴定和表征

[0218] 来自结肠直肠癌组织或COL0205细胞的膜蛋白质用包含蛋白酶抑制剂(Complete tabs;Roche Molecular Biochemicals)的提取缓冲液(50mM Tris-HCl,pH7.4,150mM NaCl,1%Nonidet P-40)进行分离。膜蛋白质裂解物首先在包含固定在蛋白G琼脂糖(Amersham Pharmacia Biotech Inc.,N.J.,U.S.A)上的未免疫小鼠IgG的1-m1柱上进行预清除,将流出部分直接加到与蛋白G琼脂糖偶联的5F1的1-m1柱上。洗涤柱且洗脱5F1的靶蛋白。在8%SDS-PAGE上分离后,分离的蛋白质的纯度通过银染进行观察,并且还通过蛋白质

印迹进行鉴定。分离的蛋白质还用于免疫小鼠以产生其他5F1样抗体例如138-10或51-41。

[0219] 对于免疫沉淀实验,使膜蛋白质与5F1或抗CD43抗体(AF2038,R&D System,Inc.)进行温育,随后与蛋白G琼脂糖(Amersham Pharmacia Biotech Inc.,N.J.,U.S.A)进行温育。沉淀物在8%SDS-PAGE上进行电泳且实施蛋白质(或免疫)印迹分析。

[0220] 使蛋白质与等体积的样品缓冲液(50mM Tris-HCl,pH6.8,100mM DTT,2%SDS,0.1%溴酚蓝,10%甘油)混合,通过8%SDS-PAGE分开,然后转移至硝酸纤维素膜(Hybond-C Super,Amersham)。硝酸纤维素膜随后用在PBS中的5%脱脂乳进行封闭,且与5F1或抗CD43抗体(AF2038)进行温育。印迹然后用辣根过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠免疫球蛋白(Jackson ImmunoResearch Laboratories,West Grove,Pa.)进行处理,并且用化学发光试剂(ECL,Amersham,UK)进行显色。

[0221] 为了测试5F1是否的确识别CD43,使用商购可得的抗CD43mAb(AF2038,R&D system,Inc.),以通过蛋白质印迹分析证实来自COLO205裂解物的5F1亲和纯化的蛋白质的身份。来自5F1结合阴性的细胞系COLO320的裂解物用作对照。结果(图1)显示抗CD43(AF2038)和5F1抗体均与由5F1免疫亲和柱捕获的蛋白质反应,这强烈暗示5F1的确识别CD43。

[0222] 单克隆抗体5F1特异性识别在非造血系统癌细胞的细胞表面上表达的CD43。

[0223] 将 2×10^5 COLO205细胞种植在v型底96孔板的每个孔中,并且于4°C与0.33-1 μ g/ml的不同浓度的5F1抗体温育1小时。细胞用200 μ l FACS缓冲液(1x PBS+1%FBS)洗涤2次,用100 μ l 1 μ g/ml(在FACS缓冲液中)山羊抗小鼠IgG-PE(Southern Biotech.)进行染色,然后于4°C温育30分钟。细胞用FACS缓冲液洗涤3次且通过流式细胞术(BD LSR,BD Life Sciences)进行分析。

[0224] 来自流式细胞术的抗体结合结果显示于下表1中。单克隆抗体例如5F1(同种型:IgG3)、或138-10(同种型IgM)、或51-41(同种型IgM)识别在COLO205结肠直肠癌细胞和NCI-N87胃癌细胞而非外周T细胞和Jurkat(类淋巴母细胞性白血病细胞系;ATCC TIB-152)的胞质膜上表达的表面CD43。参见下表1。流式细胞术数据(图2A和图2B)也显示5F1与其他类型的癌细胞结合,例如结肠直肠癌细胞(DLD-1)、和胃癌细胞(NCI-N87),但不与下述细胞结合:正常内皮细胞(HUVEC)、正常肺细胞(MRC-5)、正常乳腺上皮细胞(MCF-10A)、正常结肠直肠细胞(CCD841-CoN)、激活的T淋巴细胞(激活7天)、和正常外周血单核细胞(PBMC)。

[0225] 表1显示抗CD43抗体例如5F1、138-10或51-41与结肠直肠癌、胃癌细胞、人外周T细胞、和Jurkat(类淋巴母细胞性白血病细胞系)的抗原结合性质。

结合%/Abs	外周T细胞	Jurkat (白血病细胞)	COLO 205	NCI-N87 (胃癌细胞)
5F1	<10%	<10%	>80%	>80%
138-10	<10%	<10%	>80%	>80%
51-41	<10%	<10%	>80%	>80%
抗CD162	>80%	>80%	<10%	未检测
MEM-59 (抗-CD43; Biovendor Candler, NC)	>80%	未检测	>70%	未检测
同种型对照Ab	<10%	<10%	<10%	<10%

[0226] 为了检测COLO205细胞和人结肠直肠癌组织中5F1的靶蛋白的表达,使用常规免疫组织化学法。简言之,将细胞或组织固定以用于由1 μ g/ml 5F1免疫染色,与生物素标记的抗小鼠IgG温育,然后与抗生物素蛋白-生物素过氧化物酶复合物(Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, U.S.A.)温育,且用色素原3,3'-二氨基联苯胺四氯化物进行染色。免疫组织化学研究显示来自具有结肠直肠癌的患者的52.5%组织(31/59)为5F1染色阳性。

[0227] 实施例2. 与癌细胞上表达的CD43特异性结合的抗体的凋亡活性

[0228] 通过ELISA测定法检测COLO205细胞中由5F1诱导的凋亡

[0229] 为了评估由5F1诱导的细胞死亡类型,使结肠直肠癌细胞在培养板上生长,且与或不与5F1一起温育。使用细胞死亡检测ELISAPLUS试剂盒(Roche, 目录#1774425),通过抗体介导的捕获以及对细胞质单核小体和寡核小体相关的组蛋白-DNA复合物的检测,确定核小体间(凋亡)DNA断裂的水平。ELISA测定法根据制造商的说明书来进行。简言之,将1x10⁴ COLO205细胞种在96孔板的每个孔中,且与浓度10 μ g/ml的5F1或9E10(抗myc抗体)或培养基对照温育。于37 $^{\circ}$ C温育6、24或48小时后,细胞进行洗涤且与200 μ l裂解缓冲液温育30分钟。沉淀细胞核(200x g, 10分钟)后,将包含断裂DNA的20 μ l上清液(细胞质级分)转移至链霉抗生物素蛋白包被的微量滴定板,所述微量滴定板已与生物素化的单克隆抗组蛋白抗体温育。与抗组蛋白抗体结合的核小体的断裂DNA的量通过辣根过氧化物酶缀合的单克隆抗DNA抗体,使用ABTS(2,2-连氨基-双[3-乙基苯并二氢噻唑啉磺酸-6-二铵盐])作为底物进行评估。最后,与过氧化物酶底物温育10-20分钟后,用微板阅读仪(Molecular Devices, SPECTRA max M2)测定在405nm处的吸光度。来自仅包含裂解缓冲液和底物的孔的值作为背景扣除。释放到细胞质内的单和寡核小体的比富集数据使用以下公式由吸光度值进行分析:

[0230] 富集因子(E.F.)=样品(濒死/死亡细胞)样品的mU/培养基对照(无mAb处理的细胞)的mU

[0231] mU=吸光度[10⁻³]

[0232] 图3中所示的数据指出在温育24小时后5F1诱导核小体在COLO205细胞的细胞质中富集。与培养基对照比较,在5F1处理的细胞质中检测到的断裂DNA增加超过4倍。此富集在

用对照抗体9E10(抗myc抗体)或单独的培养基处理的细胞中未观察到,说明5F1单独引起癌细胞经历凋亡。

[0234] 使用膜联蛋白V和PI染色检测COL0205细胞中由5F1、138-10和51-41诱导的凋亡

[0235] 膜联蛋白V染色在凋亡过程的早期阶段时翻转朝向胞质膜的外侧的磷脂。因此,如FACS分析测定的,膜联蛋白V的染色指示细胞经历凋亡。将 1.2×10^5 COL0205细胞种植到96孔板的每个孔中,然后向细胞中加入在培养基中稀释的各种浓度(2-16 μ g/ml)的5F1或新鲜培养基(未处理的对照)。为了测试交联剂(CL)是否是5F1诱导肿瘤细胞凋亡所需的,将20 μ g/ml兔抗小鼠IgG(Jackson ImmunoResearch,目录#315-005-045)加入一组样品中用于比较。于37 $^{\circ}$ C温育6小时后,细胞在室温下用0.25 μ l在100 μ l膜联蛋白V结合缓冲液中的FITC缀合的膜联蛋白V(Strong Biotech Corporation)染色15分钟。细胞随后用碘化丙啶(PI,DNA染色染料)进行染色,且通过流式细胞术进行分析。

[0236] 流式细胞术数据显示在不存在交联剂的情况下,浓度4 μ g/ml或更高的5F1处理6小时引起显著数目的结肠直肠癌细胞经历凋亡,暗示5F1单独可以有效诱导COL0205细胞凋亡。

[0237] 还测试了由其他抗CD43抗体138-10和51-41诱导COL0205细胞凋亡的效果。下表2显示5F1、138-10或51-41诱导结肠直肠癌细胞中的凋亡。COL0205细胞与32微克/ml每种样品分别温育6小时,且用膜联蛋白V及随后用PI染色,随后为FACS分析。

[0238] 表2. COL0205细胞中由5F1、138-10和51-41诱导的凋亡

[0239]

	5F1	138-10	51-41	对照Ab(阴性对照)
%凋亡(膜联蛋白-V ⁺)	>40%	>30%	>30%	<15%

[0240] 上文结果显示用对表达CD43的癌特异的抗体处理可以诱导癌细胞凋亡。

[0241] 使用YO-PRO-1染色或膜联蛋白V和PI染色检测NCI-87细胞中由m5F1诱导的凋亡

[0242] 将 4×10^5 NCI-N87(人胃癌细胞系)细胞或 5×10^5 COL0205细胞种植在12孔培养板(Nunc目录#150628)中。过夜培养后,更换培养基,并且加入如图10中所示浓度的抗体或叠氮化物温育6小时。随后,细胞用胰蛋白酶消化,并且收集用于由YO-PRO-1(Invitrogen,目录#Y3603)染色,或由膜联蛋白-V-FITC和PI(Strong Biotech,凋亡检测试剂盒,目录#AVK250)双重染色。

[0243] 如图10A和10B中所示,如由YO-PRO-染色(A)和由膜联蛋白-V-FITC和PI双重染色(B)测量的,抗体m5F1诱导NCI-87和COL0205细胞凋亡。这些数据指出m5F1还可以诱导胃癌细胞凋亡。

[0244] 实施例3. 通过5F1抑制癌细胞生长

[0245] 5F1单独抑制癌细胞的生长

[0246] 种植结肠直肠癌细胞(COL0205)和正常内皮细胞(HUVEC),且与5F1或对照抗体9E10温育。还包括未处理的细胞作为阴性对照。如本文所述的,细胞存活使用MTT&WST-1测定法进行评估以检测增殖活性。

[0247] WST-1测定法基于四氮唑盐WST-1由细胞线粒体脱氢酶断裂成甲替。产生的甲替可以由分光光度计通过测量450nm处的吸光度进行定量。活细胞的增殖导致酶总体活性的增加;而酶活性的减少指示细胞生长抑制。因此,WST-1测定法用于评估肿瘤细胞在5F1处理

后的存活率。简言之,将在100 μ l培养基中的4x10³COL0205细胞种植在96孔培养板中,对于每种处理为5个复本。随后加入10 μ g/ml 5F1、对照抗体9E10(抗myc抗体)或新鲜培养基(未处理的对照)。0.5%叠氮化钠(NaN₃)的处理也包括在测定法中作为细胞毒性对照。于37 $^{\circ}$ C 3天的温育期后,向每个孔中加入20 μ l WST-1试剂(Roche,目录#1664807),随后混合物于37 $^{\circ}$ C温育30分钟。获得在450nm处的吸光度以反映处理细胞的存活率。关于COL0205细胞的WST-1测定法结果显示于图4中。数据指出COL0205细胞的生长被实质上抑制(图4),而HUVEC的生长(数据未显示)不受5F1处理的影响。与同种型对照抗体9E10处理的结肠直肠癌细胞比较,在抗体5F1处理的细胞中存活率百分比减少至小于50%。用0.5%叠氮化钠处理的阳性对照组显示19%的存活率。

[0248] 在另一种实验中,将细胞(2x10³)种植在96孔培养板的每个孔中,且与10微克/ml单克隆抗体5F1或对照抗体9E10(针对c-myc的抗体)温育。未处理的细胞用作阴性对照;用0.5%叠氮化钠处理的细胞用作阳性对照。于37 $^{\circ}$ C 2或3天的温育期后,向每个孔中加入10 μ l WST-1试剂,并且细胞进一步温育30分钟。随后如上所述进行WST-1细胞存活测定。显示于图5中的结果指出结肠直肠癌细胞例如COL0205的生长被抗体5F1实质上抑制,但正常结肠直肠癌细胞系(例如CCD841-CoN)不受影响。

[0249] MTT是用于测量细胞生存力和增殖的另一种基于四氮唑盐的方法。黄色四氮唑盐MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物)被代谢活性的细胞还原(部分地通过脱氢酶的作用),以产生还原当量例如NADH和NADPH。所得到的细胞内紫色甲替可以溶解且通过分光光度计测量方法进行定量。将细胞(5x10³)种植在96孔培养板的每个孔中,且与单克隆抗体5F1(浓度范围0-64 μ g/ml)或抗c-myc的对照抗体9E10(64 μ g/ml)温育。未处理的细胞用作阴性对照;用0.5%叠氮化钠处理的细胞用作阳性对照。于37 $^{\circ}$ C 72小时的温育期后,向每个孔中加入10 μ l MTT试剂,并且细胞进一步温育2-4小时直至紫色沉淀物可见。加入100 μ l检测试剂(DMSO)。记录样品在570nm处的吸光度。来自MTT测定法的数据证实5F1以剂量依赖方式(从0到64 μ g/ml)抑制COL0205的细胞增殖,ED₅₀(50%抑制的有效剂量)是8 μ g/ml(图6)。如同样在图6中所示,当使用64 μ g/ml 5F1时,发现细胞生长的显著抑制,而对照抗体9E10在相同浓度时不具有此类效应。

[0250] 5F1的体内抗肿瘤效应的评估

[0251] 5F1的体内抗肿瘤效应在肿瘤异种移植小鼠模型中进行分析。在第0天时将5x10⁶COL0205细胞皮下植入SCID小鼠的后侧腹区。细胞接种后1周,在一个实验中,小鼠通过腹膜内注射用500微克5F1或PBS进行处理。在另一个实验中,荷有已建立的肿瘤的4组小鼠(每组6只小鼠)每隔一天用25mg/kg 5-氟尿嘧啶加甲酰四氢叶酸(5FU/LV)进行静脉内处理,给予4个剂量,并连同或不连同各种剂量的5F1腹膜内注射每周2次。

[0252] 在一个实验中,通过在第0天时以1x10⁷细胞/小鼠皮下注射结肠直肠癌细胞COL0205,在SCID小鼠中植入肿瘤,然后在第0、3、5、7、10、12、14和17天时通过腹膜内注射单克隆抗体5F1(以500 μ g/剂量)或对照单克隆抗体9E10(抗c-myc产生的抗体)或PBS进行处理。在实验的每个组中使用15只小鼠。肿瘤大小通过宽度、宽度和长度(WxWxL)的乘积从第5天开始测量直至第24天且由mm³表示。如图7中所示,与对照抗体9E10和PBS(未处理的)比较,单克隆抗体5F1有效抑制肿瘤生长。

[0253] 为了察看5F1和化学药物如5FU/LV的组合效应,在肿瘤植入后7天,小鼠用25mg/

kg5FU/LV每隔一天进行iv注射,共4个剂量,且连同或不连同各种量的5F1抗体每周ip注射2次,共3周。肿瘤生长通过测径器每周2次测量肿瘤体积(mm^3)进行评估,并且肿瘤大小使用下式进行计算: $\pi/6 \times \text{较大直径} \times (\text{较小直径})^2$ (Kievit E, Cancer Research, 60:6649-55)。如图8中所示,与化学药物单独处理比较,5F1抗体和5FU/LV处理的组合显著抑制人结肠直肠癌肿瘤生长(图8)。

[0254] 实施例4. 三种新抗CD43抗体——5F1、138-10和51-41识别癌细胞上表达的相类表位。

[0255] 为了理解3种新抗CD43抗体(5F1、138-10和51-41)的结合性质,使用FACS分析。在各种量的非生物素化的抗体5F1、138-10和51-41的存在下,COL0205细胞(100,000)于4℃用1微克/ml生物素化的5F1染色1小时。洗涤后,细胞在相同条件下用链霉抗生物素蛋白-FITC进一步染色30分钟。细胞进行洗涤,且通过FACS进行分析。下表3中所示的数据是来自1个代表性实验的平均荧光强度。51-41和138-10抗体能够与生物素化的5F1竞争和COL0205细胞结合,暗示所有3种抗体结合在COL0205细胞的表面表达的相似结合位点上。

[0256] 表3. 5F1、138-10和51-41识别COL0205细胞上表达的相类表位。

竞争抗体浓度(微克/ml)	在未标记的5F1、51-41或138-10的存在下的平均荧光强度		
	5F1	51-41	138-10
200	9.78	75.66	199.7
66.7	60.28	165.62	297.03
22.2	21.67	325.23	395.53
7.4	129.04	606.20	640.42
2.46	733.36	783.81	702.79
0.82	1004	789.23	724.15
0.273	1027	901.36	683.08
0.09	825	869.61	717.19
0.03	888	860.13	704.33

[0257] 实施例5. 抗体5F1的表位确定

[0259] 为了进一步定义由单克隆抗体5F1识别的表位结构,使用此单克隆抗体测试其与不同多肽序列的特异反应性。96抗微量滴定板用抗体5F1以50 μl /孔以0.1M NaHCO_3 (pH8.6)包被缓冲液中10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度于4℃包被过夜。洗涤后,板用包含0.1M NaHCO_3 (pH8.6)、5mg/ml BSA、0.02% NaN_3 的封闭缓冲液(150 μl /孔)通过于4℃温育至少1小时进行封闭。板随后与各种浓度的包含各种多肽片段的融合蛋白在室温温育1小时。用包含0.5% Tween的TBS洗涤后,结合的融合蛋白-多肽用包含1mg/ml BSA的0.2M甘氨酸-HCl(pH2.2)缓冲液进行洗脱,且用1M Tris-HCl(pH9.1)进行中和。随后测定洗脱的融合蛋白-多肽的氨基酸序列。抗体5F1结合的多肽包含(从N末端到C末端)Trp-Pro-Ile(WPI)三肽序列。此三肽氨基酸序列不存在于CD43氨基酸序列中。Pallant等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1328-32, 1989; Shelley等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2819-23, 1989。

[0260] 为了进一步证实抗体5F1结合的三肽表位,执行夹心ELISA。96孔微量滴定板用抗体(5F1或对照抗体9E10)以50 μl /孔以1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度于4℃包被过夜。板通过与PBS中的0.25% BSA(150 μl /孔)于37℃温育1小时进行封闭。板随后与(包含与载体蛋白质融合的各种多肽片段的)融合蛋白在室温温育2小时。用包含0.05% Tween20的PBS洗涤4次后,板随后

与载体蛋白质-特异性抗体以2 μ g/ml在室温下温育1.5小时。温育后,板用PBST洗涤4次。随后向每个孔中加入50 μ l的1:3000稀释的与HRP缀合的山羊抗载体蛋白-特异性抗体,并且板于37 $^{\circ}$ C温育1小时。酶反应通过加入HRP酶的底物来进行,以测定指定多肽与这2种抗体(5F1和9E10)的反应性。下表4显示当5F1或9E10固定在板上时来自ELISA测定法的数据。“+”指示指定多肽与单克隆抗体结合;和“-”指示指定多肽不与单克隆抗体结合。单克隆抗体5F1识别三肽WPI表位结构。因为三肽WPI序列不存在于CD43中,所以这些数据提示5F1识别包括与三肽WPI所形成的结构具有类似或等价的物理和/或化学特征的结构的结构表位。

[0261] 表4.由5F1识别的表位结构

肽名称	氨基酸序列	5F1	9E10
5F1-01-2-21	W P I D L M S E T P I L (SEQ ID NO:17)	+	-
5F1-01-2-04	W P I A N H E N A L S A (SEQ ID NO:18)	+	-
5F1-01-2-18	W P I S G K H S F W S L (SEQ ID NO:19)	+	-
5F1-01-2-17	W P I L D H A V S R P S (SEQ ID NO:20)	+	-
5F1-01-2-16	W P I D I P Y A W D F S (SEQ ID NO:21)	+	-
5F1-01-2-13	W P I S P Q P G A R P V (SEQ ID NO:22)	+	-
5F1-01-2-09	W P I A P N R Y L L S S (SEQ ID NO:23)	+	-
5F1-01-2-06	W P I P P E V E P F K H (SEQ ID NO:24)	+	-
[0262] 5F1-01-2-05	W P I L Q N A A G T G L (SEQ ID NO:25)	+	-
5F1-01-2-23	W P I P T L M E L P S A (SEQ ID NO:26)	+	-
5F1-01-2-22	W P I T N S D S R I T W (SEQ ID NO:27)	+	-
5F1-01-2-14	W P I H S A H V R Y T T (SEQ ID NO:28)	+	-
9F9-01-03-24	A E T D Y D P D H F T P (SEQ ID NO:29)	-	-
9F9-01-03-18	D A R Y S H D P A W P Y (SEQ ID NO:30)	-	-
9F9-01-03-17	A G Q K W D P E W P H S (SEQ ID NO:31)	-	-
9F9-01-03-21	Y D H H W T N P P T Q K (SEQ ID NO:32)	-	-
9F9-01-03-25	E P N M D P N W A S P S (SEQ ID NO:33)	-	-

[0263] 实施例6.5F1、138-10和51-41的轻和重链的可变区的克隆和抗体人源化

[0264] 5F1轻和重链的可变区cDNAs通过PCR进行扩增,并且将合成的cDNAs亚克隆到peRII(Invitrogen)内用于序列测定。核苷酸序列得自几个独立克隆且进行分析。选择来自独立克隆的相同cDNA序列以表示每个抗体的轻或重链V区。下表5显示编码5F1、138—10、51-41和人源化5F1(h5F1Vc)的轻和重链V区的翻译的氨基酸序列和核苷酸序列。

[0265] 表5.抗体可变区的氨基酸序列,和编码抗体可变区的核酸序列(CDRs是有下划线的)

[0266] 5F1重链氨基酸序列(SEQ ID NO:1)和核苷序列(SEQ ID NO:9)

[0267]	1	M E W S W I F L F L L S G T A G V H S E
[0268]	1	ATGGAATGGAGTTGGATATTTCTCTTTCTCCTGTGCAAGAACTGCAGGTGTCCACTCTGAG
[0269]	21	V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V R M S
[0270]	61	GTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAGGATGTCC
[0271]	41	C T A S G Y T F T <u>S Y V M H</u> W I K Q K P
[0272]	121	TGCACGGCTTCTGGATACACATTCAGTATGTTATGCACTGGATAAAGCAGAAGCCT
[0273]	61	G Q G L D W I G <u>V T N P Y N G G T Q Y N</u>
[0274]	181	GGGCAGGCCTTGACTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGGTGGTACTCAGTACAAT
[0275]	81	<u>E K F K G</u> K A T L T S D K S S S T A Y M
[0276]	241	<u>GAGAAGTTC</u> AAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG

[0277] 101 E L S S L T S E D S A V Y Y C A R R T F

[0278] 301 GAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACGGACCTTC

[0279] 121 P Y Y F D Y W G Q G T T L T V S S

[0280] 361 CCGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

[0281] 5F1轻链氨基酸序列(SEQ ID NO:2)和核苷酸序列(SEQ ID NO:10)

[0282] 1 M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D

[0283] 1 ATGAAGTTCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTGAT

[0284] 21 V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I

[0285] 61 GTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATC

[0286] 41 S C R S S Q S I L H S N G N T Y L E W Y

[0287] 121 TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTTTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTAC

[0288] 61 L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S

[0289] 181 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCT

[0290] 81 G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S

[0291] 241 GGGTCCCAGACAGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGC

[0292] 101 R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H A P L

[0293] 301 AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTACTACTGCTTTCAAGGTTACATGCTCCTCTC

[0294] 121 T F G A G T K L E L K

[0295] 361 ACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0296] 138-10重链氨基酸序列(SEQ ID NO:3)和核苷酸序列(SEQ ID NO:11)

[0297] 1 M E C N W I L P F I L S V I S G V Y S E

[0298] 1 ATGGAATGTAAGTGGATACTTCTTTTATTCTGTCGGTAATTTTCAGGGTCTACTCAGAG

[0299] 21 V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K M S

[0300] 61 GTTCAGCTCCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCCTGGGGCTTCCGTGAAGATGTCC

[0301] 41 C K A S G Y S F I S Y W M H W V K Q R P

[0302] 121 TGCAAGGCTTCTGGCTACAGCTTTATCAGCTACTGGATGCACTGGGTAAAAACAGAGGCCT

[0303] 61 G Q G L E W I G A I S P G D S D T T Y N

[0304] 181 GGACAGGGTCTAGAATGGATTGGTGCTATTTCTCCTGGAGATAGTGATACTACCTACAAC

[0305] 81 Q R F T G K A K L T A V T S A S T A Y M

[0306] 241 CAGAGGTTTCAGGGCAAGGCCAAACTGACTGCAGTCACATCCGCCAGCACTGCCTACATG

[0307] 101 E L S S L T N E D S A V Y Y C I R R D G

[0308] 301 GAGCTCAGCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTATAAGAAGGGATGGT

[0309] 121 N Y Q V A W F A Y W G Q G T L V T V S A

[0310] 361 AACTACCAAGTTGCCTGGTTTGTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0311] 138-10轻链氨基酸序列(SEQ ID NO:4)和核苷酸序列(SEQ ID NO:12)

[0312] 1 M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D

[0313] 1 ATGAAGTTCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTGAT

[0314] 21 V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I

[0315] 61 GTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATC

[0316] 41 S C R S S Q S I V H S N G N T Y L E W Y

[0317] 121 TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAAATGGTAC

[0318] 61 L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S

[0319] 181 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCT

[0320] 81 G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S

[0321] 241 GGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGC

[0322] 101 R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P F

[0323] 301 AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCATTC

[0324] 121 T F G S G T K L E I K

[0325] 361 ACqTTCGGCTCGGGACAAAGTTGAAATAAAA

[0326] 51-41重链氨基酸序列(SEQ ID NO:5)和核苷酸序列(SEQ ID NO:13)

[0327] 1 M E C N W I L P F I L S V I S G V Y S E

[0328] 1 ATGGAATGTAAGTGGATACTTCTTTTATTCTGTGCGTAATTTTCAGGGTCTACTCAGAG

[0329] 21 V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K M S

[0330] 61 GTTCAGCTCCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCCTGGGGCTTCCGTGAAGATGTCC

[0331] 41 C K A S G Y S F T S Y W M H W V K Q R T

[0332] 121 TGCAAGGeTTCTGGCTAeAGTTTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTAAAAACAGAGGACr

[0333] 61 G Q G L E W I G A I S P G D G D T T Y N

[0334] 181 GGGCAGGGTCTAGAATGGATTGGTGTCTATTTCTCCTGGAGATGGTGATACTACCTACAAC

[0335] 81 Q K F T G K A K L T A V T S A S T A Y M

[0336] 241 CAGAAGTTCACGGGCAAGGCCAAACTGACTGCAGTCACATCCGCCAGCACTGCCTACATG

[0337] 101 E L S S L T H E D S A V Y Y C T R R D G

[0338] 301 GAGCTCAGCAGCCTGACACATGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAAGAGATGGT

[0339] 121 S Y Q V A W F A Y W G R G T L V T V S A

[0340] 361 AGCTACCAAGTTGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCGAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0341] 51-41轻链氨基酸序列(SEQ ID 1NO:6)和核苷酸序列(SEQ ID NO:14)

[0342] 1 M K L P V R L L V L M F W I P V S S S D

[0343] 1 ATGAAATTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGTGATGTTCTGGATTCTGTTTCCAGCAGTGAT

[0344] 21 V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I

[0345] 61 GTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGAGATCAAGCCTCCATC

[0346] 41 S C R S S Q S I V H S N G N T Y L E W F

[0347] 121 TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTCCATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAAATGGTTC

[0348] 61 L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S

[0349] 181 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCT

[0350] 81 G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S

[0351] 241 GGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGC

[0352] 101 R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P F

[0353] 301 AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCATTC

[0354] 121 T F G S G T K L E I K

[0355] 361 ACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA

[0356] h5F1Vc重链氨基酸序列(SEQ ID NO:7)和核苷酸序列(SEQ ID NO:15)

[0357] 1 M G W S W I F L F L L S G T A G V H S Q

[0358] 1 ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTTCTCCTCCTGTCAGGTACCGCGGGCGTGCAGTCTCAG

[0359] 21 V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S

[0360] 61 GTCCAGCTTGTCAGTCTGGGGCTGAAGTCAAGAAACCTGGCTCGAGCGTGAAGGTCTCC

[0361] 41 C K A S G Y T F T S Y V M H W V R Q A P

[0362] 121 TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGCTATGTTATGCAGTGGGTAAGGCAGGCCCT

[0363] 61 G Q G L E W I G Y I N P Y N G G T O Y N

[0364] 181 GGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGGTGGTACTCAGTACAAT

[0365] 81 E K F K G K A T I T A D E S T N T A Y M

[0366] 241 GAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACAATTACTGCAGACGAATCCACCAATACAGCCTACATG

[0367] 101 E L S S L T S E D S A V Y Y C A R R T F

[0368] 301 GAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACAGCGCAGTCTATTACTGTGCAAGACGGACCTTC

[0369] 121 P Y Y F D Y W G Q G T T L T V S S

[0370] 361 CCGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCACGCTCACAGTCTCCTCA

[0371] h5F1Vc轻链氨基酸序列(SEQ ID NO:8)和核苷酸序列(SEQ ID NO:16)

[0372] 1 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G

[0373] 1 ATGGAGACCGATAACCCTCCTGCTATGGGTCCCTCCTGCTATGGGTCCCAGGATCAACCGGA

[0374] 21 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T

[0375] 61 GATATTCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTCTCTGCTAGCGTCCGGGATAGGGTCAACC

[0376] 41 I T C R S S Q S I L H S N G N T Y L E W

[0377] 121 ATAACCTGCAGATCTAGTCAGAGCATTTTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGG

[0378] 61 Y Q Q K P G K A P K L L I Y K V S N R F

[0379] 181 TACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCTCCCAAGCTTCTAATCTATAAAAGTTTCCAACCGATTT

[0380] 81 S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I

[0381] 241 TCTGGAGTCCCTTACGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCGATTTACCCCTCACAATC

[0382] 101 S S L Q P D D F A T Y Y C F Q G S H A P

[0383] 301 AGCTCTCTGCAGCCAGATGATTTCCGCACTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGCTCCT

[0384] 121 L T F G Q G T K V E L K

[0385] 361 CTCACGTTTCGGTCAGGGGACCAAGGTGGAGCTGAAA

[0386] 实施例7. 嵌合5F1抗体的生产和表征

[0387] 嵌合抗体5F1(c5F1)的构建和生产

[0388] 为了构建用于表达嵌合抗体的载体,将5F1的轻链V区亚克隆到质粒pVk内。pVk包含CMV启动子和人轻链恒定区。关于人轻链恒定区的序列和生物信息可以在eter,P.A., 等人(1980),Cloned human and mouse kappa immunoglobulin constant and J region genes conserve homology in functional segments.Cell,22(1 Pt 1):第197—207页中找到。

[0389] 将5F1的重链V区亚克隆到质粒pVg1内。pVg1质粒具有CMV启动子且包含IgG1的人

重链恒定区。关于人IgG1重链恒定区的序列和生物信息可以在Ellison, J.w., B.J. Berson, 和L.E.Hood(1981), The Nucleotide sequence of a human immunoglobulin C gamma 1 gene., Nucleic Acids Res.10:4071中找到。

[0390] 随后将轻和重链表达质粒共转染到Cos-7细胞内。收集包含c5F1的上清液且就c5F1的凋亡诱导功能进行分析。

[0391] c5F1的功能测试

[0392] 包含c5F1的上清液随后通过表面染色就其与COLO 205细胞的结合进行测试, 并通过如上所述的膜联蛋白V凋亡测定法就其功能进行测试。对于结合测定法, 使用0.58微克/ml c5F1。对于凋亡试验, 使用2~32微克/ml m5F1、c5F1和9E10(抗myc对照抗体)且温育16小时。包含c5F1的上清液结合COLO205细胞, 且在COLO205细胞中诱导凋亡, 正如其小鼠对应物一样, 这证实克隆的cDNA片段事实上编码5F1的V区(图9A和9B)。

[0393] 实施例8. 用m5F1的结肠直肠癌组织免疫组织化学研究

[0394] 用m5F1的组织染色

[0395] m5F1靶的表达通过免疫组织化学在来自结肠直肠癌患者(n=59)的石蜡包埋的原发性肿瘤组织样品中进行研究。石蜡包埋的人结肠和直肠癌组织的组织阵列得自SuperBioChips Laboratories(人组织阵列, 目录号CD1)。标准染色操作根据制造商的说明书(VECTASTAIN Elite ABC Kit, Vector Laboratories)用于免疫组织化学。所有切片于58℃加热1小时, 用二甲苯脱石蜡5次, 且在递减浓度的一系列乙醇中再水合。用正常血清(VECTASTAIN, PK6102)封闭1小时后, 切片与m5F1以1μg/ml的浓度在RT温育1小时, 随后与二级、生物素化的抗小鼠抗体(VECTASTAIN, PK6102)进行温育。切片随后与链霉抗生物素蛋白-生物素复合物(VECTASTAIN, PK6102)进行温育。载玻片用二氨基联苯胺溶液进行显色。最后载玻片用苏木精进行复染色、脱水、清洁、且在PBS中的50%甘油中封片。

[0396] 降解的评估

[0397] 每个组织切片中的抗原表达由2个独立的观察者进行评估, 并且用5F1的染色使用经验的半定量系统进行分级:-, 阴性; +-, 弱染色; +中等染色; ++, 强染色。

[0398] 结果

[0399] 在所有切片中, m5F1染色主要在膜上。总的来说, 59个肿瘤样品中的31个(52.5%)显示5F1靶的阳性染色, 在它们中, 27个(45.8%)显示强表达水平。19个样品(32.2%)显示m5F1靶表达的阴性染色。在测试的所有结肠直肠癌样品中的染色结果概括显示于下表6中。这些数据指出抗体m5F1可以用于诊断结肠直肠癌。

[0400] 表6. 在人结肠直肠癌中5F1靶表达的频率

结肠直肠癌样品/m5F1 染色结果									
1++	2++	3++	4-	5++	6+-	7++	8-	9++	10++
11++	12-	13++	14+-	15-	16-	17++	18++	19+-	20++
[0401] 21+	22+-	23+	24-	25++	26-	27-	28-	29++	30++
31+-	32-	33-	34++	35++	36-	37-	38++	39++	40++
41+	42++	43-	44-	45-	46-	47+-	48++	49-	50+
51++	52++	53+-	54++	55++	56++	57+-	58+-	59-	60 碳

[0402] ++:27/59(45.76%)+:4/59(6.78%)+-:9/59(15.25%)-:19/59(32.20%)

[0403] 实施例9.m5F1与COL0205表达的重组人CEA(rhCEA)和CD43(rhCD43)结合,但不识别COS-7细胞表达的rhCEA或rhCD43。

[0404] 蛋白质样品制备

[0405] COL0205和COS细胞中重组Flag标签的CEA的免疫沉淀:将编码全长CEA蛋白质(35~702aa)的cDNA克隆到质粒pFlag-CMV-1内。改造的质粒DNA通过电穿孔引入COL0205内(用于稳定细胞系改造)或通过lipofectamine2000(Invitrogen, 目录#11668-019)引入COS细胞内(用于瞬时表达实验)。收集抗原表达细胞且在包含蛋白酶抑制剂(Roche, 目录#11836145001)的裂解缓冲液(50mM Tris-HCl, pH8.5, 150mM NaCl, 1%NP40)中进行裂解。使细胞裂解物的上清液与抗Flag(M2, Stratagene, 目录#200472)偶联的蛋白G琼脂糖珠(GE Healthcare, 目录#17-0618-02)于4℃温育2小时。蛋白G琼脂糖珠随后用裂解缓冲液洗涤3次。包含IP产物的蛋白G琼脂糖珠用作SDS-PAGE和蛋白质印迹的样品。

[0406] COL0205细胞中表达的Cr1标签的CD43的可溶重组蛋白质纯化:将编码CD43蛋白质的胞外域的cDNA克隆到经修饰的pcDNA3质粒内, 所述pcDNA3质粒包含N末端Flag和C末端Cr1标签。改造的质粒DNA通过电穿孔引入COL0205细胞内用于形成稳定的细胞系。由COL0205表达的可溶性重组hCD43²⁰⁻²⁵³包含N末端3xFlag标签和C末端Cr1标签。可溶蛋白质通过蛋白A琼脂糖珠(GE Healthcare, 目录#17-1279-02)进行纯化。用甘氨酸缓冲液洗脱且针对PBS透析后, 将蛋白质样品贮藏于-20℃用于未来使用。

[0407] COS细胞中瞬时表达的CD43的全细胞裂解物:包含全长人CD43的构建体(在pcDNA3.1myc-His中)通过Lipofectamine2000(Invitrogen, Catalog#11668-019)引入COS细胞内。细胞用包含蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液(50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.25% SDS, 1% NP-40)进行裂解, 且在21,900于4℃离心10分钟以收集上清液。Bio-Rad定量后, 将足够量的蛋白质裂解物加载到SDS-PAGE上用于蛋白质印迹分析。

[0408] 蛋白质印迹分析

[0409] 加入样品缓冲液后, 使蛋白质样品于95℃煮沸, 加载到SDS-PAGE微型胶上, 然后转移至NC纸(GE Healthcare, Hybond-ECL, 目录#RPN303D)。用在TBS中的5%脱脂乳封闭膜后, 加入一抗。一抗的结合通过HRP缀合的二抗(NEN Life Science, HRP-山羊抗小鼠IgG, 目录#NEF822, 或Southern Biotech, HRP-山羊抗小鼠Ig, 目录#1010-05)进行检测, 并且用ECL蛋白质印迹检测试剂(GE Healthcare, 目录#RPN2106)进行显色。

[0410] 结果

[0411] 在图11A中显示的实验中,表达rhCEA的COL0205细胞的细胞裂解物用抗Flag抗体进行免疫沉淀,并且免疫沉淀的蛋白质在SDS-PAGE上进行电泳,且转移至NC纸。NC纸用各种抗体进行印迹:抗Flag、m5F1、50-14、51-41、138-10、186-14、280-6、或抗CEA抗体(CEA/Ab-3;来自NeoMarker Cat.MS-613-P1ABX的克隆名称COL-1)。图11A中的数据显示m5F1、51-41和138-10识别由COL0205细胞表达的rhCEA。

[0412] 在图11B中显示的实验中,表达rhCEA的COS-7细胞的细胞裂解物用抗Flag抗体进行免疫沉淀,并且免疫沉淀的蛋白质在SDS-PAGE上进行电泳,且转移至NC纸。NC纸用各种抗体进行印迹:抗Flag、m5F1、或抗CEA抗体(CEA/Ab-3)。图11B中的数据显示m5F1不与COS-7细胞表达的rhCEA结合。

[0413] 在图12A中显示的实验中,由COL0205表达的可溶蛋白质用蛋白A琼脂糖珠进行纯化,并且在SDS凝胶上进行电泳,且转移至NC纸。NC纸用各种抗体进行印迹:m5F1、51-41或138-10。图12A中的数据显示m5F1、51-41和138-10识别由COL0205细胞表达的rhCD43。

[0414] 在图12B中显示的实验中,由COL0205表达的可溶蛋白质用蛋白A琼脂糖珠进行纯化,并且在SDS-PAGE上进行电泳,且转移至NC纸。NC纸用抗CD43(MEM59)(左图)或m5F1(右图)进行印迹。图12B中的数据显示m5F1不识别由COS-7细胞表达的rhCD43。这些数据指出由m5F1识别的表位包括特异于某些细胞类型的翻译后修饰。

[0415] 实施例10.由m5F1、51-41和138-10识别的表位包括路易斯^a(Le^a)结构且是岩藻糖依赖性的

[0416] 糖苷酶处理

[0417] 重组人CEA(rhCEA)通过在COL0205细胞中表达人CEA蛋白质进行生产。将编码rhCEA(CEA-N-A2)的cDNA克隆到包含Flag标签的经修饰的pcDNA3质粒内,所述cDNA是具有CEA的氨基酸35-145(N结构域)和氨基酸324-415(A2结构域)的融合物。CEA的氨基酸残基位置基于前蛋白中的氨基酸位置。改造的质粒DNA通过电穿孔引入COL0205细胞内用于稳定的细胞系改造。重组CEA蛋白质使用抗Flag抗体从表达重组CEA的稳定细胞系的细胞培养上清液中进行纯化。

[0418] 对于每个反应,使约1.8 μ g重组蛋白质(rhCEA)与来自黄单胞菌属物种(Xanthomonas sp.)(Sigma,目录#F1924)的不同量(0、0.01、0.03或0.1mU)的 α -1 \rightarrow (2,3,4)-岩藻糖苷酶溶液于37 $^{\circ}$ C温育20小时。处理后,将蛋白质样品加载到SDS-PAGE上用于考马斯蓝染色(图13左图)或用m5F1进行蛋白质印迹检测(图13右图)。

[0419] 如图13中所示,当抗原用 α -1 \rightarrow (2,3,4)-岩藻糖苷酶处理时,m5F1与rhCEA的结合减少,说明m5F1识别岩藻糖敏感性糖-表位。

[0420] 寡糖竞争试验

[0421] 为了进一步测试由m5F1识别的糖表位,使用各种寡糖进行竞争试验。购买寡糖(路易斯^a来自Sigma目录#03499、路易斯^b-乳糖来自Sigma目录#L7033、路易斯^x-乳糖来自Sigma目录#L7777、路易斯^y来自Sigma目录#L7784、唾液酸-路易斯^x来自Sigma目录#S1782、Lacto-N-四糖来自Sigma目录#L6770、Lecto-N-二岩藻糖六糖II来自Sigma目录#L6645、路易斯^a来自Calbiochem目录#434626、和 β -乳糖来自Sigma目录#L3750)且溶解于PBS中。这些寡糖的结构显示于图14中。将寡糖(以1mM的终浓度)加入包含 2×10^5 COL0205细胞的不同孔

内,随后加入指示抗体(m5F1,51-41或138-10;各自0.25ug/ml)。于4℃温育1小时后,弃去上清液且加入二级抗体(Southern Biotech,RPE-山羊抗小鼠IgG,目录#1032-09,或Southern Biotech,RPE-山羊抗小鼠IgM,目录#1022-09)。并且细胞结合信号用流式细胞术分析进行检测。

[0422] 如图15中所示,LNDFH II、Le(a)-乳糖和Le(a)在各种水平上均抑制抗体m5F1、51-41和138-10与COL0205细胞的结合;并且LNT还抑制抗体51-41和138-10的结合,但不显著抑制m5F1与COL0205细胞的结合。这指出由这些抗体识别的表位可能包括Le^a或类似结构,并且是岩藻糖敏感性的。此外,m5F1抗体具有比抗体51-41和138-10更高的对岩藻糖的依赖性。

[0423] 尽管为了清楚理解起见本发明已通过举例说明和实施例相当详细地进行了描述,但说明书和实施例不应解释为限制本发明的范围。

[0424] 参考文献

[0425] Laos,S.,Baeckstrom,D,和Hansson,G.C.(2006),结肠癌细胞中白细胞糖蛋白CD43对NF-κB激活和趋化因子表达的抑制(Inhibition of NF-kappaB activation and chemokine expression by the leukocyte glycoprotein,CD43,in colon cancer cells).Int.J.Oncol.28(3):695-704.

[0426] Fuhlbrigge,R.C.,King,S.L.,Sackstein,R.,和Kupper,TS.(2006)CD43是CLA+人T细胞上E-选择蛋白的配体(CD43is a ligand for E-selectin on CLA+human T cells).Blood.15;107(4):1421-6.

[0427] Matsumoto,M.,Atarashi,K.,Umemoto,E.,Furukawa,Y.,Shigeta,A.,Miyasaka,M.,和Hirata,T.(2005)活化的T细胞上CD43作为E-选择蛋白的配体起作用(CD43functions as a ligand for E-Selectin on activated T cells).J.Immunol.15;175(12):8042-50.

[0428] Pimenidou,A.,Madden,L.A.,Topping,K.P.,Smith,K.A.,Monson,J.R.,和Greenman,J.(2004)新CD43特异性噬菌体抗体与早期结肠直肠癌肿瘤反应(Novel CD43specific phage antibodies react with early stage colorectal tumours).Oncol.Rep.11(2):327-31.

[0429] Kadaja,L.,Laos,S.,和Maimets,T.(2004)过表达白细胞标志CD43造成肿瘤抑制蛋白p53和ARF的激活(Overexpression of leukocyte marker CD43causes activation of the tumor suppressor proteins p53and ARF).Oncogene.19;23(37):2523-2530.

[0430] Fernandez-Rodriguez.J.,Andersson.,C.X.,Laos,S.,Baeckstrom,D.,Sikut,A.,Sikut,R.,和Hansson,G.C.(2002)白细胞抗原CD43在非造血系统来源的不同细胞系中表达(The leukocyte antigen CD43is expressed in different cell lines of nonhematopoietic origin).Tumour Biol.23(4):193-201.

[0431] Cermak,L.,Simova,S.,Pintzas,A.,Horejsi,V.,和Andera,L.(2002),CD43介导的TF-I细胞凋亡的分子机制,转录Daxx表达和粘附分子的作用(Molecular mechanisms involved in CD43-mediated apoptosis of TF-I cells.Roles of transcription Daxx expression,and adhesion molecules).J Biol Chem.8;277(10):7955-61.

[0432] Carlow,D.A.,Corbel.S.Y.,和Ziltener,H.J.(2001)CD43的缺乏不能改变T细胞

的发育和反应性(Absence of CD43 fails to alter T cell development and responsiveness). *J Immunol.* 166(1):256-61.

[0433] Nieto, M., Rodriguez-Fernandez, J.L., Navarro, F., Sancho, D., Frade, J.M., Mellado, M., Martinez-A, C., Cabanas, C. 和 Sanchez-Madrid, F. (1999) 通过CD43的信号传导诱导天然杀伤细胞活化、趋化因子释放和PYK-2活化(Signaling through CD43 induces natural killer cell activation, chemokine release, and PYK-2 activation). *Blood.* 94(8):2767-77.

[0434] Sikut, R., Andersson, C.X., Sikut, A., Fernandez-Rodriguez, J., Karlsson, N.G., 和 Hansson, G.C. (1999) 通过抗CD43胞内域的新单克隆抗体在结肠腺瘤和腺癌中检测CD43(白涎蛋白)(Detection of CD43(leukosialin) in colon adenoma and adenocarcinoma by novel monoclonal antibodies against its intracellular domain). *Int. J. Cancer.* 82(1):52-8.

[0435] Lopez, S., Seveau, S., Lesavre, P., Robinson, M.K., 和 Halbwachs-Mecarelli, L. (1998) CD43(涎福林, 白涎蛋白)脱落是中粒细胞迁移过程的早期事件——这可能与粘着细胞的散布紧密相关(CD43(sialophorin, leukosialin) shedding is an initial event during neutrophil migration, which could be closely related to the spreading of adherent cells). *Cell Adhes. Commun.* 5(2):151-60.

[0436] Stockton, B.M., Cheng, G., Manjunath, N., Ardman, B., 和 von Andrian, U.H. (1998) CD43对T细胞归巢的负调节(Negative regulation of T cell homing by CD43). *Immunity.* 8(3):373-81.

[0437] McEvoy, L.M., Jutila, M.A., Tsao, P.S., Cooke, J.P., 和 Butcher, E.G. (1997) 抗CD43抑制炎症和动脉粥样化中的单核细胞-内皮粘着(Anti-CD43 inhibits monocyte-endothelial adhesion in inflammation and atherogenesis). *Blood.* 90(9):3587-94.

[0438] Baeckstrom, D. (1997) 在结肠癌细胞系中异常表达的粘蛋白样白细胞唾液酸糖蛋白(CD43)的翻译后命运(Post-translational fate of a mucin-like leukocyte sialoglycoprotein(CD43) aberrantly expressed in a colon carcinoma cell line). *J Biol Chem.* 272(17):11503-9.

[0439] McEvoy, L.M., Sun, H., Frelinger, J.G., 和 Butcher, E.C. (1997) T细胞归巢的抗CD43抑制(Anti-CD43 inhibition of T cell homing). *J Exp Med.* 185(8):1493-8.

[0440] Brown, T.J., Shuford, W.W., Wang, W.C., Nadler, S.G., Bailey, T.S., Marquardt, H., 和 Mittler, R.S. (1996) 表征CD43/白涎蛋白在人T-类淋巴母细胞细胞中介导的凋亡诱导途径(Characterization of a CD43/leukosialin-mediated pathway for inducing apoptosis in human T-lymphoblastoid cells). *J Biol Chem.* 271(44):27686-95.

[0441] Santamaria, M., Lopez-Beltran, A., Toro, M., Pena, J., 和 Molina, I.J. (1996) 抗白细胞限制性细胞表面分子CD43的特异性单克隆抗体与非造血系统肿瘤细胞反应(Specific monoclonal antibodies against leukocyte-restricted cell surface molecule CD43 react with nonhematopoietic tumor cells). *Cancer Res.* 56(15):3526-9.

[0442] Bazil, V., Brandt, J., Chen, S., Roeding, M., Luens, K., Tsukamoto, A., 和 Hoffman, R. (1996) 识别CD43(白涎蛋白)的单克隆抗体发动人造血祖细胞的凋亡但不发动

干细胞的凋亡(A monoclonal antibody recognizing CD43(leukosialin) initiates apoptosis of human hematopoietic progenitor cells but not stem cells). *Blood*.87(4):1272-81.

[0443] Manjunath, N., Correa, M., Ardman, M., 和 Ardman, B. (1995) CD43对T细胞粘着和激活的负调节(Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43). *Nature*.377(6549):535-8

[0444] Nong, Y.H., Remold-O'Donnell, E., LeBien, T.W., 和 Remold, H.G. (1989) 涎福林(CD43)的单克隆诱导人单核细胞的同型粘着和激活(A monoclonal antibody to sialophorin(CD43) induces homotypic adhesion and activation of human monocytes). *J Exp Med*.170(1):259-67.

[0445] Mentzer, S.J., Remold-O'Donnell, E., Crimmins, M.A., Bierer, B.E., Rosen, F.S., 和 Burakoff, S.J. (1987) 涎福林——一种在威-奥二氏综合征中缺陷的表面唾液酸糖蛋白——参与T淋巴细胞增殖(Sialophorin, a surface sialoglycoprotein defective in the Wiskott-Aldrich syndrome, is involved in human T lymphocyte proliferation). *J Exp Med*.165(5):1383-92.

[0446] Pallant, A., Eskenazi, A., Mattei, M.G., Fournier, R.E.K., Carlsson, S.R., Fukuda, M., 和 Frelinger, J.G. (1989) 编码人白涎蛋白的cDNA的表征和白涎蛋白基因在染色体16上的定位(Characterization of cDNA encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome 16). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*86:1328-32.

[0447] Shelley, C.S., Remold-O'Donnell, E., Davis III, A.E., Bruns, G.A.P., Rosen, F.S., Carroll, M.C., 和 Whitehead, A.S. (1989) 涎福林(CD43)——在威-奥二氏综合征中缺陷的淋巴细胞表面唾液酸糖蛋白——的分子表征(Molecular characterization of sialophorin(CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*86:2819-23.

<210> 2
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Murine

<400> 2
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
 35 40 45
 Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser His Ala Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Leu Lys
 130

[0002]

<210> 3
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Murine

<400> 3
 Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Ile Ser Gly
 1 5 10 15
 Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45
 Ile Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Ala Ile Ser Pro Gly Asp Ser Asp Thr Thr Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Arg Phe Thr Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ile Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Gln Val Ala Trp Phe Ala
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135 140

<210> 4
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Murine

<400> 4
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys
 130

<210> 5
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Murine

[0003] <400> 5
 Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Ile Ser Gly
 1 5 10 15
 Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Ala Ile Ser Pro Gly Asp Gly Asp Thr Thr Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Thr Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr His Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Asp Gly Ser Tyr Gln Val Ala Trp Phe Ala
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135 140

<210> 6
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Murine

<400> 6
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Val
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys
 130

<210> 7
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 7
 Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gln Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Thr Phe Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135

[0004]

<210> 8
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 8
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

20 25 30
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 Ile Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Phe Gln Gly Ser His Ala Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 115 120 125
 Val Glu Leu Lys
 130

<210> 9
 <211> 411
 <212> DNA
 <213> Murine

[0005] <400> 9
 atggaatgga gttggatatt tctcttctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt ccaactcgag 60
 gtcacgtgc agcagctctgg acctgagctg gtaaagcctg gggcttcagt gaggatgtcc 120
 tgcacggctt ctggatacac attcactage tatgttatgc actggataaa gcagaagcct 180
 gggcagggcc ttgactggat tggatatatt aatccitaca atggtgttac tcagtacaat 240
 gagaagtca aaggcaagc cacactgact tcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 gagctcagca gectgaccte tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag acggaccttc 360
 ccgtactact ttgactactg gggccaagc accactctca cagtctctc a 411

<210> 10
 <211> 393
 <212> DNA
 <213> Murine

<400> 10
 atgaagtgc ctgtaggct gttggtgctg atgtctgga tctctctc cagcagtgat 60
 gttttgatga cccaaactcc actctcctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 tcttcagat ctatgcagag caftttacat agtaatgga acacctattt agaatgttac 180
 ctgcagaac caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagttccaa cegattttct 240
 ggggtcccaag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
 agagtggagg ctgaggatct gggagttac tactgcttc aaggttcaca tctctctctc 360
 acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa 393

<210> 11
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> Murine

<400> 11
 atggaatgta actggatact tctctttatt ctgtcggtaa ttcaggggt ctactcagag 60
 gttcagctcc agcagctctgg gactgtgctg gcaaggcctg gggcttcctg gaagatgicc 120
 tgcaggctt ctggctacag ctttaccagc tactggatgc actgggtaaa acagaggcct 180
 ggacagggtc tagaatggat tgggtctatt tctctggag atagtgatac tacctacaac 240
 cagaggttca cgggcaagc caaactgact gcagtcacat ccgccagcac tgcctacatg 300
 gagctcagca gectgacaaa tgaggactct gcggtctatt attgtataag aagggatggt 360

aactaccaag ttgacctggt tgcctactgg ggccaaggga ctctggtcac tctctctgca 420

<210> 12
<211> 393
<212> DNA
<213> Murine

<400> 12
atgaagtgc ctgftaggct gttggtgctg atgtctgga ttctgttc cagcagtgat 60
gtttgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
tcttcagat ctagtcagag cattgtacat agtaatggaa acacctattt agaatggtac 180
ctgcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgacttaca aagttccaa ccgattttct 240
ggggicccag acaggttcag tggcagtggg tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
agagtggagg ctgaggatct gggagtttat tactgtttc aaggttcaaa tgttccattc 360
acgtcggct cggggacaaa gttggaaata aaa 393

<210> 13
<211> 420
<212> DNA
<213> Murine

[0006] <400> 13
atggaatgta actggatact tcttttatt ctgtcggtaa tttcaggggt ctactcagag 60
gttcagctcc agcagtctgg gactgtgctg gcaaggcctg gggttccgt gaagatgtcc 120
tgcaaggctt ctggctacag tttaccagc tactggatgc actgggtaaa acagaggact 180
gggcagggc tagaatggat tgggtctatt tctctggag atggtgatac tacctacaac 240
cagaagtca cgggcaagc caaactgact gcagtcacat ccgccagcac tgcctacatg 300
gagctcagca gectgacaca tgaggactct gcggtctatt actgtacaag aagagatggt 360
agctaccaag ttgacctggt tgcctactgg ggccgaggga ctctggtcac tctctctgca 420

<210> 14
<211> 393
<212> DNA
<213> Murine

<400> 14
atgaaattgc ctgttaggct gttggtgctg atgtctgga ttctgtttc cagcagtgat 60
gtttgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
tcttcagat ctagtcagag cattgtccat agtaatggaa acacctattt agaatggtc 180
ctgcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgacttaca aagttccaa ccgattttct 240
ggggicccag acaggttcag tggcagtggg tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
agagtggagg ctgaggatct gggagtttat tactgtttc aaggttcaaa tgttccattc 360
acgtcggct cggggacaaa gttggaaata aaa 393

<210> 15
<211> 411
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 15
atgggatgga gctggatctt tctctctc ctgtcaggta ccgctggcgt gcactctcag 60
gtccagctg tccagctctg gctgaagtc aagaacctg gctcagcgt gaaggtctcc 120

tgcaaggctt ctggctacac ctttactagc fatgttatgc actgggtaag gcaggeccct 180
 ggacagggtc tggaatgat tggatatatt aatcctfaca atggtggtac tcagtacaat 240
 gagaagtca aaggcaaggc cacaattact gcagacgaat ccaccaatac agcctacatg 300
 gaaactgagca gcctgacatc tgaggacagc gcagtctatt actgtgcaag acggaccttc 360
 cegtactact ttgactactg gggccaagga accacgetca cagtctctc a 411

<210> 16
 <211> 396
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 16
 atggagaccg ataccctcct gctatgggtc ctctctgtat gggcccagg atcaaccgga 60
 gatattcaga tgaccagtc tccatctcc ctctctgcta gegtgggga tagggtcacc 120
 ataacctga gatctagca gagcattta catagtaatg gaaacaccta ttagaatgg 180
 taccagcaga agccaggcaa agctcccaag ctctaatct ataaagttc caaccgatt 240
 tctggagtc ctccagctt cagtggcagt ggatctggga ccgatttcae cctcacaatc 300
 agctctctgc agccagatga ttctgccaact tattactgct tcaaggttc acatgctcct 360
 ctcacgttcg gtcaggggac caaggtggag ctgaaa 396

<210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

[0007]

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 17
 Trp Pro Ile Asp Leu Met Ser Glu Thr Pro Ile Leu
 1 5 10

<210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 18
 Trp Pro Ile Ala Asn His Glu Asn Ala Leu Ser Ala
 1 5 10

<210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 19
 Trp Pro Ile Ser Gly Lys His Ser Phe Trp Ser Leu
 1 5 10

<210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 20
 Trp Pro Ile Leu Asp His Ala Val Ser Arg Pro Ser
 1 5 10

<210> 21
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

[0008] <400> 21
 Trp Pro Ile Asp Ile Pro Tyr Ala Trp Asp Phe Ser
 1 5 10

<210> 22
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 22
 Trp Pro Ile Ser Pro Gln Pro Gly Ala Arg Pro Val
 1 5 10

<210> 23
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 23
 Trp Pro Ile Ala Pro Asn Arg Tyr Leu Leu Ser Ser
 1 5 10

<210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 24
 Trp Pro Ile Pro Pro Glu Val Glu Pro Phe Lys His
 1 5 10

<210> 25
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 25
 Trp Pro Ile Leu Gln Asn Ala Ala Gly Thr Gly Leu
 1 5 10

[0009]

<210> 26
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 26
 Trp Pro Ile Pro Thr Leu Met Glu Leu Pro Ser Ala
 1 5 10

<210> 27
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 27
 Trp Pro Ile Thr Asn Ser Asp Ser Arg Ile Thr Trp
 1 5 10

<210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 28

Trp	Pro	Ile	His	Ser	Ala	His	Val	Arg	Tyr	Thr	Thr
1					5						10

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 29

Ala	Glu	Thr	Asp	Tyr	Asp	Pro	Asp	His	Phe	Thr	Pro
1					5						10

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

[0010]

<400> 30

Asp	Ala	Arg	Tyr	Ser	His	Asp	Pro	Ala	Trp	Pro	Tyr
1					5						10

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 31

Ala	Gly	Gln	Lys	Trp	Asp	Pro	Glu	Trp	Pro	His	Ser
1					5						10

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 32

Tyr	Asp	His	His	Trp	Thr	Asn	Pro	Pro	Thr	Gln	Lys
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1	5	10
	<210> 33		
	<211> 12		
	<212> PRT		
[0011]	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> Synthetic Construct		
	<400> 33		
	Glu Pro Asn Met Asp Pro Asn Trp Ala Ser Pro Ser		
	1	5	10

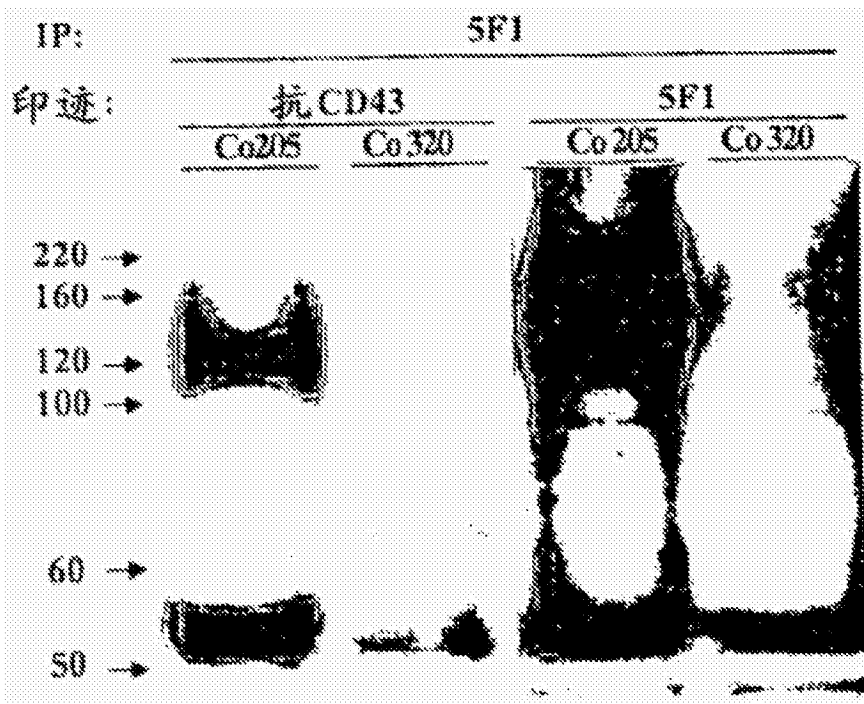


图1

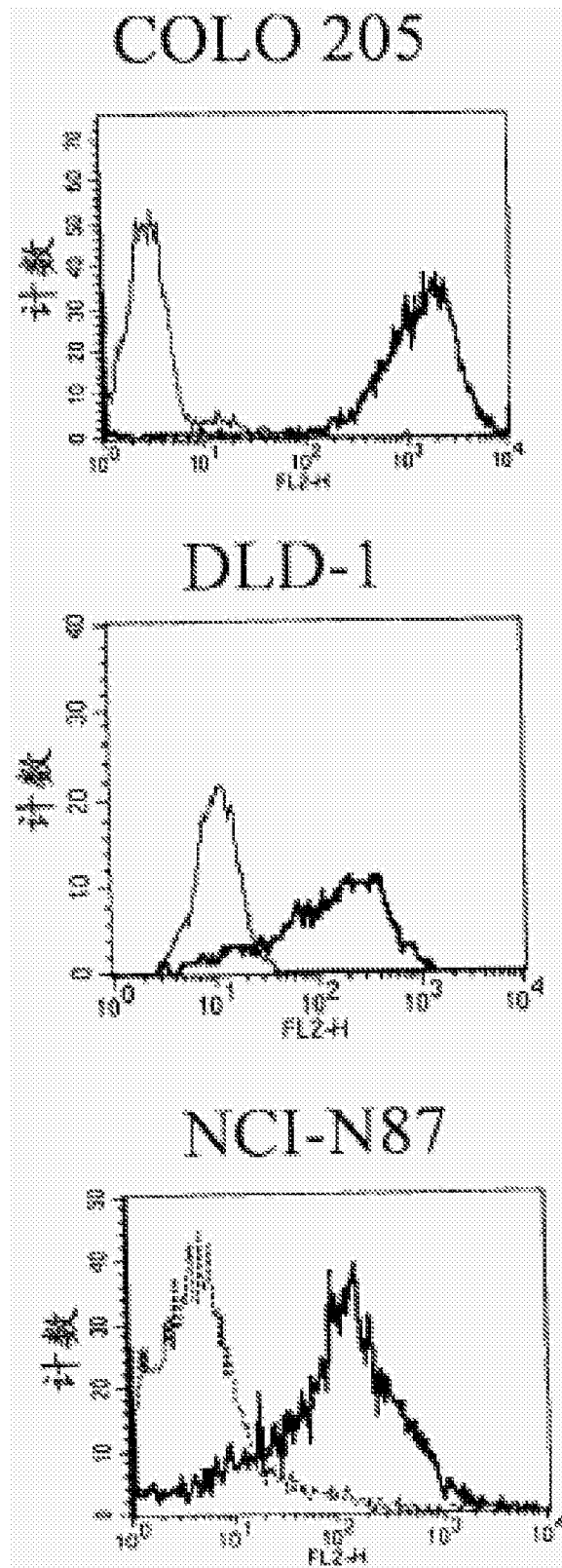


图2A

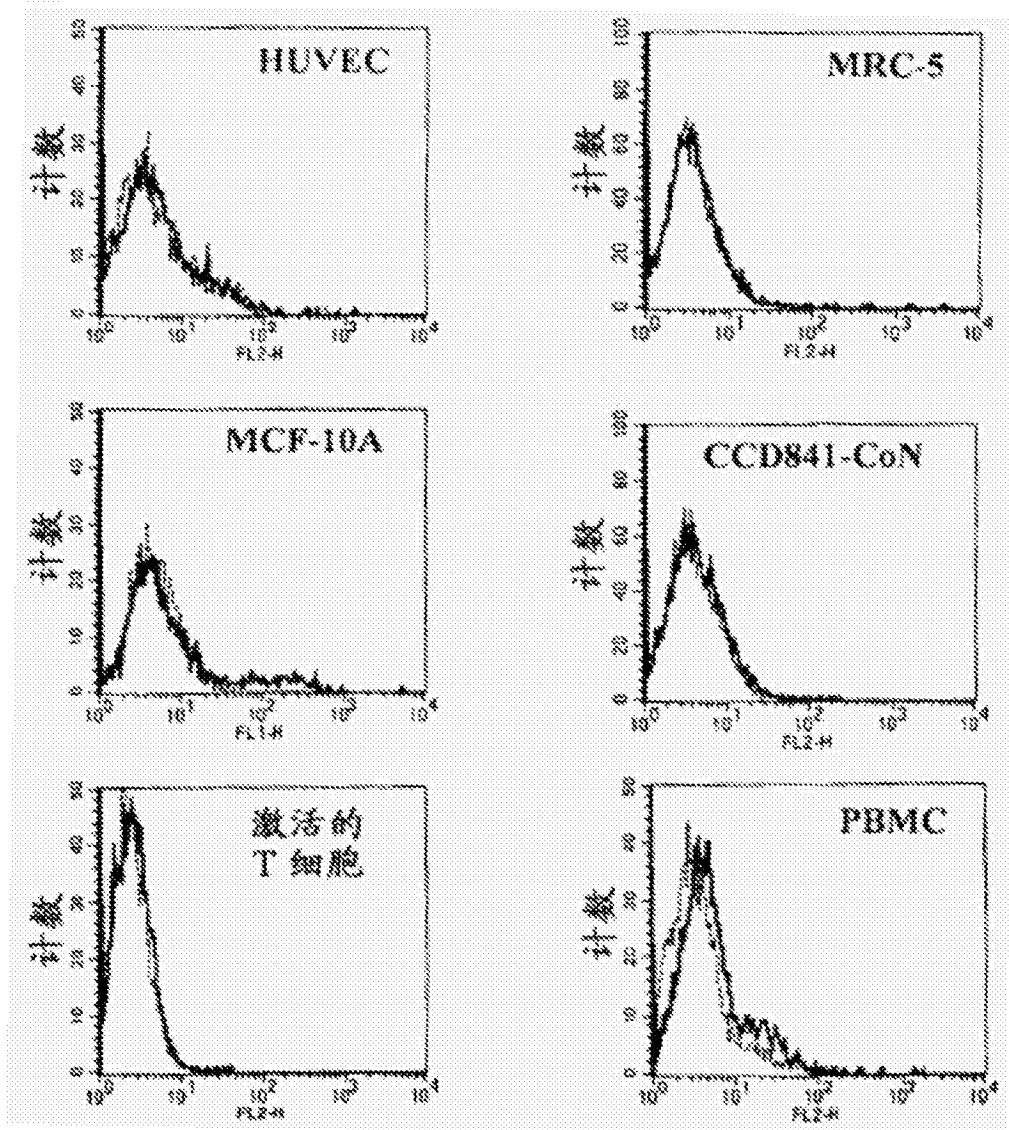


图2B

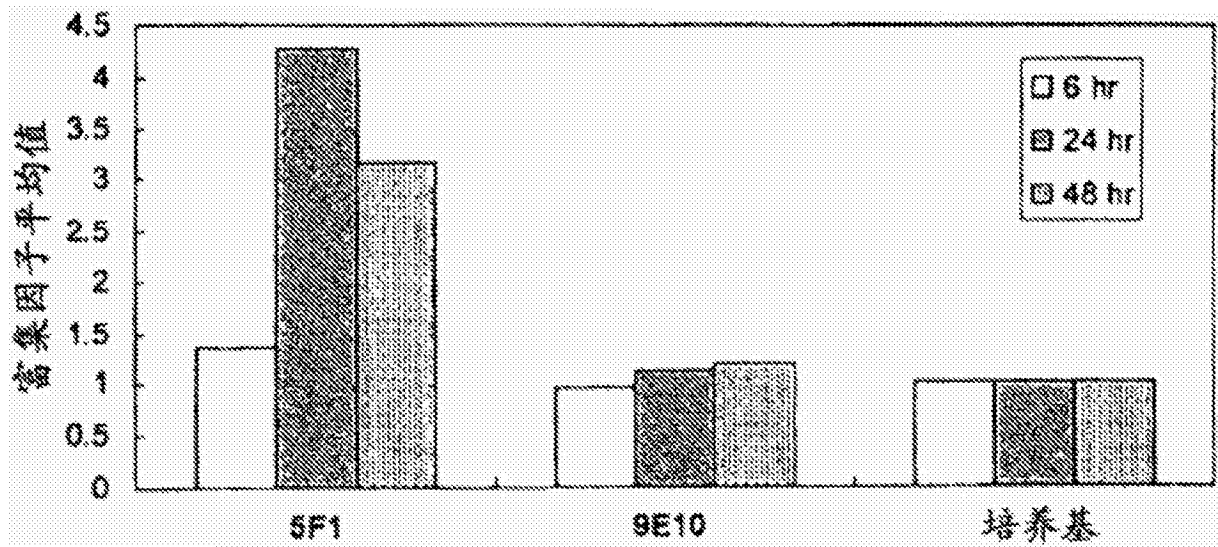


图3

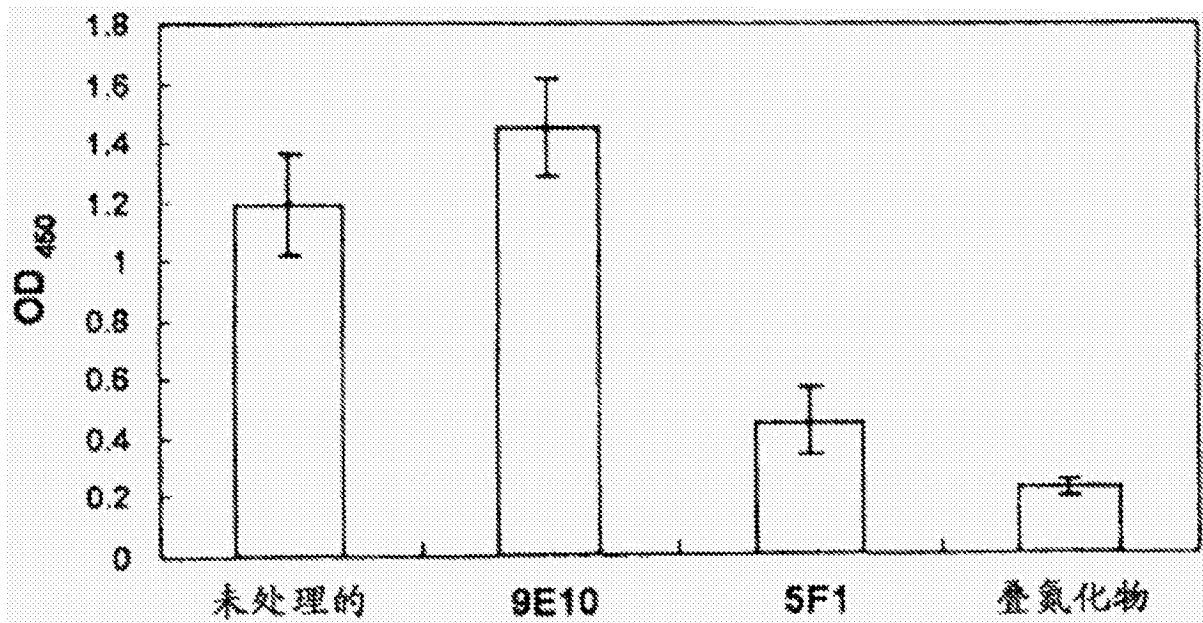


图4

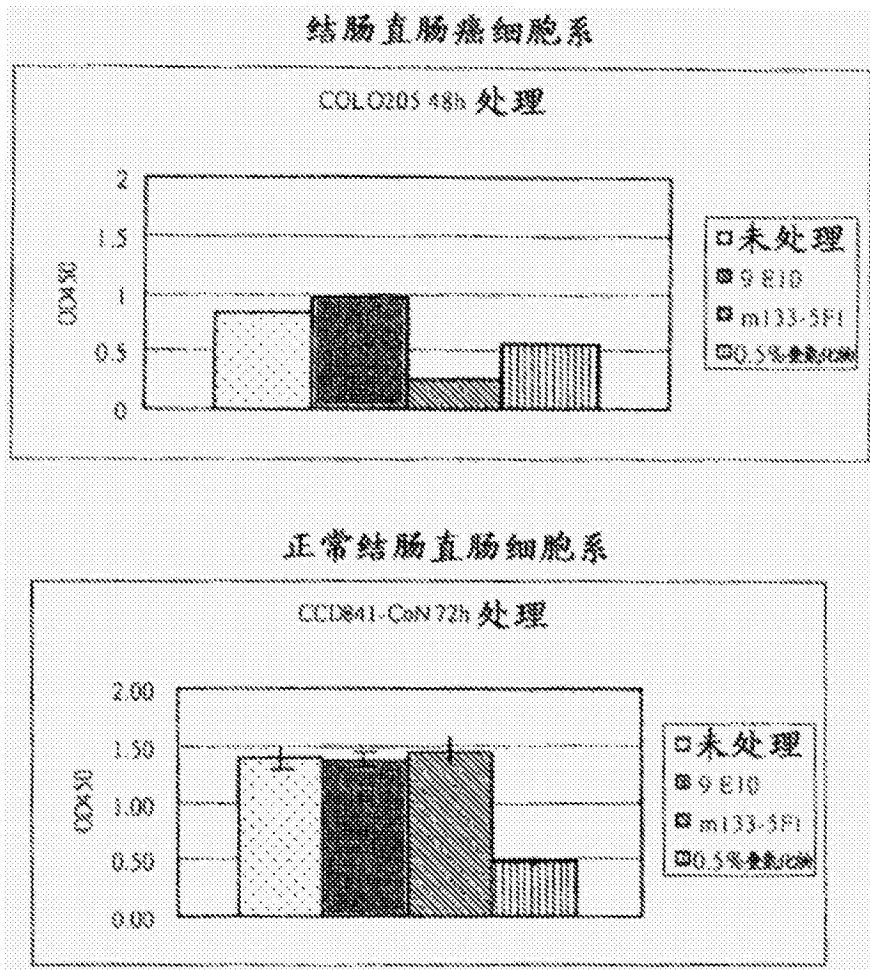


图5

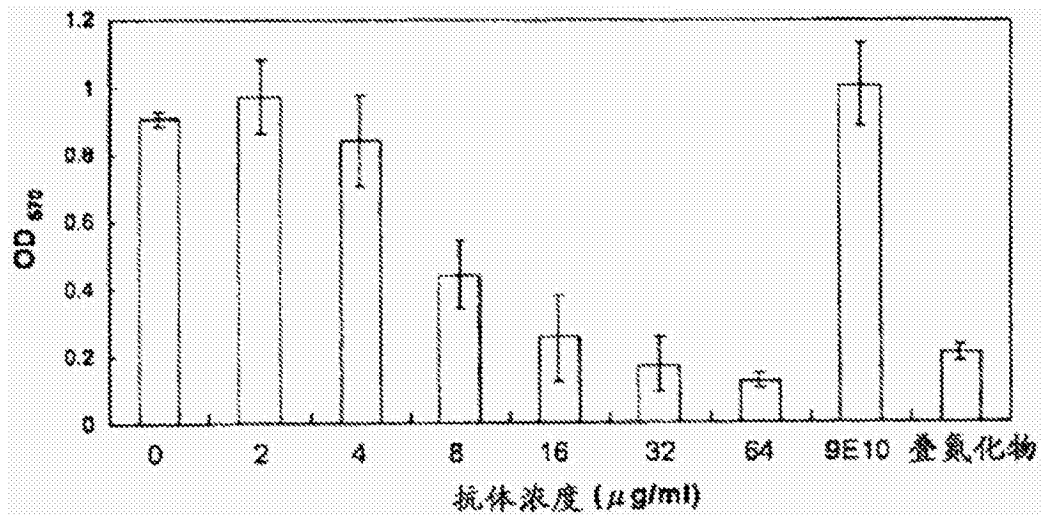


图6

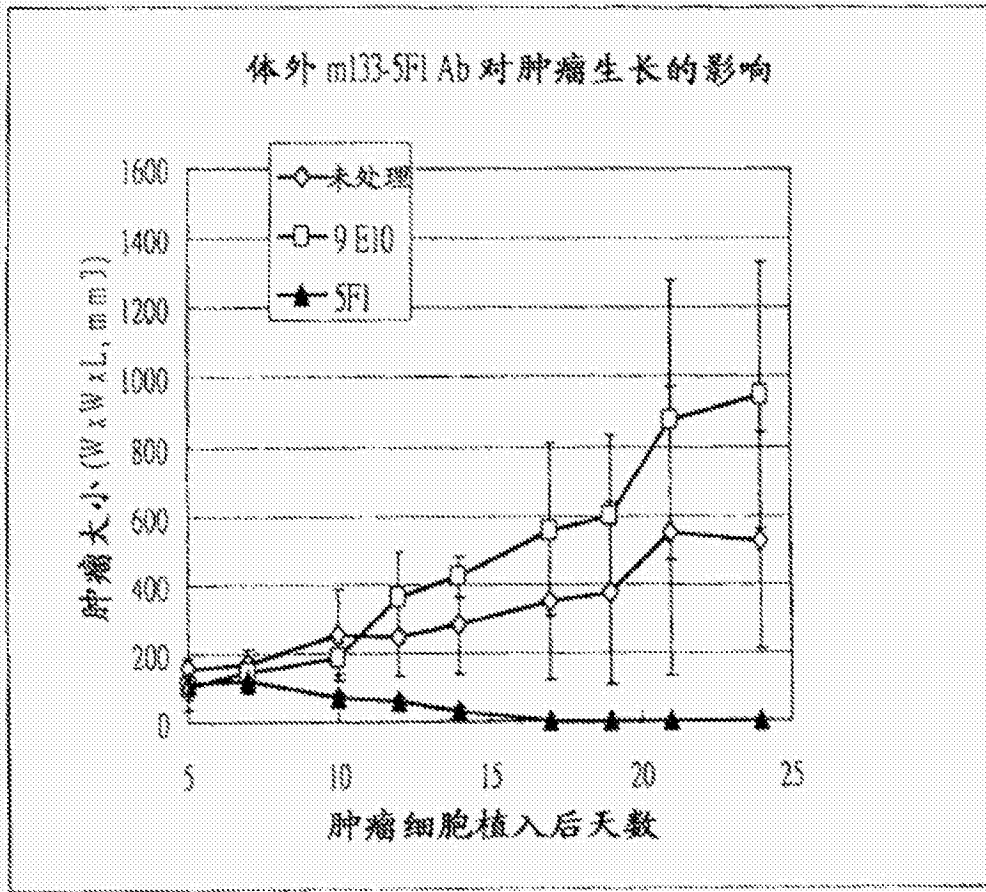


图7

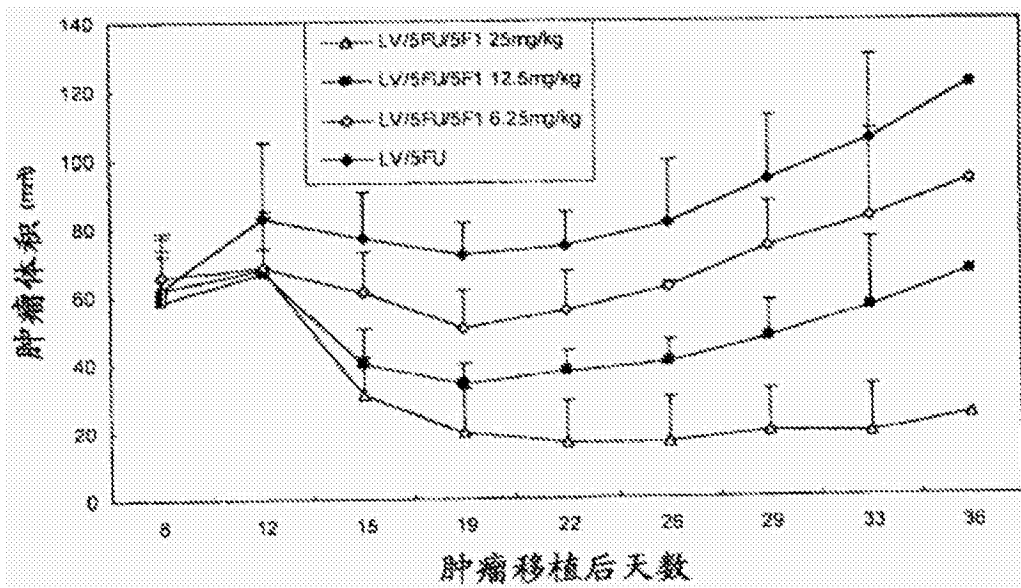


图8

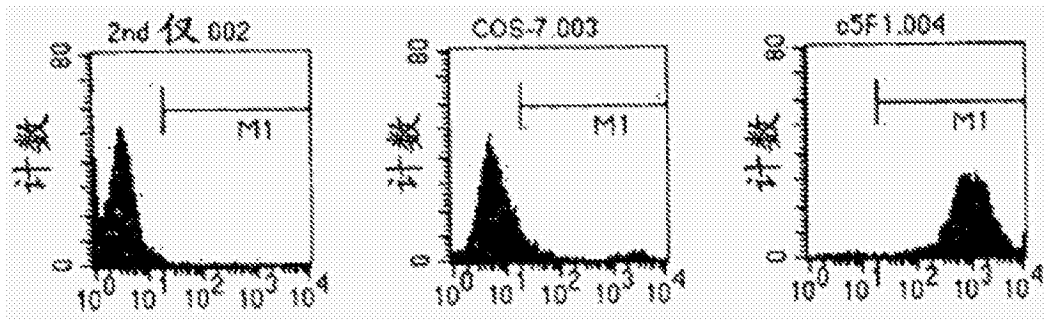


图9A

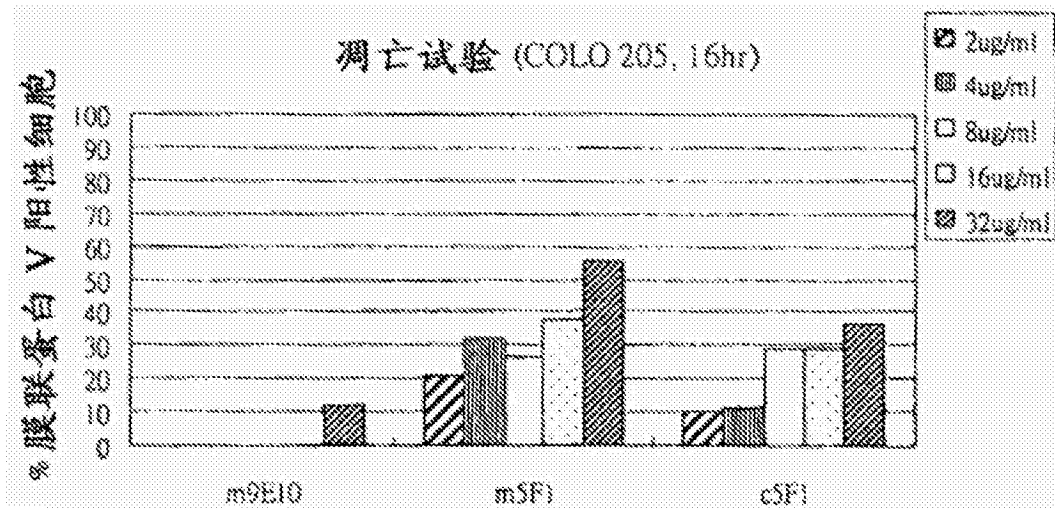


图9B

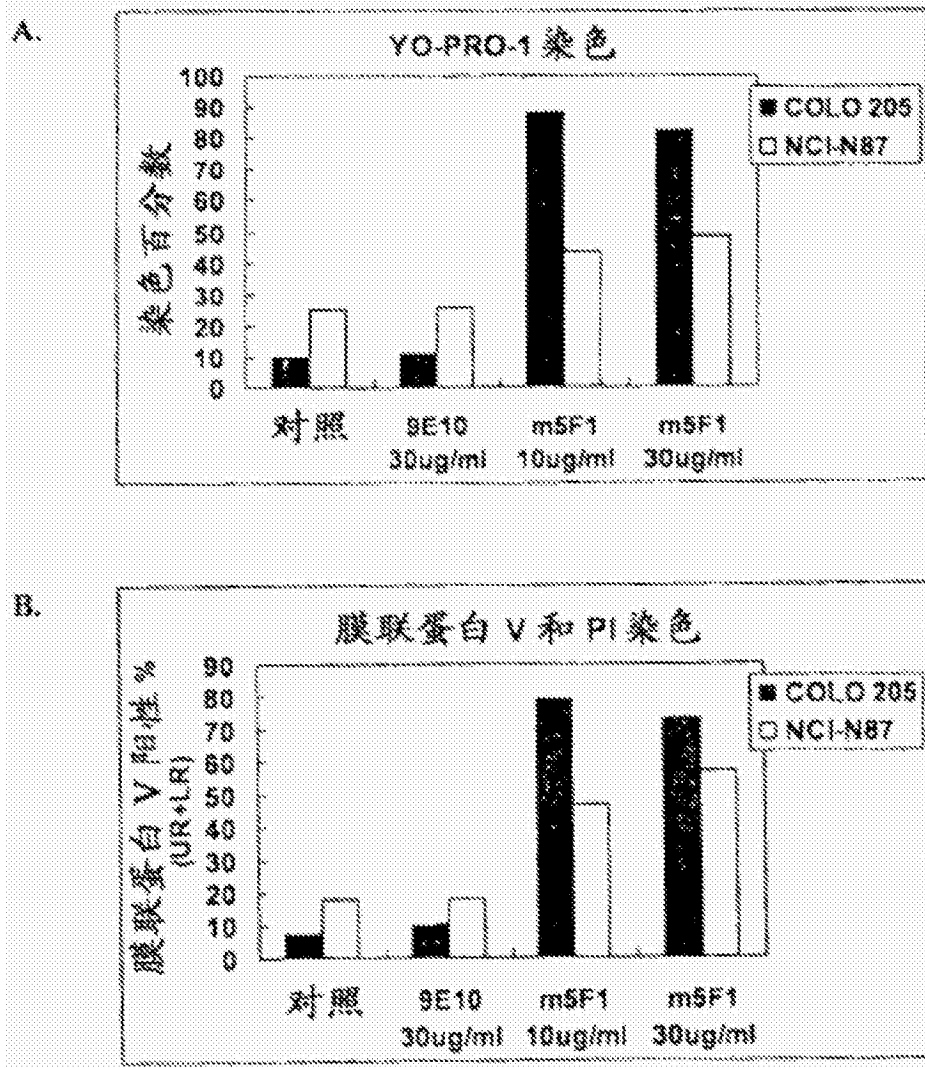


图10

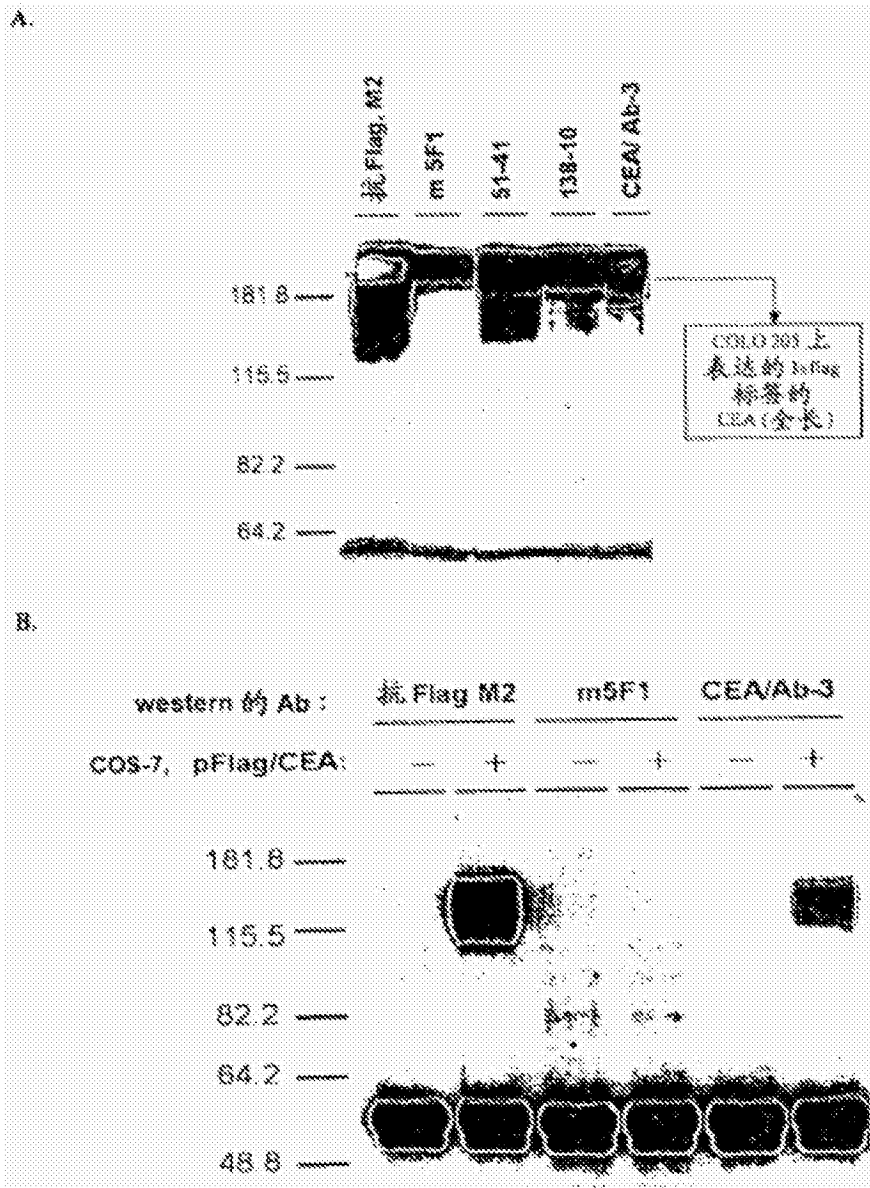


图11

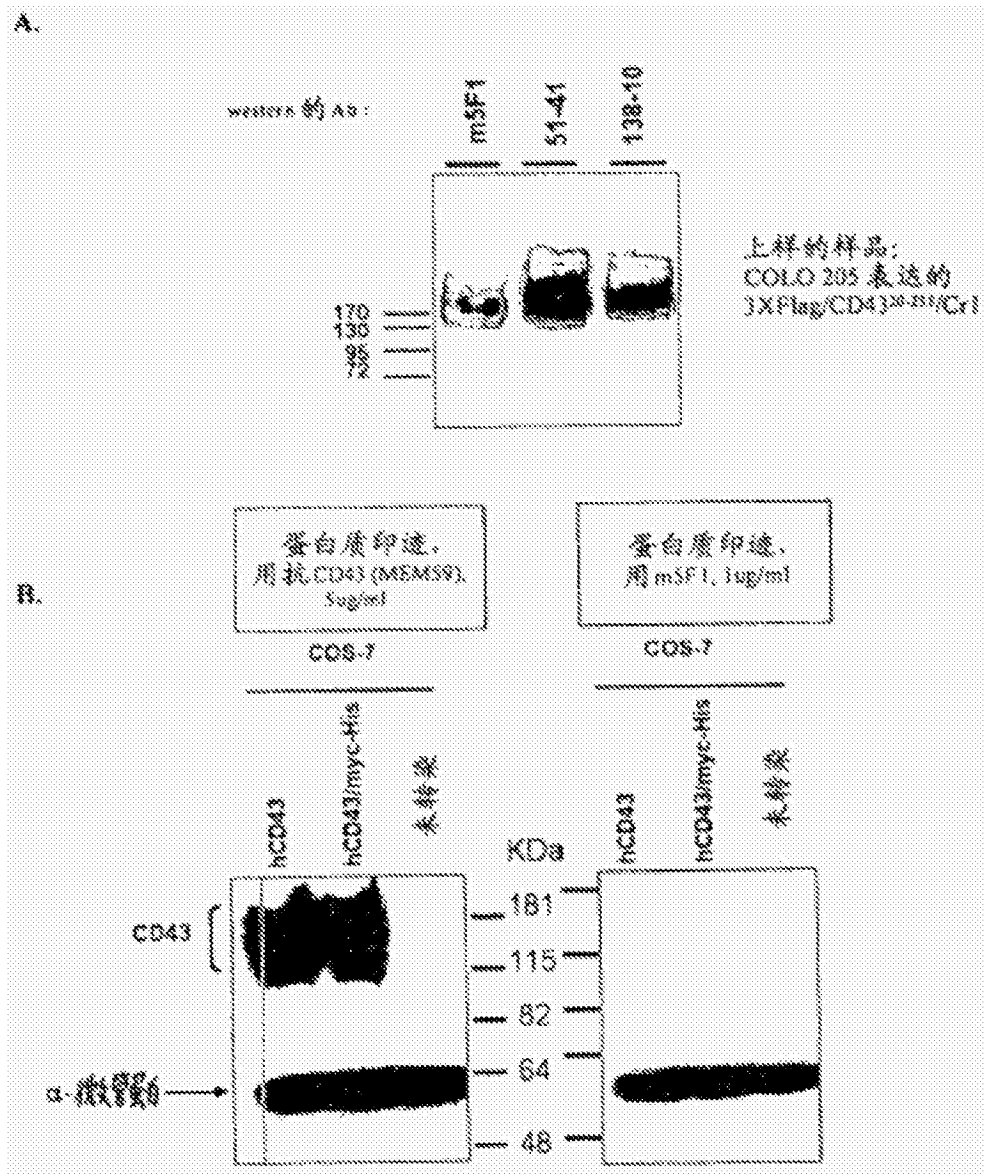


图12

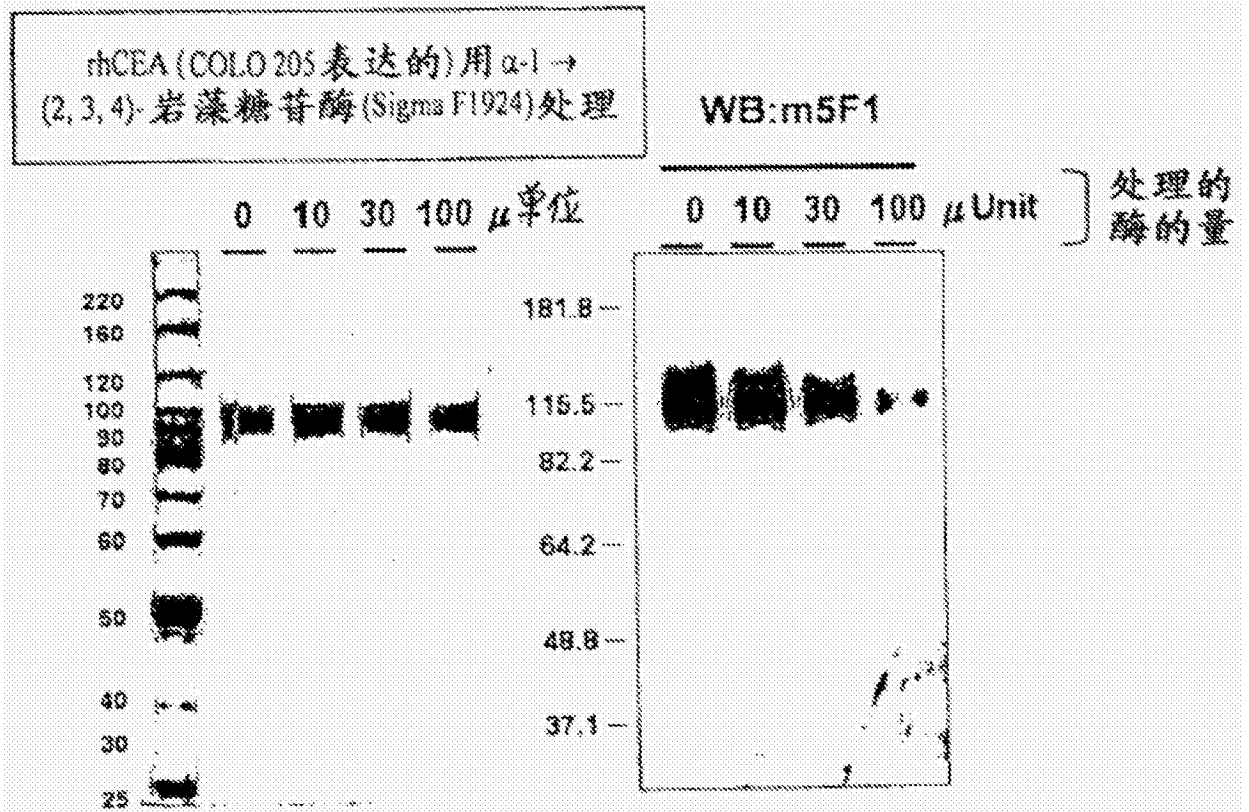


图13

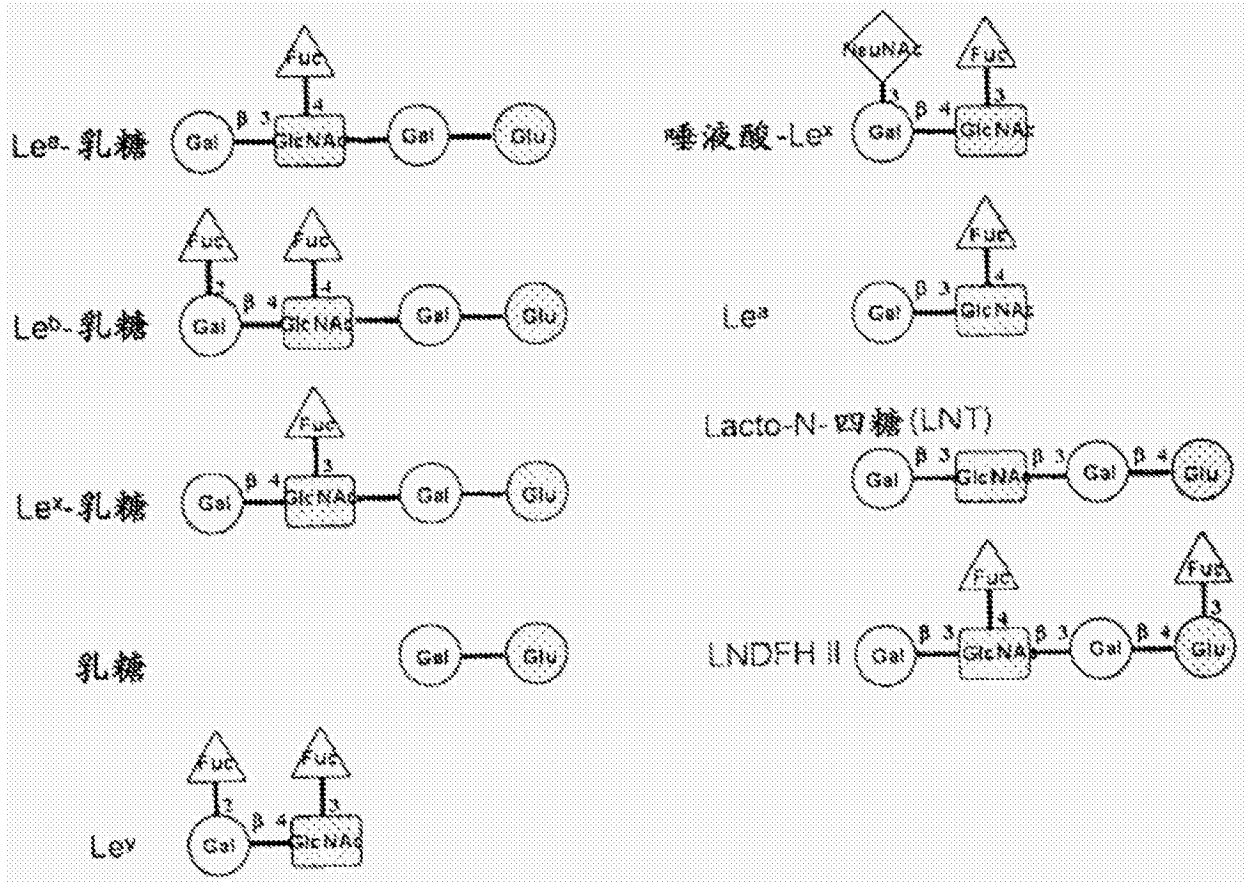


图14

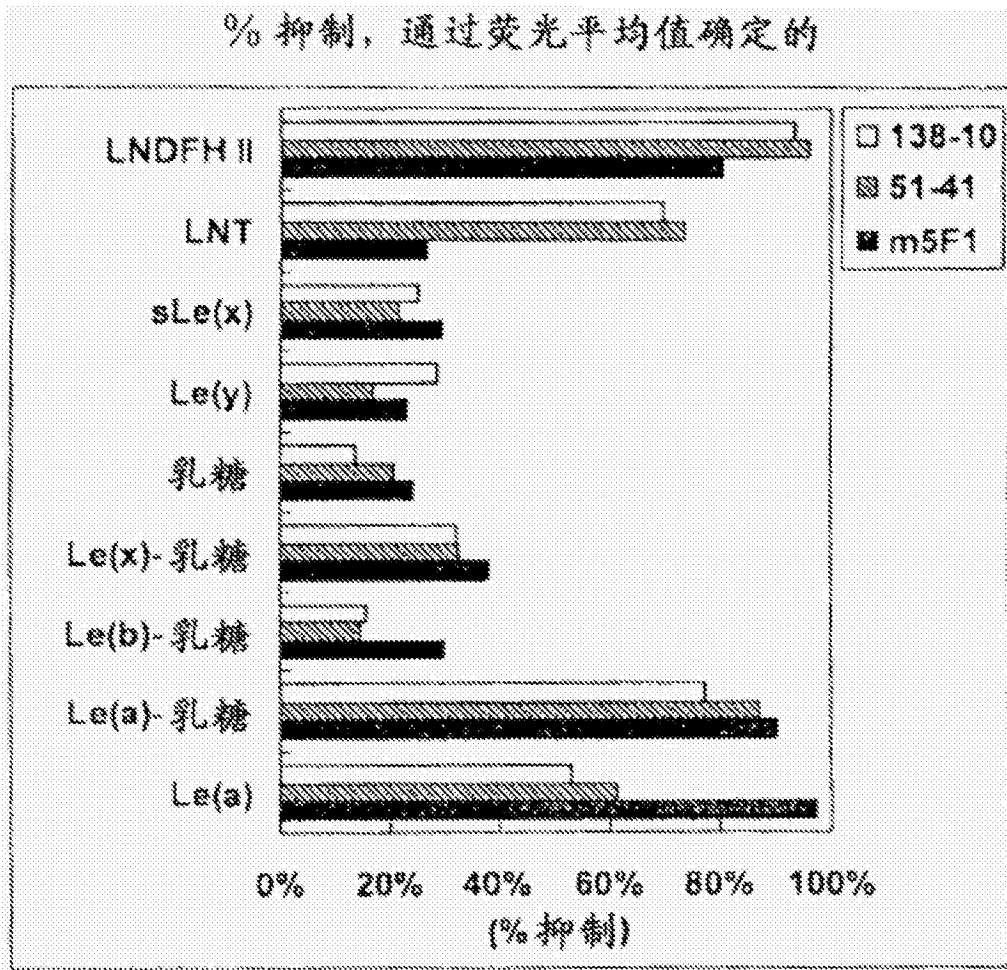


图15